

## تشخیص سریع و اندازه‌گیری حساس لوودوپا در نمونه‌های دارویی و زیستی با استفاده از استخراج فاز جامد ترکیب شده با طیف‌نورسنج تحرک یونی

معصومه محمدنژاد<sup>۱\*</sup> و نرگس انصاری<sup>۲</sup>

۱- استادیار شیمی تجزیه، گروه شیمی، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران

۲- استادیار فیزیک، گروه فیزیک، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران

دریافت: بهمن ۱۳۹۵، بازنگری: آبان ۱۳۹۶، پذیرش: آذر ۱۳۹۶

**چکیده:** لوودوپا دارویی است که به‌عنوان تولیدکننده ناقل عصبی دوپامین برای کنترل بیماری پارکینسون مورد استفاده قرار می‌گیرد. تعیین مقادیر این دارو در نمونه‌های زیستی برای دنبال کردن مقدار اثر درمانی آن بسیار مهم است. در این پژوهش، دستگاه طیف‌نورسنج تحرک یونی با منبع یونش کرونا به‌عنوان یک روش سریع و کارا برای اندازه‌گیری این دارو در نمونه‌های متفاوت ارائه شده است. عامل‌هایی مانند دمای محل تزریق، دمای ناحیه رانش، سرعت جریان گاز و همچنین ولتاژ منبع یونش بهینه شد. با این روش لوودوپا با حد تشخیص بسیار پایین ( $1.17 \text{ ng.ml}^{-1}$ )، در زمان تجزیه بسیار کوتاه و با بازده مناسب (۹۶.۳ تا ۹۸.۶٪) بدون نیاز به مراحل آماده‌سازی پیچیده و مقادیر زیاد حلال‌های آلی تعیین شد. برای اندازه‌گیری دقیق و گزینشی لوودوپا در نمونه ادرار نیاز به یک مرحله جداسازی است که با استفاده از نانوجندسازه گرافن آهن مغناطیسی به‌عنوان فاز جامد استخراج، این کار انجام شد. روش پیشنهادی نشان می‌دهد که ترکیب کردن دستگاه طیف‌نورسنج تحرک یونی با یک مرحله استخراج فاز جامد امکان تجزیه و اندازه‌گیری ساده، ارزان، سریع و حساس ترکیبات دارویی را در نمونه‌های زیستی میسر می‌سازد.

**واژه‌های کلیدی:** لوودوپا، طیف‌نورسنج تحرک یونی، نانوجندسازه گرافن آهن مغناطیسی، نمونه ادرار

### مقدمه

از روش‌های اندازه‌گیری داروها بر اساس روش‌های جداسازی مانند روش کروماتوگرافی گازی<sup>۱</sup> و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا<sup>۲</sup> هستند که روش‌های بسیار وقت‌گیر با شرایط کار سخت هستند. هدف از این پژوهش یافتن روشی ساده، سریع و بسیار حساس برای شناسایی و اندازه‌گیری لوودوپا است که با یک روش جداسازی اولیه برای اندازه‌گیری این دارو در نمونه ادرار، ترکیب شود.

روش طیف‌نورسنج تحرک یونی<sup>۳</sup> یک روش تجزیه‌ای است

تعیین داروها در نمونه‌های زیستی برای دنبال کردن مقدار اثر آن‌ها در سامانه بدن بسیار حائز اهمیت است. بر این اساس روش‌های متفاوتی ارائه شده که حساسیت و گزینش پذیری آن‌ها تعیین‌کننده کارایی روش‌ها برای تجزیه و اندازه‌گیری داروها در نمونه‌های حقیقی است. یکی از بزرگترین مشکلات در تجزیه نمونه‌های زیستی وجود گونه‌های متفاوت و تاثیر آن‌ها بر نشانک تجزیه‌ای داروی موردنظر است. به‌همین دلیل بسیاری

1. Gas Chromatography (GC)

2. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

3. Ion Mobility Spectrometry (IMS)

در نمونه‌های زیستی وجود دارند روش های متفاوت استخراج مانند استخراج فاز جامد<sup>۵</sup> یا میکرواستخراج فاز جامد<sup>۶</sup> [۱۸ تا ۱۹] استفاده می‌شود.

امروزه پژوهش در زمینه یافتن روش‌های ساده برای دنبال کردن و اندازه‌گیری ترکیبات دارویی درحال گسترش است. این مطالعه تلاشی است برای توسعه قابلیت دستگاه چندسازه تحرک یونی برای تشخیص و اندازه‌گیری سریع، ساده و کم هزینه لوودوپا در نمونه‌های متفاوت که برای نخستین بار معرفی می‌شود. افزون بر این کاربرد یک نانوجندسازه گرافن مغناطیسی به عنوان فاز جامد برای استخراج لوودوپا از نمونه ادرار و آنالیز آن با روش طیف‌نورسنج تحرک یونی مورد بررسی قرار می‌گیرد. گرافن ماده کربنی است که خواص فیزیکی، شیمیایی، الکتریکی و مکانیکی ویژه‌ای دارد و برای تولید مواد چندسازه‌ای بسیار مناسب است. گرافن به دلیل داشتن مساحت سطح و نسبت سطح به حجم بالا و قابلیت استفاده مجدد به عنوان جاذب برای جذب ترکیبات متفاوت مانند متیل اورانژ، نفتالن، ۱- نفتل، آرسنیک و فلزات سنگین از آب استفاده می‌شود [۲۰]. نانوذرات آهن با ویژگی‌های الکتریکی و مغناطیسی قابل توجه، تقویت‌کننده مناسبی برای ویژگی‌های مغناطیسی گرافن بشمار می‌رود. افزون بر آن، آهن به عنوان فراوان‌ترین و پایدارترین فلز، مزیت در دسترس بودن با قیمت مناسب را برای کاربردهای صنعتی به ارمغان می‌آورد. با توزیع نانوذرات آهن روی سطح گرافن و تولید چندسازه‌های پایدار می‌توان ویژگی‌های الکتریکی و مغناطیسی را بهبود داد [۲۱]. نانوجندسازه‌های بر پایه گرافن مزایای بسیاری به علت ضخامت بسیار کم، رسانندگی بالا و سطح ویژه بسیار زیاد دارند که با بهینه کردن شرایط می‌توان از آن‌ها به عنوان جاذب استفاده و آنالیت را بر روی سطح آنها جذب کرد.

