JARC

اندازه‌گیری افلوکساسین با روش میکرواستخراج امولسیون‌سازی به کمک امواج فراصوت به‌وسیله دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

ندا کلیایی[۱]، پروین شهدوستی[۲] و محمد آقامحمدی[۲و*]

۱- کارشناس ارشد شیمی تجزیه، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران
۲- استادیار شیمی تجزیه، گروه شیمی، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران

دریافت: آذر ۱۳۹۵، بازنگری: دی ۱۳۹۵، پذیرش: اسفند ۱۳۹۵

چکیده: در این پژوهش، یک روش ساده و سریع برای اندازه‌گیری افلوکساسین توسعه داده شده است. افلوکساسین آنتی‌بیوتیکی است که برای درمان عفونت‌های باکتریایی استفاده می‌شود. روش میکرواستخراج امولسیون‌سازی به کمک امواج فراصوت (USAEME) بر اساس به‌کارگیری حلال‌های آلی سنگین‌تر از آب به همراه تجزیه با دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) برای اندازه‌گیری افلوکساسین استفاده شد. به این منظور، ۱۵۰ µl حلال کلروفرم به‌عنوان حلال استخراجی به‌آرامی به داخل ظرف سانتریفوژ که حاوی ۱۰ ml نمونه آبی بود، در داخل حمام التراسونیک تزریق شد. امولسیون تشکیل شده در فاز آبی به‌وسیله سانتریفوژ با سرعت ۵۰۰۰ دور بر دقیقه از فاز آبی جدا شد. ۲۰ µl از فاز آلی جدا شده که حاوی افلوکساسین استخراج شده بود، برای تجزیه به دستگاه HPLC مجهز به آشکارساز UV/Vis در طول‌موج ۲۹۰ nm، تزریق شد. عامل‌های مؤثر بر فرایند میکرواستخراج USAEME مانند نوع و حجم حلال استخراجی مورد بهینه‌سازی قرار گرفتند. در شرایط بهینه به‌دست آمده، منحنی کالیبراسیون در گستره ۱۰ تا ۱۰۰۰ µg l^{-1} خطی شد. حد تشخیص (LOD) و حد اندازه‌گیری کمی (LOQ) به ترتیب ۷ µg l^{-1} و ۲۳ و عامل پیش تغلیظ ۲۷ به دست آمد.

واژه‌های کلیدی: افلوکساسین، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، میکرواستخراج امولسیون‌سازی به کمک امواج فراصوت

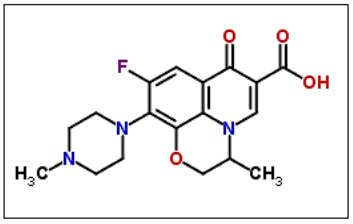
مقدمه

افلوکساسین[۱] از مشتقات کینولون‌ها است که به‌عنوان داروی آنتی‌بیوتیک در درمان عفونت‌های تنفسی، دستگاه ادراری و اسهال‌های عفونی کاربرد دارد. ساختار ترکیب افلوکساسین در شکل ۱ نشان داده شده است. از عوارض این دارو می‌توان به سردرد، بی‌خوابی، تپش قلب، کهیر، برافروختگی، تهوع، اسهال و درد مفصل‌ها اشاره کرد [۱]. افلوکساسین یکی از داروهایی است که سالانه مقدار زیادی به شکل قرص روکش‌دار ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرمی تولید می‌شود. بنابراین، کنترل دقیق افلوکساسین در داروهای تولیدی برای رعایت استاندارد تولید دارو در شرکت‌های داروسازی، بسیار حائز اهمیت است. با توجه به اهمیت کنترل آنتی‌بیوتیک در فراورده‌های دارویی که حاوی این ماده است، ارایه روشی معتبر برای ایجاد نتیجه‌های تکرارپذیر و با صحت بالا الزامی است. روش‌های متعددی برای کمی‌سازی

1. Ofloxacin (OFL)

*عهده‌دار مکاتبات: aghamo_m@yahoo.com

و اندازه‌گیری داروهای آنتی‌بیوتیک در نمونه داروها، بافت‌های متفاوت بدن و... به کار می‌رود.



شکل ۱ ساختار ترکیب افلوکساسین

روش رایج اندازه‌گیری افلوکساسین در بافت‌های متفاوت، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا به‌وسیله آشکارساز فلورسانس است [۲ تا ۴]. این ترکیب همچنین، با کروماتوگرافی مایع مجهز به آشکارساز طیف‌سنج جرمی [۵] و الکتروفورز مویین [۶ تا ۸] مورد ارزیابی قرار گرفته است. مقدار افلوکساسین در اشک خرگوش تحت درمان با قطره چشمی حاوی افلوکساسین، در سال ۲۰۱۲ با روش HPLC/MS/MS اندازه‌گیری شد. افلوکساسین برای درمان و جلوگیری از عفونت‌های چشمی سطحی در حیوانات و انسان استفاده می‌شود. اشک با نوار اشک جمع‌آوری و استخراج با استفاده از روش LLE انجام شد. منحنی کالیبراسیون در گستره ۱۰–۵۰۰۰ ng/ml خطی و حد قابل اندازه‌گیری ۱۰ ng/ml گزارش شد [۹].

