

## حسگر الکتروشیمیایی مبتنی بر پلیمرهای قالب مولکولی برای تعیین داروی دیازپام

علی مطهریان<sup>۱</sup> و سید محمد رضا میلانی حسینی<sup>۲\*</sup>

۱- دانشجوی دکترای شیمی تجزیه، دانشکده شیمی، دانشگاه علم و صنعت ایران، تهران، ایران

۲- دانشیار شیمی تجزیه، دانشکده علم و صنعت ایران، تهران، ایران

دریافت: مرداد ۱۳۹۴، بازنگری: شهریور ۱۳۹۴، پذیرش: شهریور ۱۳۹۴

**چکیده:** در این پژوهش، یک حسگر الکتروشیمیایی مبتنی بر الکتروکد خمیر کربن (CP) اصلاح شده با پلیمر قالب مولکولی (MIP)، برای تعیین داروی دیازپام (DZ) تهیه شد. ذرات پلیمر قالب‌گیری شده مولکولی با روش پلیمریزاسیون رسوبی تهیه شده و سپس از آن‌ها به‌عنوان عنصر شناسایی در ساخت حسگر استفاده شد. همچنین به‌منظور مقایسه، ذرات پلیمر قالب‌گیری نشده (NIP) نیز به روش مشابه ولی در غیاب مولکول‌های دیازپام سنتز شدند. تصاویر SEM پلیمرهای تهیه شده نشان داد که ذرات MIP به‌دست‌آمده دارای ابعادی در گستره ۱۰۰ تا ۳۰۰ nm هستند. روش‌های ولتامتری چرخه‌ای (CV) و ولتامتری موج مربعی (SWV) برای بررسی رفتار الکتروشیمیایی و اندازه‌گیری‌های کمی مورد استفاده قرار گرفتند. نتیجه‌های به‌دست‌آمده نشان داد که الکتروکد MIP-CP توانایی بسیار بیشتری را برای شناسایی دیازپام، نسبت به NIP-CP دارد. اثر برخی از عوامل مؤثر بر پاسخ حسگر، از قبیل ترکیب الکتروکد، شرایط استخراج و همچنین شرایط اندازه‌گیری الکتروشیمیایی مورد بررسی قرار گرفت و سپس منحنی درجه‌بندی رسم شد. جریان پیک در گستره  $M \times 10^{-6} - 8.00 \times 10^{-8}$  با غلظت دیازپام رابطه‌ی خطی نشان داد و حد تشخیص نیز برابر  $M \times 10^{-8}$  به دست آمد. انحراف استاندارد نسبی برای پنج بار اندازه‌گیری محلول  $M \times 10^{-7}$  ۵.۰۰٪ دیازپام ۳.۴۸٪ به‌دست آمد. حسگر تهیه شده به‌طور موفقیت‌آمیزی برای تعیین دیازپام در نمونه‌ی سرم خون انسان مورد استفاده قرار گرفت.

**واژه‌های کلیدی:** پلیمر قالب‌گیری شده مولکولی، نانوذرات، حسگر الکتروشیمیایی، دیازپام، الکتروکد خمیر کربن

### مقدمه

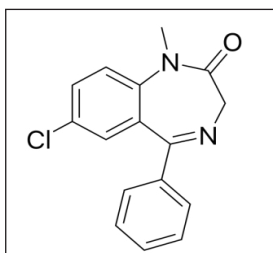
قربانیان مورد استفاده قرار می‌گیرد. تعیین بنزودیازپین‌ها به دلیل نیاز به شناسایی و اندازه‌گیری کمی آن‌ها در مطالعات بالینی و یا پزشکی قانونی، به‌صورت گسترده‌ای مورد مطالعه قرار گرفته است. تجزیه این ترکیبات، یکی از قسمت‌های مهم در بسیاری از آزمایشگاه‌های تجزیه دارویی است. دیازپام (DZ)، ۷-کلرو-۱-و ۳-دی‌هیدرو-۱-متیل-۵-فیل-۲H-۱-و ۴-بنزودیازپین-۲-یک، یکی از شایع‌ترین داروهای مورد استفاده، از خانواده بنزودیازپین‌ها به‌حساب می‌آید که به‌عنوان خواب‌آور، آرام‌بخش، ضد تشنج و شل‌کننده عضلانی کاربرد دارد [۱].

بنزودیازپین‌ها به دلیل اثراتی همچون ضد تشنج، بی‌هوش‌کنندگی، ضدافسردگی، خواب‌آور بودن و خواص آرام‌بخشی، به گروهی از پرمصرف‌ترین داروها تبدیل شده‌اند. آن‌ها همچنین به‌عنوان پیش‌دارو برای القاء و یا به‌طور کلی در کاربردهای بیهوشی، به‌طور گسترده‌ای در سراسر جهان تجویز می‌شوند. با این حال، موارد زیادی از مسمومیت‌های دارویی و یا یکی از عوامل مهم در تصادفات رانندگی، ناشی از مصرف بنزودیازپین‌ها بوده است. همچنین این داروها توسط مجرمان برای ناتوان کردن

روش‌های تجزیه‌ای متفاوتی از قبیل اسپکتروفتومتری [۲ تا ۵]، کروماتوگرافی [۶ تا ۱۰]، میکرو استخراج مایع پخشی [۱۱]، الکتروفورز موئنه‌ای [۱۲]، ایمونواسی رادیویی [۱۳] و روش الکتروشیمیایی [۱۴ تا ۲۱] برای تعیین دیازپام در نمونه‌های زیستی و هم‌چنین فرمولاسیون دارویی گزارش شده است. در این میان، روش‌های الکتروشیمیایی به‌عنوان سامانه‌هایی سریع، ساده، ارزان قیمت و با گزینش‌پذیری بالا و نتیجه‌های تکرارپذیر، جایگاه خاصی را به خود اختصاص داده‌اند. گستره وسیعی از حسگرهای الکتروشیمیایی سازگار با محیط‌زیست که این نیازها را برآورده می‌سازند به‌صورت تجاری در دسترس هستند.