در این پژوهش، آنالیت با استفاده از نانوجندسازه گرافن مغناطیسی به عنوان فاز جامد، از بستر<sup>۷</sup> پیچیده ادرار استخراج می‌شود. پس از جدا کردن نانوجندسازه مغناطیسی به وسیله آهنربا، فاز جامد با حلال متانول شسته شده و محلول حاصل حاوی آنالیت به دستگاه طیف‌نورسنج تحرک یونی تزریق می‌شود.

که در سال ۱۹۷۰ معرفی شد. در این روش، ترکیبات در اثر گرما بخار می‌شوند و در فاز گازی در اثر تبادل الکترون و یا پروتون با یون‌های واکنشگر<sup>۱</sup>، در ناحیه یونش تولید یون می‌کنند. این تبادل بر اساس تمایل ترکیبات به گرفتن الکترون یا پروتون است. یون‌های تولید شده وارد ناحیه رانش<sup>۲</sup> شده و در اثر یک میدان الکتریکی ضعیف حرکت می‌کنند و به انتهای ناحیه رانش می‌رسند. در طول مسیر رانش، یون‌ها بر اساس اندازه، شکل و بار جدا می‌شوند و در زمان‌های متفاوتی به آشکارساز می‌رسند. در نتیجه زمان رانش و رسیدن به آشکارساز مشخصه هر یون است. همچنین، تعداد یون‌های رسیده به آشکارساز و نشانک الکتریکی تولید شده نشان دهنده مقدار ترکیبات و غلظت آن‌ها است [۱ تا ۲]. حساسیت بالا، سادگی و زمان پاسخ‌دهی کوتاه از مزایای بسیار مهم روش طیف‌نورسنج تحرک یونی است.

امروزه استفاده از طیف‌نورسنج تحرک یونی گسترش یافته و برای شناسایی بسیاری از ترکیبات با پروتون‌خواهی یا الکترون‌خواهی بالا مانند آمینواسیدها، داروهای مسکن، گازهای شیمیایی و همچنین آلاینده‌های محیط زیست به کار برده می‌شود [۳ تا ۵]. لوودوپا (۲-آمینو-۳-۴ و ۳-دی‌هیدروکسی‌فنیل) پروپیونیک اسید) دارویی است که به عنوان پیش‌ماده ترکیب انتقال دهنده عصبی (دوپامین) در بیماران پارکینسونی عمل می‌کند [۶]. این بیماری یک اختلال عصبی است و زمانی اتفاق می‌افتد که مغز نتواند به مقدار کافی دوپامین تولید کند. تجویز لوودوپا برای درمان بیماری به صورت یک چهارم قرص و سه نوبت در روز شروع می‌شود و سپس به مقدار بیشینه آن (۱۰۰۰ تا ۱۲۰۰ میلی گرم در روز) افزایش می‌یابد [۷].

به دلیل اثر این دارو و استفاده از آن در درمان بیماری پارکینسون، مطالعات زیادی در زمینه تعیین مقادیر آن صورت گرفته است. در این راستا، روش‌هایی مانند طیف‌نورسنجی [۸ تا ۹]، الکتروکودج<sup>۳</sup> [۱۰ تا ۱۱]، طیف‌سنجی فلورومتالی<sup>۴</sup> [۱۲ تا ۱۳] روش‌های الکتروشیمیایی [۱۴ تا ۱۵] و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا [۱۶ تا ۱۷] برای اندازه‌گیری لوودوپا ارائه شده است. به‌طور معمول در این روش‌ها برای حذف مزاحمت گونه‌هایی که

1. Reactant Ions      2. Drift tube      3. Electrophoresis      4. Spectrofluorimetry      5. Solid Phase Extraction (SPE)  
6. Solid Phase Micro Extraction (SPME)      7. Matrix

## بخش تجربی

### مواد شیمیایی

همه مواد مورد استفاده (لوودوپا، نمک آهن آمونیم سولفات، متانول، استیک اسید و سدیم استات برای ساخت بافر) از شرکت مرک آلمان خریداری شدند و دارای خلوص تجزیه‌ای بودند. محلول استاندارد لوودوپا با غلظت  $100 \text{ mg/l}$  با حل کردن  $1$  میلی‌گرم از آن در  $10$  میلی‌لیتر آب مقطر تهیه شد.