برای تجزیه هر ترکیب، آماده‌سازی نمونه به‌منظور جداسازی آنالیت از بافت نمونه، خالص‌سازی و پیش‌تغلیظ ترکیب موردنظر ضروری است. در سال ۲۰۰۸، Rgueiro و همکارانش برای اولین بار روش میکرواستخراج امولسیون‌سازی به کمک امواج فراصوت[1] را برای استخراج و اندازه‌گیری برخی آلاینده‌های مهم در نمونه آب‌های محیطی استفاده کردند [۱۰]. به خاطر حجم کم مجموعه فازهای گیرنده و دهنده در این روش، استفاده از سانتریفوژ امکان‌پذیر بوده و بنابراین، نگرانی در مورد امولسیون شدن فازها و در نتیجه افزایش زمان جدایی فازها به‌طورکلی مرتفع شد. در این روش همانند روش‌های میکرواستخراج مایع– مایع پخشی (DLLME)، استخراج مایع– مایع همگن (HLLE)[2] و استخراج در نقطه ابری شدن[3]، سطح تماس بین دو فاز به‌شدت افزایش می‌یابد، به‌طوری‌که پس از امولسیون شدن، توزیع آنالیت‌ها بین دو فاز در چند ثانیه به تعادل می‌رسد و بلافاصله پس از انجام فرایند امولسیون‌سازی می‌توان با عمل سانتریفوژ دو فاز را از یکدیگر جداسازی کرد. روش‌های HLLE و DLLME جزء سامانه‌های سه‌جزئی بوده که برای انجام آن‌ها افزون بر فاز دهنده (آبی) و گیرنده (آلی) نیاز به یک عامل پخش‌کننده یا همگن کننده نیز است. فاکتورهای تغلیظ بزرگ، زمان استخراج و هزینه کم از مهم‌ترین مزایای این روش‌ها است. از طرفی مصرف حلال‌های کمکی (حلال‌های پخش‌کننده یا همگن کننده) در روش‌های HLLE و DLLME منجر به کاهش ضرایب توزیع آنالیت‌ها از فاز آبی به آلی شده و از طرفی، حجم حلال مصرفی را افزایش می‌دهد. همچنین، تنوع حلال‌های آلی که در این روش‌ها مورد استفاده قرار گرفته محدود است. کاربرد امواج فراصوت برای امولسیون‌سازی حلال آلی، جایگزین حلال پخشی در روش DLLME شده است. امواج فراصوت باعث پخش فاز آلی به‌صورت قطرات ریز در محلول آبی (تشکیل امولسیون) و با افزایش سطح تماس بین دو فاز باعث افزایش سرعت انتقال جرم از فاز دهنده به فاز گیرنده، افزایش سرعت و کارایی استخراج می‌شود [۱۱]. در روش میکرواستخراج امولسیون‌سازی به کمک امواج فراصوت، به‌طورمعمول ظرف حاوی نمونه و فاز گیرنده غیر محلول وارد حمام فراصوت محتوی یک مایع انتقال‌دهنده‌ی امواج فراصوت می‌شود. امواج فراصوت در مدت‌زمان معینی اعمال شده و پس از جدا کردن فازها، فاز گیرنده برای تجزیه و یا مرحله‌ی بعدی آماده‌سازی نمونه به کار می‌رود. کاربردهای متعددی از این روش برای استخراج انواع متفاوت آنالیت‌ها در نمونه‌های مایع گزارش شده است [۱۲ تا ۱۴].

در این مطالعه سعی شده برای اندازه‌گیری افلوکساسین از روش میکرواستخراج امولسیون‌سازی به کمک امواج فراصوت استفاده شود که دارای مزایای زیاد مانند: مصرف ناچیز حلال آلی، سرعت بالا، پیش‌تغلیظ زیاد، سادگی کار و بازده بالای استخراج است.

1. Ultrasound-assisted emulsification microextraction (USAEME)
2. Homogeneous liquid-liquid extraction (HLLE)
3. Cloud point extraction (CPE)

بخش تجربی

مواد موردنیاز

حلال‌های استخراجی شامل: حلال‌های استخراجی سبک: اوکتانول، n–هگزان، n–دودکان، بوتیل استات، تولوئن و حلال‌های استخراجی سنگین: کربن تترا کلرید، کلروفرم، دی کلرو متان، تری کلرو اتان، کلرو بنزن و اسید پرکلریک ($HClO_4$)، جفت یون آنیونی (NaHxSo)[1] و کاتیونی (TBAHS)[2] از شرکت مرک آلمان و متانول با درجه خلوص HPLC برای فاز متحرک، از شرکت رومیل انگلستان خریداری شدند. آب یون‌زدایی شده با دستگاه TKA Smart با سامانه Q-5Direct با صافی ۰/۰۲ میکرون تهیه شد. ترکیب افلوکساسین از شرکت سیگما لوئیس خریداری شد و محلول استاندارد افلوکساسین با غلظت ۱۰۰۰ $mg\ l^{-1}$ در متانول تهیه شد. برای تهیه‌ی محلول‌های با غلظت کمتر، از رقیق‌سازی محلول اصلی استفاده شد.

دستگاه‌های مورد استفاده

از دستگاه HPLC مدل PerkinElmer Series 200 ساخت کمپانی پرکین المر[3] آمریکا مجهز به آشکارساز UV/Visible مدل Series 200 و ستون جداسازی C18 (Agilent – 10cm, 4/6mm, 3/5µm) برای اندازه‌گیری افلوکساسین و دستگاه سانتریفیوژ مدل (nuve 200) NF ساخت ترکیه برای جداسازی فاز آلی از آبی و دستگاه فراصوت مدل ED 244 s استفاده شد. ترازو با دقت ۰/۰۰۰۱ g ساخت کمپانی سارتوریوس[4] آلمان برای توزین به کار گرفته شد.