در دهه‌های گذشته، الکترودهای اصلاح‌شده‌ی شیمیایی به دلیل کارایی و گزینش‌پذیری مناسب خود که از طریق تغییر گونه اصلاح‌کننده به دست می‌آید، به‌صورت گسترده‌ای برای تعیین کمی انواع گونه‌های آلی و معدنی (از طریق پیش تغلیظ گونه در سطح الکترودها) به‌کاررفته‌اند. معرف اصلاح‌کننده می‌تواند در سطح الکترودهای جامد و یا در ترکیب اصلی در حین ساخت الکترودها قرار گیرد [۲۲]. در میان انواع الکترودهای اصلاح‌شده، که اصلاحات نه‌تنها در سطح بلکه در ترکیب آن‌ها نیز در حین آماده‌سازی امکان‌پذیر است، الکترودهای خمیر کربن (CPE) از رایج‌ترین انتخاب‌ها هستند. البته تثبیت اصلاح‌کننده در توده‌ی الکترودها، امکان تجدید سطح ساده و تکرارپذیر آن را فراهم می‌کند و این می‌تواند مهم‌ترین مزیت الکترودهای اصلاح‌شده‌ی خمیر کربن باشد [۲۳].

از اصلاح‌گرهایی که در ترکیب خمیر کربن به‌کار رفته‌اند می‌توان به الکتروکاتالیست، آنزیم‌ها و پلیمرهای قالب‌گیری شده‌ی مولکولی اشاره کرد. هم‌چنین اصلاح سطح این الکترودها به‌طور گسترده‌ای به‌وسیله‌ی لایه‌های نازک فلزات، عناصر شناسایی زیستی و یا غشاهای محافظتی انجام شده است [۲۴].



شکل ۱- ساختار شیمیایی مولکول دیازپام

## بخش تجربی

### دستگاه‌ها

تمامی اندازه‌گیری‌های الکتروشیمیایی با استفاده از دستگاه Meterohm Trace analyzer مدل VA 746 و در یک سامانه سه الکترودی شامل الکتروده مرجع Ag/AgCl، الکتروده کمکی میله پلاتین و الکتروده خمیر کربن با قطر داخلی ۲٫۵ میلی‌متر به‌عنوان الکتروده کار انجام شد. برای تنظیم pH از دستگاه pH متر CORNING 140 استفاده شد. ریخت‌شناسی MIP سنتز

در دهه‌های گذشته، الکترودهای اصلاح‌شده‌ی شیمیایی به دلیل کارایی و گزینش‌پذیری مناسب خود که از طریق تغییر گونه اصلاح‌کننده به دست می‌آید، به‌صورت گسترده‌ای برای تعیین کمی انواع گونه‌های آلی و معدنی (از طریق پیش تغلیظ گونه در سطح الکترودها) به‌کاررفته‌اند. معرف اصلاح‌کننده می‌تواند در سطح الکترودهای جامد و یا در ترکیب اصلی در حین ساخت الکترودها قرار گیرد [۲۲]. در میان انواع الکترودهای اصلاح‌شده، که اصلاحات نه‌تنها در سطح بلکه در ترکیب آن‌ها نیز در حین آماده‌سازی امکان‌پذیر است، الکترودهای خمیر کربن (CPE) از رایج‌ترین انتخاب‌ها هستند. البته تثبیت اصلاح‌کننده در توده‌ی الکترودها، امکان تجدید سطح ساده و تکرارپذیر آن را فراهم می‌کند و این می‌تواند مهم‌ترین مزیت الکترودهای اصلاح‌شده‌ی خمیر کربن باشد [۲۳].

از اصلاح‌گرهایی که در ترکیب خمیر کربن به‌کار رفته‌اند می‌توان به الکتروکاتالیست، آنزیم‌ها و پلیمرهای قالب‌گیری شده‌ی مولکولی اشاره کرد. هم‌چنین اصلاح سطح این الکترودها به‌طور گسترده‌ای به‌وسیله‌ی لایه‌های نازک فلزات، عناصر شناسایی زیستی و یا غشاهای محافظتی انجام شده است [۲۴].

پلیمرهای قالب مولکولی مواد قابل اطمینانی هستند که در سال‌های اخیر به‌طور پیوسته در اصلاح الکترودها، برای تهیه انواع حسگرهای الکتروشیمیایی، به‌عنوان عناصر تشخیص یا عوامل اصلاح‌کننده (به‌جای اصلاح‌کننده‌های معمول دیگر) مورد استفاده قرار گرفته‌اند. MIP یک پلیمر سنتزی است که دارای خواص

به دست آمده با استفاده از مخلوط حلال‌های متانول - اسیداستیک (با نسبت ۹ به ۱) و با روش سوکسله شست‌وشو داده شد.

#### تهیه‌ی الکتروکدکس کربن اصلاح نشده (CP)

برای تهیه‌ی الکتروکدکس کربن، در یک شیشه‌ی ساعت، ۰٫۰۷۵ گرم پودر گرافیت با ۰٫۰۲۵ گرم پارافین به‌خوبی مخلوط و سپس خمیر تهیه شده در الکتروکدکس متراکم شد. در پایان، انتهای الکتروکدکس را بر روی کاغذ مخصوص صیقل داده تا سطح صاف و تکرارپذیری ایجاد شود.

#### تهیه‌ی الکتروکدکس کربن اصلاح شده

به منظور ساخت حسگر، در یک هاون شیشه‌ای ۰٫۰۱۵ g پودر MIP و ۰٫۰۶۰ g پودر گرافیت را با یکدیگر مخلوط و سپس این مخلوط، به ۰٫۰۲۵ g پارافین افزوده شد. خمیر تهیه شده به الکتروکدکس منتقل و پس از متراکم کردن، سطح آن بر روی یک کاغذ مناسب، صیقل داده شد.