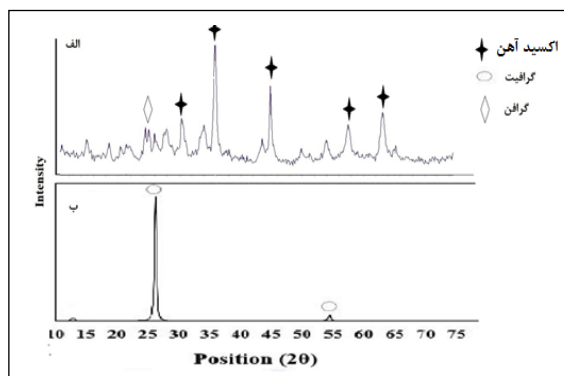
### دستگاه‌ها

دستگاه طیف‌نورسنج تحرک یونی مورد استفاده در این پژوهش مدل IMS-300 بود که در دانشگاه صنعتی اصفهان ایران طراحی و ساخته شده است. قسمت اصلی دستگاه، سل آن است که شامل دو ناحیه یونش (قسمت اول) و رانش (قسمت دوم) است (شکل ۱). قسمت اول مجهز به یک منبع یونش از نوع تخلیه‌ای کرونا است که در دو حالت مثبت و منفی عمل می‌کند. هوا به عنوان گاز حامل و گاز رانش برای انتقال نمونه به قسمت یونش مورد استفاده قرار می‌گیرد. یون‌های واکنشگر اصلی در مد مثبت دستگاه،  $\text{H}_3\text{O}^+$  و  $\text{NH}_4^+$  هستند که از طریق واکنش انتقال پروتون باعث یونیزه شدن نمونه آنالیت در ناحیه یونش می‌شوند. محل تزریق و وسیله تزریق دستگاه به گونه‌ای طراحی شده است که هر دو نمونه جامد و مایع قابل تزریق به دستگاه باشند [۲۲]. برای مشخصه‌یابی نانوجندسازه ساخته شده از دستگاه پراش پرتو ایکس مدل STADI-STOE با منبع پرتو X مس  $\lambda=1.54060\text{\AA}$  و دستگاه FT-IR مدل بروکر استفاده شد.

### سنتر و مشخصه‌یابی نانوجندسازه گرافن/آهن مغناطیسی

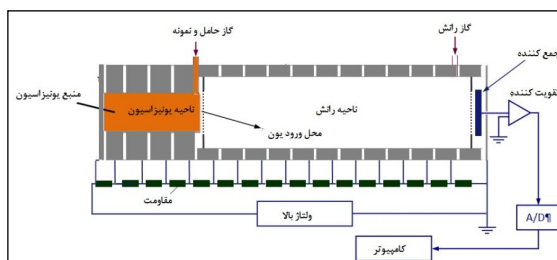
نانوذره به روش سنتر الکتروشیمیایی مستقیم آندی محلول  $0.1$  مولار آهن آمونیم سولفات و آب مقطر با استفاده از ویفر سیلیکونی لایه نشانی شده با پلاتین به عنوان آند و فویل گرافیت به عنوان کاتد ساخته شد. فاصله بین الکترودها  $3$  سانتی‌متر و اختلاف پتانسیل اعمال شده بین آند و کاتد برابر  $10 \text{ v DC}$  است. واکنش در  $3$  ساعت و در دمای اتاق انجام شد. در پایان فرایند پودر مغناطیسی سیاه رنگ تشکیل شده چندین بار با آب مقطر شسته و روی دستگاه گرم‌کن با دمای  $100$  درجه سانتی‌گراد خشک شد [۲۳].

برای مشخصه‌یابی عناصر از نانوجندسازه ساخته شده و فویل گرافیت اولیه الگوی XRD گرفته شده که تصاویر مربوط به ترتیب در شکل‌های ۲-الف و ۲-ب نشان داده شده است. با توجه به شکل الف پیک‌های آهن اکسید در  $2\theta$  برابر با  $35^\circ$ ،  $43^\circ$  و  $57.63^\circ$  دیده می‌شود. پیک پهن در حوالی  $2\theta$  برابر با  $26^\circ$  دلالت بر وجود صفحات دوبعدی گرافن می‌کند [۲۴].



شکل ۲ الگوی پراش پرتو ایکس الف: نانوجندسازه سنتر شده و ب: گرافیت

همچنین، طیف IR برای گرافیت و چندسازه گرافن-آهن با ساخت قرص KBr ثبت شد. در شکل ۳ پیک‌های ارتعاشی O-H مربوط به گروه هیدروکسیل در گرافن و آب جذب شده در  $2900 \text{ cm}^{-1}$ ، لایه‌های گرافن در حوالی  $1630 \text{ cm}^{-1}$  و  $1510 \text{ cm}^{-1}$ ، C-O در  $1126 \text{ cm}^{-1}$ ، C=C در  $1060 \text{ cm}^{-1}$  و C-O-Fe در  $1020 \text{ cm}^{-1}$  مشاهده می‌شود. پیک جذبی  $597 \text{ cm}^{-1}$  مربوط به ارتعاش Fe-O در اکسید آهن است.



شکل ۱ شماتیک دستگاه طیف‌نورسنج تحرک یونی

## آماده سازی نمونه‌های قرص و ادرار و فرایند استخراج

۵ عدد نمونه قرص لوودوپا C ۲۰۰ میلی گرمی پس از وزن کردن به خوبی آسیاب شد و ۰٫۱ گرم از آن با محلول کلریدریک اسید رقیق حل شد. پس از هم‌زدن و پس از ۱۰ دقیقه محلول صاف شد و برای قرار گرفتن غلظت آن در محدوده غلظتی خطی، رقیق شد.

