

## استخراج کارودیلول از نمونه‌های پلاسما با روش میکرواستخراج مایع-مایع با کمک امواج فراصوت بر پایه حلال اتکتیک عمیق

حسن حیدری<sup>۱\*</sup>، زینب اسماعیل‌زاده<sup>۲</sup> و کاظم جمشیدی قلعه<sup>۳</sup>

۱- دانشیار شیمی تجزیه، گروه شیمی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران

۲- کارشناس ارشد شیمی، گروه شیمی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران

۳- استاد فیزیک، گروه فیزیک، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران

دریافت: اردیبهشت ۹۸ بازنگری: مرداد ۹۹ پذیرش: مرداد ۹۹

**چکیده:** در این پژوهش، یک روش میکرواستخراج مایع-مایع با کمک امواج فراصوت (UALLME) بر پایه حلال اتکتیک عمیق (DES) برای نخستین بار برای استخراج کارودیلول از نمونه‌های پلاسما پیش از تجزیه با روش اسپکتروفلوریمتری توسعه داده شد. DES با مخلوط کردن مقدار مناسب کولین کلراید و فنل در نسبت ۲:۱ تهیه شد. DES تهیه شده بدون خالص‌سازی بیشتر برای استخراج کارودیلول از نمونه‌های پلاسما استفاده شد. تاثیر تعدادی از عامل‌های مهم شامل نسبت اجزای DES، افزودن نمک و نوع حلال تعلیق‌کننده با روش یک عامل در یک زمان مطالعه و بهینه شدند. از طراحی مرکب مرکزی برای بهینه‌سازی کارآمد بقیه متغیرهای اصلی موثر در روش استخراج شامل pH، حجم DES، حجم تتراهیدروفوران (THF) و زمان فراصوت استفاده شد. این روش خطی بودن عالی ( $R^2=0/9982$ ) در گستره ۱۵ تا  $300 \text{ ng ml}^{-1}$  را در شرایط بهینه نشان داد. بازیابی استخراج ۹۳/۲٪ و مقادیر LOD و LOQ به ترتیب برابر با  $3/30$  و  $9/82 \text{ ng ml}^{-1}$  به دست آمد. این روش با موفقیت برای تعیین دارو در نمونه‌های پلاسما انسانی آغشته شده استفاده شد و بازیابی‌های نسبی ۹۱/۷٪ و ۹۳/۲٪ را ارائه داد.

واژه‌های کلیدی: کارودیلول، حلال اتکتیک عمیق، طراحی مرکب مرکزی، پلاسما، اسپکتروفلوریمتری.

### مقدمه

که هیچ‌یک از قرینه‌پارها به تنهایی مشخصات دارویی مخلوط راسمیک را ندارند نمونه اولیه و فرآورده‌های عمومی کارودیلول حاوی مخلوط راسمیک R[+] و S[-] هستند [۱]. سطح غلظت درمانی کارودیلول در پلاسما در گستره ۵۰ تا  $500 \text{ ng ml}^{-1}$  قرار

کارودیلول به‌طور گسترده‌ای برای درمان بیماری‌های قلبی عروقی مانند فشار خون بالا، بیماری‌های ایسکمیک قلبی، انفارکتوس میوکارد و نارسایی احتقانی قلب تجویز می‌شود. از آنجا

دارد [۲].

تشکیل یک مخلوط اتکتیک با یک نقطه ذوب کمتر از هر یک از اجزای جداگانه را می‌دهند. DESها به‌طور معمول با مخلوط کردن یک مقدار مناسب از پذیرنده پیوند هیدروژنی با یک هالید فلزی یا یک دهنده پیوند هیدروژنی تشکیل می‌شوند که می‌توانند با توجه به برهم‌کنش‌های پیوند هیدروژنی با یکدیگر در ارتباط باشند. در مقایسه با مایعات یونی، این حلال‌ها هزینه کمتر، زیست تخریب‌پذیری بهتر، فرایند تهیه آسان‌تر و سمیت قابل‌قبول دارویی دارند. کاربرد DESها در شیمی تجزیه را می‌توان به چندین گروه از جمله روش‌های (میکرو) استخراج، اصلاح سطوح جامد برای بهبود کارایی استخراج، هضم یا انحلال نمونه‌های جامد، به‌عنوان اصلاح‌کننده فاز متحرک در سوانگاری<sup>۵</sup> و به‌عنوان شوینده در روش‌های بر پایه استخراج فاز جامد تقسیم کرد [۶]. در سال‌های اخیر، DESها توجه زیادی برای جایگزینی حلال‌های آلی متداول در روش‌های LLME دریافت کرده‌اند [۷ تا ۹].

در این پژوهش، ابتدا DES بر پایه کولین کلراید و فنل به‌عنوان یک حلال سبز تهیه شد. سپس، حلال تهیه‌شده برای میکرواستخراج مایع-مایع به کمک امواج فراصوت (UALLME) [۱۰ و ۱۱]، داروی کارودیلول از نمونه‌های زیستی پلاسما، به‌کارگرفته شد. برای بهینه‌سازی عامل‌های موثر بر کارایی استخراج، روش طراحی مرکب مرکزی<sup>۶</sup> (CCD) به‌کارگرفته شد. داروی استخراج‌شده با دستگاه اسپکتروفلوریمتر اندازه‌گیری شد.

### بخش تجربی

#### مواد و دستگاه‌ها

استاندارد داروی کارودیلول از شرکت دارویی صالحان شیمی (تهران، ایران) تهیه شد. استونیتریل، متانول و تتراهیدروفوران<sup>۷</sup> (THF) با درجه خلوص HPLC از شرکت کارلو اربا<sup>۸</sup> (فرانسه)

مشکل اصلی در تجزیه داروهای موجود در نمونه‌های زیستی برای پایش درمانی آن‌ها، مراحل استخراج به‌منظور پیش‌تغلیظ آنالیت و حذف گونه‌های ناخواسته مانند پروتئین‌ها، DNA و غیره از بسترهای پیچیده است که با فرایندهای وقت‌گیر همراه است. روش‌های تهیه نمونه متفاوتی مانند استخراج مایع-مایع، استخراج فاز جامد و رسوب پروتئین در تجزیه زیستی استفاده شده است. به‌هرحال، روش‌های برپایه رسوب پروتئین حتی در ترکیب با سایر روش‌های آماده‌سازی نمونه به دلیل پیوند متوسط تا زیاد پروتئین به بیشتر داروها به‌طور گسترده‌ای به‌کارگرفته شده است و روش رسوب پروتئین سعی در ایجاد اختلال در برهم‌کنش پروتئین-دارو و آزادسازی آن‌ها دارد [۲]. با وجود مزایای استخراج مایع-مایع متداول مانند سادگی و در دسترس بودن، این روش از نظر زمان‌بر بودن و نیاز مکرر به مقادیر زیادی از حلال‌های آلی خطرناک، محدودیت‌هایی دارد. بنابراین، در دهه‌های گذشته روش‌های متفاوت میکرواستخراج مایع-مایع<sup>۱</sup> (LLME) برای حل مشکلات مربوط به روش سنتی استخراج مایع-مایع توسعه پیدا کرده است. برجسته‌ترین این روش‌ها میکرواستخراج مایع-مایع پخشی<sup>۲</sup> (DLLME) و میکرواستخراج تغلیقه‌سازی به کمک امواج فراصوت<sup>۳</sup> (USAEME) هستند [۳ و ۴]. در هر دو روش DLLME و USAEME، قطرات ریز حلال آلی امتزاج‌ناپذیر با آب به‌عنوان استخراج‌کننده در محلول آبی به ترتیب با حلال آلی امتزاج‌پذیر با آب یا امواج فراصوت تشکیل می‌شوند.