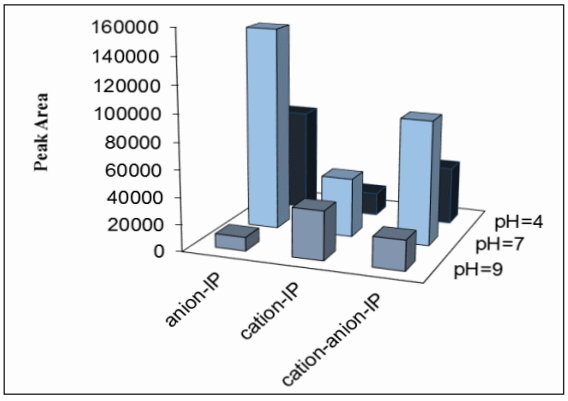
فاز متحرک مخلوطی از آب یون‌زدایی شده (حاوی بافر H_3PO_4 در pH برابر با ۳/۵) و متانول حاوی ۱۰٪ ایزوپروپانول به نسبت حجمی ۶۰:۴۰ v/v، در حالت ایزوکراتیک با سرعت جریان ۰/۹ ml/min بود. طول‌موج آشکارساز ۲۹۰ nm انتخاب و از لوله حلقه‌ای با حجم تزریقی ۱۰ µl استفاده شد.

نتیجه‌ها و بحث

در هر روش استخراجی عامل‌هایی بر کارایی روش و بازده استخراج مؤثرند که باید بهینه شوند. این عامل‌های مؤثر در روش استخراجی USAEME، به ترتیب عبارت‌اند از: نوع حلال استخراجی، مقدار اثر قدرت یونی نمک، حجم حلال استخراجی، pH محلول استخراجی و اثر جفت یون.

اثر نوع زوج یون در pHهای متفاوت

سازوکار استخراج OFL از نمونه‌های آبی، ایجاد جفت یون بالکی قابل استخراج به حلال آلی با یک زوج یون مناسب است. در این مرحله اثر نوع جفت یون در pHهای متفاوت مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور، اثر زوج یون آنیونی NaHxSo، زوج یون کاتیونی TBAHS و مخلوط دو زوج یون آنیونی NaHxSo و کاتیونی TBAHS همراه با هم در pHهای ۴، ۷ و ۹ مورد ارزیابی قرار گرفت. پایین بودن بازده استخراج در pHهای قلیایی حاکی از بازده پایین تشکیل جفت یون با زوج یون کاتیونی TBAHS است. شاید علت آن را بتوان به عدم استقرار بار منفی OFL در pHهای قلیایی نسبت داد. همان‌طور که از شکل ۲ مشاهده می‌شود، استفاده از زوج یون آنیونی در pH برابر با ۷ منجر به بیشترین بازه استخراج شد.



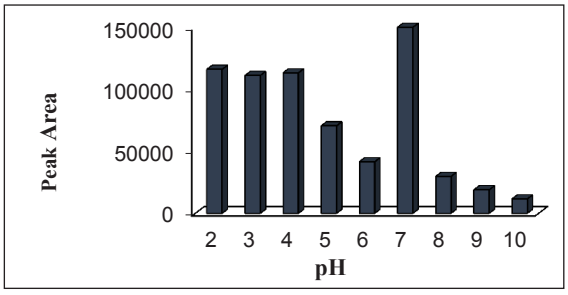
شکل ۲ اثر نوع زوج یون در pHهای متفاوت بر کارایی استخراج OFL، شرایط آزمایش: ۱۰ ml محلول نمونه حاوی ۵۰۰ $\mu g\ l^{-1}$ OFL، ۲۰۰ µl حلال کربن تترا کلرید، زمان امولسیون سازی: ۳۰ ثانیه و زمان سانتریفوژ: ۵ دقیقه.

اثر pH بر استخراج OFL

با توجه به وجود گروه‌های عاملی اسیدی و بازی در این ترکیب (pKa_2 برابر با ۸/۲۲ و pKa_1 برابر با ۶/۰۵)، در pHهای پایین‌تر از