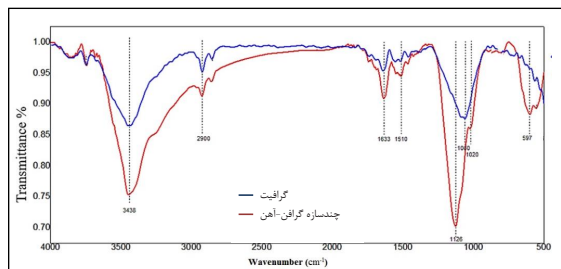
نمونه ادرار از داوطلب جمع‌آوری و در یخچال نگهداری شد. به یک میلی‌لیتر از نمونه ادرار که با دمای محیط هم‌دم شده بود مقادیر مناسب از محلول استاندارد لوودوپا افزوده و تا ۵۰۰ برابر به وسیله آب مقطر رقیق شد.

برای تجزیه بهتر نمونه، لازم است آنالیت از ماتریس پیچیده ادرار استخراج شود. بهترین استخراج با بهینه‌کردن شرایط متفاوت آزمایش مانند pH، زمان، مقدار فاز جامد و ... به دست می‌آید. براساس شرایط بهینه (زمان و pH) فاز جامد در معرض ۱۰ میلی‌لیتر محلول ادرار حاوی لوودوپا قرار گرفت. پس از فرایند جذب، جاذب مغناطیسی به وسیله یک آهنربای قوی از محلول جدا شد و به وسیله متانول شسته شد. محلول متانول جدا شده پس از عبور دادن از یک فیلتر سرسرنجی و قرار گرفتن بر وسیله تزریق دستگاه طیف‌نورسنج تحرک یونی به محل تزریق، وارد شد و تجزیه انجام گرفت.

## نتیجه‌ها و بحث

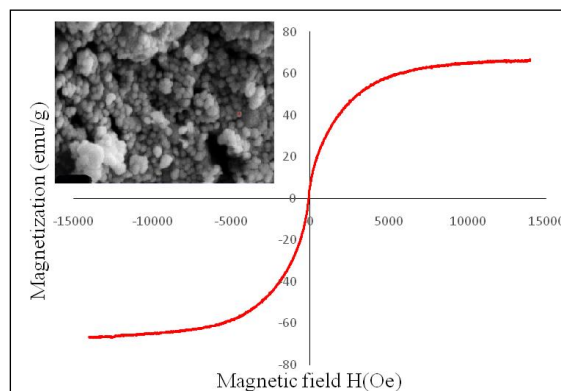
## طیف تحرک یونی و محاسبه مقدار تحرک یونی

برای ثبت تحرک یونی در دستگاه در ابتدا نیاز است شرایط ورود نمونه به دستگاه طیف‌نورسنج تحرک یونی بهینه شود. برای جلوگیری از مزاحمت حلال و اثر پروتون‌خواهی آن، مقدار ۱ میکرولیتر از آنالیت روی وسیله تزریق جامد نشانده شد و پس از تبخیر حلال در بخش تزریق دستگاه قرار گرفت. آنالیت به دلیل دمای بالای محل تزریق، بخار شده و به وسیله گاز حامل وارد سل دستگاه می‌شود و در سل دستگاه شروع به حرکت می‌کند. عوامل متفاوت دستگاهی بر تحرک یون‌های به دست آمده از



شکل ۳ طیف IR نانوجندسازه سنتز شده

برای بررسی رفتار مغناطیسی نمونه، منحنی پسماند مغناطیسی<sup>۱</sup> ثبت شد (شکل ۴). منحنی، چندسازه تولید شده رفتار سوپر پارامغناطیسی با مغناطش اشباع  $66,17 \text{ (emu.g}^{-1}\text{)}$  دارد که نزدیک مغناطش اکسیدهای آهن است و بیانگر خاصیت مغناطیسی بسیار بالا است. مورفولوژی نانوذرات به دست آمده از طریق میکروسکوپ الکترونی روبشی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و با بررسی تصاویر، میانگین اندازه نانوذرات در حدود ۵۰ نانومتر به دست آمد. در شکل ۴ تصویر نانوذرات دیده می‌شود.

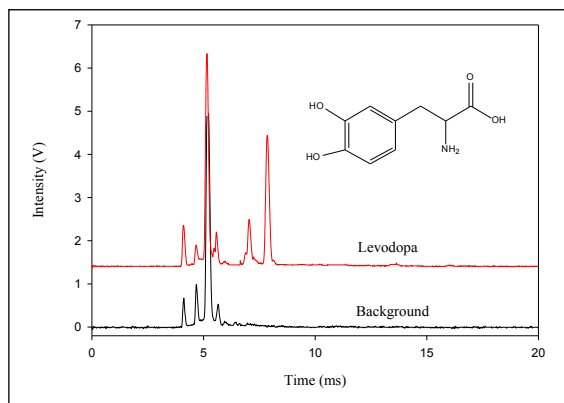


شکل ۴ منحنی پسماند مغناطیسی چندسازه گرافن آهن و عکس میکروسوپ الکترونی

خاصیت مغناطیسی بالا این ترکیب باعث می‌شود که فاز جامد پس از عمل جذب به راحتی به وسیله یک آهنربا از محلول اولیه جدا شده و پس از شستشو دوباره مورد استفاده قرار گیرد. افزون بر این، امکان استفاده از آن را به عنوان یک بستر برای جذب و حذف مواد گوناگون از نمونه‌های زیست محیطی فراهم می‌سازد.