به‌تازگی، گروه جدیدی از استخراج‌کننده‌ها تحت عنوان حلال‌های اتکتیک عمیق<sup>۴</sup> (DESS) به‌عنوان یک حلال سبز جایگزین مایعات یونی پیشنهاد شده است [۵]. DESها به‌طور عموم از دو یا سه جز ارزان و ایمن تشکیل شده است که اغلب از راه برهم‌کنش‌های پیوند هیدروژنی توانایی خود تجمعی دارند، که

1. Liquid-liquid microextraction

2. Dispersive liquid-liquid microextraction

3. Ultrasound-assisted emulsification microextraction

4. Deep eutectic solvents

5. Chromatography

6. Central composite design

7. Tetrahydrofuran

8. Carlo Erba

دمای °C ۸۰ تا به دست آمدن یک محلول شفاف، تهیه شدند. DESها بر پایه فنل از مخلوط کردن یک مول ChCl با مولهای متفاوتی از فنل (۱، ۲، ۳ و ۴ مول) در دمای اتاق و همزدن مخلوط در داخل یک فالدون تا به دست آمدن یک محلول یکنواخت، تهیه شدند. با توجه سادگی روش تهیه، DES مورد نیاز به صورت روزانه پیش از شروع انجام روش میکرواستخراج تهیه می شدند.

#### روش UALLME بر پایه DES

مقدار ۰/۶ میلی لیتر از نمونه پلاسما آغشته<sup>۱</sup> شده درون یک فالدون افزوده شد. برای رسوب پروتئینهای پلاسما و از بین بردن برهم کنش دارو-پلاسما مقدار ۱/۸ میلی لیتر استونیتریل در داخل حمام فراصوت به آرامی بر نمونه پلاسما افزوده و سپس، به مدت ۲ دقیقه به شدت هم زده شد. سپس، برای جداسازی پروتئینهای رسوب شده به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ rpm گریزانه شد. محلول بالایی به فالدون دیگر منتقل و تحت جریان ملایم گاز N<sub>2</sub> استونیتریل باقی مانده تبخیر شد. سپس، حجم محلول باقی مانده با آب یون زدوده به ۶ میلی لیتر رسانده و pH آن در ۷/۲۹ تنظیم شد. پس از آن، مقدار ۴۰۹ میکرولیتر DES به آن افزوده و در ادامه، برای خودتجمعی مولکولهای DES و ابری شدن محلول مقدار ۵۴۶ میکرولیتر حلال آپروتیک THF به آن افزوده و به مدت یک دقیقه داخل حمام فراصوت قرار داده شد. برای جداسازی فازها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ rpm گریزانه شد که فاز غنی شده از آنالیت در بالای محلول جمع شد. با سرنگ معمولی محلول زیری کشیده شد و فاز غنی شده در قسمت مخروطی فالدون با استفاده از میکروسرنگ جمع آوری شد. سپس، حجم آن با افزودن متانول در ۲۵۰ میکرولیتر تنظیم و درون میکروسرنگ ریخته و شدت فلورسانس در  $\lambda_{em}$  برابر با ۳۵۵ نانومتر پس از تحریک در ۳۲۰ نانومتر اندازه گیری شد.

خریداری شدند. کولین کلراید<sup>۱</sup> (ChCl) از شرکت اکسیر<sup>۲</sup> (اتریش)، اوره، اتیلن گلیکول، فنل و استون از شرکت مرک تهیه شدند. مواد شیمیایی دیگر مانند سدیم هیدروکسید، هیدروکلریک اسید و سدیم کلرید با درجه خلوص تجزیه ای از شرکت مرک تهیه شدند. در کل کار پژوهشی از آب یون زدوده استفاده شد. نمونه های پلاسما به عنوان نمونه های واقعی از سازمان انتقال خون تبریز تهیه شدند.

برای بررسی داروی کارودیلول از دستگاه اسپکتروفلوریمتر جاسکو<sup>۳</sup> مدل FP-6200 ساخت ژاپن استفاده شد. از سل کوارتز ۱ cm با حداکثر حجم ۷۰۰ میکرولیتر برای اندازه گیری های شدت فلورسانس استفاده شد. ترازوی دیجیتالی سارتوریوس<sup>۴</sup> مدل SECURA124-1S با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم برای وزن کردن مواد به کار گرفته شد. برای تنظیم pH محلولها، دستگاه pH متر دیجیتالی مدل ۷۴۴ متروهم<sup>۵</sup> و برای جداسازی فازها، دستگاه گریزانه مدل EBA200 ساخت کمپانی هیتیش<sup>۶</sup> به کار گرفته شد. حمام آبی فراصوت مدل DSA100-XN<sub>2</sub>-4.0L با انرژی ۱۰۰ وات و فرکانس ۴۰ کیلوهرتز ساخت کمپانی MAXMACHINE (چین) و میکروسرنگ همیلتون<sup>۷</sup> (سوئیس) به حجم ۱۰۰ میکرولیتر برای جدا کردن فازها پس از گریزانه به کار گرفته شد.