1. Hexan-1-sulfonic acid sodium salt
2. Tetra-n-butylammonium hydregen sulfate
3. Perkin Elmer
4. Sartorius

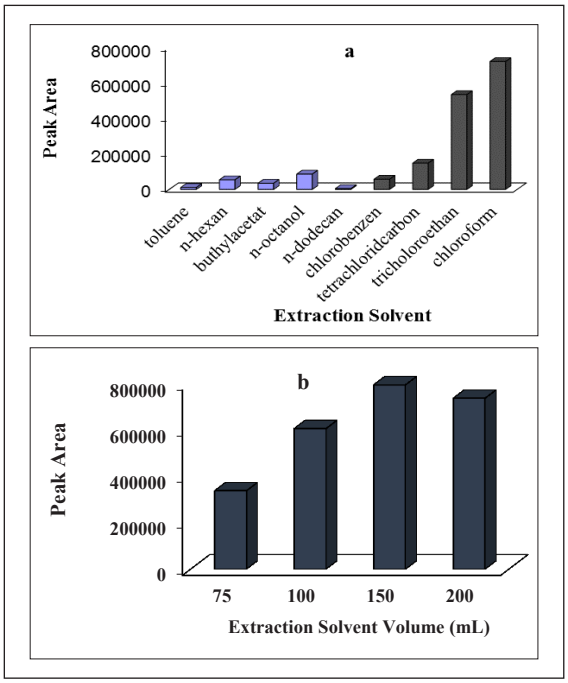
pKa_1 این ترکیب به‌طور عمده به‌صورت کاتیونی است و در این حالت گروه آمینی H^+ می‌گیرد و گروه اسیدی به‌صورت یونیزه نشده است در pHهای بالاتر از pKa_2 این ترکیب به‌طور عمده به‌صورت آنیونی است و در این حالت گروه آمینی یونیزه نشده و گروه اسیدی، H^+ از دست می‌دهد، البته بار منفی در فرم آنیونی مستقر نبوده و در رزونانس شرکت می‌کند. در گستره‌ی pH بین pKa_2 و pKa_1 یعنی بین ۶٫۰۵ تا ۸٫۲۲ این ترکیب دارای بار مثبت و منفی است. میزان استخراج OFL در گستره‌ی pH بین ۲ تا ۱۰ مورد ارزیابی قرار گرفت. نتیجه‌ها در شکل ۳ نشان داده شده است. همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود در pHهای قلیایی که OFL به‌صورت آنیونی بوده و قابلیت تشکیل جفت یون با NaHxSo آنیونی را ندارد، بازده استخراج بسیار ناچیز است. در محدوده‌ی pH بین ۲ تا ۴ که OFL به‌طور عمده به فرم کاتیونی است، بازده استخراج به‌تقریب ثابت است. در pH برابر با ۶ نیمی از ترکیب به‌صورت کاتیونی و نیمی دیگر به‌صورت خنثی است، بنابراین، بازده تشکیل جفت یون کمتر از pHهای ۵ و ۴ است. همان‌گونه که پیش از این اشاره شد در pHهای ۴ و ۵ درصد فرم کاتیونی بیشتر است، در pH برابر با ۷ که به‌تقریب pH نقطه ایزوالکتریک ((pKa_2+pKa_1)/۲٫۱) این ترکیب است بیشترین بازده استخراج به‌دست آمده است. در این pH، بار مثبت و منفی OFL مساوی و در نتیجه بار الکتریکی خالص آن صفر است. در این pH کمترین مقدار قطبیت، حلالیت در آب و کمترین مقدار آب پوشی و در نتیجه بیشترین آزادی عمل برای ایجاد جفت یون با NaHxSo وجود دارد. در نتیجه pH برابر با ۷ به‌عنوان مقدار بهینه pH برای آزمایش‌های بعدی انتخاب شد.



شکل ۳ تأثیر pH بر کارایی استخراج OFL، شرایط آزمایش: ml ۱۰ محلول نمونه حاوی $\mu g\ l^{-1}$ ۵۰۰ OFL و g ۰٫۰۰۱ زوج یون NaHxSo، µl ۲۰۰ حلال کربن تتراکلرید، زمان امولسیون‌سازی: ۳۰ ثانیه و زمان سانتریفوژ: ۵ دقیقه

بهینه‌سازی نوع حلال استخراجی و حجم آن

انتخاب یک حلال استخراجی مناسب در روش‌های میکرواستخراج از اهمیت زیادی برخوردار است. در انتخاب حلال آلی چند عامل مهم مورد توجه قرار می‌گیرد. حلال موردنظر باید در آب نامحلول یا حلالیت اندکی داشته باشد، تمایل زیادی برای استخراج و انحلال ترکیب موردنظر را در خود داشته و با دستگاه تجزیه مورد استفاده نیز سازگار باشد و در گستره‌ی ماده‌ی استخراجی پیک نداشته باشد. در این پژوهش، کارایی هر دو گروه حلال‌های با چگالی کمتر از آب و با چگالی بیشتر از آب برای استخراج OFL مورد بررسی قرار گرفت (حجم حلال آلی µl ۲۰۰). این حلال‌ها شامل حلال‌های زیر هستند: n–هگزان، تولوئن، n–دودکان، اوکتانول، بوتیل استات و کربن تترا کلرید، کلروفرم، دی کلرو متان، تری کلرو اتان و کلرو بنزن. ظروف استخراج برای حلال‌های با چگالی کمتر از آب، دهانه مخروطی دارد و در ظروف استخراجی مخصوص حلال سنگین، بخش مخروطی در ته این ظروف است تا حلال آلی به‌راحتی جمع شود. نتیجه‌های به‌دست آمده در شکل a–۴ نشان داده شده است.



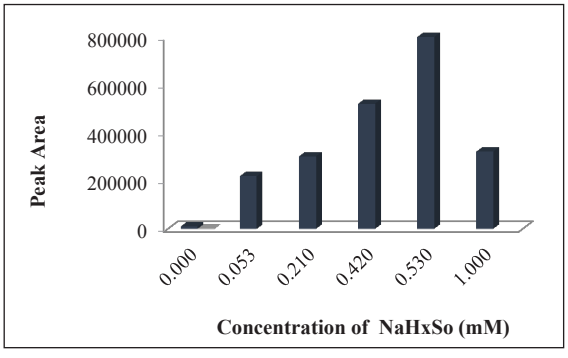
شکل ۴ تأثیر نوع حلال آلی (a) و حجم حلال آلی (b) بر کارایی استخراج OFL، شرایط آزمایش: ml ۱۰ محلول نمونه حاوی $\mu g\ l^{-1}$ ۵۰۰ OFL در pH برابر با ۷، g ۰٫۰۰۱ زوج یون NaHxSo، زمان امولسیون‌سازی: ۳۰ ثانیه و زمان سانتریفوژ: ۵ دقیقه.

