

## سنتز و کاربرد پلیمر قالب مولکولی هسته - پوسته به منظور استخراج گزینشی مترونیدازول از مایعات بیولوژیکی: ایزوترم‌ها و سینتیک

راحله سنجرى<sup>۱</sup>، مهدی انصاری<sup>۲</sup>، مریم کاظمی پور<sup>۳\*</sup>، لیلا زیدآبادی<sup>۴</sup>

۱- دانشجوی دکتری، گروه شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان، کرمان، ایران

۲- استاد، گروه کنترل غذا و دارو، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

۳- استاد، گروه شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان، کرمان، ایران

۴- استادیار، گروه شیمی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

\* نویسنده مسئول: m.kazemipour@iauk.ac.ir

دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۵/۲۸، پذیرش مقاله: ۱۴۰۱/۶/۱۳

### چکیده

در این مطالعه، پلیمر قالب مولکولی مغناطیسی جهت استخراج انتخابی داروی مترونیدازول از نمونه پلاسما سنتز گردید. برای انتخاب مناسب‌ترین مونومر و حلال پلیمریزاسیون در سنتز مترونیدازول از یک روش محاسباتی مبتنی بر تئوری مکانیک کوانتوم برای محاسبه انرژی پیوند بین مولکول‌های مونومر و آنالیت استفاده گردید. این محاسبات بر پایه مقایسه انرژی‌های حالت پایه مونومرها و آنالیت و کمپلکس‌های حاصل بین آنالیت و مونومرهای عاملی بدست آمده توسط تئوری تابعی چگالی می‌باشد. نقش حلال پلیمریزاسیون با استفاده از مدل قطبیده یکپارچه مطالعه گردید. ابتدا تمامی ساختارها به صورت مجزا و در حالت کمپلکس با استفاده از نرم‌افزار گوس ویو رسم شدند. ساختارهای رسم شده با محاسبات تئوری تابعی چگالی در سطح B3LYP و مجموعه پایه (d) 3-11 G-6 بهینه شده‌اند. خروجی‌ها برای تعیین برهمکنش‌های هیدروژنی با استفاده از مکانیک کوانتومی و تحلیل اوربیتال پیوند طبیعی مورد بررسی قرار گرفت. مشخصات پلیمرهای به دست آمده از طریق آزمون‌های طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه، پراش پرتو ایکس، مغناطیس‌سنجی ارتعاشی نمونه و میکروسکوپ الکترونی تعیین گردید. مکانیسم برداشت داروها به وسیله ایزوترم‌های لانگمویر و فروندلیخ ارزیابی گردید. این قالب‌های پلیمری به عنوان یک جاذب انتخابی برای استخراج مترونیدازول و آنالیز توسط کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا استفاده شد. نتایج محاسبات مشخص کرد که مناسب‌ترین مونومر، حلال و عامل شبکه‌ای کننده پلیمریزاسیون برای تهیه پلیمر قالب مولکولی مترونیدازول، حلال اتکتیک، اتانول، اتیلن گلیکول دی‌متاکریلات است. پلیمر قالب مولکولی مغناطیسی مترونیدازول با استفاده از حلال اتکتیک به عنوان مونومر مناسب در حلال و پلیمریزاسیون اتانول در حضور نانوذرات مگنتیت عامل دار شده با گروه‌های آمینی سنتز گردید. برای مترونیدازول در پلاسما خطی بودن بین پاسخ‌ها (سطح زیر پیک) و غلظت در محدود ۱۰-۰/۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر با ضریب رگرسیون خطی  $R^2 = 0/992$  به دست آمدند. حد تشخیص (LOD) و حد قابل اندازه‌گیری (LOQ) برای مترونیدازول در پلاسما به ترتیب ۱/۲ و ۵/۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. ایزوترم‌های جذبی نشان دادند که پدیده‌ی جذب از مدل فروندلیخ تبعیت می‌کند. مطالعات سینتیکی نشان دادند که فرآیند جذب از سینتیک شبه مرتبه‌ی دوم تبعیت می‌کند. در نهایت پلیمر سنتز شده به طور موفقیت‌آمیزی به منظور استخراج و اندازه‌گیری مترونیدازول در پلاسما با موفقیت بکار برده شد.

واژه‌های کلیدی: پلیمر قالب مولکولی مغناطیسی، حلال‌های اتکتیک، محاسبات تئوری تابعی چگالی، مترونیدازول

### مقدمه

واقع در میان فرآیندهای تجزیه‌ای از قبیل نمونه‌برداری، آماده‌سازی نمونه، جداسازی، شناسایی و آنالیز داده‌ها، آماده‌سازی نمونه به منظور جداسازی گونه‌های مورد نظر از بافت‌های پیچیده بسیار مهم بوده و بر روی صحت و اعتبار نتایج آنالیزها تاثیر مستقیم دارد. بیش از ۸۰٪ زمان آنالیز عموماً صرف مراحل نمونه‌برداری و آماده‌سازی نمونه شامل استخراج، تغلیظ و جداسازی گونه‌ها می‌شود. بنابراین آماده‌سازی نمونه به عنوان گلوگاه اصلی یک

علم شیمی تجزیه روش‌های متنوعی را برای آنالیز کمی و کیفی مواد ارائه می‌دهد. امروزه روش‌های جداسازی، تفکیک گونه‌های موجود در بافت‌های پیچیده را با حد تشخیصی در حد خیلی کم مقدر ساخته است. علاوه بر روش‌های جداسازی، مرحله‌ی آماده‌سازی نمونه نیز یکی از مهم‌ترین مراحل در روند تجزیه می‌باشد. در

وجود بسترهای فاز جامد مرسوم مانند C<sub>8</sub>، C<sub>18</sub>، سیلیکا ژل، آلومینا و پلیمرها براساس جذب آنالیت با برهم کنش غیر ویژه<sup>۶</sup> و فاقد انتخاب‌گری می‌باشند، که سبب استخراج هم‌زمان گونه‌های تداخل‌کننده‌ی ماتریکس با آنالیت‌های هدف می‌شوند. استفاده از پلیمرهای قالب مولکولی به عنوان مواد جاذب اختصاصی این امکان را فراهم می‌کنند که یک مرحله استخراج اختصاصی نمونه قبل از تشخیص و تعیین میزان نهایی اجرا شود به همین دلیل این روش استخراج فاز جامد بر پایه‌ی پلیمرهای قالب مولکولی<sup>۷</sup> نامیده شده است، که از پیشرفته‌ترین کاربردهای تکنیکی پلیمرهای قالب مولکولی است. تحقیقات زیادی تا به امروز برای جداسازی و تمیزسازی<sup>۸</sup> آنالیت‌های گوناگون از ماتریکس‌های متفاوت بر پایه استخراج فاز جامد بر اساس انتخاب‌گری پلیمرهای قالب مولکولی انجام شده است [۶،۷].

پلیمرهای قالب مولکولی، ترکیبات سنتزی می‌باشند و دارای نقاط شناسایی هستند که به صورت مصنوعی شکل گرفته‌اند. این مواد قادر به اتصال اختصاصی و اولویت‌دار به مولکول هدف در مقایسه با سایر ترکیبات نزدیک به آن از نظر ساختاری می‌باشند. پلیمرهای قالب مولکولی از طریق پلیمریزاسیون گروه‌های عاملی مونومرها و ایجاد پیوندهای عرضی بین آن‌ها در اطراف مولکول الگو بوجود می‌آیند، که به این ترتیب یک شبکه‌ی پلیمری سه‌بعدی با پیوندهای عرضی فراوان ایجاد می‌شود. مونومرهای مورد استفاده در ساخت این پلیمرها، با در نظر گرفتن توانایی آن‌ها در برهم‌کنش با گروه‌های عاملی آنالیت هدف، انتخاب می‌شوند. پلیمرهای قالب مولکولی به دست آمده پایدار، مستحکم و مقاوم به محدوده‌ی وسیعی از pH، دما و حلال‌ها می‌باشند. رفتار پلیمرهای قالب مولکولی از برهم‌کنش‌های ایجاد شده میان گروه‌های عاملی طبیعی آن در نقاط اتصال با مولکول هدف تعیین می‌شود. به این ترتیب به صورت انتخابی و مانند اتصال آنتی‌بادی به آنتی‌ژن مولکول هدف را در خود حفظ می‌کند. علاوه بر این باید این نکته‌ی مهم را خاطر نشان ساخت که

فرآیند تجزیه‌ای بسیار مورد اهمیت است. این مرحله شامل تبدیل بافت یک نمونه حقیقی به حالتی است که برای تجزیه با یک تکنیک جداسازی و یا روش‌های دیگر مناسب باشد. می‌توان گفت مرحله آماده‌سازی نمونه برای رسیدن به اهداف زیر طراحی شده است:

- ۱) حذف مزاحمت‌ها از نمونه به منظور افزایش گزینش-پذیری روش
  - ۲) پیش‌تغلیظ آنالیت مورد نظر و افزایش غلظت آن به نحوی که بتوان آن را با دستگاه‌های تجزیه‌ای اندازه‌گیری کرد.
  - ۳) تبدیل آنالیت‌ها به فرمی که برای شناسایی با دستگاه تجزیه‌ای مناسب باشد.
  - ۴) ایجاد یک روش مطمئن و تکرارپذیر مستقل، از تنوع موجود در بافت نمونه‌های مورد بررسی
- روش‌های آماده‌سازی که در گذشته کاربرد داشته‌اند، به دلیل استفاده از مقادیر زیاد حلال‌های آلی باعث آلودگی‌های زیست محیطی شده که این آلودگی‌ها خود خطر ابتلا به سرطان را افزایش داده و منجر به تخریب لایه‌ی اوزون می‌گردد. لذا روش‌هایی با مصرف حلال کمتر، مانند استخراج با فاز جامد، استخراج با آب داغ، استخراج به کمک مایکروویو و انواع روش‌های میکرواستخراج به عنوان روش‌های جایگزین مطرح شده‌اند. بدیهی است که روش‌های قدیمی آماده‌سازی نمونه از جمله، استخراج مایع-مایع<sup>۱</sup> و استخراج فاز جامد قادر<sup>۲</sup> به تأمین اغلب نیازهای فعلی نیست و طی سال‌های اخیر روش‌های استخراج جدیدی مانند: میکرواستخراج فاز جامد<sup>۳</sup> و میکرواستخراج فاز مایع<sup>۴</sup> به طور گسترده در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی استفاده می‌شوند که اهمیت آماده‌سازی نمونه در همه‌ی فرآیندهای تجزیه‌ای را به صورت برجسته مشخص می‌کند [۱-۳]. از گذشته دور استخراج فاز جامد به صورت گسترده برای استخراج مقادیر بسیار کم<sup>۵</sup> ترکیبات آلی و معدنی گوناگون از نمونه‌های محیطی به کار گرفته شده است [۴،۵]. با این

<sup>۱</sup> -Liquid-liquid extraction (LLE)

<sup>۲</sup> -Solid Phase Extraction (SPE)

<sup>۳</sup> -Solid phase microextraction (SPME)

<sup>۴</sup> -Liquid phase microextraction (LPME)

<sup>۵</sup> -Trace

<sup>۶</sup> -Non-specific interaction

<sup>۷</sup> -Molecularly imprinted solid phase extraction

(MISPE)

<sup>۸</sup> -Clean-up

سنتر شده در استخراج انتخابی استفاده خواهد شد و همچنین در ادامه ایزوترم‌های جذبی و سینتیک جذب مورد بررسی قرار خواهند گرفت.