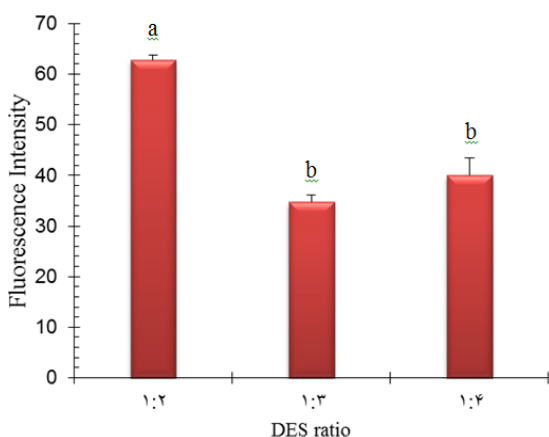
#### تهیه DESها

DESها با مخلوط کردن به عنوان پذیرنده پیوند هیدروژنی با فنل، اتیلن گلیکول و یا اوره به عنوان دهنده پیوند هیدروژنی تهیه شدند. برای این منظور، DESها بر پایه اتیلن گلیکول و یا اوره از مخلوط کردن یک مول ChCl و دو مول اتیلن گلیکول یا اوره در داخل یک فالدون و گرمادهی مخلوط در

1. Choline chloride  
2. Exir  
3. Jasco  
4- Sartorius

5- Metrohm  
6- Hettich  
7. Hamilton  
8. Spike

برای بهینه‌سازی نسبت مولی مربوط، DES بر پایه ChCl : فنل در چهار نسبت مولی متفاوت تهیه شد. نسبت ۱:۱ از ChCl و فنل گرانبوی خیلی بالایی داشت به طوری که کارکردن با آن خیلی مشکل بود. نسبت‌های دیگر شامل ۲:۱، ۳:۱ و ۴:۱ نیز مورد آزمون قرار گرفتند که نتایج به دست آمده در شکل ۱ نشان داده شده است. همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، کاهش قابل توجهی در شدت فلورسانس با افزایش غلظت مولی فنل از ۲ به ۳ و ۴ ایجاد می‌شود. این کاهش در کارایی استخراج را می‌توان به کاهش گرانبوی DES با افزایش نسبت فنل نسبت داد. همچنین، ANOVA یک طرفه و به دنبال آن آزمون توکی نشان داد که نتیجه استخراج به دست آمده برای نسبت مولی ۲:۱ به طور چشمگیری از نسبت‌های مولی ۳:۱ و ۴:۱ متفاوت است. در نتیجه نسبت مولی ۲:۱ به عنوان نسبت بهینه برای ادامه بررسی انتخاب شد.



a یا b: گروه‌بندی به دست آمده از ANOVA یک طرفه دنبال شده با آزمون توکی. ستون‌هایی که با حروف یکسان مشخص شده‌اند، به طور معنی‌داری باهم تفاوت ندارند.

شکل ۱ بهینه‌سازی نسبت مولی اجزای DES (شرایط استخراج: حجم نمونه ۶ میلی‌لیتر، pH برابر با ۱۰، حجم DES برابر با ۴۰۰ میکرولیتر، حجم THF برابر با ۴۰۰ میکرولیتر، غلظت کارودیلول برابر با  $1 \text{ mg ml}^{-1}$ ، بدون افزودن نمک و مدت فراصوت ۵ دقیقه)

CCD در ترکیب با تابع مطلوبیت با استفاده از نرم‌افزار دیزاین اکسپرت<sup>۱</sup> نسخه ۱۰ طراحی و بررسی شد. شدت فلورسانس به عنوان پاسخ در نظر گرفته شد. همچنین، مقایسه‌های چندگانه با تحلیل واریانس<sup>۲</sup> (ANOVA) یک طرفه و به دنبال آن آزمون توکی<sup>۳</sup> برای آنالیز تعقیبی<sup>۴</sup> با نرم افزار مینی‌تب<sup>۵</sup> نسخه ۱۹ انجام شد. معنی‌داری آماری در سطح  $0.05 < P$  پذیرفته شد.

## نتیجه‌ها و بحث

بهینه‌سازی روش UALLME بر پایه DES

اثر نوع و ترکیب DES

برهم‌کنش‌هایی مانند آب‌گریزی، الکترواستاتیک و  $\pi$ - $\pi$  با آنالیت موردنظر نقش کلیدی در انتخاب DES مناسب برای روش‌های استخراج ایفا می‌کنند. بر این پایه سه نوع DES در نسبت مولی ۲:۱ بر پایه ChCl : فنل، ChCl : اوره و ChCl : اتیلن گلیکول تهیه و مورد آزمایش قرار گرفتند. پس از تهیه مقدار ۴۰۰ میکرولیتر از هر یک از این حلال‌ها به داخل محلول نمونه با حجم ۶ میلی‌لیتر افزوده شد. هر سه نوع DES مورد آزمایش امتزاج‌پذیری بالایی را با آب داشتند. به طوری که، پس از افزودن آن‌ها به درون نمونه آبی، سامانه یک فازی تشکیل شد. برای جداسازی حلال اتکتیک عمیق و خودتجمعی آن‌ها حلال تعلقه‌کننده THF به کار گرفته شد. نتایج نشان داد که به جز DES بر پایه ChCl : فنل بقیه هیچ نوع خودتجمعی را نشان نمی‌دهند. همچنین، از حلال‌های آپروتیک استون و ۱ و ۴ دی‌اکسان نیز برای خودتجمعی DES بر پایه اوره و اتیلن گلیکول استفاده شد و دوباره هیچ اثری از خودتجمعی مشاهده نشد. از این‌رو، در ادامه بررسی از حلال اتکتیک عمیق بر پایه ChCl : فنل استفاده شد.

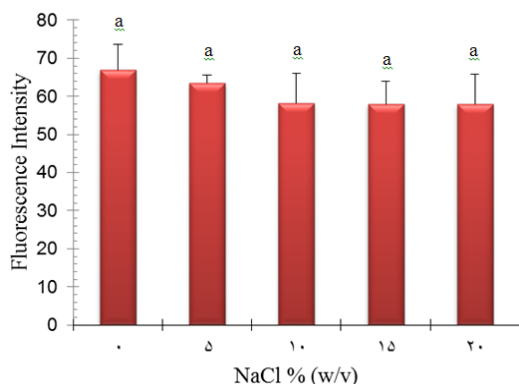
1. Design Expert  
2. Analysis of variance  
3. Tukey test

4. Post hoc analysis  
5. Minitab

داروی کارودیلول بررسی شد. نتایج نشان داد که خودتجمعی مناسب تنها با استفاده از THF به دست می آید و بقیه حلال های مورد استفاده توانایی ایجاد خودتجمعی بین مولکول های DES را نداشتند. از این رو، THF به عنوان حلال آپروتیک مناسب برای ادامه بررسی ها انتخاب شد.

#### اثر افزودن نمک

یکی از عامل های اصلی که می تواند بر کارایی استخراج اثر داشته باشد، افزودن نمک است. در حالت کلی، افزودن نمک می تواند انحلال پذیری آنالیت در محلول آبی را کاهش داده و انتقال آن به درون فاز DES را افزایش دهد. بنابراین، کارایی استخراج را بهبود بخشد (پدیده بیرون رانی نمک). از سوی دیگر افزودن نمک می تواند ویژگی لایه انتشاری نرست را تغییر داده و سرعت انتشار آنالیت به درون فاز DES را کاهش دهد (پدیده حل کردن نمک) [۱۳].