در روش استخراج مایع–مایع، حلال استخراجی باید دارای برهم‌کنش مناسب با آنالیت موردنظر باشد. از بین حلال‌های کار شده، نیروی بین‌مولکولی در هگزان، کربن تترا کلرید و دودکان به دلیل عدم داشتن ممان دوقطبی و همچنین مکان‌های دهنده و گیرنده پروتون فقط از نوع لاندن بوده و برهم‌کنش مناسبی با جفت یون OFL که دارای گروه‌های اکسیژن و نیتروژن است، نداشته و در نتیجه کارایی پایینی در استخراج این ترکیب دارند. حلال‌هایی مانند اکتانول و بوتیل استات قادر به ایجاد پیوند هیدروژنی و حلال‌هایی مانند کلروفرم و تری کلرواتان دارای برهم‌کنش بین‌مولکولی از نوع دوقطبی–دوقطبی هستند. افزون بر عامل یاد شده، جفت یون‌ها در حلال‌هایی با ثابت دی الکتریک پایین، پایدار می‌مانند. به همین دلیل، کلروفرم با ثابت دی الکتریک ۴٫۸ در استخراج جفت یون OFL موفق‌تر از تری‌کلرواتان با ثابت دی الکتریک برابر با ۷٫۲ است [۱۵]. همچنین، در روش استخراج به کمک امواج فراصوت، حلال استخراجی باید قابلیت تشکیل امولسیون با کارایی بالا در اثر جذب امواج فراصوت داشته باشد. حلال‌هایی با گرانروی بیشتر، در برابر عبور امواج فراصوت مقاومت بیشتر و در نتیجه توانایی کمتری در ایجاد امولسیون با قطرات کوچک در مقایسه با حلال‌های با گرانروی کمتر دارند [۱۶]. بنابراین، حلال‌هایی مانند کلروفرم با گرانروی برابر با ۰٫۵۶ و تری کلرواتان با گرانروی برابر با ۰٫۷۳ در مقایسه با اوکتانول با گرانروی برابر با ۷٫۵۹ [۱۵] در استخراج موفق‌تر بوده و در اثر جذب امواج فراصوت امولسیونی با ذرات کوچک ایجاد کرده که به‌تبع آن سطح تماس بین دو فاز آبی و آلی بسیار زیاد و در نتیجه انتقال جرم آنالیت افزایش می‌یابد. در نهایت، حلالی کارایی بیشتر در استخراج آنالیت را دارد که هم‌زمان در همه مراحل استخراج به کمک امواج فراصوت موفق عمل کند. کارایی کلروفرم برای استخراج OFL به دلیل برهم‌کنش مناسب و پایدار نگه‌داشتن جفت یون OFL، امولسیون شدن خوب و همچنین، تفاوت گرانروی مناسب با آب جهت جدایی دو فاز آبی و آلی در مقایسه با حلال‌های دیگر به مقدار قابل‌توجهی بیشتر است. بنابراین، کلروفرم به‌عنوان حلال بهینه در سایر آزمایش‌ها مورد استفاده قرار گرفت.

در مرحله بعد برای تعیین حجم بهینه حلال استخراجی، حجم‌های متفاوتی از کلروفرم به‌عنوان حلال استخراجی بهینه مورد بررسی قرار گرفت. شکل b–۴ سطوح زیر پیک OFL استخراج شده را برحسب حجم‌های حلال استخراجی نشان می‌دهد. همان‌گونه که بیشترین تغلیظ و بنابراین، بهترین حساسیت مربوط به ۱۵۰ µl حلال آلی در فرایند استخراج به دست آمد. همان‌طور که از شکل مشخص است، سطوح زیر پیک مربوط به OFL در فاز آلی یا به‌عبارتی‌دیگر غلظت آن در فاز آلی با افزایش حجم این فاز بیش از ۱۵۰ µl به علت رقیق شدن OFL، کاهش می‌یابد.

اثر غلظت زوج یون

غلظت بحرانی سورفکتانت (CMC) برای NaHxSo برابر با ۰٫۵۴ M است [۱۷]. همان‌طور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود، بازده استخراج تا رسیدن به ۰٫۵۳ میلی مولار روند افزایشی دارد و پس از گذشتن از این مقدار کاهش می‌یابد و بیشترین بازده استخراج مربوط به غلظت ۰٫۵۳ میلی مولار است که بسیار کمتر از غلظت CMC ترکیب NaHxSo است.

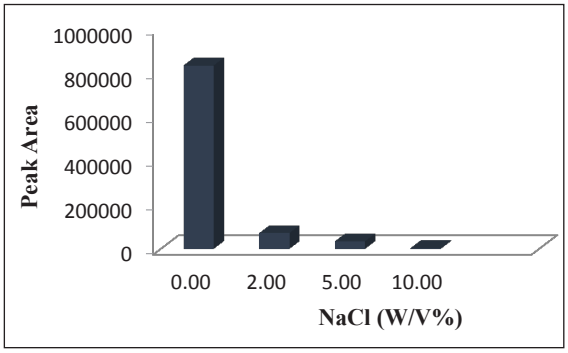


شکل ۵ اثر غلظت زوج یون NaHxSo بر کارایی استخراج OFL، شرایط آزمایش: ۱۰ ml محلول نمونه حاوی ۵۰۰ µg l^{-1} OFL در pH برابر با ۷ و ۱۵۰ µl حلال کلروفرم، زمان امولسیون سازی: ۳۰ ثانیه و زمان سانتریفوژ: ۵ دقیقه.