## بخش تجربی

### مواد و تجهیزات

اطلاعات مربوط به مواد شیمیایی و تجهیزات مورد استفاده در این پژوهش به ترتیب در جدول‌های (۱) و (۲) آورده شده است. دستگاه مغناطیس‌سنج نمونه ارتعاشی<sup>۲</sup>، جهت اندازه‌گیری خواص مغناطیسی ماده مغناطیسی مورد استفاده قرار گرفت. آنالیز طیف‌بینی مادون قرمز تبدیل فوریه (FT-IR) به منظور بررسی و تعیین گروه‌های عاملی موجود در نانومواد سنتر شده و همچنین بررسی برهمکنش‌های مولکول هدف با مونومرهای عاملی انجام شد. به منظور شناسایی سایز و مورفولوژی نانوذرات مغناطیسی و نانوذرات پلیمری پوسته- هسته از میکروسکوپ الکترونی گسیل میدانی<sup>۳</sup> استفاده شد. از دستگاه پراش اشعه ایکس<sup>۴</sup> نیز برای بررسی نوع فازهای تشکیل دهنده نانو ذرات  $Fe_3O_4$  و نانوذرات پلیمری هسته - پوسته استفاده شد.

ساختن پلیمرهای قالب مولکولی ارزان و ساده است و به این ترتیب پلیمرهای قالب مولکولی می‌توانند جایگزین گیرنده‌های طبیعی گردند. لذا به کارگیری پلیمرهای قالب مولکولی در استخراج نیاز به استفاده از دستگاه‌هایی گران قیمتی نظیر LC/MS/MS و LC/MS را برطرف نموده و امکان استفاده از دستگاه‌های معمول و در دسترس نظیر HPLC با آشکارساز UV را فراهم می‌کند. از طرف دیگر به دلیل استخراج انتخابی مزاحمت ناشی از بافت نمونه به طور کامل برطرف خواهد شد. در سنتر پلیمر قالب مولکولی، باید دقت شود که نسبت مناسبی از هر یک از اجزاء سازنده پلیمر انتخاب شود تا انتخاب‌گری و ظرفیت جذب آن به بیشینه مقدار خود برسد [۸].

پلیمرهای قالب مولکولی جهت استخراج انتخابی طیف گسترده‌ای از ترکیبات دارویی [۹]، آلاینده‌های آلی [۱۰] و سموم [۱۱] مورد استفاده قرار گرفته‌اند. با این حال زمینه‌ی پلیمرهای قالب مولکولی با خاصیت مغناطیسی زمینه‌ای کاملاً رو به رشد بوده و امکان استخراج‌های سریع‌تر را فراهم کرده چرا که این پلیمرها به راحتی و با به کارگیری با یک میدان مغناطیسی خارجی قابل جداسازی از محلول‌اند.

هدف اصلی این تحقیق ارائه یک روش استخراجی ساده، سریع، کارآمد و با دقت و صحت و گزینش‌پذیری بالا جهت تعیین مقادیر کم داروی مترونیدازول در مایعات بیولوژیکی می‌باشد. این روش می‌تواند به عنوان روشی ساده، آسان و سریع برای شناسایی و اندازه‌گیری داروی مورد نظر بکار رود. در واقع استفاده از پلیمر قالب مولکولی مغناطیسی در این روش از طرفی منجر به تمیزسازی بیشتر نمونه‌های با بافت پیچیده نظیر پلاسما و ادرار خواهد شد و از طرف دیگر منجر به گزینش‌پذیری بالای روش می‌گردد. لازم به ذکر است که روش استخراج فاز جامد بر پایه پلیمر قالب مولکولی<sup>۱</sup> (MISPE) تاکنون جهت استخراج و اندازه‌گیری داروی مترونیدازول مورد استفاده قرار نگرفته است. به عنوان هدف دیگر، در ابتدا با استفاده از روش‌های طراحی کامپیوتری نسبت‌های مناسب از واکنشگرها به دست خواهند آمد تا بهترین شرایط پلیمریزاسیون فراهم گردد. در ادامه از پلیمرهای

<sup>2</sup>- Vibrating Sample Manometer

<sup>3</sup>- Field emission scanning electron microscope

<sup>4</sup>- X-ray Diffraction

<sup>1</sup>-Molecularly imprinted solid phase extraction

جدول ۱- مواد شیمیایی مورد استفاده در پژوهش

کشور سازنده	شرکت سازنده	فرمول	اختصار	ماده شیمیایی
ایران	ایران دارو	$C_6H_9N_3O_3$	MET	مترونیدازول
آمریکا	Sigma Aldrich	$C_5H_{14}ClNO$	ChCl	کولین کلراید
آلمان	Merck	$C_2H_6O_2$	EG	اتیلن گلیکول
آمریکا	Sigma Aldrich	$C_4H_6O_2$	MA	متاکریلیک اسید
آمریکا	Sigma Aldrich	$C_{10}H_{14}O_4$	EGDMA	اتیلن گلیکول دی متاکریلات
آمریکا	Sigma Algrich	$C_8H_{12}N_4$	AIBN	۲، ۲- آزویس ایزوبوتیل نیتریل
آلمان	Merck	$C_2H_5OH$		اتانول
آلمان	Merck	$CH_3OH$		متانول
آلمان	Merck	$CH_3CN$		استونیتریل
آلمان	Merck	$Fe_3O_4$		مگنتیت
آلمان	Merck	$C_2H_8O$		ایزوپروپانول
آلمان	Merck	$NH_4OH$		آمونیم هیدروکسید
آلمان	Merck	$Sic_8H_{20}O_4$		تتراتیل اورتو سیلیکات
آلمان	Merck	$FeCl_2 \cdot 4H_2O$		کلرید آهن (II) چهار آبه
آلمان	Merck	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$		کلرید آهن (III) شش آبه

جدول ۲- تجهیزات مورد استفاده در پژوهش

کشور سازنده	شرکت سازنده	مدل	دستگاه
آلمان	Agilent	Technologies series Agilent 1200	کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا
آلمان	Agilent	XDB-C18	ستون HPLC ( $50 \times 4.6mm, id 1.8\mu m$ )
آلمان	ZEISS	SIGMA VP	میکروسکوپ الکترونی گسیل میدانی (FE-SEM)
آلمان	STOE	IPDS 2T	پراش اشعه ایکس
ایران		MDK	مغناطیس سنج نمونه مرتعش (VSM)
ایران		3491	آون
سوئیس	Mettler	College 150	ترازوی دیجیتال با دقت ۴ رقم اعشار
آمریکا	PerkinElmer	Lambda25	دستگاه اسپکتروفتومتر UV-VIS
ایتالیا	EVISA	ALC 4232	سانتریفیوژ
اسپانیا	Selecta	3000865	اولتراسونیک
آلمان	Heidolph	3001K	همزن مغناطیسی
چین	Golden Sagi	SPN-300	نیترژن ژنراتور
چین	Golden Sagi	SPN-30	ژنراتور هوا
آلمان	Alpha	Bruker	طیف سنج مادون قرمز

## محلول سازی

به منظور تهیه محلول ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر از مترونیدازول، دقیقاً مقدار ۰/۰۱ گرم از مترونیدازول در اتانول حل شد و در یک بالن ۱۰۰ میلی لیتری به حجم رسانده شد. محلول حاصل در دمای چهار درجه سانتی-گراد نگهداری گردید. برای تهیه محلول های رقیق تر حجم خاصی از محلول استاندارد استفاده گردید.

## محاسبات مکانیک کوانتوم

عملکرد و گزینش پذیری پلیمرهای قالب مولکولی شدیداً به ساختمان آن ها بستگی دارد. لذا اجزاء شرکت کننده در پلیمریزاسیون نظیر نوع و مقدار مونومر و نوع حلال و مقدار عامل شبکه‌ای کننده با استفاده از محاسبات مکانیک کوانتومی و آغازگر با توجه به شرایط پلیمریزاسیون و خصوصیات شیمیایی مولکول الگو انتخاب می‌شوند. محاسبات مکانیک کوانتوم بر پایه اب اینیشیو<sup>۱</sup> جهت اندازه‌گیری انرژی حالت پایه الکترونی کمپلکس‌های مولکول الگو- مونومر مورد استفاده قرار گرفت، محاسبات اب اینیشیو همچنین نقش حلال را در تشکیل کمپلکس مولکول الگو- مونومر بیان می‌کند. تمامی محاسبات انرژی الکترونی با استفاده از روش DFT در سطح E3LYP و مجموعه پایه 6-311G(d) انجام گرفت که شامل توابع قطبیده d برای اتم‌های کربن، نیتروژن و اکسیژن است.

## انتخاب نظری نوع و نسبت مونومر

برای بررسی برهمکنش مولکول الگو و مونومرها ابتدا با استفاده از نرم افزار گوس ویو ۵/۰۸ ساختار مولکول الگو و مونومرها را رسم کرده و این ساختارها به عنوان فایل ورودی به نرم افزار گوسین داده شد. سپس مولکول الگو و مونومرها به طور جداگانه توسط گوسین از نظر ساختار فضائی و هندسی بهینه گردیدند. هدف از بهینه‌سازی پیدا کردن پایدارترین کانفورماسیون مولکول ها می‌باشد. در مرحله بعدی با استفاده از ساختار بهینه شده مترونیدازول و مونومرها و به کمک نرم افزار گووس ویو ساختار

کمپلکس‌های (مترونیدازول - مونومر) با نسبت‌های مختلف ترسیم و به عنوان فایل ورودی به نرم افزار گوسین داده شد تا ساختار کمپلکس‌ها از نظر فضایی و الکترونی بهینه گردد و انرژی کمپلکس‌های (مترونیدازول - مونومر) در فاز گازی با نسبت‌های ۱:۱، ۱:۲، ۱:۳، ۱:۴، ۱:۵ و ۱:۶ به دست آمد. در نهایت انرژی برهمکنش ( $\Delta E$ ) پایدارترین کمپلکس‌های مولکول الگو - مونومر با نسبت‌های مولی مختلف، از طریق رابطه ۱ محاسبه گردید.