به منظور اثبات وجود قالب مولکولی در ساختار پلیمر و حساسیت حسگر نسبت به مولکول هدف، الکتروکدکس دیگری با استفاده از پلیمر قالب‌گیری نشده (NIP-CP) و به روش مشابه تهیه شد.

#### فرایند الکتروشیمیایی برای تعیین دیازپام با استفاده از الکتروکدکس اصلاح شده با MIP

برای این منظور الکتروکدکس اصلاح شده به مدت ۱۵ دقیقه در محلول دیازپام (تهیه شده با بافر BR با pH برابر با ۳٫۸) قرار گرفته و پس از شست‌وشو، در سل الکتروشیمیایی محتوی بافر BR با pH برابر با ۱٫۶ (به عنوان الکتروکدکس حامل) قرار گرفته و سیگنال کاهش دیازپام با روش SWV نسبت به الکتروکدکس مرجع Ag/AgCl ثبت شد ارتفاع سیگنال کاهش دیازپام، برای رسم منحنی درجه‌بندی استفاده شد.

#### اندازه‌گیری دیازپام در نمونه‌ی حقیقی سرم خون

به منظور بررسی توانایی حسگر پیشنهادی برای اندازه‌گیری

شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی Hitachi مدل S-4160 بررسی شد.

#### معرف‌ها و مواد

داروی دیازپام از شرکت سبحان دارو و ۲-۲-آزوبیس ایزو بوتیرو نیتریل (AIBN) از شرکت سیگما-آلدریج تهیه شدند. متا آکریلیک اسید (MAA)، اتیلن گلیکول دی متا آکریلات (EGDMA)، پودر گرافیت و هم‌چنین سایر معرف‌ها، حلال‌ها و ترکیبات مورد استفاده در این پژوهش از شرکت مرک خریداری شدند. محلول استوک  $5.0 \times 10^{-3}$  M DZ با انحلال مقدار مناسب دیازپام در حلال اتانول تهیه شد. بافر بریتون-راینسون (BR) از مخلوط کردن سه اسید شامل استیک اسید، فسفریک اسید و بوریک اسید (که نسبت به هریک از آن‌ها ۰٫۰۴ مولار باشد) تهیه و سپس با استفاده از سود، pH آن تنظیم شد.

#### روش‌ها

#### تهیه پلیمر قالب مولکولی

پلیمر قالب‌گیری شده‌ی مولکولی با استفاده از دیازپام، به عنوان مولکول هدف و بر اساس دستور کار ذکر شده در مرجع ۲۷ تهیه شد. برای این منظور، در یک ظرف شیشه‌ای ۰٫۲۵ mmol دیازپام را در ۲۰ ml کلروفرم حل کرد و سپس، ۱ mmol از MAA به آن افزوده و به مدت ۴۵ دقیقه با همزن برقی با هم مخلوط شدند تا کمپلکس مونومر-مولکول هدف تشکیل شود. سپس ۵ mmol از EGDMA و ۱٫۹ mmol آغازگر (AIBN) به این مخلوط افزوده شد. برای حذف اکسیژن، گاز  $N_2$  به مدت ۱۰ دقیقه از محلول عبور داده شد. سپس درب ظرف به‌خوبی بسته و در حمام روغن با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده و به مدت ۱۲ ساعت در این دما نگه‌داشته شد. پس از پایان پلیمریزاسیون، ظرف را در دمای اتاق قرار داده و درب آن را باز کرده تا حلال اضافی از ظرف تبخیر شود. قابل ذکر است که پلیمر قالب‌گیری نشده (NIP) نیز با روش مشابه تهیه شد. با این تفاوت که در این‌جا از مولکول هدف استفاده نشده است. به منظور استخراج مولکول هدف از شبکه MIP، پلیمر

گرفت. همان طور که در شکل ۲ مشاهده می شود MIP تهیه شده دارای ابعادی در گستره ۱۰۰ تا ۳۰۰ نانومتر است.

بررسی پاسخ حسگر تهیه شده نسبت به دیازپام برای این منظور نخست رفتار الکتروشیمیایی محلول  $5.0 \times 10^{-5}$  M دیازپام (pH برابر با ۴٫۶) به وسیله الکتروکد خیمیر کربن اصلاح نشده، با استفاده از روش ولتامتری چرخه‌ای در گستره‌ی پتانسیل ۶۰۰- تا ۱۲۰۰- میلی‌ولت و با سرعت رویش پتانسیل ۱۰۰ mV/s بررسی شد. ولتاموگرام به دست آمده (شکل ۳ قسمت الف) نشان داد که DZ دارای یک پیک کاهش برگشت‌ناپذیر در پتانسیل ۰٫۸۹- ولت نسبت به الکتروکد مرجع نقره - کلرید نقره است که مربوط به کاهش گروه ۴ و ۵ آزومتین در مولکول دیازپام در یک فرایند  $H^{2+}$ ،  $e^{-2}$  است [۱۷ تا ۲۰]. بنابراین، در ادامه از این سیگنال برای سایر اندازه‌گیری‌ها استفاده شد. همچنین با توجه به حساسیت بالای روش ولتامتری موج

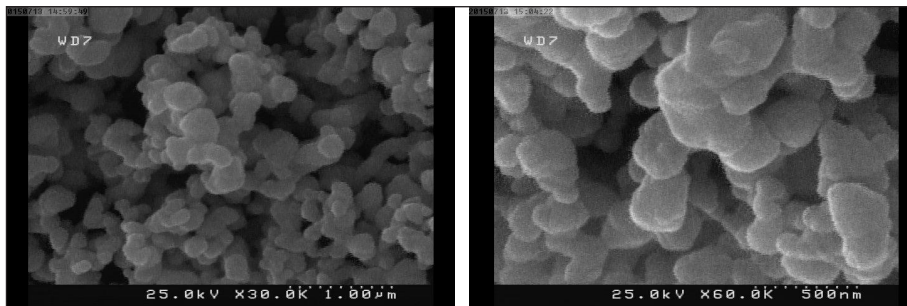
دیازپام در بستر پیچیده، از آن برای تعیین DZ در سرم خون انسان استفاده شد.