بهینه‌سازی مقدار اثر قدرت یونی محلول نمونه

برای بررسی اثر قدرت یونی محیط بر مقدار استخراج، از نمک NaCl استفاده شد. پس از تزریق نمونه‌های به دستگاه HPLC،

مساحت پیک‌های به‌دست آمده با یکدیگر مقایسه شدند (شکل ۶). همان‌گونه که شکل ۶ مشاهده می‌شود، در شرایط بدون استفاده از نمک، بازده استخراج بیشتر است. با افزودن قدرت یونی محلول، گرانروی محلول آبی بیشتر شده و انتقال جرم به‌خوبی به فاز آلی صورت نمی‌گیرد و بازده استخراج کم می‌شود.



شکل ۶ تأثیر قدرت یونی بر کارایی استخراج OFL، شرایط آزمایش: ml ۱۰ محلول نمونه حاوی $\mu g\ l^{-1}$ OFL ۵۰۰ و g ۰/۰۰۱ زوج یون NaHxSo، µl ۱۵۰ حلال کلروفرم، زمان امولسیون‌سازی: ۳۰ ثانیه و زمان سانتریفوژ: ۵ دقیقه.

کارایی تجزیه‌ای روش

رسم منحنی کالیبراسیون و کار بر روی نمونه‌ی حقیقی

به‌منظور آزمودن شاخص‌های تجزیه‌ای روش، تجزیه OFL تحت شرایط بهینه انجام گرفت. منحنی‌های کالیبراسیون در آب خالص رسم شد. شاخص‌های تجزیه‌ای روش USAEME-HPLC-UV برای اندازه‌گیری OFL در جدول ۱ نشان داده شده است. روش پیشنهادی در گستره‌ی ۱۰ تا ۱۰۰۰ $\mu g\ l^{-1}$ خطی بوده، حد تشخیص روش (LOD) و حد اندازه‌گیری کمی (LOQ) به ترتیب ۷ و ۲۳ $\mu g\ l^{-1}$ و فاکتور پیش تغلیظ (EF) برابر با ۲۷ به دست آمد. انحراف استاندارد نسبی (RSD٪) محاسبه شده با پنج مرتبه استخراج از محلولی حاوی ۱۰۰ $\mu g\ l^{-1}$ از OFL کمتر از ۱۰٪ بود.

جدول ۱ شاخص‌های تجزیه‌ای روش USAEME-HPLC-UV برای اندازه‌گیری OFL

آنالیت	گستره خطی ($\mu g\ L^{-1}$)	R^2	LOD ($\mu g\ L^{-1}$)	LOQ ($\mu g\ L^{-1}$)	EF	RSD% (n=3)
OFL	۱۰-۱۰۰۰	۰/۹۹۰۴	۷	۲۳	۲۷	۹/۶

هدف از انجام این کار پژوهشی، ارایه یک روش کارآمد، سریع و ساده برای اندازه‌گیری داروی افلوکساسین در فراورده‌های دارویی و سرم خون است. به این منظور، ۵ عدد قرص (۲۰۰ mg OFL) وزن شده و سپس آسیاب شد. ۰/۰۱ گرم از قرص‌های آسیاب شده را به بالون ۵۰ میلی‌لیتری منتقل کرده و ml ۵ متانول به آن افزوده و به مدت ۱۵ دقیقه در حمام فراصوت قرار داده شد تا به‌طور کامل حل شود، سپس با آب مقطر به حجم رسانده و g ۰/۰۰۵ از NaHxSo به آن افزوده شد. ml ۱۰ از این محلول را به ظرف استخراج منتقل کرده و با µl ۱۵۰ کلروفرم به‌وسیله روش USAEME در شرایط بهینه به‌دست آمده استخراج شده و µl ۲۰ از حلال استخراجی برای تجزیه به دستگاه HPLC تزریق شد. برای بررسی تکرارپذیری روش، آزمایش فوق ۳ بار تکرار شد. کروماتوگرام به‌دست آمده از استخراج OFL از قرص حاوی این دارو در شکل b–۷ نشان داده شده است و میانگین غلظت OFL محاسبه شده در جدول ۲ آورده شده است.

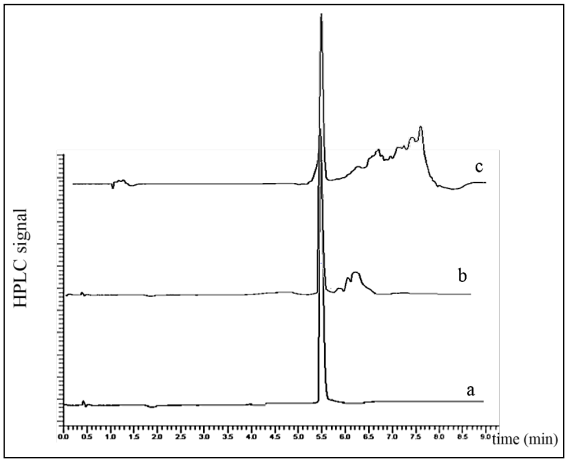
جدول ۲ اندازه‌گیری OFL در نمونه‌های حقیقی با روش USAEME-HPLC

نمونه	بازده استخراج	RSD% (n=۳)	صحت	مقدار پیدا شده ($\mu g\ l^{-1}$)	مقدار افزوده شده ($\mu g\ l^{-1}$)
قرص	٪۸۸	۹/۷	٪ -۱۲*	(در g ۰/۰۱ قرص) g ۰/۰۲	۰
سرم خون				۰	۰
	٪۹۳/۲	۹/۸	٪ -۶/۸	۴۶/۶	۵۰
	٪۱۰۳/۴	۸/۲	+۳/۴	۱۰۳/۴	۱۰۰

* دوز OFL در هر قرص با میانگین وزن g ۰/۰۸۸ برابر با mg ۲۰۰ است.