رابطه ۱

$$\Delta E = E_{(\text{template-monomer complex})} - [E_{(\text{template})} + nE_{(\text{monomer})}]$$

طبق معادله فوق  $\Delta E$  بیانگر انرژی برهمکنش کمپلکس الگو- مونومر،  $E_{(\text{template-monomer complex})}$  بیانگر انرژی کمپلکس الگو- مونومر،  $E_{(\text{template})}$  انرژی الگو و  $nE_{(\text{monomer})}$  مجموع انرژی مونومرهای استفاده شده در کمپلکس می‌باشد [۱۵-۱۲].

## انتخاب نوع حلال پلیمریزاسیون

حلال پلیمریزاسیون نقش مهمی را در سنتز و کارایی MIP دارد. با توجه به اینکه فرآیند پلیمریزاسیون در فاز محلول انجام می‌گیرد، بایستی اثر حلال پلیمریزاسیون در محاسبات انرژی در نظر گرفته شود، زیرا حلال سبب تغییر در انرژی و پایداری کمپلکس‌های دارو - مونومر می‌گردد. روش‌هایی که جهت ارزیابی اثر حلال به کار گرفته می‌شوند به دو دسته اصلی تقسیم می‌گردند: دسته اول مولکول‌های حلال را به طور مجزا در نظر گرفته و دسته دوم حلال را به عنوان یک محیط یکپارچه در نظر می‌گیرند. مدل‌های یکپارچه که متداول تر بوده، حلال را به صورت یک محیط قطبیده یکنواخت<sup>۲</sup> با یک ثابت دی-الکتریک خاص در نظر گرفته که ماده حل‌شونده به شکل یک حفره در داخل آن قرار می‌گیرد. در این مطالعه جهت بررسی اثر حلال در محاسبات انرژی و بدست آوردن بهترین حلال پلیمریزاسیون از مدل PCM استفاده گردید.

<sup>2</sup>- Uniform Polarizable Medium (PCM)

<sup>1</sup>- Ab initio

قطره قطره اضافه گردید. پس از آن ذرات با استفاده از آهن ربا جمع آوری شدند. رسوب سیاه با استفاده از آب مقطر  $pH7$  چندین مرحله شستشو شده و مرحله آخر شستشو ذرات با اتانول انجام شد. پس از شستشو نانوذرات آهن در دمای  $60^\circ C$  درجه سانتی گراد برای ۱۲ ساعت قرار داده شد.

## آمین دار کردن نانو ذرات آهن



بدین منظور دو گرم از نانوذرات آهن به  $75$  میلی لیتر مخلوط ایزوپروپانول و  $15$  میلی لیتر آب دیونیزه اضافه گردید و اجازه داده شد تا مخلوط با سرعت  $300$  دور بر دقیقه هم زده شود. سپس تحت شرایط هم زدن  $15$  میلی لیتر آمونیوم هیدروکساید جهت تنظیم  $pH$  استفاده شد و پس از آن  $5$  میلی لیتر TEOS اضافه شد و در نهایت  $12$  ساعت در دمای اتاق تحت شرایط هم زدن باقی ماند و در پایان رسوب سیاه رنگ با آب مقطر و متانول ترکیب شد و  $15$  قطره MPS اضافه شده و به مدت  $22$  ساعت هم زده شد. در نهایت رسوب بدست آمده با متانول شسته شده و درون آن با دمای  $40^\circ C$  درجه سانتی گراد خشک گردید.

## سنتز نانوذرات $Fe_3O_4@SiO_2 - NH_2$

### MIP به روش پلیمریزاسیون هسته - پوسته

در ابتدا  $0.6$  گرم  $Fe_3O_4@SiO_2 - NH_2$  به  $0.71$  گرم مترونیدازول و نسبت مولی  $2:6:6$  حلال اتکتیک که در  $2$  میلی لیتر اتانول حل شده اضافه گردید و به مدت  $15$  دقیقه اولتراسونیک شد. در ادامه مخلوط به مدت  $3$  ساعت تحت هم زدن ملایم قرار گرفت تا در این شرایط مونومر عاملی و مترونیدازول فرصت کافی برای تشکیل کمپلکس را داشته باشند. سپس  $1.18$  میلی لیتر اتیلن گلیکول دی متاکریلات و  $0.49$  گرم AIBN به مخلوط واکنش اضافه شد. محتویات ظرف به یک لوله آزمایش انتقال داده شده و سپس به مدت  $2$  دقیقه تحت گاز نیتروژن قرار گرفت تا اکسیژن حذف گردد. سپس درب لوله آزمایش را محکم بسته و در حمام آب گرم در دمای  $70^\circ C$  درجه سانتی گراد و به مدت  $20$  ساعت قرار داده شد. پس از

انرژی ساختارها در حلال های مختلف از محاسبات مکانیک اب- اینیشیو بر پایه DFT در سطح B3LYP و مجموعه پایه 6-311G(d) استفاده گردید و جهت بررسی اثر حلال مدل PCM را به عنوان مدل حلال به فایل ورودی گوسین اضافه کرده و انرژی در حلال های انتخابی به طور مجزا محاسبه شدند. انرژی حلال با استفاده از رابطه ۲ محاسبه می گردد.

رابطه ۲

$$\Delta E(\text{solvent energy}) = \Delta E_1 - \Delta E_2$$

## انتخاب نوع عامل شبکه ای کننده

در روش قالب گیری مولکولی عمدتاً از سه نوع عامل شبکه ای کننده استفاده می شود که عبارتند از EGDMA، TRIM و DVB. با توجه به انعطاف پذیری کم MIP های تهیه شده با DVB که انتقال مولکول الگو را از ماتریکس پلیمر با مشکل مواجه می نماید، EGDMA به عنوان عامل شبکه ای کننده انتخاب شد. نسبت مولی مونومر عاملی به عامل شبکه ای کننده نیز با استفاده از محاسبات مکانیک کوانتوم بهینه شد تا سایز و اندازه پلیمر همگن باشد. زیرا عامل شبکه ای کننده سبب پایداری مکانیکی MIP و ایجاد ساختار سه بعدی سایت های اتصال بعد از برداشتن مولکول الگو از MIP می گردند. این در حالی است که هیچ برهمکنشی بین عامل شبکه ای کننده و مولکول الگو مشاهده نمی شود. برای به دست آوردن انرژی کمپلکس مترونیدازول و مونومر عاملی و اتیلن گلیکول دی- متاکریلات محاسبات مکانیک بر پایه DFT در سطح B3LYP و مجموعه پایه ای 6-311G(d) انجام شد [۱۶].

## سنتز نانوجاذب مغناطیسی

### سنتز نانوذرات آهن $Fe_3O_4$

$3/9$  گرم  $FeCl_2 \cdot 4H_2O$  و  $10/8$  گرم  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  به  $160$  میلی لیتر آب دیونیزه در یک بالن سه دهانه اضافه گردید. سپس محلول با سرعت ملایم جهت همگن شدن تحت شرایط دمای  $80^\circ C$  درجه سانتی گراد قرار گرفت و در ادامه  $30$  میلی لیتر محلول آمونیوم هیدروکسید به صورت

سینتیک جذب مترونیدازول در سایت‌های فعال جاذب در مدت زمان ۲ تا ۱۵ دقیقه با استفاده از محلول ۸ میلی گرم بر لیتر تحت شرایط بهینه استخراج بررسی شد و سرعت جذب بر اساس معادلات سینتیکی شبه درجه یک و شبه درجه دو تعیین شد.

## بحث و نتیجه‌گیری

### شبیه‌سازی کامپیوتری

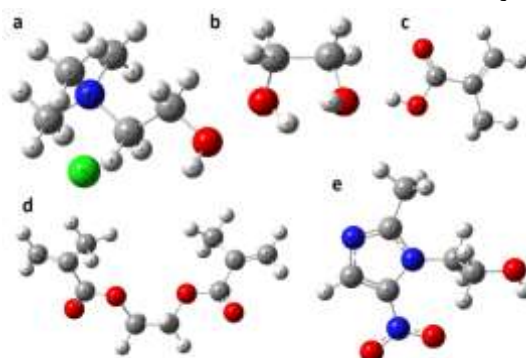
به منظور سنتز پلیمر با بیشترین ظرفیت جذب و بیشترین گزینش‌پذیری لازم است تا نسبت دقیقی از هر یک از مواد شرکت‌کننده در پلیمریزاسیون تعیین گردد. علاوه بر این، نوع حلال پلیمریزاسیون تأثیر بسیاری زیادی در گزینش‌پذیری و ظرفیت استخراج پلیمر دارد، لذا در این مطالعه تمام فاکتورهای ذکر شده با روش‌های محاسباتی مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور ابتدا ساختار مونومر عامل (DES) و مترونیدازول بهینه شد (شکل ۱) و سپس پایدارترین ساختارهای مترونیدازول و مونومر عاملی و عامل شبکه‌ای کننده بهینه شد (شکل-های ۲ تا ۴).

با استفاده از اوربیتال‌های پیوندی طبیعی مکان‌هایی که توانایی تشکیل پیوند هیدروژنی و برهمکنش را دارند شناسایی شدند (شکل ۵).

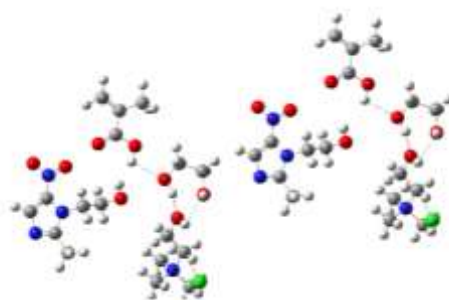
کامل شدن فرآیند پلیمریزاسیون، ذرات پلیمری جهت شستشو درون سوکسله قرار داده شد. مرحله شستشو ۵ مرتبه تکرار شد تا اینکه مقدار جذب محلول رویی ذرات جدا شده با آهن‌ربا توسط اسپکتروفتومتر مرئی - ماوراء-بنفش در طول موج ۳۱۹ نانومتر به صفر برسد. مرحله بعد، شستشو نانوذرات  $Fe_3O_4@SiO_2 - NH_2 - MIP$  با آب دیونیزه است و شستشو مانند مرحله قبل انجام شد. سپس نانوذرات  $Fe_3O_4@SiO_2 - NH_2 - MIP$  توسط آهن‌ربا جمع‌آوری شده و خشک شدند. برای اثبات تشکیل پلیمر و قرار گرفتن مولکول هدف در ساختار پلیمر از طیف‌سنجی FT-IR استفاده شد. همچنین برای تعیین اندازه ذرات پلیمر و بررسی مورفولوژی آن از میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی (FESEM) استفاده شده و تکنیک پراش اشعه ایکس جهت بررسی فازی ساختار پلیمر به کار گرفته شد.