برای این منظور در ۴ لوله کوچک (با حجم ۲ ml)، ۰٫۶ ml نمونه‌ی سرم خون، ۰٫۴ ml محلول دیازپام (با غلظت‌های مختلف) و ۰٫۵ ml استونیتریل ریخته شد. سپس برای ته‌نشین سازی پروتئین‌های رسوب کرده، از دستگاه سانتریفیوژ با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه، به مدت ۱۵ دقیقه استفاده شد. پس از پایان سانتریفیوژ، ۰٫۴ ml از محلول شفاف فوقانی برداشته و به ۴ بالن حجمی ۲۵ میلی‌لیتری منتقل شده و با بافر BR در pH برابر با ۳٫۸ به حجم رسید. ه و مراحل استخراج و آنالیز برای این محلول‌ها، با شرایط بهینه انجام شد.

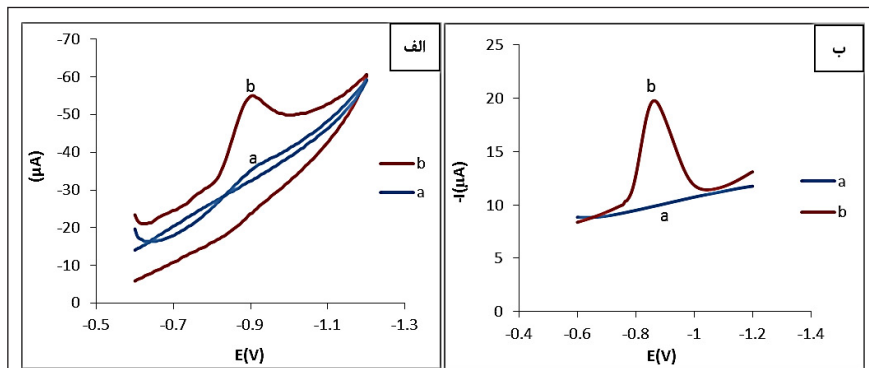
## نتیجه‌ها و بحث

### مشخصه‌یابی

ریخت‌شناسی پلیمرهای قالب مولکولی تهیه شده با استفاده از تصویرهای میکروسکوپ الکترونی روبشی مورد بررسی قرار



شکل ۲ تصویرهای FE-SEM پلیمر قالب مولکولی تهیه شده



شکل ۳- (الف) ولتاموگرام چرخه‌ای محلول  $5.0 \times 10^{-5}$  M دیازپام با استفاده از الکتروکد خیمیر کربن، در بافر BR با غلظت  $0.04$  M در pH برابر با ۴٫۶ و با سرعت رویش پتانسیل  $100$  mV/s (a) محلول بلانک و (b) محلول نمونه (ب) ولتاموگرام موج مربعی محلول  $5.0 \times 10^{-5}$  M دیازپام (شرایط:  $\Delta E = 20$  mV,  $\nu. step = 6$  mV,  $\Delta t. step = 0.3$  s, Frequency = ۵۰ Hz) اسکن در جهت کاتدی

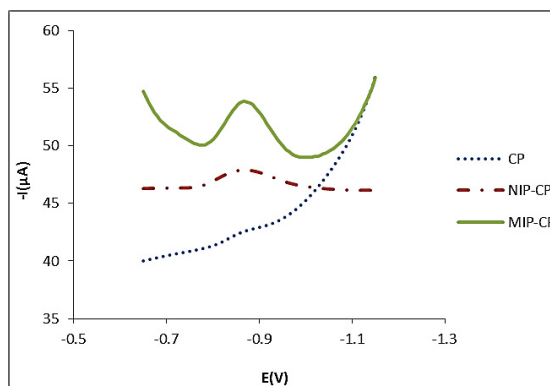
به وسیله‌ی الکتروکد خمیر کربن تنها (CP) سیگنال قابل توجهی مشاهده نمی‌شود. این نتیجه‌ها حاکی از آن است که پلیمر قالب مولکولی به کاررفته در الکتروکد خمیر کربن، به شدت دیازپام را از محلول آبی جذب می‌کند، درحالی‌که الکتروکدهای CP و NIP-CP این قابلیت را نداشته و یا کمتر دارند. در نتیجه می‌توان به وجود مکان‌های فعال تشخیص DZ در شبکه‌ی پلیمر قالب‌گیری شده پی برد. در واقع در مرحله سنتز پلیمر قالب مولکولی، حفره‌هایی در MIP ایجاد می‌شود که از نظر اندازه، شکل و جهت‌گیری گروه‌های عاملی مکمل مولکول دیازپام هستند و وجود همین مکان‌های شناسایی مولکولی منجر به تمایل زیاد MIP نسبت به دیازپام در مقایسه با پلیمر قالب‌گیری نشده (NIP) است. از طرفی گروه‌های عاملی که در ساختار مونومرهای MAA و اتصال‌دهنده‌های عرضی EGDMA و در نتیجه پلیمرهای به دست آمده وجود دارند منجر به وجود خاصیت جذب سطحی در پلیمر می‌شوند که همین امر موجب جذب شدن مقداری دیازپام در الکتروکد NIP-CP مقایسه با الکتروکد اصلاح نشده CP شده است.

پس از اطمینان از تشکیل مکان‌های شناسایی در MIP و پاسخ حسگر تهیه شده به دیازپام، عامل‌های مؤثر بر اندازه‌گیری کمی DZ، بهینه شدند.