در قسمت بعدی، کارایی روش پیشنهاد شده برای اندازه‌گیری OFL در سرم خون، مورد ارزیابی قرار گرفت. از آن‌جایی که دستیابی به سرم خون بیماری که تحت درمان با داروی OFL باشد، امکان نداشت، از سرم خون فرد سالم برای بررسی کارایی روش استفاده شد. به این منظور ml ۲ از سرم خون فرد سالم را در ظرف استخراج ریخته و پس از افزودن g ۰/۰۰۱ از NaHxSo حجم آن را به ml ۱۰ رسانده و با روش USAEME

عمل استخراج انجام شد. نتیجه‌های به‌دست آمده در جدول ۲ و کروماتوگرام‌های به‌دست آمده از استخراج سرم خون در شکل ۷- c نشان داده شده است.



شکل ۷ کروماتوگرام به‌دست آمده از تزریق ۲۰ میکرولیتر کلروفرم پس از استخراج OFL تحت شرایط بهینه به‌دست آمده. (a) استاندارد OFL با غلظت ۱۰۰ $\mu g\ l^{-1}$ در آب، (b) قرص بدون اسپایک استخراج شده و (c) نمونه سرم خون فرد سالم اسپایک شده با غلظت ۱۰۰ $\mu g\ l^{-1}$ از OFL

مقایسه برخی از شاخص‌های تجزیه‌ای روش ارایه شده با روش‌های میکرواستخراج گزارش شده در مقالات برای اندازه‌گیری OFL در جدول ۳ آورده شده است. مزایایی از قبیل سادگی، هزینه و مصرف کم حلال آلی را می‌توان به این روش نسبت داد. زمان موردنیاز برای امولسیون‌سازی حلال آلی و استخراج در روش USAEME به‌طور قابل‌توجهی بسیار کمتر از زمان موردنیاز برای استخراج در روش‌های گزارش شده در جدول ۳ است که مهم‌ترین مزیت این روش به‌حساب می‌آید. تهیه بسپار در روش میکرواستخراج فاز جامد (SPME) مستلزم صرف مواد شیمیایی متفاوت، زمان طولانی و هزینه زیاد است. روش میکرواستخراج مایع–مایع پخشی به کمک امواج فراصوت (UA-DLLME)، نیاز به مصرف حلال کمکی (حلال پخش‌کننده) دارد که افزون بر آن افزایش حجم حلال مصرفی منجر به کاهش ضرایب توزیع آنالیت‌ها از فاز آبی به آلی می‌شود. همچنین، تنوع حلال‌های آلی که در این روش استفاده شده است محدود است.

جدول ۳ مقایسه روش USAEME-HPLC با برخی از روش‌های میکرواستخراج گزارش شده در منابع برای اندازه‌گیری OFL

روش مورد استفاده*	گستره خطی ($\mu g\ l^{-1}$)	حد تشخیص ($\mu g\ l^{-1}$)	زمان استخراج (min)	نمونه	مرجع
SPME-MIP HPLC-UV/Vis	۵-۶۰۰ ($\mu g\ ml^{-1}$)	LOQ: ۰/۳ ($\mu g\ ml^{-1}$)	۲۰	شیر	[۱۸]
UA-DLLME HPLC-UV/Vis	۱۰-۲۰۰۰	۰/۳۴	۱۰	آب فاضلاب	[۱۹]
in-tube MSPME HPLC-UV/Vis	۰/۵-۵۰۰	۰/۰۵	۱۳/۵	آب شرب و ادرار	[۲۰]
SALLUE-ASS	۲۱-۲۰۰۴	۱۲	۵۰	شیر	[۲۱]
SD-LLLME CE/UV	۴۰-۱۰۰۰	۲۳/۲۴	۴۰	ادرار	[۲۲]
USAEME HPLC-UV/Vis	۱۰-۱۰۰۰	۷	۵	قرص و سرم خون	پژوهش حاضر

*SPME: solid-phase microextraction; MIP: molecularly imprinted polymer; UA-DLLME: ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction; in-tube MSPME: In-tube magnetic solid phase microextraction; SALLUE: salting-out assisted liquid–liquid ultrasonic extraction, ASS: aluminum sensitized spectrofluorimetric method; SD-LLLME: single drop liquid–liquid–liquid microextraction; CE: capillary electrophoresis.

نتیجه‌گیری

هدف از این پژوهش، ارایه روش استخراجی با به‌کارگیری حداقل مقدار حلال آلی با کارایی بالا در حداقل زمان است. بدین منظور برای استخراج افلوکساسین روش میکرواستخراج امولسیون‌سازی به کمک امواج فراصوت به کار گرفته شد. زمان استخراج در این روش ۵ دقیقه است. تحت شرایط آزمایشگاهی بهینه، گستره خطی مناسب با حد تشخیص و حد قابل اندازه‌گیری قابل‌قبول به دست آمد. در نهایت روش پیشنهاد شده به‌طور موفقیت‌آمیزی برای اندازه‌گیری OFL در نمونه قرص این دارو و سرم خون به کار رفت. روش ارایه شده، ساده، ارزان و سریع است که می‌تواند برای پیش تغلیظ و اندازه‌گیری افلوکساسین در نمونه‌های دارویی و سایر بافت‌های حقیقی به کار گرفته شود.

سپاسگزاری

از دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد که تمامی امکانات و تسهیلات انجام این پژوهش را میسر ساختند، تشکر و قدردانی می‌کنیم.