### بررسی ایزوترم‌های جذبی و سینتیک جذب

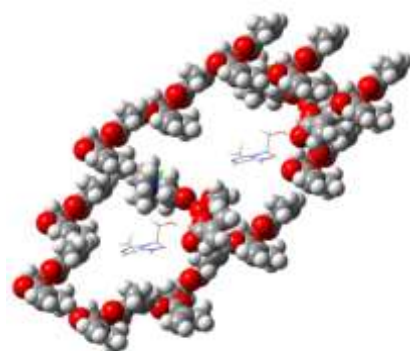
ایزوترم‌های جذبی به طور گسترده‌ای به منظور بررسی میزان آنالیت جذب شده به ازای جرم واحد جاذب (یک گرم) و غلظت تعادلی آن به کار می‌روند. بدین منظور محلول‌های مختلفی از مترونیدازول در محدوده‌ی غلظتی  $1-2 \text{ mg L}^{-1}$  همراه با  $0.02$  گرم از پلیمر قالب مولکولی در زمان ۱۵ دقیقه در تماس با هم قرار داده شد. بر این اساس، داده‌های حاصل با فرم خطی ایزوترم‌های لانگمویر و فرن‌دلیچ مورد بررسی قرار گرفت.



شکل ۱- ساختار هندسی بهینه شده اجزای پلیمر قالب مولکولی (a) کولین کلراید (b) اتیلن گلیکول (c) متاکریلیک اسید (e) EGDMA (d) مترونیدازول



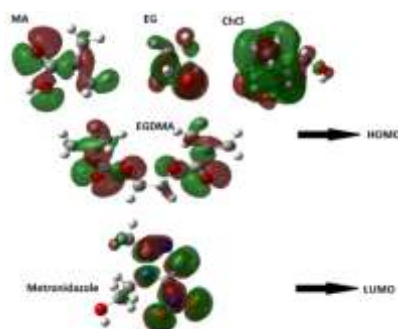
شکل ۲- پایدارترین ساختار  $(MET)_2 - (DES)_2$



شکل ۳- شبیه‌سازی پایدارترین ساختار  $(MET)_2 - (DES)_2 - (EGDMA)_{11}$



شکل ۴- شبیه‌سازی پایدارترین ساختار  $(DES)_2 - (EGDMA)_{11}$

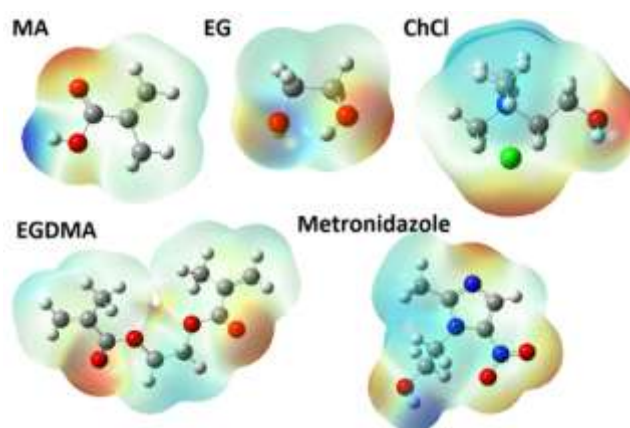


شکل ۵- بالاترین اوبیتال مولکولی اشغال شده برای مترونیدازول و پایین‌ترین اوبیتال اشغال شده برای  $EGDMA, DES$



جدول ۳- انرژی خصوصیات الکترونی نظیر بالاترین و پایین ترین اوربیتال مولکولی اشغال شده، پتانسیل شیمیایی، نرمی شیمیایی و سختی شیمیایی

structure	ELUMO	EHOMO	$\mu$	$\eta$	S	$\omega$
ChCl	۱.۳۹۶۱۴۵	-۱.۷۵۲۵۸	-۰.۱۷۸۲۲	۱.۵۷۳۶۴	۰.۶۳۵۱۷۷	۰.۰۱۰۰۸۷
MA	-۱.۰۵۳۳	-۵.۶۶۱۱۶	-۳.۳۵۷۲۳	۲.۳۰۳۹۳۱	۰.۴۳۴۰۴۱	۲.۴۴۶۰۳۵
EG	۱.۸۹۵۱۷۷	-۵.۰۲۶۲	-۱.۵۶۲۷۲	۳.۴۵۷۸۹۸	۰.۲۸۹۱۹۳	۰.۳۵۳۱۱۹
Met	-۲.۴۰۳۱۹	-۵.۵۴۶۴۲	-۳.۹۷۴۸	۱.۵۷۱۶۱۴	۰.۶۳۶۲۸۹	۵.۰۲۶۳۷۶
EGDMA	-۱.۰۸۰۷۸	-۵.۶۴۲۵	-۳.۳۶۱۶۴	۲.۲۸۰۸۵۸	۰.۴۳۸۴۳۲	۲.۴۷۷۲۷۳



شکل ۶- نقشه هم سطح دمای چگالی الکترونی با سطح انرژی پتانسیل الکترواستاتیک برای متاکرلیک اسید، اتیلن گلیکول، کولین کلراید، EGDMA و مترونیدازول

جدول ۴- انرژی برهمکنش بین مترونیدازول و مونومر عاملی (DES) و اتصال دهنده عرضی بر اساس روش GGA/PW91

Single ring	$\Delta E(\text{kcal mol}^{-1})$	Two ring	$\Delta E(\text{kcal mol}^{-1})$
Met-DES	-۱.۶۱۹۹	(Met) <sub>2</sub> -DES	-۲.۴۱۱۵
Met-DES-(EGDMA) <sub>1</sub>	-۳.۵۸۷۱	(Met) <sub>2</sub> -(DES) <sub>2</sub>	-۴.۶۷۰۱
Met-DES-(EGDMA) <sub>2</sub>	-۵.۶۲۳۱	(Met) <sub>2</sub> -(DES) <sub>2</sub> -(EGDMA) <sub>1</sub>	-۶.۶۰۱۲
Met-DES-(EGDMA) <sub>3</sub>	-۷.۵۰۰۱	(Met) <sub>2</sub> -(DES) <sub>2</sub> -(EGDMA) <sub>2</sub>	-۸.۹۴۳۷
Met-DES-(EGDMA) <sub>4</sub>	-۹.۰۴۴۷	(Met) <sub>2</sub> -(DES) <sub>2</sub> -(EGDMA) <sub>3</sub>	-۱۱.۰۸۷۱
Met-DES-(EGDMA) <sub>5</sub>	-۱۰.۵۷۷۳	(Met) <sub>2</sub> -(DES) <sub>2</sub> -(EGDMA) <sub>4</sub>	-۱۲.۹۵۸۱
Met-DES-(EGDMA) <sub>6</sub>	-۱۰.۵۱۲۳	(Met) <sub>2</sub> -(DES) <sub>2</sub> -(EGDMA) <sub>5</sub>	-۱۴.۶۱۲۳
		(Met) <sub>2</sub> -(DES) <sub>2</sub> -(EGDMA) <sub>6</sub>	-۱۶.۱۷۶
		(Met) <sub>2</sub> -(DES) <sub>2</sub> -(EGDMA) <sub>7</sub>	-۱۷.۳۴۹۰
		(Met) <sub>2</sub> -(DES) <sub>2</sub> -(EGDMA) <sub>8</sub>	-۱۸.۹۱۴۴
		(Met) <sub>2</sub> -(DES) <sub>2</sub> -(EGDMA) <sub>9</sub>	-۲۰.۴۷۰۱
		(Met) <sub>2</sub> -(DES) <sub>2</sub> -(EGDMA) <sub>10</sub>	-۲۱.۷۰۲۵
		(Met) <sub>2</sub> -(DES) <sub>2</sub> -(EGDMA) <sub>11</sub>	-۲۳.۴۱۲۸
		(Met) <sub>2</sub> -(DES) <sub>2</sub> -(EGDMA) <sub>12</sub>	-۲۳.۵۸۸۱

ترتیب که DES شماره‌ی یک پودری و سفید رنگ، DES شماره‌ی دو ژله‌ای و سبز رنگ، DES شماره‌ی ۳ ژله‌ای و بنفش رنگ، و DES شماره‌ی چهار ژله‌ای و سبز رنگ بودند.

به منظور ساخت DES سه جزئی (کولین کلراید - متاکریلیک اسید و اتیلن گلیکول) پیشنهاد داده شد که چهار DES مختلف با نسبت‌های مختلف توسط نرم‌افزار گوسین طراحی شد. برطبق جدول (۵) DES های ساخته شده هر کدام دارای شکل ظاهری مختلفی بوده به این

جدول ۵- فرمول حلال‌های اتکتیک سنتز شده

DES	DES 1	DES 2	DES 3	DES 4
Ternary DES	Chcl:EG:MA	Chcl:EG:CA	Chcl:FA:MA	Chcl:FA:CA
Ratio	6:6:2	6:6:2	6:6:2	6:6:2
شکل ظاهری	پودری سفید	ژله‌ای سبز لجنی	ژله‌ای زرشکی بنفش	ژله‌ای سبز و زرد

شماره یک ساخته شده با DES شماره‌ی یک به عنوان پلیمر اصلی با درصد جذب ۹۲ درصد تأیید و انتخاب شد.

در ادامه و براساس جدول (۶) با چهار DES ساخته شده‌ی مختلف، چهار پلیمر سنتز شده که در نهایت پلیمر

جدول ۶- اطلاعات آماده‌سازی پلیمرهای پیشنهادی و درصد جذب هر یک

Formulation	MIPI	MIP2	MIP3	MIP4
Monomer (DES)	DES1	DES2	DES3	DES4
Crosslinking agent (EGDMA)	5.4 mmol Chcl:EG:MA 6:6:2	5.4 mmol Chcl:EG:CA 6:6:2	5.4 mmol Chcl:EG:MA 6:6:2	5.4 mmol Chcl:EG:CA 6:6:2
Initiator (AIBN)	0.3 mmol	0.3 mmol	0.3 mmol	0.3 mmol
Template (metronidazole)	1.0 mmol	1.0 mmol	1.0 mmol	1.0 mmol
Adsorption (%)	92%	37%	77%	74%

۳۵۰۰ نشان دهنده‌ی تشکیل پیوند هیدروژنی بین منومر و مترونیدازول می‌باشد. پیک‌های موجود در ۹۳۳ و ۱۴۰۵ نیز مربوط به مترونیدازول است و وجود این ماده را در ساختار پلیمر تأیید می‌کند.