شکل ۲ اثر افزودن نمک بر بازده استخراج (شرایط استخراج: نسبت مولی ChCl : فنل برابر با ۲:۱ و بقیه شرایط مشابه شکل ۱)

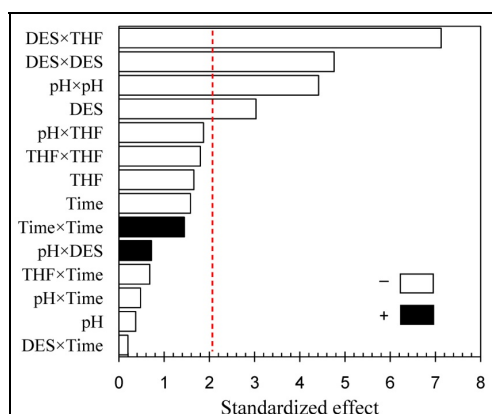
چگالی گرانی، شونندو گرانی [۱۴] به منظور بررسی اثر افزودن نمک بر عملکرد UALLME بر پایه DES مقادیر متفاوتی از NaCl (صفر تا ۲۰ % w/v) به محلول های نمونه افزوده و نتایج در شکل ۲ نشان داده شده است. همان طور که مشاهده می شود با افزایش مقدار نمک افزوده شده، شدت فلورسانس کاهش پیدا می کند.

برای به دست آوردن شدت فلورسانس صحیح یک آنالیت لازم است اثر حلال استخراج کننده بر شدت فلورسانس نیز بررسی شود. از این رو، اثر DES بر پایه ChCl : فنل در نسبت مولی ۲:۱ به عنوان حلال استخراج کننده بر طیف فلورسانس بررسی شد. برای این منظور، طیف های نشری حلال DES رقیق شده با متانول (حلالی که برای تنظیم حجم نهایی پس از UALLME بر پایه DES استفاده شد) پس از تحریک در سه طول موج ۲۴۰، ۲۸۲ و ۳۲۰ نانومتر (طول موج های تحریک کارودیلول) ثبت شدند. طیف های نشری مربوط به تحریک در طول موج های ۲۴۰ و ۲۸۳ نانومتر یک پیک در طول موج ۳۰۴ نانومتر نشان دادند که با طول موج نشری داروی کارودیلول همپوشانی ندارد و طیف نشری مربوط به طول موج تحریک ۳۲۰ نانومتر هیچ پیک خاصی را نشان نداد. در مرحله بعدی، طیف نشری حلال DES رقیق شده با متانول حاوی کارودیلول در سه طول موج ۲۴۰، ۲۸۲ و ۳۲۰ نانومتر ثبت و مشاهده شد که تنها زمانی که طول موج تحریک ۳۲۰ نانومتر است فلورسانس مربوط به کارودیلول در طول موج ۳۵۵ نانومتر مشاهده می شود، در دو طول موج دیگر فلورسانسی برای کارودیلول داخل این حلال مشاهده نشد. بنابراین، با وجود اینکه شدت فلورسانس داروی کارودیلول در طول موج ۳۲۰ نانومتر کمتر از دو طول موج دیگر است، این طول موج برای اندازه گیری غلظت کارودیلول داخل این حلال انتخاب شد.

#### اثر حلال تعلیق کننده

خودتجمعی DES ها به علت برهم کنش قوی تر حلال های آپروتیک با آب در مقایسه با DES است. بنابراین، مولکول های DES مولکول های آب را رها کرده و تجمعی درون نمونه آبی ایجاد می کنند. این خودتجمعی مولکول های DES را می توان به پیوند هیدروژنی، همپوشانی  $\pi-\pi$  و انتقال بار بین گونه های DES نسبت داد [۱۲]. بنابراین، اثر چندین حلال آپروتیک شامل THF، استون و ۱-۴ دی اکسان در روش UALLME بر بازده استخراج

شوند در سطح اطمینان ۹۵٪ معنی دار خواهند بود [۱۵].



شکل ۳ نمودار پارتو تاثیر به دست آمده با به کارگیری CCD (خط عمودی خط چین سطح اطمینان ۹۵٪ را مشخص می کند)

باتوجه به نمودار پارتو می توان نتیجه گرفت که حجم DES اثر معنی دار و منفی بر پاسخ دارد، بدین معنی که وقتی از پایین ترین سطح آن به بالاترین سطح می رویم، کارایی استخراج کاهش پیدا می کند. حجم THF اثر غیرمعنی دار و منفی بر پاسخ دارد. با وجود استفاده از THF برای خودتجمعی مولکول های DES، بازیابی همه مولکول های DES افزوده شده به درون محلول غیرممکن است و بنابراین، مقداری از آن در محلول باقی خواهد ماند. با افزایش در حجم DES و THF افزوده شده، حجم فاز جدا شده نیز افزایش می یابد و از طرف دیگر، حجم DES و THF باقی مانده نیز افزایش می یابد. از آنجا که در نهایت تنظیم حجم انجام می شود، این اثر منفی را نمی توان به رقیق شدن آنالیت درون فاز نهایی نسبت داد. از اینرو، برپایه اینکه دارو می تواند بین DES و THF جدا شده از محلول و باقی مانده در محلول توزیع شود، اثر منفی این عامل ها را می توان به افزایش مقدار این حلال های باقی مانده در محلول که موجب نگه داشتن

به نظر می رسد "اثر حل کردن با نمک" پدیده غالب. همچنین، آزمون توکی نشان داد که نتایج به دست آمده با درصدهای متفاوت نمک به طور معنی داری باهم تفاوت ندارند. بنابراین، آزمایش ها بدون افزودن نمک انجام داده شد.