#### بهینه‌سازی عامل‌های مؤثر بر اندازه‌گیری کمی DZ

بهینه‌سازی ترکیب الکتروکد خمیر کربن اصلاح شده با MIP به منظور یافتن بهترین ترکیب برای الکتروکد خمیر کربن اصلاح شده با MIP، الکتروکدهایی تهیه شد که در آن‌ها مقدار پارافین ثابت (۲۵٪ مقدار کل ترکیب خمیر) و مقدارهای MIP و گرافیت نسبت به هم متغیر بود. سپس برای هر یک از الکتروکدها، مراحل استخراج (از محلول DZ M  $5.0 \times 10^{-6}$  با pH برابر با ۳) و آنالیز (با روش SWV) انجام گرفت. نمودار جریان الکتروکد در مقابل نسبت وزنی کربن/MIP در شکل ۵ رسم شده است. نمودار به دست آمده نشان می‌دهد که بیشترین جریان در نسبت گرافیت/MIP برابر ۰٫۳۴ (یعنی الکتروکد شامل ۱۹٪ MIP و ۵۶٪ گرافیت) است. بنابراین، این نسبت به عنوان مقدار بهینه در تهیه حسگر انتخاب شد.

مربعی (SWV)، این روش برای اندازه‌گیری‌های کمی انتخاب شد. پس از بررسی رفتار الکتروشیمیایی دیازپام و اطمینان از الکتروفعال بودن آن در سطح الکتروکد خمیر کربن، الکتروکدهای خمیر کربن اصلاح شده با میکروذرات (MIP-CP) و MIP میکروذرات (NIP-CP) مطابق دستور کار ذکر شده در بخش قبلی تهیه شد و از آن‌ها برای تعیین DZ استفاده شد. برای این منظور، استخراج از محلول DZ M  $5.0 \times 10^{-6}$  به مدت ۱۰ دقیقه با استفاده از حسگرهای تهیه شده، صورت گرفته و الکتروکدها پس از شست‌وشو به درون یک سل الکتروشیمیایی محتوی بافر BR با غلظت ۰٫۰۴ M و pH برابر با ۴٫۶ منتقل شد و سپس سیگنال SWV دیازپام در گستره‌ی پتانسیل ۶۰- تا ۱۲۰۰ میلی ولت ثبت شد (شکل ۴).

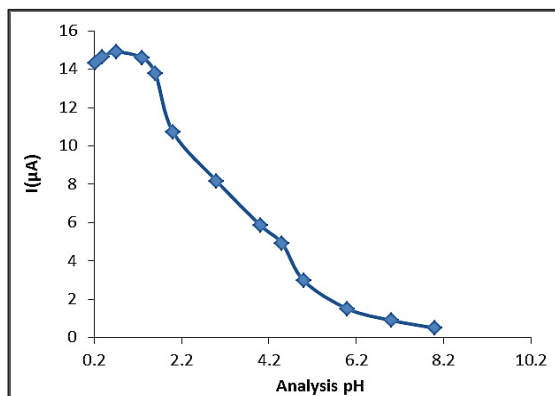


شکل ۴- مقایسه‌ی پاسخ SWV الکتروکدهای CP، NIP-CP، و MIP-CP پس از استخراج از محلول  $5.0 \times 10^{-6}$  M دیازپام (pH=۳). (شرایط: Frequency = ۵۰ Hz, t. step = ۰٫۳ s,  $\Delta E = 20$  mv, v. step = ۶ mv)

همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، الکتروکد تغلیظ شده در محلول دیازپام نیز پیک کاهش گروه ۴ و ۵ آزومتین در مولکول دیازپام را که پیش از این به وسیله‌ی الکتروکد خمیر کربن (CP) و به طور مستقیم در محلول DZ به دست آمده بود، نشان می‌دهد که این امر حاکی از قرار گرفتن دیازپام در سطح الکتروکد اصلاح شده است. افزون بر آن، ولتاموگرام‌های به دست آمده نشان می‌دهد که سیگنال ولتامتری الکتروکد MIP-CP نسبت به سیگنال مربوط به الکتروکد NIP-CP بیشتر است. هم‌چنین برای استخراج DZ

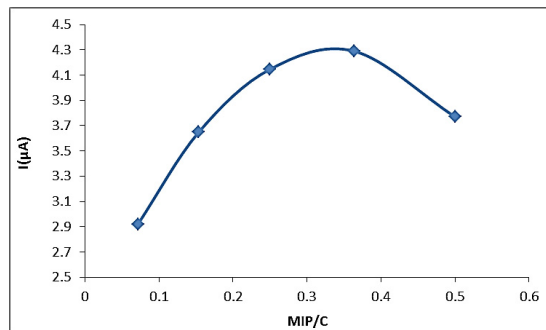
### بهینه‌سازی pH تجزیه

یک عامل بسیار مهم در اندازه‌گیری‌های الکتروشیمیایی، pH محلول تجزیه است. به منظور یافتن بهترین pH برای اندازه‌گیری الکتروشیمیایی، استخراج از محلول  $5.0 \times 10^{-6}$  M دیازپام (pH برابر با ۳/۸) با شرایط بهینه، انجام گرفته و پس از شست‌وشوی الکترو، اندازه‌گیری جریان الکترو در محلول تجزیه با pHهای متفاوت (در گستره pH برابر با ۰/۲۲ تا ۸) با روش SWV انجام شد. (قابل ذکر است که برای pHهای زیر ۱/۶، هیدروکلریک اسید به عنوان الکترولیت حامل در نظر گرفته شده است) نمودار جریان‌های به دست آمده بر حسب pH محلول تجزیه در شکل ۷ ارائه شده است. این نمودار نشان می‌دهد که شدت سیگنال مربوط به فرایند کاهش دیازپام، به شدت به pH وابسته است و با افزایش pH جریان کاهش می‌یابد که این رفتار با توجه به سازوکار کاهش دیازپام ( $H^{2+}$ ,  $e^{-}$ ) قابل پیش‌بینی نیز است. با توجه به نتیجه‌های به دست آمده، و ثابت بودن تقریبی جریان در گستره pH به تقریب برابر با ۰/۲۲ تا ۱/۳، محلول  $0.2$  M HCl ( $pH \approx 0.7$ ) به عنوان الکترولیت حامل انتخاب شد.