جهت بررسی ریخت<sup>۱</sup> و اندازه نانوذرات، تصویر FESEM مربوط به  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ،  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @ $\text{SiO}_2$ - $\text{NH}_2$  و  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @ $\text{SiO}_2$ -MIP بررسی شد. تمامی تصاویر نشان‌دهنده‌ی کروی بودن ذرات بودند. اندازه متوسط نانوذرات  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ،  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @ $\text{SiO}_2$ - $\text{NH}_2$  و  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @ $\text{SiO}_2$ -MIP به ترتیب برابر با ۲۰، ۴۵ و ۸۰ نانومتر می‌باشد. افزایش اندازه ذرات نشان‌دهنده‌ی سنتز موفقیت‌آمیز هر مرحله است. همچنان که در شکل (۸-ج) نشان داده شده است نانوذرات پلیمری دارای ساختار کاملاً همگن می‌باشند.

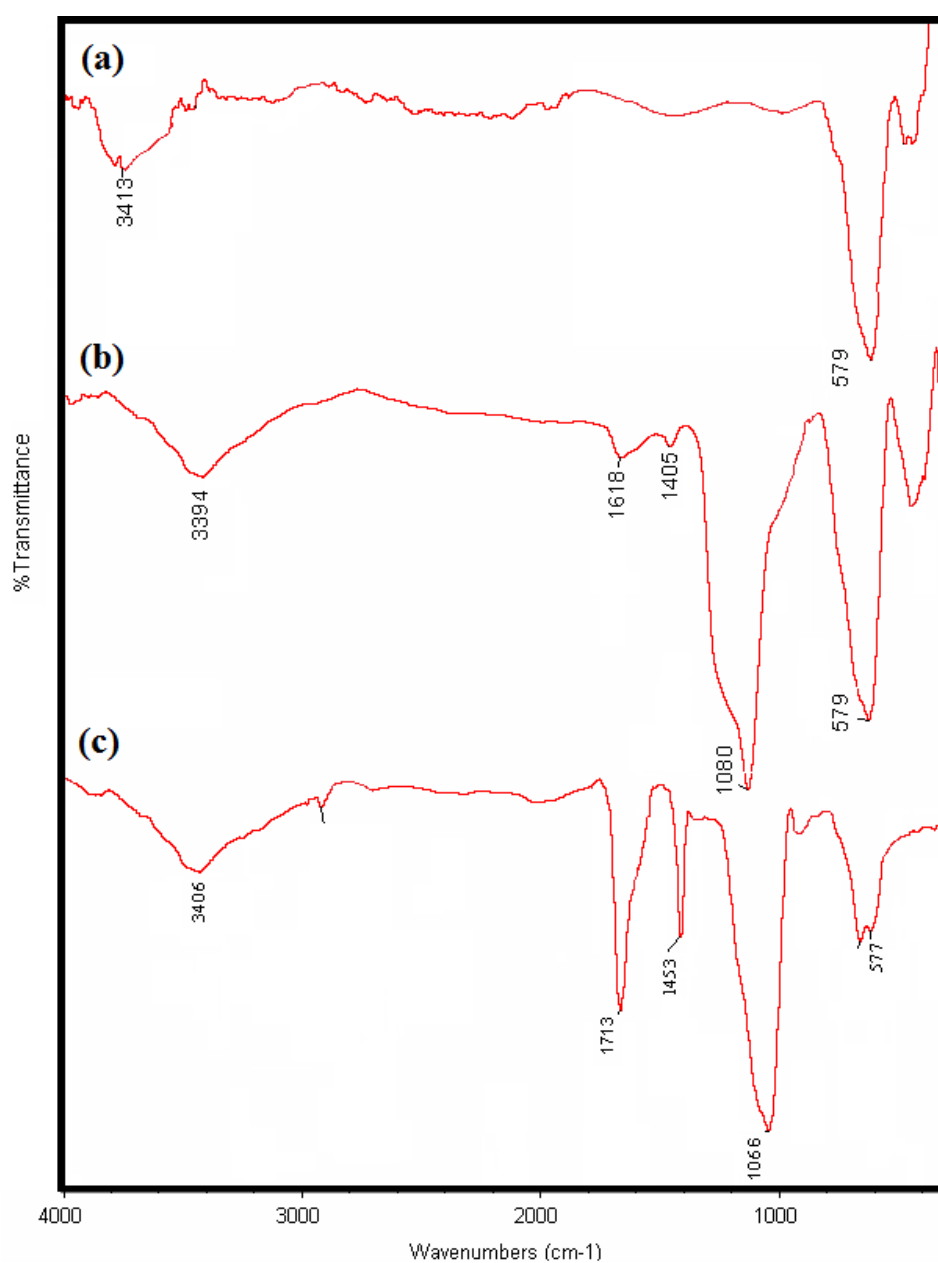
## بررسی ساختار جاذب سنتز شده

به منظور تأیید سنتز جاذب از روش‌های طیف‌بینی زیر قرمز تبدیل فوریه (FT-IR)، پراش پرتو ایکس (XRD)، میکروسکوپی الکترونی روبشی گسیل میدانی (FESEM) و مغناطیس‌سنجی لرزشی نمونه (VSM) استفاده گردید. ابتدا طیف FT-IR مربوط به  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ،  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @ $\text{SiO}_2$ - $\text{NH}_2$  و  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @ $\text{SiO}_2$ -MIP بدست آمد (شکل ۷). پیک‌های موجود در ناحیه ۵۷۰-۵۸۰ در این طیف‌ها نشان‌دهنده‌ی وجود ذرات  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  در ساختار MIP و جاذب‌های واسطه می‌باشد. پیک‌های موجود در ۱۰۸۰ و ۱۰۶۶ مربوط به پیوند Si-O-Si در ساختار  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @ $\text{SiO}_2$ - $\text{NH}_2$  و  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @ $\text{SiO}_2$ -MIP می‌باشد. در طیف  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @ $\text{SiO}_2$ -MIP پیک موجود در ۱۷۱۳ مربوط به گروه کربونیل است و نشان می‌دهد که پلیمر از طریق واکنش آکریلیک اسید و EGDMA سنتز شده است. همچنین، پیک پهن موجود در ناحیه ۳۰۰۰-

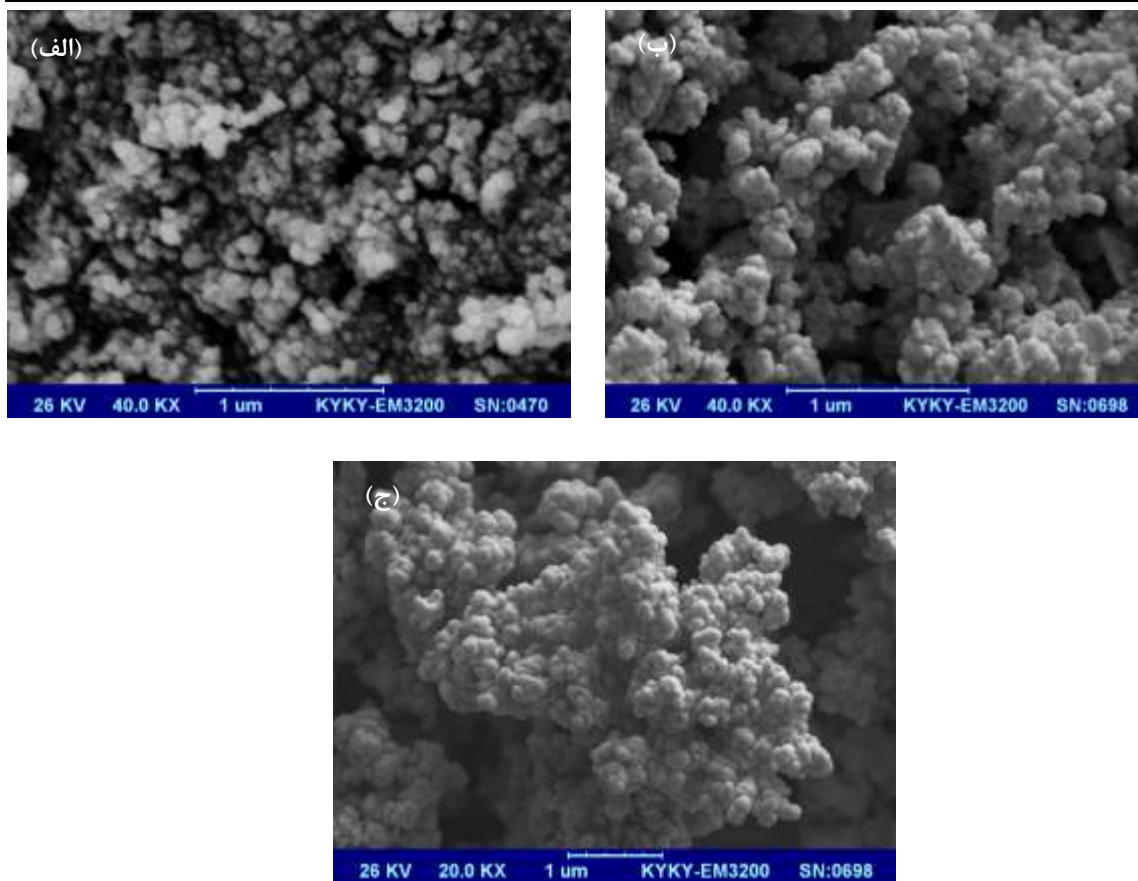
<sup>۱</sup> Morphology

در ادامه تکنیک VSM به منظور بررسی خاصیت مغناطیسی نانوجاذب‌های سنتز شده با به کارگیری میدان مغناطیسی در دمای اتاق استفاده شد. منحنی‌های VSM به دست آمده از مراحل مختلف سنتز نانوجاذب در شکل (۹) نشان داده شده‌اند. نتایج به دست آمده نشان داد که نانوجاذب‌ها خاصیت ابرپارامغناطیسی دارند، چرا که در غیاب میدان مغناطیسی (مبدأ منحنی)، مغناطیس اشباع صفر است. از روی قسمت مسطح منحنی مقدار مغناطیس اشباع برای نانوذرات  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ،  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2\text{-NH}_2$  و  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2\text{-NH}_2\text{-MIP}$  به ترتیب برابر با ۵۴، ۳۸ و ۳۸ emu  $\text{g}^{-1}$  به دست آمد. مقدار مغناطیس اشباع بالای به دست آمده و نیز خاصیت ابرپارامغناطیسی نانوجاذب‌های سنتز شده، قابلیت بالای آن‌ها را در روش‌های آماده‌سازی نمونه نشان می‌دهد زیرا با قرار دادن آهن‌ریا در خارج ظرف استخراج، به راحتی می‌توان جاذب را در زمان کوتاهی جمع‌آوری کرد. همچنین مقدار مغناطیس اشباع بالای به دست آمده نشان دهنده‌ی ساختار بلوری نانوذرات سنتز شده می‌باشد.