#### بهینه سازی چند متغیره عامل های دیگر با CCD

در ادامه، برای بهینه سازی عامل های موثر دیگر در UALLME بر پایه DES از CCD در ۵ سطح استفاده شد. برای این منظور، چهار متغیر شامل pH، حجم DES، حجم THF و زمان فراصوت به عنوان عامل های اصلی موثر بر کارایی استخراج بررسی شد. سطوح عامل های مورد بررسی بر پایه مقادیر کدبندی شده و نشده در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱ سطوح کدبندی شده و نشده عامل های مورد بررسی با به کارگیری CCD

| عامل                   | سطوح    |     |     |     |         |
|------------------------|---------|-----|-----|-----|---------|
|                        | -a (-۲) | -۱  | ۰   | +۱  | +a (+۲) |
| pH:A                   | ۲       | ۴٫۵ | ۷   | ۹٫۵ | ۱۲      |
| B: حجم DES (میکرولیتر) | ۳۰۰     | ۴۰۰ | ۵۰۰ | ۶۰۰ | ۷۰۰     |
| C: حجم THF (میکرولیتر) | ۳۰۰     | ۴۰۰ | ۵۰۰ | ۶۰۰ | ۷۰۰     |
| D: زمان فراصوت (دقیقه) | ۱       | ۴   | ۷   | ۱۰  | ۱۳      |

طراحی آزمایش ها برپایه CCD انجام شد. همچنین، ۳۰ آزمایش با شش تکرار در نقطه مرکزی با ترتیب تصادفی انجام شد تا اثر عامل های کنترل نشده که ممکن است تمایل به یک طرف را در اندازه گیری ها اعمال کنند، به حداقل برسد. جواب های به دست آمده با ANOVA بررسی شدند و نتایج با نمودار پارتو<sup>۱</sup> نمایش داده شده است (شکل ۳). در این نمودار طول هر میله متناسب با اهمیت هر عامل بر کارایی استخراج کارودیلول است. خط عمودی خط چین در نمودار پارتو سطح اطمینان با احتمال ۹۵٪ را نشان می دهد. بنابراین، اثراتی که از این خط عمودی رد

شده‌اند. از آنجا که توان دوم DES از نظر آماری معنی‌دار است، در شکل‌های ۴-ب، ۴-ج و ۴-ه نمودارهای سهمی‌وار مشاهده می‌شود. همچنین، توان دوم pH معنی‌دار است که می‌توان در شکل‌های ۴-الف، ۴-ب و ۴-د این اثر را مشاهده کرد. معنی‌دار بودن برهم‌کنش بین حجم‌های DES و THF را می‌توان در شکل ۴-ج مشاهده کرد که نمودار رویه پاسخ تقریبی یک پیچ و تاب خوردگی از خود نشان می‌دهد. برپایه معیارهای یادشده در جدول ۲، بهینه‌سازی انجام شد. شرایط مربوط به مطلوبیت برابر یک عبارت بود از ۷/۲۹ برای pH، ۴۰۹ میکرولیتر برای DES، ۵۴۶ میکرولیتر برای THF و ۱ دقیقه برای مدت فراصوت. در نهایت شرایط بهینه به‌دست آمده با CCD در ترکیب با تابع مطلوبیت برای روش UALLME برپایه DES برای میکرواستخراج داروی کارودیلول به‌صورت تجربی بررسی شد. بدین منظور، آزمایش در شرایط بهینه چندین بار تکرار و مشاهده شد، شدت فلورسانس به‌دست آمده ارتباط نزدیکی با شدت فلورسانس پیشنهادشده با نرم‌افزار برای شرایط بهینه دارد. این نشان‌دهنده مناسب بودن روش مورد استفاده برای بهینه‌سازی روش UALLME بر پایه DES است.

جدول ۳ معیارهای بهینه‌سازی انتخاب شده برای هر یک از عامل‌ها و پاسخ

| نام                    | هدف      | وزن | اهمیت |
|------------------------|----------|-----|-------|
| pH: A                  | در گستره | ۱   | -     |
| B: حجم DES (میکرولیتر) | در گستره | ۱   | -     |
| C: حجم THF (میکرولیتر) | در گستره | ۱   | -     |
| D: زمان فراصوت (دقیقه) | در گستره | ۱   | -     |
| پاسخ                   | بیشینه   | ۱   | ۵     |

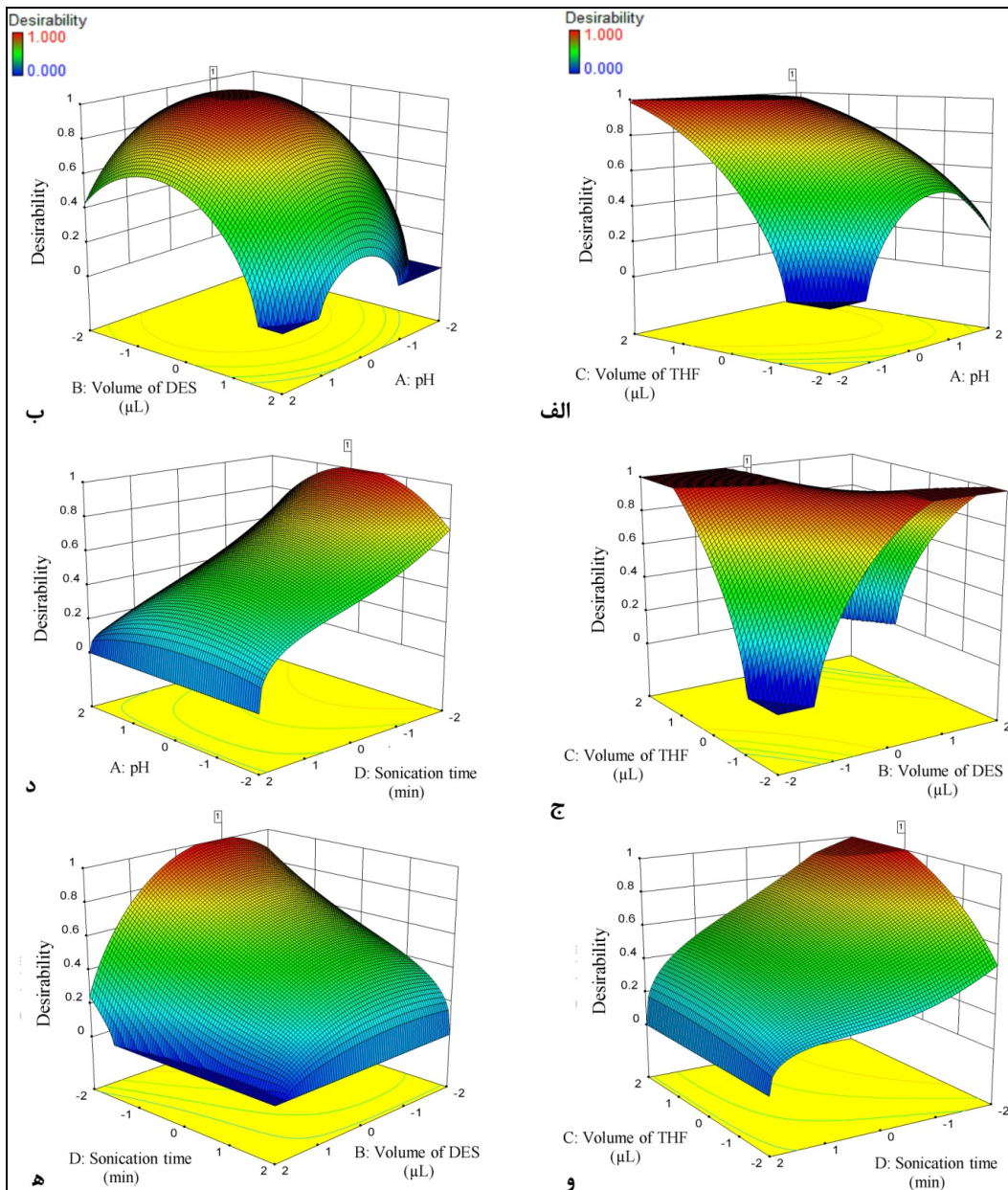
آنالیت با خود می‌شوند، نسبت داد. از دیگر عامل‌های معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵٪ می‌توان به برهم‌کنش بین حجم‌های DES و THF و توان دوم DES و pH اشاره کرد، است و [۷]گریزانه نتایج ANOVA، نشان داد که برای مدل مقدار F محاسبه شده (۸/۲۰) بزرگتر از مقدار بحرانی است و از لحاظ مقدار P کمتر از ۰/۰۵ است (۰/۰۰۰۱) و این به مفهوم آن است که مدل در سطح اطمینان ۹۵٪ معنی‌دار است. مقدار P برای نقص برازش<sup>۱</sup> ۰/۶۶۱ به‌دست آمد که بزرگتر از ۰/۰۵ است که نشان دهنده اهمیت بیشتر مدل توسعه داده شده در سطح اطمینان ۹۵٪ است [۱۶ تا ۱۹].