1. Hysteresis loop

$$K_{o(unknown)} = K_{o(s\ standard)} \times \frac{t_{d(s\ standard)}}{t_{d(unknown)}}$$



شکل ۵ طیف IMS لوودوپا

در معادله،  $K_0$  نشان دهنده مقادیر تحرک یونی برای نمونه استاندارد (یون آمونیم) و آنالیت و  $t_d$  نشان دهنده زمان رسیدن یون‌های استاندارد و آنالیت به آشکارساز است.

مقادیر زمان رانش نسبی و تحرک یونی کاهشی به دست آمده برای پیک‌های لوودوپا نسبت به یون‌های واکنشگر در جدول ۲ آورده شده است. بر اساس جستجوهای انجام شده تاکنون مقادیر تحرک یون‌های به دست آمده از لوودوپا در مقالات علمی گزارش نشده است.

بر اساس نتایج به دست آمده از آنجایی که در طیف تحرک یونی لوودوپا دو پیک در دو زمان متفاوت مشاهده می‌شود، می‌توان نتیجه گرفت که یون‌های به دست آمده از لوودوپا دارای اندازه و شکل متفاوت و بنابراین، دارای تحرک‌های متفاوتی هستند. احتمال دارد پیک مربوط به زمان  $7.03 \text{ ms}$  مربوط به یون به دست آمده از تفکیک و شکسته شده مولکول باشد که کوچکتر بوده، دارای تحرک بالاتری ( $1/86$ ) است و در زمان کوتاه‌تری به آشکارساز می‌رسد. پیک مشاهده شده در زمان  $7.95 \text{ ms}$  مربوط به فرم پروتونه شده لوودوپا است که به دلیل بزرگتر بودن دارای تحرک کمتری بوده و در زمان دیرتری به آشکارساز می‌رسد [۵].

آنالیت موثرند که به منظور دست‌یابی به بهترین شرایط و تعیین زمان رسیدن یون‌ها به آشکارساز نیاز است اثر آن‌ها مورد بررسی قرار گیرد. به این منظور با تغییر هر کدام از متغیرهای ولتاژ، سرعت جریان گاز حامل و رانش، پهنای پالس اعمالی و دمای محل تزریق و سل، نشانک مربوط به آنالیت ثبت شد. مقادیر بهینه برای حصول بهترین طیف‌های تحرک یونی، شدت نشانک بیشتر برای تعیین غلظت پایین‌تر و حد تشخیص بهتر به دست آمد. نتایج بهینه‌سازی متغیرهای دستگاه در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱ عامل‌های بهینه شده طیف‌نورسنج تحرک یونی

مقدار بهینه	عامل
۲٫۵ KV	ولتاژ کرونا
۵۰۰ V/cm	میدان رانش
۸۰۰ ml/min	سرعت جریان گاز رانش
۳۰۰ ml/min	سرعت جریان گاز حامل
۲۰۰ °C	دمای ناحیه رانش
۲۵۰ °C	دمای محل تزریق
۶۰ μs	پهنای پالس
گاز مورد استفاده	هوا

پس از بهینه‌سازی شرایط دستگاه، طیف تحرک یونی در عدم حضور و در حضور لوودوپا ثبت شد (شکل ۵). لوودوپا به دلیل داشتن گروه آمین در ساختار خود تمایل زیادی به جذب پروتون و تولید یون مثبت دارد. در سل طیف‌نورسنج تحرک یونی دو گونه یونی از لوودوپا تشکیل می‌شود که دارای تحرک‌های متفاوتی بوده و در زمان‌های متفاوت به آشکارساز می‌رسند. یکی از پیک‌ها مربوط به پروتونه شدن گروه آمین و دیگری احتمال دارد مربوط به شکسته شدن مولکول و تولید یونی دیگر باشد.

دو پیک مربوط به لوودوپا دارای زمان‌های رانش  $7.95 \text{ ms}$  و  $7.03 \text{ ms}$  هستند. مقدار تحرک یونی کاهشی<sup>۱</sup> این دو یون با در نظر گرفتن مقدار تحرک یونی آمونیم در دمای  $200 \text{ °C}$  ( $3.24 \text{ cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) از معادله زیر به دست می‌آید [۲۵]:

1. Reduced mobility

جدول ۲ مقادیر زمان رانش، زمان رانش نسبی و تحرک یونی کاهش یافته

برای پیک‌های مشاهده شده از لوودوپا

لوودوپا		یون‌های واکنشگر			
L2	L1	H <sub>3</sub> O <sup>+</sup>	NO <sup>+</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	
۷,۹۵	۷,۰۳	۵,۰۵	۴,۵۶	۴,۰۴	زمان رانش (ms)
۱,۹۷	۱,۷۴	۱,۲۵	۱,۱۳	۱,۰۰	زمان رانش نسبی
۱,۶۴	۱,۸۶	۲,۵۹	۲,۸۷	۳,۲۴	تحرک یونی کاهشی