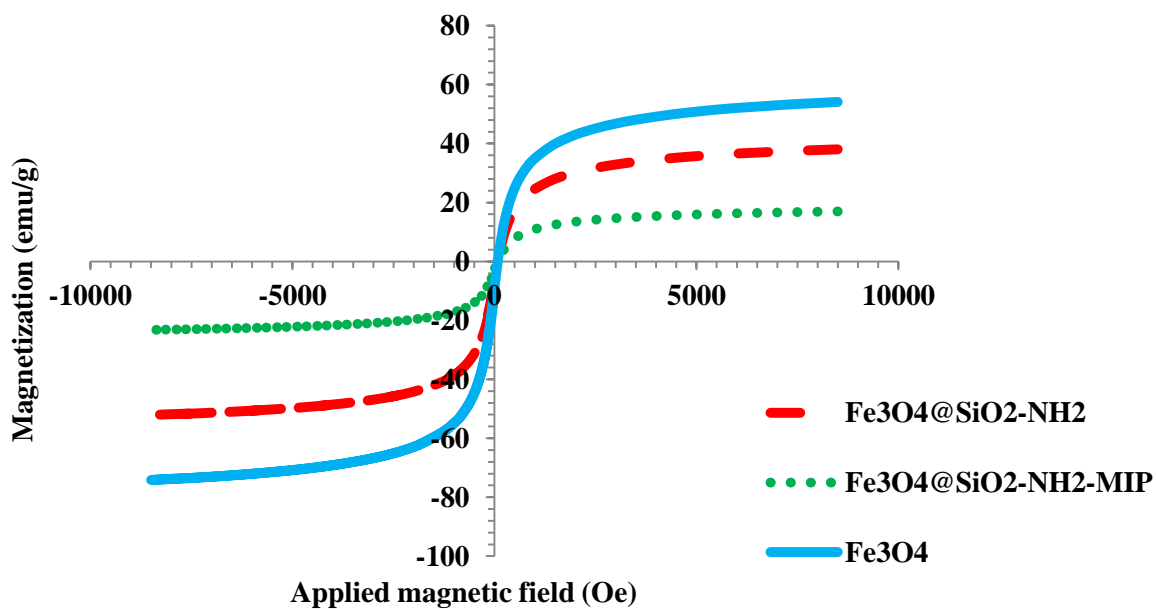
در ادامه تکنیک VSM به منظور بررسی خاصیت مغناطیسی نانوجاذب‌های سنتز شده با به کارگیری میدان مغناطیسی در دمای اتاق استفاده شد. منحنی‌های VSM به دست آمده از مراحل مختلف سنتز نانوجاذب در شکل (۹) نشان داده شده‌اند. نتایج به دست آمده نشان داد که نانوجاذب‌ها خاصیت ابرپارامغناطیسی دارند، چرا که در غیاب میدان مغناطیسی (مبدأ منحنی)، مغناطیس اشباع صفر است. از روی قسمت مسطح منحنی مقدار مغناطیس اشباع برای نانوذرات  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ،  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2\text{-NH}_2$  و  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2\text{-NH}_2\text{-MIP}$  به ترتیب برابر با ۵۴، ۳۸ و ۳۸ emu  $\text{g}^{-1}$  به دست آمد. مقدار مغناطیس اشباع بالای به دست آمده و نیز خاصیت ابرپارامغناطیسی نانوجاذب‌های سنتز شده، قابلیت بالای آن‌ها را در روش‌های آماده‌سازی نمونه نشان می‌دهد زیرا با قرار دادن آهن‌ریا در خارج ظرف استخراج، به راحتی می‌توان جاذب را در زمان کوتاهی جمع‌آوری کرد. همچنین مقدار مغناطیس اشباع بالای به دست آمده نشان دهنده‌ی ساختار بلوری نانوذرات سنتز شده می‌باشد.



شکل ۷- طیف FT-IR (a)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ، (b)  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2\text{-NH}_2$  و (c)  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2\text{-NH}_2\text{-MIP}$



شكل ۸- الف: تصوير FESEM نانوذرات Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, ب: Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> و ج: Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>-MIP



شكل ۹- منحنى هاى VSM از مراحل مختلف سنتز نانوذرات پليمرى

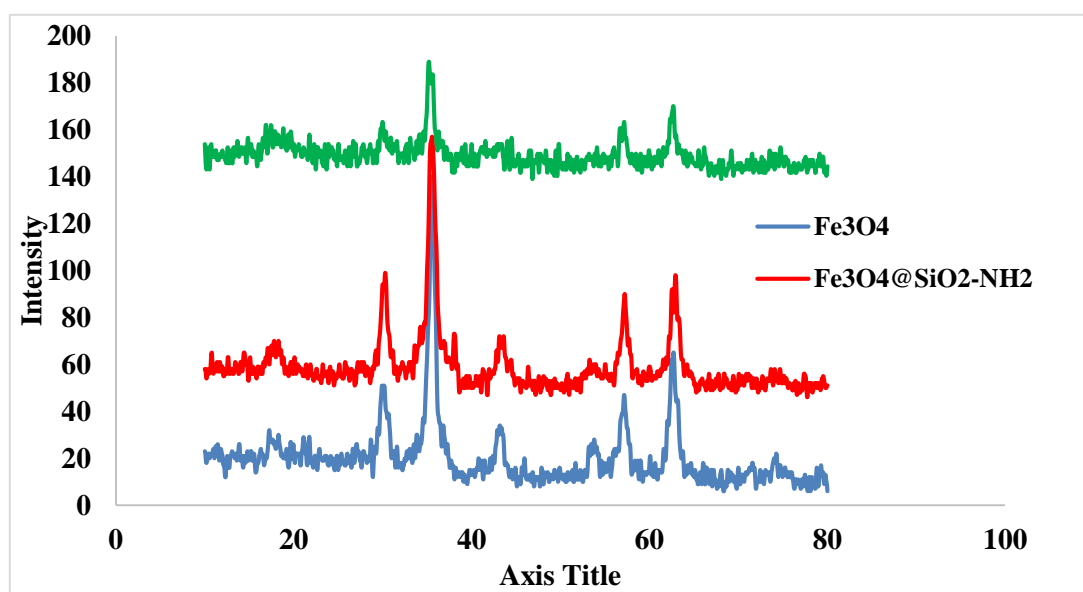
شد (شكل ۱۰). همان گونه كه در شكل (۱۰) مشاهده مى شود، تمام پيك هاى پراشى مگنتيت در هر سه ماده

شناسايى نانوذرات Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>، Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> و Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>-MIP توسط پراش پرتو ايكس انجام

### بهینه‌سازی پارامترهای موثر بر استخراج

ابتدا اثر سه متغیر غلظت اولیه دارو، زمان جذب و دوز جاذب بر درصد جذب مترونیدازول مورد بررسی قرار گرفت. جدول (۷) آزمایش‌های طراحی شده و پاسخ‌های بدست آمده را نشان می‌دهد.

وجود دارد. مشاهده‌ی الگوی پراشی در حالت High-angle نشان داد که ساختار کریستالی  $Fe_3O_4$  پس از اصلاح با  $SiO_2-NH_2$  و پلیمری شدن حفظ شده ولی شدت پیک-های پراشی با اصلاح و پلیمری شدن کاهش یافته که این امر نشان دهنده‌ی کاهش نظم کریستالی می‌باشد.



شکل ۱۰- الگوی پراش پرتو ایکس نانوذرات  $Fe_3O_4$ ،  $Fe_3O_4@SiO_2-NH_2$  و  $Fe_3O_4@SiO_2-NH_2-MIP$

جدول (۷) آزمایش‌های طراحی شده و پاسخ‌های بدست آمده در مرحله‌ی جذب

Std	Run	Time (min)	Adsorbent (g)	Conc. (mg/L)	Response
1	1	5	0.01	5	71.48
5	2	20	0.01	5	76.59
3	3	5	0.05	5	94.23
6	4	20	0.05	5	88.71
9	5	5	0.01	10	65.23
10	6	20	0.01	10	74.56
7	7	5	0.05	10	88.12
8	8	20	0.05	10	89.6
2	9	12.5	0.03	7.5	88.9
4	10	12.5	0.03	7.5	86.85
11	11	12.5	0.03	7.5	86.85

مثبت بر استخراج مترونیدازول دارند و بیشترین اثر مربوط به زمان استخراج است. مقدار p-value برای عدم تطابق مدل برابر ۰,۱۸۸۲ به دست آمد که چون بیشتر از ۰,۰۵ است نشان می‌دهد که مدل پیشنهادی تطابق

در این رابطه آزمایش‌ها به طور تصادفی انجام شدند تا از اثرگذاری فاکتورهای کنترل نشده بر روی نتایج ممانعت به عمل آید. نتایج حاصل از تجزیه واریانس (ANOVA) نشان داد که تمامی متغیرها اثر چشمگیر و

### ايزوترم‌هاى جذبى و سينتيك

در اين راستا ايزوترم‌هاى لانگموير و فرندليچ به عنوان دو ايزوترم متداول بررسى شدند كه شكل خطى آن‌ها در شكل‌هاى (۱۲) تا (۱۴) نشان داده شده است. بر اساس اين نمودارها جذب مترونيدازول بر روى پليمير از ايزوترم فروندليخ تبعيت مى‌كند و بر اين اساس ميزان  $Kf$  و  $1/n$  به ترتيب برابر با 4.01 و 0.3833 تعيين شد.

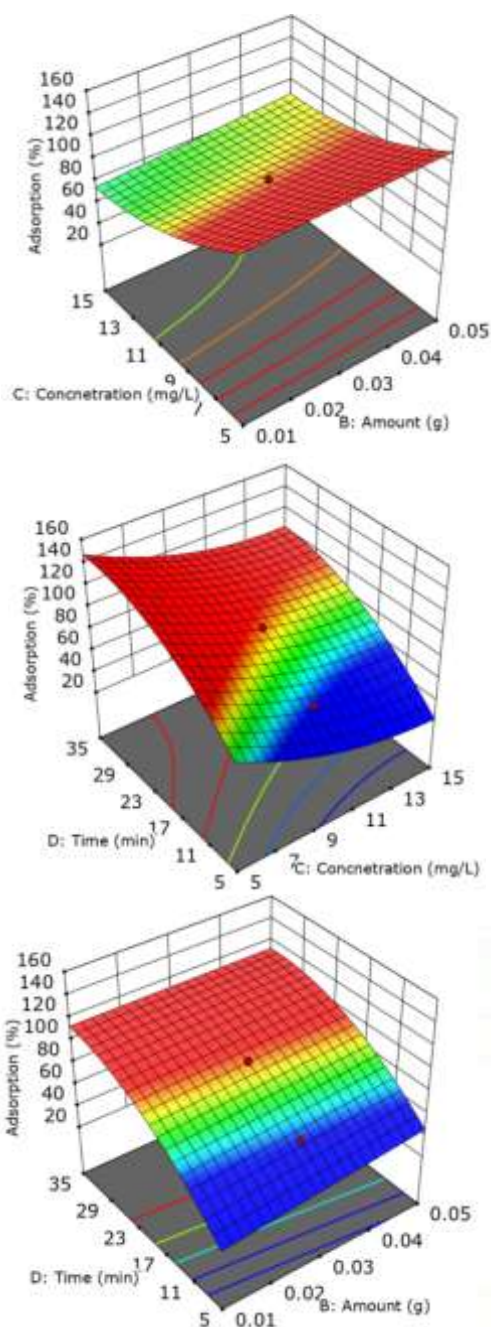
در ادامه سينتيك جذب در بازه‌ى زمانى ۱۵-۲ دقيقه مورد مطالعه قرار گرفت و سرعت جذب بر اساس معادلات سينتيكى شبه درجه يك و شبه درجه دو تعيين شد. بر اساس معادلات خطى رسم شده و ضرايب رگرسيون حاصل مشخص شد كه سينتيك جذب از معادله سينتيكى شبه درجه دوم تبعيت مى‌كند. شكل (۹) نتايج به دست آمده از مطالعات سينتيكى را نشان مى‌دهد.