جدول ۲ نتایج ANOVA به‌دست آمده برای CCD

| منبع         | مجموع مربعات | درجات آزادی | مربع میانگین | مقدار F | مقدار P |
|--------------|--------------|-------------|--------------|---------|---------|
| مدل          | ۸۲۷۰٫۲۴      | ۱۴          | ۵۹۰٫۷۳       | ۸٫۲۰    | ۰٫۰۰۰۱  |
| باقی‌مانده   | ۱۰۸۰٫۱۰      | ۱۵          | ۷۲٫۰۱        |         |         |
| نقص برازش    | ۶۵۵٫۳۷       | ۱۰          | ۶۵٫۵۴        | ۰٫۷۷    | ۰٫۶۶۱۰  |
| خطای خالص    | ۴۲۴٫۷۳       | ۵           | ۸۴٫۹۵        |         |         |
| کل اصلاح شده | ۹۳۵۰٫۳۵      | ۲۹          |              |         |         |

برای به‌دست آوردن شرایط بهینه از روش تابع مطلوبیت استفاده شد و برای این هدف از گزینه مطلوبیت در نرم‌افزار دیزاین اکسپرت استفاده شد. در این روش هر پاسخ تبدیل به تابع مطلوبیت می‌شود که گستره صفر تا ۱ را دارد و هدف پیدا کردن یک ترکیبی از سطوح عامل‌ها است که مقدار مطلوبیت حداکثر است [۲۰]. با این تابع مطلوبیت با تمام اهداف از پیش انتخاب شده برای هر عامل که در جدول ۳ نشان داده شده است، بهینه‌سازی انجام شد و رویه پاسخ به‌دست آمده برای تابع مطلوبیت کل در شکل ۴ نشان داده شده است. این نمودارهای رویه پاسخ برای یک جفت عامل معین به‌دست آمده است. در حالی که، دیگر عامل‌ها در مقادیر بهینه‌شان ثابت نگه‌داشته

1- Lack-of-fit



شکل ۴ نمودارهای رویه پاسخ برای دو عامل بر پایه تابع مطلوبیت (عامل‌های دیگر در مقادیر بهینه‌شان تثبیت شده‌اند).



گونه‌های مزاحم تحت شرایط بهینه بررسی و درصد تغییر در شدت فلورسانس ( $\Delta F\%$ ) محاسبه شد. نتایج در جدول ۵ آورده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، بیشتر داروها مزاحم خیلی کمی را با وجود غلظت بالایشان نشان می‌دهند. همچنین، نتایج آزمون توکی نشان داد که تنها غلظت ۵۰ ppm از اکس کاربازپین و لورازپام تفاوت معنی‌داری را در مقایسه با کارودیلول تنها نشان می‌دهند. درحالی‌که، غلظت ۵ ppm از این مزاحم‌ها نیز تفاوت معنی‌داری ندارند.

جدول ۵ بررسی اثر مزاحمت داروهای دیگر بر استخراج کارودیلول ( $50 \text{ ng ml}^{-1}$ )

| نام دارو      | غلظت گونه مزاحم ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) | درصد تغییر شدت فلورسانس ( $\Delta F\%$ ) |
|---------------|---|--|
| آملودیپین     | ۵   | -۶٫۱۵ <sup>a</sup>                       |
| کاربامازپین   | ۵   | -۷٫۶۷ <sup>a</sup>                       |
| لامیتروژن     | ۵   | -۷٫۰۰ <sup>a</sup>                       |
| لوزارتان      | ۵۰  | -۶٫۸۴ <sup>a</sup>                       |
| نیفیدپین      | ۵   | -۱۱٫۸۵ <sup>a</sup>                      |
| اکس کاربازپین | ۵۰  | -۳۹٫۲۸ <sup>b</sup>                      |
| اکس کاربازپین | ۵   | -۵٫۵۳ <sup>a</sup>                       |
| فتوباریتال    | ۵۰  | ۷٫۴۸ <sup>a</sup>                        |
| لورازپام      | ۵۰  | -۳۸٫۰۹ <sup>b</sup>                      |
| لورازپام      | ۵   | -۲٫۰۵ <sup>a</sup>                       |
| فنی‌توئین     | ۵۰  | -۳٫۰۳ <sup>a</sup>                       |

a یا b: گروه‌بندی به‌دست آمده از ANOVA یک‌طرفه دنبال شده با آزمون توکی به‌عنوان آزمون تعقیبی

#### کاربردهای تجزیه‌ای

کاربرد روش UALLME بر پایه DES با تجزیه داروی موردنظر در نمونه‌های پلاسما بررسی شد. در نمونه‌های پلاسما تجزیه‌شده هیچ اثری از داروی کارودیلول پیدا نشد که نشان‌دهنده پایین‌بودن غلظت دارو زیر LOD روش یا عدم حضور دارو بوده است. با افزودن مقدار مناسب از دارو به نمونه‌های