منحنی واسنجی<sup>۱</sup> و عامل‌های تجزیه‌ای

در طیف تحرک یونی لوودوپا دو پیک وجود دارد که برای اندازه‌گیری حساس‌تر از پیکی استفاده می‌شود که بیشترین شدت را داشته باشد. به همین منظور پیک با زمان تحرک ۷,۹۵ ms انتخاب شد. یک سری محلول با غلظت‌های مشخص (از ۱ تا ۱۰۰ ng.ml<sup>-1</sup>) از لوودوپا ساخته شد و پس از تنظیم عامل‌های بهینه دستگاه، طیف تحرک یونی تمام محلول‌ها ثبت شد. منحنی واسنجی آنالیت با رسم بیشینه شدت پیک نسبت به غلظت در گستره غلظتی ۵,۰ تا ۲۰,۰ ng.ml<sup>-1</sup> خطی شد. مقادیر ضریب همبستگی، حد تشخیص<sup>۲</sup> و تکرارپذیری در جدول ۳ آورده شده‌است. مقادیر حدتشخیص و حد کمی بودن<sup>۳</sup> غلظتی از آنالیت است که به ترتیب نسبت نشانک<sup>۴</sup> به نوفه<sup>۵</sup> برابر ۳ و ۱۰ ایجاد کند. دقت و تکرارپذیری روش با اندازه‌گیری ۵ بار محلول آنالیت با غلظت ۱۰ ng.ml<sup>-1</sup> و تعیین مقدار انحراف استاندارد نسبی محاسبه شد. مقدار درصد بازیابی در گستره ۹۶,۳ تا ۹۸,۶٪ به‌دست‌آمد.

بهینه‌سازی شرایط استخراج لوودوپا از نمونه ادرار

استخراج لوودوپا از نمونه ادرار به‌وسیله جاذب نانوجندسازه گرافن آهن مغناطیسی انجام شد. وجود گروه‌های عاملی در ساختار آروماتیک مولکول‌های جذب شونده مانند گروه کربوکسیلیک اسید می‌تواند برهمکنش π-π را بین مولکول‌های جذب شونده و گرافن از طریق اوربیتال‌های π گروه‌های عاملی فراهم کند. از آنجایی که لوودوپا دارای گروه کربوکسیلیک است، این گروه عاملی می‌تواند روی سطح گرافن با اتم‌های کربن متصل شود و برهم‌کنش گرافن-مولکول جذب‌شونده را افزایش دهد. برهم‌کنش بین گروه کربوکسیل و گرافن یک دوقطبی را از طریق انتقال بار بین مولکول‌های جذب‌شونده و سطح جاذب القا می‌کند [۲۶]. به‌منظور رسیدن به شرایط استخراج مناسب لازم است عامل‌های متفاوت مانند زمان استخراج و pH بهینه شود.

اثر pH

pH نمونه عامل بسیار مهم در بازده جذب آنالیت از نمونه است. برای بررسی این اثر، نمونه‌های لوودوپا با غلظت یکسان و pH متفاوت (۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰) ساخته‌شد. پس از ثبت نشانک طیف‌نورسنج تحرک یونی، منحنی تغییرات شدت نسبت به pH رسم شد (شکل ۶). با توجه به نمودار، بیشترین بازده در محلول با pH برابر ۴ (حاوی استیک اسید و سدیم استات با غلظت ۰,۵ مولار) به‌دست‌آمد. استفاده از محلول بافر و حضور نمک سدیم استات به دلیل افزایش قدرت یونی محیط و اثر نمک<sup>۷</sup>، باعث کاهش حلالیت آنالیت و جذب آن بر سطح جاذب می‌شود. در مقادیر pH بالا، لوودوپا به‌راحتی اکسید می‌شود و تمایل به اتصال

جدول ۳ ارقام شایستگی برای اندازه‌گیری لوودوپا

آنالیت	گستره خطی (ng.ml <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	درصد بازیابی	LOD (ng.ml <sup>-1</sup> )	LOQ (ng.ml <sup>-1</sup> )	RSD% برای ۵ بار اندازه‌گیری
لوودوپا	۵,۰-۲۰,۰	۰,۹۸۹	۹۷,۴	۱,۱۷	۴,۲۲	۳,۹۴

1. Calibration 2. Limit of Detection (LOD) 3. Limit of Quantification (LOQ) 4. Signal 5. Noise  
6. Relative Standard Deviation (RSD) 7. Salting-out effect

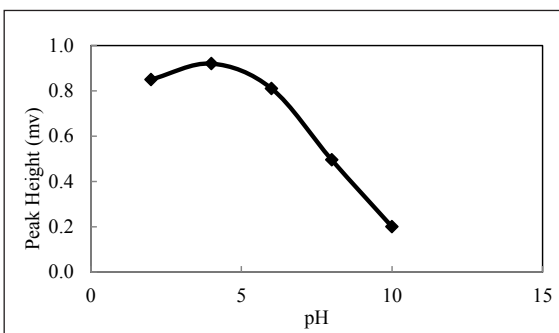
بررسی کارایی روش برای اندازه‌گیری لوودوپا در نمونه حقیقی برای بررسی کارایی روش، مقدار لوودوپا در نمونه آب و ادرار تعیین شد. برای اندازه‌گیری در نمونه آب، مقادیر مشخصی از لوودوپا به نمونه آب افزوده شد و براساس روش آزمایش توضیح داده شده برای نمونه‌های استاندارد، آزمون انجام گرفت و مقدار بازده میانگین برابر ۹۷٫۳٪ به دست آمد. اندازه‌گیری نمونه قرص لوودوپا پس از آماده‌سازی انجام شد و مقدار بازده برابر ۹۸٫۹٪ بود. برای اندازه‌گیری آنالیت در نمونه زیستی، نمونه ادرار پس از جمع‌آوری و افزودن مقادیر مناسب لوودوپا در حضور نانوچندسازه گرافن آهن مغناطیسی قرار گرفت. پس از جذب شدن آنالیت بر فاز جامد، جذب با آهن‌ریا جدا گردید و با حلال متانول شسته شد. محلول به دست آمده پس از جدا کردن جذب برای تزریق به دستگاه آماده شد. طیف تحرک یونی برای مقادیر متفاوت لوودوپا افزوده شده به نمونه ادرار ثبت شد و غلظت آن با استفاده از روش افزایش استاندارد محاسبه شد. مقادیر بازده در گستره ۹۶٫۵ تا ۹۴٫۲٪ به دست آمد.