خوبى با داده‌هاى تجربى دارد. در شكل (۱۱) نمودارهاى سطح پاسخ تخمينى جهت تعيين مقدار بهينه‌ى هر فاكتر و بررسى وجود برهم‌كنش بين دو فاكتر در حالى كه فاكتر سوم در مقدار مركزى ثابت شده است، نشان داده شده است. همان‌گونه كه در اين شكل نشان داده شده است افزايش هر سه متغير تا ميزان بهينه بر درصد جذب مترونيدازول اثر مثبت دارد. با توجه به مزايای ذكر شده در کاربرد نانوجاذب‌ها، مى‌توان نتيجه گرفت كه اين ويژگي‌ها منجر به ظرفيت استخراج بالا و استخراج سريع دارو مى‌شوند. افزون بر اين، چون نانوجاذب‌هاى مغناطيسى به سهولت مى‌توانند با استفاده از يك ميدان مغناطيسى خارجى از محلول نمونه جدا شوند، بنا بر اين، زمان‌هاى استخراج کوتاه‌ترى در اين حالت حاصل شده و نياز به مراحل وقت‌گير سانتريفيوژ كردن و يا صاف كردن نيست، لذا مى‌توان انتظار داشت با مصرف مقادير كمى جاذب نتايج قابل قبول به دست آيد. اين جاذب‌ها در مقايسه با جاذب‌هاى معمول، مساحت سطح به حجم بالاتر و مسير نفوذ کوتاه‌ترى را فراهم کرده و لذا هنگام استفاده از جاذب‌هاى با ابعاد نانو، زمان‌هاى کوتاه‌ترى براى جذب صرف مى‌شود كه اين موضوع به خوبى در شكل (۱۱) نشان داده شده است. در نهايت شرايط بهينه جذب عبارت بودند از: غلظت اوليه، ۸ ppm؛ دماى محيط؛ زمان جذب، ۱۰ دقيقه؛ دوز جاذب، ۰.۰۲ گرم.

به منظور بهينه‌سازى پارامترهاى موثر در مرحله شويش، اثر پارامترهاى حجم حلال شويش، دما و زمان شويش بر ميزان واجذب روش بهينه‌سازى چندمتغيرى استفاده شد. بر اين اساس تعداد ۱۱ آزمايش طراحى و اجرا گرديد و پس از دو بار تكرر نتايج مطلوب حاصل نشد. از اينرو، بهينه‌سازى به روش يك متغير در زمان (OVAT<sup>۱</sup>) انجام شد كه نتايج حاصل در جدول (۸) آورده شده است.

در نهايت شرايط بهينه واجذب به دست آمده از طراحى آزمايش عبارت بودند از: دما، دماى محيط؛ زمان شويش، ۱۰ دقيقه؛ حجم حلال واجذب، ۱.۵ ميلي‌ليتر استونيتريل.

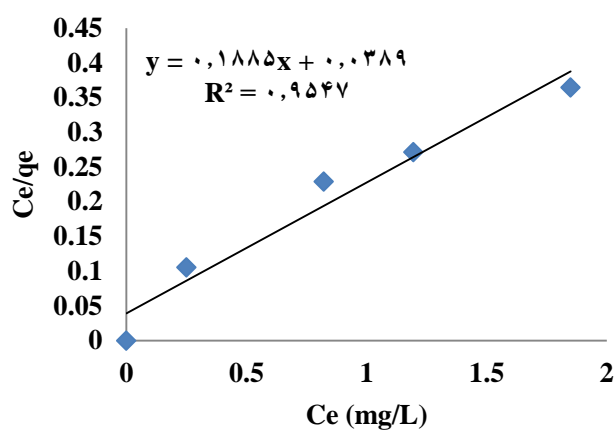
<sup>۱</sup>- One variable at a time



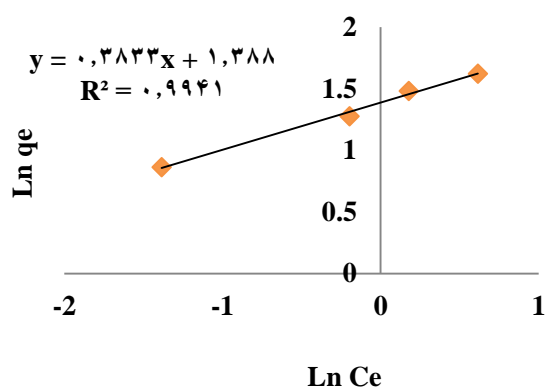
شکل ۱۱- نمودارهای سطح پاسخ تخمینی بدست آمده در مرحله‌ی جذب

جدول ۸- نتایج بهینه‌سازی واجذب با روش یک متغیر در زمان

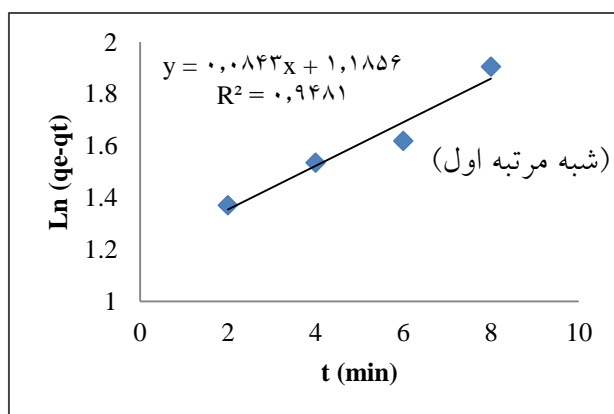
حجم واجذب	۱ ml	۱,۵ ml	۲ ml	۲,۵ ml	۳ ml
واجذب خوانده	۲,۰۰۷۵	۱,۶۰۷۹	۱,۱۰۸۵	۰,۸۸۷۲	۰,۷۰۹۵
درصد واجذب	۸۵,۸۶	۱۰۳,۲۶	۹۴,۹	۹۴,۹۴	۹۱,۱۲
فاکتور تغلیظ	۱۰	۶,۶۶	۵	۴	۳,۳۳
حجم جذب	۱۰ ml	۱۰ ml	۱۰ ml	۱۰ ml	۱۰ ml
جذب خوانده	۰,۰۱۷۸	۰,۰۱۷۳	۰,۰۲۶۹	۰,۰۲۳۷	۰,۰۱۹۸
درصد جذب	۹۲,۴۶	۹۲,۶۷	۸۸,۶	۸۹,۹۶	۹۱,۱۲



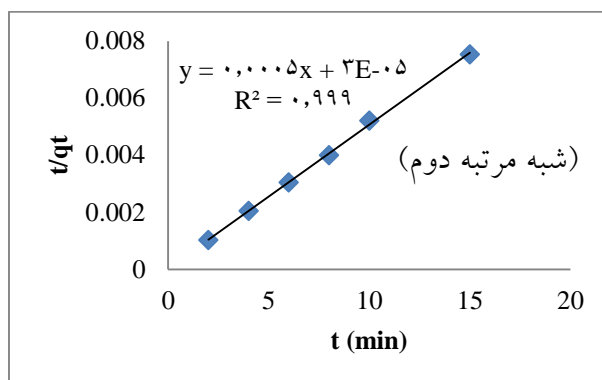
شکل ۱۲- شکل خطی ایزوترم لانگمویر جذب مترونیدازول توسط پلیمر قالب مولکولی



شکل ۱۳- شکل خطی ایزوترم فروندلیخ جذب مترونیدازول توسط پلیمر قالب مولکولی







شکل ۱۴- نمودارهای سینتیک جذب مترونیدازول

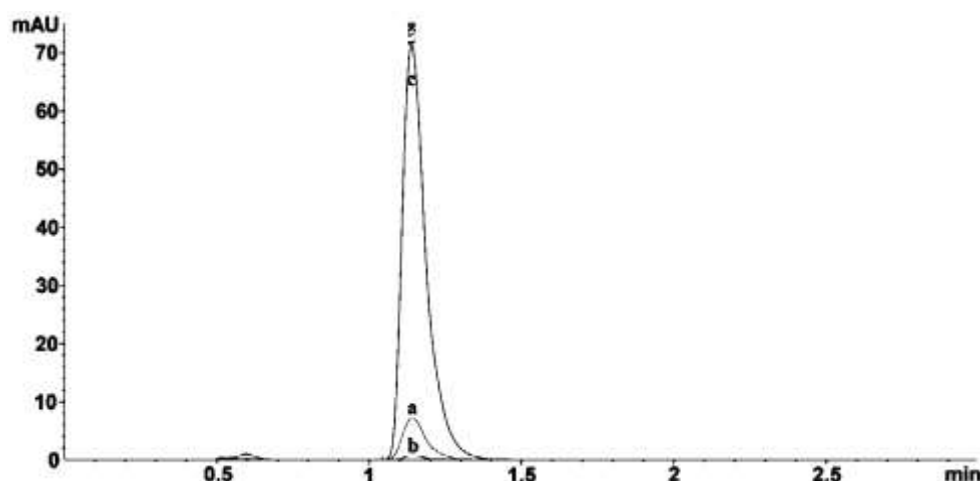
## ارقام شایستگی روش

به منظور معتبرسازی روش، ارقام شایستگی آن شامل حد تشخیص، محدوده خطی، دقت و صحت مورد ارزیابی قرار گرفت. محدوده خطی مناسبی برای داروی مترونیدازول در محدوده غلظتی ۰/۱ تا ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر با ضریب رگرسیون خطی  $R^2$  برابر با ۰/۹۹۲ در پلاسما بدست آمد. معادله نمودار کالیبراسیون مترونیدازول در پلاسما به صورت  $y = 38/613 X + 9618$  بدست آمد. درصد بازیافت‌های بدست آمده قابل قبول و جهت تعیین مقدار کمی داروی مترونیدازول در نمونه‌ی بیولوژیکی انسانی کافی می‌باشد. میزان LOD و LOQ محاسبه شده برای مترونیدازول در نمونه پلاسما به ترتیب برابر با ۱/۲ و ۵/۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر بدست آمد.