شکل ۷- نمودار جریان بر حسب pH محلول تجزیه

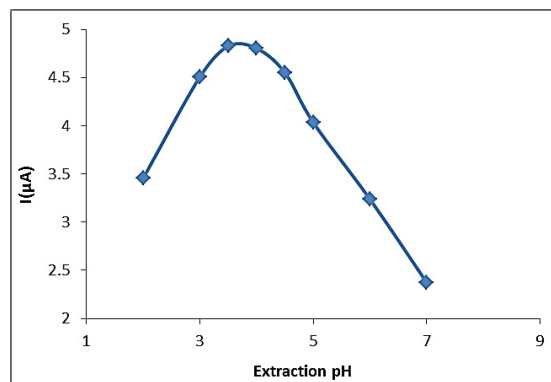
بهینه‌سازی زمان استخراج و سرعت هم‌زدن محلول نمونه در بررسی زمان استخراج و سرعت به هم‌زدن محلول در میزان استخراج دیازپام، مشخص شد که با افزایش زمان استخراج تا ۱۵ دقیقه و سرعت هم‌زدن تا ۳۵۰ rpm، جریان پیک افزایش



شکل ۵- اثر نسبت گرافیت / MIP در پاسخ الکترو د خیمیر کربن اصلاح شده

### بهینه‌سازی pH استخراج

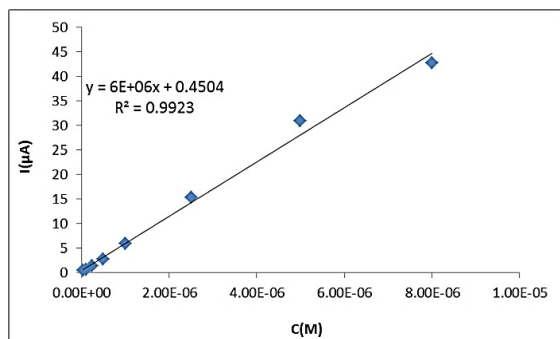
برای این منظور محلول‌هایی از DZ با غلظت  $5.0 \times 10^{-6}$  M و pHهای متفاوت (با استفاده از بافر BR) تهیه شد و سپس با استفاده از الکترو در ترکیب بهینه‌شده، مراحل استخراج، شست‌وشو و تجزیه، برای هر یک از محلول‌ها انجام گرفت. نمودار شدت جریان بر حسب pH استخراج در شکل ۶ ارائه شده است.



شکل ۶- نمودار جریان بر حسب اثر pH محلول نمونه، استخراج از محلول  $5.0 \times 10^{-6}$  M دیازپام.

(شرایط: Frequency = ۵۰ Hz, t. step = ۰/۳ s, ΔE = ۲۰ mv, v. step = ۶ mv)

در بررسی pH استخراج مشخص شد که برای استخراج دیازپام، محیط‌های اسیدی مناسب می‌باشند. نمودار جریان بر حسب pH استخراج نشان می‌دهد که پاسخ حسگر در گستره‌ی pH برابر با ۳/۳ تا ۴/۳ به تقریب ثابت است، ولی در مقدارهای بالاتر و یا پایین‌تر از این گستره، جریان به شدت کاهش می‌یابد. بنابراین، pH برابر با ۳/۸ به عنوان مقدار بهینه انتخاب شد.



شکل ۸. منحنی جریان بر حسب غلظت دیازپام تحت شرایط بهینه شده

مقدارهای حد تشخیص (LOD) و حد تعیین کمی (LOQ)، با استفاده از رابطه‌ی  $kS_b/m$  (انحراف استاندارد جریان‌های مربوط به سه بار اندازه‌گیری محلول بلانک در محل پیک دیازپام،  $m$ : شیب منحنی کالیبراسیون،  $k$  برابر با ۳ برای LOD و  $k$  برابر با ۱۰ برای LOQ) به ترتیب برابر با  $۱.۹۴ \times 10^{-8} M$  و  $۶.۴۵ \times 10^{-8} M$  به دست آمد.

هم‌چنین برای پنج بار اندازه‌گیری محلول  $۵.۰۰ \times 10^{-7} M$  با شرایط بهینه‌شده، تکرارپذیری خوبی با انحراف استاندارد نسبی ۳/۴۸٪ به دست آمده است.

#### بررسی مزاحمت‌ها

پس از تثبیت روش اندازه‌گیری، به منظور بررسی گزینش‌پذیری حسگر تهیه شده، اثر تداخل انواع مولکول‌ها و یون‌ها در تعیین دیازپام مورد بررسی قرار گرفت. حد مزاحمت، به عنوان غلظتی از گونه‌ی مزاحم که سبب تغییر در سیگنال آنالیت، بیش از ۵٪ مقدار اولیه شود، در نظر گرفته شد. برای تعیین حد مزاحمت هرگونه در اندازه‌گیری محلول  $۵.۰۰ \times 10^{-7} M$  دیازپام، آن قدر به این محلول گونه‌ی مزاحم افزوده شد که سیگنال آن به اندازه‌ی ۵٪ نسبت به سیگنال اولیه تغییر کند. نتیجه‌ها در جدول ۲ آمده است.

نتیجه‌های به دست آمده نشان داد که اکثر مولکول‌ها و یون‌های مورد بررسی، تأثیر زیادی بر استخراج دیازپام ندارند و در میان آن‌ها ترکیباتی دارای ساختار با شباهت بیشتر و با دارای گروه‌های عاملی زیاد، مزاحمت بیشتری دارند که این می‌تواند مربوط به

می‌یابد و مقدارهای بیشتر زمان و سرعت هم‌زدن، اثر قابل توجهی بر میزان استخراج DZ ندارد. بنابراین، این مقادیر به عنوان بهینه انتخاب شدند.