پس از بهینه‌سازی، عملکرد تجزیه‌ای روش UALLME بر پایه DES در عبارتهای خطی‌ودن، حد تشخیص<sup>۱</sup> (LOD)، حد تعیین کمی<sup>۲</sup> (LOQ)، دقت و درصد بازیابی استخراج بررسی شد که نتایج در جدول ۴ آورده شده است. نمودار واسنجی<sup>۳</sup> در شش سطح غلظتی با نمونه‌های پلاسمای آغشته‌شده در گستره غلظتی ۱۵ تا  $1000 \text{ ng ml}^{-1}$  با ضریب تعیین ( $R^2$ ) ۰٫۹۹۹۳ تهیه شد که نشان‌دهنده خطی‌بودن عالی روش است. مقادیر LOD و LOQ به ترتیب برپایه نسبت نشانک‌به‌نوفه  $3/3$  و  $10$  محاسبه شدند [۲۱]. دقت روش در عبارتهای، دقت در طول روز و دقت بین روز محاسبه شد و در عبارتهای انحراف‌های استاندارد نسبی<sup>۴</sup> (RSDs) بیان شدند. بازیابی استخراج تحت شرایط بهینه در غلظت  $50 \text{ ng ml}^{-1}$  برپایه معادله زیر محاسبه شد:

که در آن  $C_i$  غلظت اولیه کارودیلول در نمونه،  $C_f$  غلظت نهایی کارودیلول در فاز DES،  $V_i$  حجم پلاسما رقیق‌نشده ( $0.6$  میلی‌لیتر) و  $V_f$  حجم نهایی فاز DES ( $250$  میکرولیتر) است.

جدول ۴ عملکرد تجزیه‌ای روش UALLME بر پایه DES در ترکیب با اسپکتروفلوریمتر برای آنالیز کارودیلول

| بازیابی استخراج (%) | RSD% (n=3) |            | LOQ ( $\text{ng ml}^{-1}$ ) | LOD ( $\text{ng ml}^{-1}$ ) | $R^2$  | گستره خطی ( $\text{ng ml}^{-1}$ ) |
|---------------------|------------|------------|-----------------------------|-----------------------------|--------|-----------------------------------|
|                     | مابین روز  | در طول روز |                             |                             |        |                                   |
| ۹۳٫۲                | ۷٫۶۸       | ۶٫۹۵       | ۹٫۸                         | ۳٫۶                         | ۰٫۹۹۹۳ | ۱۵-۱۰۰۰                           |

در ادامه، انتخاب‌پذیری روش حاضر با تجزیه داروی کارودیلول در حضور تعدادی از داروها بررسی شد. برای این منظور روش UALLME بر پایه DES برای غلظت  $1 \text{ ng ml}^{-1}$  از کارودیلول در حضور غلظت‌های ۱۰۰۰ یا ۱۰۰ برابر

1. Limit of detection

2. Limit of quantitation

3. Calibration

4- Relative standard deviations

مقایسه و در اکثر موارد بهتر است. روش UALLME بر پایه DES گستره خطی مناسب و وسیع، LOD پایین تر و دقت خوبی را دارد. در کنار این موارد، استفاده از حلال سبز مزیت دیگر این روش است.

جدول ۶ عملکرد تجزیه‌ای روش حاضر برای نمونه‌های پلاسما

| مقدار افزوده شده | مقدار پیداشده* | بازیابی نسبی | RSD% (n=3) |
|------------------|----------------|--------------|------------|
| ۳۰۰              | ۲۷۵±۲۴         | ۹۱٫۷         | ۸٫۸        |
| ۵۰۰              | ۴۶۶±۳۵         | ۹۳٫۲         | ۷٫۵        |

\* مقدار پیداشده به صورت میانگین ± انحراف استاندارد گزارش شده است.

پلاسما به حجم ۰/۶ میلی‌لیتر، نمونه‌های پلاسما آغشته شده تهیه شدند. نتایج در جدول ۶ نشان داده شده است. در این جدول بازیابی‌های نسبی به صورت درصد غلظت داروی پیداشده به غلظت افزوده شده، محاسبه شدند. این مقادیر به دست آمده برای بازیابی‌های نسبی و %RSD به ترتیب نشان‌دهنده درستی و دقت خوب روش حاضر برای بررسی داروی کارودیلول در نمونه‌های پلاسما است.

مقایسه روش حاضر با دیگر روش‌های گزارش شده

جدول ۷ برخی از ویژگی‌های تجزیه‌ای روش حاضر را در مقایسه با دیگر روش‌های گزارش شده برای اندازه‌گیری کارودیلول در نمونه‌های زیستی نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود، در مقایسه با سایر روش‌ها، نتایج این روش قابل

جدول ۷ مقایسه روش حاضر با روش‌های دیگر برای اندازه‌گیری کارودیلول در نمونه‌های زیستی

| روش                    | وسیله تشخیص      | نمونه  | LOD (ng ml <sup>-1</sup> ) | گستره خطی (ng ml <sup>-1</sup> ) | RSD% (در طول روز) | مرجع     |
|------------------------|------------------|--------|----------------------------|----------------------------------|-------------------|----------|
| استخراج جذبی فیلم نازک | اسپکتروفلوریمتری | پلاسما | ۴٫۵                        | ۱۵-۳۰۰                           | ۵                 | [۲۲]     |
| DLLME*-SFO**           | اسپکتروفلوریمتری | پلاسما | ۱۸                         | ۴۰-۳۰۰                           | ۸٫۷               | [۲۳]     |
| DLLME                  | HPLC-UV          | پلاسما | ۱۴                         | ۵۰-۷۵۰                           | ۸٫۸               | [۲۴]     |
| رسوب پروتئین           | HPLC-DAD         | سرم    | ۶۶۰                        | ۴۸۰-۳۰۲۰                         | ۲٫۹               | [۲۵]     |
| استخراج مایع-مایع      | GC-MS            | پلاسما | ۵                          | ۱۵-۵۰۰                           | ۴٫۴۱              | [۲۶]     |
| استخراج فاز جامد       | LC-MS            | پلاسما | <۱۰                        | ۲۵-۶۲۵                           | ۵٫۲               | [۲۷]     |
| UALLME بر پایه DES     | اسپکتروفلوریمتری | پلاسما | ۳٫۳                        | ۱۵-۱۰۰۰                          | ۶٫۹۵              | کار حاضر |

Solidification of floating organic \*\*

\* DLLME بر پایه منجمدسازی قطره آلی شناور

## نتیجه‌گیری

نمونه‌های پلاسما استفاده شد. داشتن گستره واسنجی خطی وسیع‌تر، حدتشخیص پایین و استفاده از حلال‌های استخراج سبز از مزایای این روش در مقایسه روش‌های گزارش شده برای اندازه‌گیری کارودیلول است. سادگی، سریع بودن و هزینه پایین از دیگر مزایای این روش است. روش طراحی آزمایش مرکب مرکزی در ترکیب با تابع مطلوبیت برای به دست آوردن شرایط بهینه روش UALLME بر پایه DES به کار برده شد. تحت

DES به‌عنوان نسل جدیدی از حلال‌های سبز ویژگی منحصر به فردی دارند و بنابراین، گزینه‌های مناسبی برای جایگزین کردن حلال‌های خطرناک و مضر در های میکرواستخراج هستند. یک روش UALLME بر پایه DES به‌عنوان حلال استخراج‌کننده توسعه داده شد. این روش به‌طور موفقیت‌آمیزی برای استخراج و پیش‌تغلیظ داروی کارودیلول از

دقت‌های خوبی) را ارائه داده است.