انحراف استاندارد نسبی به عنوان معیاری از دقت روش محاسبه شد. جهت تعیین انحراف استاندارد نسبی، غلظت‌های ۰،۱، ۵ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از مترونیدازول انتخاب شد و فرآیند استخراج سه بار متوالی تکرار شد. انحراف استاندارد و میانگین برای این سه بار تکرار آزمایش محاسبه و مقدار انحراف استاندارد نسبی به ترتیب برابر با ۱۲، ۸،۰ و ۵،۵ درصد تعیین شد.

## بررسی صحت روش و تعیین میزان مترونیدازول

به منظور بررسی کارایی روش ارائه شده در اندازه‌گیری مترونیدازول در نمونه‌ی حقیقی، نمونه‌ی پلاسمای خون از بیمارستان باهنر کرمان و از فردی که در حال مصرف دارو بود تهیه گردید. نمونه‌ی دریافتی که به صورت سرم بود در سه نوبت از بیمار دریافت شده بود. بدین منظور ابتدا مقدار ۵/۰ میلی‌لیتر از سرم را برداشته و روی آن ۰/۵ میلی‌لیتر استونیتریل ریخته و با سانتریفیوژ دور ۵۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه پروتئین‌زدایی شد. سپس محلول زرد رنگ رویی که پلاسما نام دارد روی ۰/۰۲ گرم پلیمر ریخته شد و با شرایط بهینه‌ی جذب و واجذب انجام و در نهایت به دستگاه UPLC تزریق گردید. کروماتوگرام به دست آمده از این بررسی در شکل (۱۵) نشان داده شده است. همان‌گونه که مشخص است استخراج با پلیمر قالب مولکولی مغناطیسی سبب افزایش حساسیت و کاهش حیزان حد تشخیص اندازه‌گیری شده است.



شکل ۱۰- کروماتوگرام جذب مترونیدازول در مجاورت پلاسما. (a) پیک دارو در نمونه پلاسما، (b) پیک دارو در نمونه پلاسما پس از واجذب پس از قرارگیری در معرض پلیمر، (c) پیک دارو در پلاسما پس از واجذب

## نتیجه گیری

در حال حاضر با توجه به افزایش سرعت رشد مقالات منتشر شده در این فناوری امیدهای بسیاری را برای تهیه آنزیم‌ها، سنسورهای ویژه‌گزین، توسعه روش‌های جداسازی و تشخیصی، دارورسانی، تلغیظ داروها، استخراج مواد زیست‌فعال و زمینه‌های بسیار دیگر در شیمی بوجود آمده است. نتایج این کار تحقیقاتی نشان داد که طراحی کامپیوتری می‌تواند بعنوان یک ابزار ارزیابی مفید در سیستم‌های MIP-روش سنتز پلیمر تأثیر زیادی در خصوصیات پلیمر قالب مولکولی و توزیع اندازه ذرات دارد- بکار رود. استفاده از DES بعنوان مونومر عاملی باعث شد که نانوذرات یکنواخت با خصوصیات تشخیصی خوب برای مترونیدازول ایجاد کند. علاوه براین، بعلت استفاده از حلال دوست‌دار محیط زیست هزینه‌ها کاهش داده شد و میزان آلودگی کمتری به فاضلاب‌ها وارد شد. فرآیند استخراج با استفاده از پلیمر قالب مغناطیسی ساخته شده جهت استخراج مترونیدازول در نمونه پلاسما انجام گرفت و نتایج با استفاده از دستگاه UPLC-DAD به صورت کمی آنالیز گردید. با توجه به درصد بازیافت‌های قابل قبول، روش MIP-UPLC-DAD برای تعیین مقدار کمی داروی مترونیدازول در نمونه بیولوژیکی پلاسما مناسب می‌باشد.

## References

- 1- Smith RM. Before the injection-modern methods of sample preparation for separation techniques. *Journal of Chromatography A*. 2003 Jun 6;1000 (1-2):3-27.
- 2- Ramos L. Critical overview of selected contemporary sample preparation. *Journal of Chromatography A*. 2012 Jan 20;1221: 84-98.
- 3- Ahmadi-Jouibari T, Fattahi N, Shamsipur M, Pirsasheb M. Dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography-ultraviolet detection to determination of opium alkaloids in human plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2013 Nov 1;85:14-20.
- 4- Rasmussen KE, Pedersen-Bjergaard S. Developments in hollow fibre-based, liquid-phase microextraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2004 Jan 1;23(1):1-0.
- 5- Hennion MC. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1999 Sep 24;856(1-2):3-54.
- 6- Rodriguez I, Turnes MI, Mejuto MC, Cela R. Determination of chlorophenols at

- imprinted polymers for selective solid-phase extraction of organophosphorus pesticides from honey. *Food Chemistry*. 2015 Nov 15;187:7-331.
- 12- Gholivand MB, Khodadadian M. Rationally designed molecularly imprinted polymers for selective extraction of methocarbamol from human plasma. *Talanta*. 2011 Sep 15;85(3):8-1680.
- 13- Ahmadi F, Yawari E, Nikbakht M. Computational design of an enantioselective molecular imprinted polymer for the solid phase extraction of S-warfarin from plasma. *Journal of Chromatography A*. 2014 Apr 18;1338:9-16.
- 14- Ahmadi F, Ahmadi J, Rahimi-Nasrabad M. Computational approaches to design a molecular imprinted polymer for high selective extraction of 3, 4-methylenedioxyamphetamine from plasma. *Journal of Chromatography A*. 2011 Oct 28;1218(43):47-7739.
- 15- Nezhadali A, Feizy J, Beheshti HR. A molecularly imprinted polymer for the selective extraction and determination of fenvalerate from food samples using high-performance liquid chromatography. *Food Analytical Methods*. 2015 May;8(5):37-1225.
- 16- Azimi A, Javanbakht M. Computational prediction and experimental selectivity coefficients for hydroxyzine and cetirizine molecularly imprinted polymer based potentiometric sensors. *Analytica Chimica Acta*. 2014 Feb 17;812:184-90.
- the sub-ppb level in tap water using derivatization, solid-phase extraction and gas chromatography with plasma atomic emission detection. *Journal of Chromatography A*. 1996 Jan 19;721(2):297-304.
- 7- Lucci P, Derrien D, Alix F, Pérollier C, Bayouhd S. Molecularly imprinted polymer solid-phase extraction for detection of zearalenone in cereal sample extracts. *Analytica Chimica Acta*. 2010 Jul 5;672(1-2):9-15.
- 8- Xu Z, Fang G, Wang S. Molecularly imprinted solid phase extraction coupled to high-performance liquid chromatography for determination of trace dichlorvos residues in vegetables. *Food Chemistry*. 2010 Mar 15;119(2):50-845.
- 9- Ebrahimzadeh H, Dehghani Z, Asgharinezhad AA, Shekari N, Molaei K. Determination of haloperidol in biological samples using molecular imprinted polymer nanoparticles followed by HPLC-DAD detection. *International Journal of Pharmaceutics*. 2013 Sep 10;453(2):9-601.
- 10- Urraca JL, Huertas-Pérez JF, Cazorla GA, Gracia-Mora J, García-Campaña AM, Moreno-Bondi MC. Development of magnetic molecularly imprinted polymers for selective extraction: Determination of citrinin in rice samples by liquid chromatography with UV diode array detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2016 Apr;408(11):42-3033.
- 11- He J, Song L, Chen S, Li Y, Wei H, Zhao D, Gu K, Zhang S. Novel restricted access materials combined to molecularly

## Synthesis and Application of Core-Shell Magnetic Molecularly Imprinted Polymer for the Selective Extraction of Metronidazole from Biological Fluids: Isotherms and Kinetic

Raheleh Sanjari<sup>1</sup>, Mehdi Ansari<sup>2</sup>, Maryam Kazemipour\*<sup>3</sup>, Leila Zeidabadinejad<sup>4</sup>

1- PhD student, Department of Chemistry, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran

2- Professor, Department of Drug and Food Control, Faculty of Pharmacy, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

3- Professor, Department of Chemistry, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran

4- Assistant Professor, Department of Chemistry, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

Corresponding author: m.kazemipour@iauk.ac.ir

Received: 19/7/2022, Accepted: 4/9/2022

### Abstract

In this study, a magnetic molecularly imprinted polymer (MMIP) was synthesized to selectively extract the metronidazole from the plasma sample. To select the most suitable monomer and polymerization solvent in the synthesis of MMIP, a computational method based on quantum mechanical theory was used to calculate the bond energy between monomer and analyte molecules. These calculations are based on the comparison of ground state energies of monomers and the analyte, and the complexes of analyte-functional monomers obtained by density functional theory. The role of polymerization solvent was studied using the integrated polarization model. First, the structures were drawn separately and in the complex mode using GooseView software. The drawn structures were optimized by density functional theory calculations at B3LYP level and G(d) 311-6 basis set. The outputs were analyzed to determine hydrogen interactions using quantum mechanics and natural bond orbital analysis. The characteristics of the obtained polymers were determined by means of Fourier transform, X-ray scattering, sample vibrational magnetometry, and electron microscopy. The uptake of the drug was evaluated by Langmuir and Freundlich isotherms. The MMIPs were used as the selective adsorbents for metronidazole extraction and analysis by high performance liquid chromatography. The results of calculations indicate that the most suitable monomer, solvent and polymerization network agent for the preparation of polymer is eutectic solvent, ethylene glycol, and ethylene glycol dimethacrylate, respectively. Accordingly, the MMIP was synthesized by using eutectic solvent (monomer), ethylene glycol (the polymerization solvent) in the presence of magnetite nanoparticles functionalized with amine groups. The calibration plot was linear in the range 0.1-10 µg/mL (peak area) with a coefficient of determination ( $R^2$ ) equal to 0.992. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) for metronidazole in plasma sample were 1.2 and 5.0 ng/ml, respectively. Isotherms study exhibited that the adsorption phenomenon follows the Freundlich model. Kinetic studies showed that the absorption process follows pseudo-second-order kinetics. Finally, the new method was used to successfully determine the metronidazole in plasma sample, satisfactorily.

**Keywords:** Magnetic Molecularly Imprinted Polymer, Eutectic Solvents, Density Functional Theory Calculation, Metronidazole