مراجع

[۱] محتشمی، رضا؛ "داروهای ژنریک ایران و دسته‌بندی داروها"، انتشارات آثار سبحان، ایران، چاپ هفتم، صفحه‌ی ۱۵۵، ۱۳۹۵.

[2] Fabre D, Bressolle F, Kinowski, JM, Bouvet O, Paganin F, Galtier M. J. Pharm. Biomed. Anal., 12, 1463-1469, 1994. 146

[3] Macek J, Ptacek. P. J. Chromatogr. B 673, 316-319, 2007.

[4] Cheng GW, Wu HL, Huang YL. Anal. Chim. Acta 616, 230-234, 2008.

[5] Lillenberg M, Yurchenko, S., Kipper, K., Herodes, K., Pihl, V., Sepp, K., Lohmus, R., Nei, L.; J. Chromatogr. A 1216, 5949–5954, 2009.

[6] See, K.L., Elbashir, A.A., Saad, B., Alia, A.S.M., Aboul-Enein, H.Y.; Biomed. Chromatogr. 23, 1283–1290, 2009.

[7] Xie, H.Y., Wang, Z.R., Fu, Z.F.; J. Pharma. Anal. 4, 412-416, 2014.

[8] Horstkötter, C., Blaschke, G.; J. Chromatogr. B 754, 169-178, 2001.

[9] Byrro, R.M.D., de Oliveira Fulgencio, G., da Silva Cunha, A., Cesar, I.C., Cellini, P.R., Pianetti, G.A.; J. Pharma. Biomed. Anal. 70 544-548, 2012.

[10] Regueiro, J., Llompart, M., Garcia-Jares, C., Garcia-Monteagudo, J.C., Cela, R.; J. Chromatogr. A 1190, 27-38, 2008.

[11] Saleh, A., Yamini, Y., Faraji,.M, Rezaee, M., Ghambarian. M.; J. Chromatogr. A. 1216, 6673, 2009.

[12] Aghamohammadi M., Shahdousti, P., Harooni, B.; Microchem. J. 124, 188, 2016.

[13] Shahdousti, P., Aghamohammadi, M., Seidi, Sh., Harooni, B., Kalhor. H.; J. Iran. Chem. Soc. 12, 1757, 2015.

[14] Aghamohammadi, M., Faraji, M., Shahdousti, P., Kalhor, H., Saleh. A.; Phytochem. Anal. 26, 209, 2015.

[15] Lide D.R.; "CRC Handbook of Chemistry and Physics", CRC Press, USA; 84th ed. CH 3:4-572, 2004.

[16] Rostagno, M.A., Prado, J.M.; "Natural Product Extraction: Principles and Applications", Royal Society of Chemistry, UK; 89-112, 2013.

[17] Annunziata, A., Constantino, L., D'Errico, G., Paduano, L., Vitagliano, V.; J. Colloid Interface Sci. 216, 1999, 16.

[18] Zhao, T., Guan, X., Tang, W., Ma, Y., Zhang, H.; Anal. Chim. Acta. 853, 2015, 668.

[19] Yan, H., Wang, H., Qin, X., Liu, B., Du, J.; J. Pharma. Biomed. Anal. 54, 2011, 53.

[20] Manbohi, A., Ahmadi, S. H.; Anal. Chim. Acta. 885, 2015,114.

[21] Xia, Q., Yang, Y., Liu, M.; Spectrochim. Acta: Mol. Biomol. Spectrosc. 96, 2012, 358.

[22] Gao, W., Chen, G., Chen, Y., Zhang, X., Yin, Y., Hu, Z.; J. Chromatogr. B 879, 2011, 291.

JARC

Determination of Ofloxacin Using Ultrasound-assisted emulsification microextraction by high performance liquid chromatography

N. Kolyaee[1], P. Shahdousti[2] and M. Aghamohammadi[3,*]

1. MSc in Analytical Chemistry, Department of Chemistry, Boroujerd Branch, Islamic Azad University, Boroujerd, Iran
2. Assistant Prof. of Analytical Chemistry, Department of Chemistry, Boroujerd Branch, Islamic Azad University, Boroujerd, Iran
3. Assistant Prof. of Analytical Chemistry, Department of Chemistry, Boroujerd Branch, Islamic Azad University, Boroujerd, Iran

Recieved: November 2016, Revised: December 2016, Accepted: January 2017

Abstract: In this study, a simple and fast method was developed for ofloxacin determination. Ofloxacin is an antibiotic that is used to treat bacterial infections. Ultrasound-assisted emulsification microextraction (USAEME) based on applying heavy density organic solvent followed by high performance liquid chromatography (HPLC) was used for ofloxacin determination. For this purpose, 150 µl chloroform as extraction solvent was slowly injected into the centrifuge glass vial containing 10 µl aqueous sample located inside the ultrasonic water bath. The formed emulsion was centrifuged at 5000 rpm and 20 µl of separated organic solvent containing extraction ofloxacin was injected into the HPLC system equipped with a UV/Vis detector at 290 nm. The influences of different parameters affecting the USAEME procedure were evaluated to optimize the efficiency of the microextraction process. Under the optimum extraction conditions, the calibration carve was linear in range of 10- 1000 µg l^{-1}. The limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), and preconcentration factor in water sample were obtained 7, 23 µg l^{-1} and 27, respectively.

Keywords: Ofloxacin, High Performance Liquid Chromatography, Ultrasound-assisted Emulsification Microextraction

*Corresponding author Email: aghamo_m@yahoo.com