شرایط بهینه روش توسعه داده شده ویژگی تجزیه‌ای خوب (خطی بودن عالی، گستره خطی وسیع، حد تشخیص پایین و

## مراجع

- [1] Galanopoulou, O.; Rozou, S.; Antoniadou-Vyza, E.; J. Pharm. Biomed. Anal. 48, 70-77, 2008.
- [2] Heidari, H.; Limouei-Khosrowshahi, B.; J. Chromatogr. B 1114-1115, 24-30, 2019.
- [3] Rezaee, M.; Assadi, Y.; Milani Hosseini, M.-R.; Aghaee, E.; Ahmadi, F.; Berijani, S.; J. Chromatogr. A 1116, 1-9, 2006.
- [4] Regueiro, J.; Llompert, M.; Garcia-Jares, C.; Garcia-Monteagudo, J.C.; Cela, R.; J. Chromatogr. A 1190, 27-38, 2008.
- [5] Abbott, A.P.; Boothby, D.; Capper, G.; Davies, D.L.; Rasheed, R.K.; J. Am. Chem. Soc. 126, 9142-9147, 2004.
- [6] Shishov, A.; Bulatov, A.; Locatelli, M.; Carradori, S.; Andruch, V.; Microchem. J. 135, 33-38, 2017.
- [7] Heidari, H.; Ghanbari-Rad, S.; Habibi, E.; J. Food Compos. Anal. 87, 103389, 2020.
- [8] Shishov, A.Y.; Chislov, M.V.; Nechaeva, D.V.; Moskvina, L.N.; Bulatov, A.V.; J. Mol. Liq. 272, 738-745, 2018.
- [9] Deng, W.; Yu, L.; Li, X.; Chen, J.; Wang, X.; Deng, Z.; Xiao, Y.; Food Chem. 274, 891-899, 2019.
- [10] Khezeli, T.; Daneshfar, A.; Sahraei, R.; Talanta 150, 577-585, 2016.
- [11] Liu, W.; Zhang, K.; Chen, J.; Yu, J.; J. Mol. Liq. 260, 173-179, 2018.
- [12] Khezeli, T.; Daneshfar, A.; Sahraei, R.; J. Chromatogr. A 1425, 25-33, 2015.
- [13] Psillakis, E.; Kalogerakis, N.; TrAC, Trends Anal. Chem. 21, 54-64, 2002.
- [14] Hashemi, M.; Jahanshahi, N.; Habibi, A.; Desalination 288, 93-97, 2012.
- [15] Heidari, H.; Razmi, H.; Talanta 99, 13-21, 2012.
- [16] Alizadeh, M.; Pirsa, S.; Faraji, N.; Food Analytical Methods 10, 2092-2101, 2017.
- [17] Ghasemi, F.; Pirsa, S.; Alizadeh, M.; Mohtarami, F.; Separation Science and Technology (Philadelphia) 53, 117-125, 2018.
- [18] Ghasemi, F.; Alizadeh, M.; Pirsa, S.; Mohtarami, F.; Journal of Agricultural Science and Technology 21, 1447-1458, 2019.
- [19] Kalantari, S.; Roufegarinejad, L.; Pirsa, S.; Gharekhani, M.; Main Group Chem. 19, 61-80, 2020.
- [20] Heidari, H.; Razmi, H.; Jouyban, A.; J. Sep. Sci. 37, 1467-1474, 2014.
- [21] ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1), International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 1994.
- [22] Karimi, S.; Talebpour, Z.; Adib, N.; Anal. Chim. Acta 924, 45-52, 2016.
- [23] Zamani-Kalajahi, M.; Fazeli-Bakhtiyari, R.; Amiri, M.; Golmohammadi, A.; Afrasiabi, A.; Khoubnasabjafari, M.; Jouyban, A.; Bioanalysis 5, 437-448, 2013.
- [24] Soltani, S.; Ramezani, A.M.; Soltani, N.; Jouyban, A.; Bioanalysis 4, 2805-2821, 2012.
- [25] Zhao, J.; Wu, H.L.; Niu, J.F.; Yu, Y.J.; Yu, L.L.; Kang, C.; Li, Q.; Zhang, X.H.; Yu, R.Q.; J. Chromatogr. B 902, 96-107, 2012.
- [26] Yilmaz, B.; Arslan, S.; J. Chromatogr. Sci. 49, 35-39, 2011.
- [27] Maurer, H.H.; Tenberken, O.; Kratzsch, C.; Weber, A.A.; Peters, F.T.; J. Chromatogr. A 1058, 169-181, 2004.

## Ultrasound-assisted liquid-liquid microextraction based on a deep eutectic solvent for extraction carvedilol from plasma samples before determination by spectrofluorimetry method

Hassan Heidari<sup>1,\*</sup>, Zeynab Esmailzadeh<sup>2</sup>, Kazem Jamshidi-Ghaleh<sup>3</sup>

1. Associate Prof. of Analytical Chemistry, Department of Chemistry, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran.
2. M.Sc. of Analytical Chemistry, Department of Chemistry, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran.
3. Prof. of Physics, Department of Physics, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran.

**Abstract:** In this study, an ultrasound-assisted liquid-liquid microextraction (UALLME) method based on the deep eutectic solvent (DES) was developed, for the first time, for extraction of carvedilol from plasma samples before analysis by spectrofluorimetry method. The DES was prepared by mixing the appropriate amount of the choline chloride and phenol in the ratio of 1:2. The prepared DES was used without any further purification for UALLME of carvedilol from plasma samples. The effects of some critical parameters including DES components ratio, salt addition, and kind of emulsifying solvent were studied and optimized by a one-at-a-time approach. A central composite design was used for efficient optimization of the rest of the main variables in the extraction procedure including pH, the volume of DES, the volume of THF, and ultrasonication time. The method showed excellent linearity ( $R^2 = 0.9993$ ) in the range of 15-1000 ng ml<sup>-1</sup>, under the optimal conditions. The extraction recovery of 93.2 % was obtained, and LOD and LOQ values were found 3.3 ng ml<sup>-1</sup> and 9.8 ng ml<sup>-1</sup>, respectively. The method was successfully applied for the determination of the drug in spiked human plasma samples where it gave relative recoveries of 91.7 % and 93.2 %.

**Keywords:** Carvedilol, Deep eutectic solvent, Central composite design, Plasma, Spectrofluorimetry.