براساس جدول ۴ می‌توان نتیجه گرفت که روش طیف‌نورسنج تحرک یونی با حساسیت و دقت بالا قابلیت اندازه‌گیری داروها را در فرمولبندی آن‌ها و نمونه‌های آبی متفاوت با احتمال آلودگی ترکیبات دارویی، بدون نیاز به مراحل آماده‌سازی پیچیده و روش‌های پیش تغلیظ دارد. افزون بر این، با ترکیب کردن آن با یک مرحله جداسازی با فاز جامد می‌توان این روش را برای اندازه‌گیری لوودوپا در نمونه ادرار با بازده مناسب به کار برد. همچنین، بررسی و ساخت بسترهای متفاوت برای جذب داروها، امکان حذف آن‌ها را از نمونه‌های پسماند متفاوت که احتمال آلوده شدن با نمونه‌های دارویی را دارند، فراهم می‌سازد.

جدول ۴ اندازه‌گیری لوودوپا در نمونه آب، قرص و ادرار

نمونه	مقدار اضافه شده یا وجود داشته (ng. ml <sup>-1</sup> )	مقدار پیدا شده (ng. ml <sup>-1</sup> )	بازده (%)	RSD (%)
آب شهر	۱۰٫۰	۹٫۷۳±۰٫۳۸	۹۷٫۳	۳٫۹۱
قرص	۱۰٫۰	۹٫۸۹±۰٫۳۹	۹۸٫۹	۲٫۹۳
ادرار	۰	۰	-	-
	۸٫۰	۷٫۵۳±۰٫۵۰	۹۴٫۲	۶٫۶۴
	۱۵٫۰	۱۴٫۴۷±۰٫۸۲	۹۶٫۵	۵٫۶۷

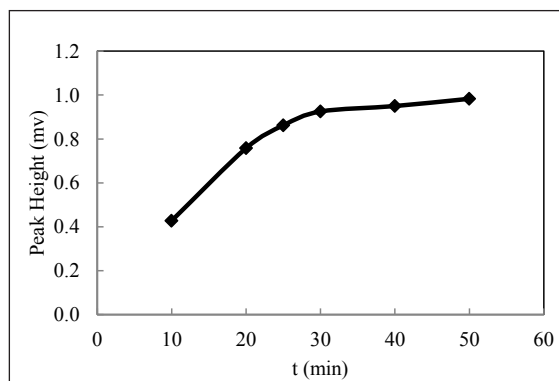
به سطح جذب کمتر می‌شود افزون بر این، شدت نشانک به دلیل تغییر ماهیت ماده و متفاوت بودن زمان رانش کاهش می‌یابد. درحالی‌که در pH های اسیدی، OH های موجود و همچنین عامل اسیدی و آمینی تمایل برای اتصال به سطح گرافنی را دارند.



شکل ۶ منحنی تغییرات شدت نشانک نسبت به pH

#### اثر زمان استخراج

زمان، عامل موثر دیگر بر مقدار استخراج است. بهترین نتیجه در زمانی ایجاد می‌شود که بیشترین مقدار آنالیت بتواند روی سطح جذب قرار گیرد. این اثر در مدت ۱۰ تا ۶۰ دقیقه با غلظت‌های یکسان لوودوپا بررسی شد (شکل ۷). نتایج نشان داد که با افزایش زمان در معرض قرار گرفتن فاز جامد با نمونه لوودوپا، مقدار نشانک تا زمان ۳۰ دقیقه افزایش می‌یابد و پس از آن ثابت می‌ماند. بنابراین، این زمان برای استخراج لوودوپا انتخاب شد.



شکل ۷ تغییرات شدت نشانک نسبت به زمان

## نتیجه‌گیری

در این پژوهش، برای نخستین بار قابلیت طیف‌نورسنج تحرک یونی با منبع یونش تخلیه کرونا برای اندازه‌گیری لوودوپا مورد بررسی قرار گرفت. برای تجزیه نمونه زیستی با استفاده از یک روش استخراج فاز جامد می‌توان از طیف‌نورسنج تحرک یونی با حساسیت بسیار بالا و حد تشخیص بسیار مناسب استفاده کرد. عامل‌های متفاوتی مانند دمای محل تزریق و پهنای پالس برای حصول بهترین پاسخ بهینه شد و مقدار تحرک برای گونه‌های یونی تشکیل شده از لوودوپا برای نخستین بار محاسبه شد. نتایج به‌دست‌آمده نشان می‌دهد که روش طیف‌نورسنج تحرک یونی یک

روش سریع (تولید نشانک در چند ثانیه)، ساده، ارزان قیمت و حساس است. شایان ذکر است که این روش به‌دلیل مصرف کم حلال (در مقایسه با HPLC) آلودگی زیست محیطی بسیار کمتری در مقایسه با سایر روش‌های ارائه‌شده دارد. توسعه این روش می‌تواند امکان تجزیه و دنبال کردن راحت‌تر و سریع‌تر بسیاری از ترکیبات دارویی را در نمونه‌های زیستی و به‌ویژه در صنعت داروسازی فراهم سازد.

## سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از حمایت‌های مالی معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه الزهرا صمیمانه تشکر می‌کنند.