#### بهینه‌سازی عامل‌های دستگاهی

برای این منظور دو عامل مهم روش SWV یعنی دامنه‌ی پالس ( $\Delta E$ ) و فرکانس (F) مورد بررسی قرار گرفتند. انتخاب مقدار بهینه برای هر یک از عامل‌ها، بر اساس میزان جریان و هم‌چنین پهنای پیک (در نیمه‌ی ارتفاع) بوده است. در مورد  $\Delta E$ ، گرچه با افزایش دامنه‌ی پالس مقدار جریان پیک افزایش می‌یافت ولی پهنای آن نیز بیشتر می‌گشت. هم‌چنین در مورد فرکانس نیز با افزایش F، جریان پیک ابتدا افزایش و سپس کاهش داشت ولی پهنای پیک به صورت جزئی روندی کاهشی را دنبال کرد. بنابراین، در مورد هر دو عامل بررسی شده، مقداری به عنوان بهینه انتخاب شد که در آن نسبت ارتفاع پیک به پهنای آن، بیشترین مقدار بود. نتیجه‌های به دست آمده در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱- بررسی اثر عامل‌های دستگاهی بر اندازه‌گیری دیازپام

مقدار بهینه	گستره‌ی مورد بررسی	عامل مورد بررسی
۴۰ mV	۱۰ - ۵۰ mV	$\Delta E$ (mV)
۶۰ Hz	۱۰ - ۹۰ Hz	Frequency(Hz)

#### مشخصات تجزیه‌ای

##### ارزاق شایستگی

پس از بهینه‌سازی عامل‌های مؤثر بر اندازه‌گیری دیازپام، منحنی درجه‌بندی تحت شرایط بهینه‌شده، رسم شد (شکل ۷). همان‌گونه که در شکل ۸ مشاهده می‌شود، جریان در گستره‌ی  $۴.۰۰ \times 10^{-8} M$  تا  $۸.۰۰ \times 10^{-6} M$  با غلظت DZ رابطه خطی داشته و این خط از معادله‌ی  $y = ۶ \times 10^6 x + ۰.۴۵$  پیروی می‌کند که در آن x، غلظت دیازپام بر حسب M و میزان همبستگی ( $R^2$ ) نیز برابر ۰/۹۹۲۳ است.

تهیه شده کارایی بسیار خوبی را جهت تعیین دیازپام در نمونه‌های با ماتریس پیچیده داراست.

برهمکنش‌های هیدروژنی آن‌ها با مولکول دیازپام و یا مکان‌های شناسایی پلیمر و در نتیجه کاهش میزان استخراج DZ باشد.

جدول ۳ تعیین DZ در نمونه سرم خون انسان (n = ۳)

افزوده شده (μM)	بازیابی شده (μM)	درصد بازیابی (%)	ردیف
-	-	-	۱
۰٫۰۸	۰٫۰۷۷ ± ۰٫۰۰۳	۹۶٫۷۹	۲
۰٫۴۰	۰٫۳۷۷ ± ۰٫۰۱۵	۹۴٫۲۵	۳
۲٫۰۰	۱٫۹۱۴ ± ۰٫۱۱۳	۹۵٫۷۱	۴

جدول ۲ بررسی اثر گونه‌های مزاحم در اندازه‌گیری دیازپام

Interferents	Tolerance limit (mol ratio)
Li <sup>+</sup> , Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup>	۱۰۰۰
Mg <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup>	۹۰۰
CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> , HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	۶۰۰
Cl <sup>-</sup>	۱۰۰۰
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	۳۰۰
Glucose	۱۴۰
Urea	۱۶۰
Uric acid	۱۰۰
Ascorbic acid	۸۰
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	۱۵۰

### نتیجه‌گیری

در این پژوهش، یک حسگر الکتروشیمیایی مبتنی بر الکترودهای خمیر کربن اصلاح شده با ذرات پلیمر قالب مولکولی، برای اندازه‌گیری داروی دیازپام در غلظت‌های کم تهیه شد. به‌کارگیری MIP به‌عنوان یک عنصر شناسایی گزینش‌پذیر در تهیه حسگر منجر به پیش‌تغلیظ بسیار خوب دیازپام در سطح الکتروده اصلاح شده شد. حسگر پیشنهادی دارای ویژگی‌هایی از قبیل روش تهیه‌ی آسان، گزینش‌پذیری و حساسیت زیاد، تکرارپذیری خوب، دامنه‌ی خطی وسیع و حد تشخیص پایین، بوده و به‌صورت موفقیت‌آمیزی جهت تعیین داروی دیازپام در نمونه سرم خون انسان مورد استفاده قرار گرفت.

کاربرد حسگر تهیه شده در نمونه حقیقی

به‌منظور ارزیابی کارایی حسگر پیشنهادی جهت تعیین دیازپام در نمونه‌های با بستر پیچیده، از این حسگر جهت اندازه‌گیری DZ در نمونه سرم خون انسان و بر طبق دستور کار ذکر شده در قسمت اندازه‌گیری دیازپام استفاده شد. هر آزمایش سه مرتبه تکرار شد. میانگین نتیجه‌ها در جدول ۳ گزارش شده است. درصدهای بازیابی به‌دست‌آمده (۹۴٫۳۵ تا ۹۶٫۷۹) نشان می‌دهد که حسگر

### مراجع

- [1] Aurora Prado, M.S.; Steppe, M.; Tavares, M.F.M.; Kedor-Hackmann, E.R.M.; Santoro, M.I.R.M.; J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 37, 273-279, 2005.
- [2] Chaichi, M.J.; Alijanpour, S.O.; Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 118, 36-41, 2014.
- [3] Salem, A.; Barsoum, B.; Izake, E.; Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 60, 771-780, 2004.
- [4] Moros, J.; Garrigues, S.; de la Guardia, M.; J. pharmaceutical and biomedical analysis; 43, 1277-1282, 2007.
- [5] Liawruangrath, S.; Makchit, J.; Liawruan-



- grath, B.; The international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry; 22, 127-130; 2006.
- [6] Mali, B.D.; Rathod, D.S.; Garad, M.V.; J. Planar Chromatography-Modern TLC; 18, 330-332, 2005.
- [7] Umezawa, H.; Lee, X.P.; Arima, Y.; Hasegawa, C.; Marumo, A.; Kumazawa, T.; Sato, K.; Rapid Communications in Mass Spectrometry, 22, 2333-2341; 2008.
- [8] Maheswar, K.U.; Rao, P.L.; Krishna, K.B.; Rambabu, C.; Indo American Journal of Pharmaceutical Research, 4, 4054-4059; 2014.
- [9] Zhang, L.; Wu, P.; Zhang, Y.; Jin, Q.; Yang, D.; Wang, L.; Zhang, J.; Analytical Methods, 6, 503-508, 2014.
- [10] Abbara, C.; Bardot, I.; Cailleux, A.; Lallement, G.; Le Bouil, A.; Turcant, A.; Clair, P.; Diquet, B.; J. Chromatography B; 874, 42-50; 2008.
- [11] Vardini, M.T.; Mashayekhi, H.A.; Saber-Tehrani, M.; J. Liquid Chromatography & Related Technologies, 35, 988-999, 2012.
- [12] Aurora Prado, M.S.; Steppe, M.; Tavares, M.F.M.; Kedor-Hackmann, E.R.M.; Santoro, M.I.R.M.; J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 37, 273-279; 2005.
- [13] Dixon, R.; Crews, T.; J. Analytical Toxicology; 2, 210-213, 1978.
- [14] Guo, W.; Lin, H.; Liu, L.; Song, J.; J. pharmaceutical and biomedical analysis, 34, 1137-1144, 2004.
- [15] Lozano-Chaves, M.E.; Palacios-Santander, J.M.; Cubillana-Aguilera, L.M.; Naranjo-Rodriguez, I.; Hidalgo-Hidalgo-de-Cisneros, J.L.; Sensors and Actuators B: Chemical, 115, 575-583, 2006.
- [16] Tyszczuk, K.; Electroanalysis, 22, 1975-1984, 2010.
- [17] Naggar, A.H.; ElKaoutit, M.; Naranjo-Rodriguez, I.; El-Sayed, A.E.-A.Y.; de Cisneros, J.L.H.-H.; Talanta, 89, 448-454, 2012.
- [18] Zare, M.; Tehrani, M.S.; Husain, S.W.; Azar, P.A.; Electroanalysis, 26, 2599-2606, 2014.
- [19] Nagappa, N.; Mimani, T.; Sheshadri, B.; Mayanna, S.M.G.; Chemical & pharmaceutical bulletin, 46, 715-717, 1998.
- [20] Thomas, L.; Vilchez, J.; Crovetto, G.; Thomas, J.; J. Chemical Sciences, 98, 221-228, 1987.
- [21] Honeychurch, K.C.; Crew, A.; Northall, H.; Radbourne, S.; Davies, O.; Newman, S.; Hart, J.P.; Talanta, 116, 300-307, 2013.
- [22] Alizadeh, T.; Ganjali, M.R.; Norouzi, P.; Zare, M.; Zeraatkar, A.; Talanta, 79, 1197-1203, 2009.
- [23] Mikysek, T.S.; svancara, I.; Kalcher, K.; Bartos, M.; Vytras, K.; Ludvik, J.I.; Analytical chemistry, 81, 6327-6333; 2009.
- [24] Hocevar, S.B.; Ogorevc, B.; Talanta, 74, 405-411, 2007.
- [25] Sadeghi, S.; Motaharian, A.; Moghaddam, A.Z.; Sensors and Actuators B: Chemical, 168, 336-344, 2012.
- [26] Blanco-Lopez, M.; Lobo-Castanon, M.; Miranda-Ordieres, A.; Tunon-Blanco, P.; Trends in Analytical Chemistry; 23, 36-48; 2004.
- [27] Su, Q.; Zeng, C.; Tang, Y.; Finlow, D.E.; Cao, M.; J. chromatographic science; bms039; 2012.

## Electrochemical sensor based on molecularly imprinted polymer nanoparticles for determination of diazepam drug

A. Motaharian<sup>1</sup> and M.R. Milani-Hosseini<sup>2,\*</sup>

1. PhD student of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Science and Technology, Tehran, Iran
2. Associate Prof. of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Science and Technology, Tehran, Iran

Received: August 2015, Revised: September 2015, Accepted: September 2015

**Abstract:** In this research an electrochemical sensor based on carbon paste (CP) electrode modified by molecularly imprinted polymer (MIP) was prepared for determining of the diazepam (DZ) drug. Molecularly imprinted polymer microparticles were synthesized by precipitation polymerization method and then were used as identification element in construction of the sensor. Also for comparison, the non-imprinted polymer (NIP) particles were synthesized in a similar manner but in absence of diazepam molecules. SEM images of obtained polymers showed that the MIP particles have dimensions in the range of 100-300 nm. Cyclic voltammetry (CV) and square wave voltammetry (SWV) methods were applied to study the electrochemical behavior and quantitative measurements. The obtained results showed that the MIP-CP electrode have much higher adsorption ability to diazepam than the NIP-CP electrode. The effect of some parameters affecting on the sensor response, such as electrode composition, extraction conditions, and electrochemical measurements conditions were studied and then calibration curve was drawn. Peak current showed a linear relationship with diazepam concentration in range of  $4.0 \times 10^{-8}$  to  $8.0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> and the limit of detection was also equal to  $1.94 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>. The relative standard deviation for five measurement of  $5.0 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> diazepam solution was obtained 3.48%. The developed sensor has been successfully used for determinations of diazepam in human blood serum samples.

**Keywords:** Molecularly imprinted polymer, Nanoparticles, Electrochemical sensor, Diazepam, Carbon paste electrodes.