## مراجع

- [1] Creaser, C.S.; Griffiths, J.R.; Bramwell, C.J.; Noreen, S.; Hill, C.A.; Thomas, C.P.; Analyst 129, 984-994, 2004.
- [2] Eiceman, G.A.; Karpas, Z.; Hill, Jr H.H.; Ion mobility spectrometry, 3rd edn., CRC press, Taylor & Francis Group, New York, 2013.
- [3] Khayamian, T.; Tabrizchi, M.; Jafari, M.; Talanta 59, 327-333, 2003.
- [4] Sheibani, A.; Tabrizchi, M.; Ghaziaskar, H.S.; Talanta 75, 233-238, 2008.
- [5] Mohammadnejad, M.; Farhadpour, M.; Mahdavi, V.; Tabrizchi, M.; Int. J. Ion Mobil. Spec., DOI: 10.1007/s12127-016-0211-6, 2016.
- [6] Clane, D.B.; Engl., N.; J. Med 329, 1021-1028, 1993.
- [7] Chitnis, Sh.; Neurol. Clin. 26, S29-S44, 2008.
- [8] Chamsaz, M.; Safavi, A.; Fadaee, J.; Anal. Chim. Acta 603, 140-146, 2007.
- [9] Dinc, E.; Kayab, S.; Doganay, T.; Baleanu, D.; J. Pharm. Biomed. Anal. 44, 991-995, 2007.
- [10] Zhao, Sh.; Bai, W.; Wang, B.; He, M.; Talanta 73, 142-146, 2007.
- [11] Zeid, A.M.; Nasr, J.J.M.; Belal, F.F.; Kitagawa, Sh.; Kaji, N.; Baba, Y.; Mohamed, I.W.; RSC Adv. 6, 17519-17530, 2016.
- [12] Ghasemi, F.; Hormozi-Nezhad, M.R.; Mahmoudi, M.; Anal. Chim. Acta 917, 85-92, 2016.
- [13] Madrakian, T.; Afkhami, A.; Mohammadnejad, M.; Talanta 78, 1051-1055, 2009.
- [14] Stankovi, D.M.; Samphao, A.; Dojcinovi, B.; Kalcher, K.; Acta Chim. Slov. 63, 220-226, 2016.
- [15] Kanchana, P.; Radhakrishnan, S.; Navaneethan, M.; Arivanandhan, M.; Hayakawa, Y.; Sekar, C.; J. Nanosci. Nanotechnol. 16, 6185-6192, 2016.
- [16] Raut, P.P.; Charde, Sh.Y.; Luminesc. 29, 762-771, 2014.
- [17] Sravanthi, D.; Anusha, M.; Madhavi, S.; Firdose, S.; Nalluri, B.N.; J. Chem. Pharm. Res. 15, 422-428, 2013.
- [18] Socas-Rodríguez, B.; Hernández-Borges, J.; Salazar, P.; Martín, M.; Rodríguez-Delgado, M.Á.; J. Chromatogr. A 1397, 1-10, 2015.
- [19] Li, X.; Shuli, N.; Kellermann, G.; Talanta 159, 238-247, 2016.
- [20] Rochefort, A.; Wuest, J.D.; Langmuir 25, 210-215, 2009.



- [21] Nasir, M.; Zhang, Ch.; Yin, H.; Hou, Y.; J. Mater. Chem. A 2, 15-32, 2014.
- [22] Tabrizchi, M.; Khayamian, T.; Taj, N.; Rev. Sci. Instrum. 71, 2321-2328, 2000.
- [۲۳] کاربرد نانوجندسازه مغناطیسی  $Fe_0/\gamma-Fe_2O_3/Graphene$  در حذف آلایندگی متیل اورانژ، انصاری، نرگس، منتظری، معصومه، محمدنژاد، معصومه، فقهی، فاضله، سیزدهمین کنفرانس ماده چگال انجمن فیزیک ایران
- [24] Kim, H.K.; Kamali, A.R.; Roh, K.C.; Kim, K.B.; Fray, D.J.; Energy Environ. Sci., 9 2249-2256, 2016.
- [25] Tabrizchi, M.; Appli. Spectrosc. 55, 1653-1659, 2001.
- [26] Kong, L.; Enders, A.; Rahman, T.S.; Dowben, P. A.; J. Phys.: Condens. Matter. 26, 443001-443026, 2014.

## Rapid detection and sensitive determination of levodopa in pharmaceutical and biological samples using solid-phase extraction followed by Ion mobility Spectrometry

M. Mohammadnejad<sup>1,\*</sup> and N. Ansari<sup>2</sup>

1. Assistant Prof. of Analytical Chemistry, Department of Chemistry, Alzahra University, Tehran, Iran

2. Assistant Prof. of Physics, Department of Physics, Alzahra University, Tehran, Iran

Received: February 2017, Revised: November 2017, Accepted: December 2017

**Abstract:** Levodopa is a precursor of the neurotransmitter dopamine used in the treatment of Parkinson's disease. Determination of this drug in biological samples is very important for monitoring of its therapeutic effect. In this study, corona discharge ion mobility spectrometry (IMS) was applied as a rapid and efficient method for determination of this drug in different samples. Injection and oven temperatures, gas flow rate and corona voltage were optimized as experimental parameters influencing both detection and determination efficiencies. By this method, levodopa was determined with low detection limit ( $1.17 \text{ ng. ml}^{-1}$ ) in very short time and good recoveries (96.3-98.6%) without needing any complicated preparation and organic solvents. For selective and sensitive determination of levodopa in urine sample, levodopa was extracted using a magnetic Iron graphene nanocomposite as a solid phase. The proposed method shows a solid phase extraction procedure followed by IMS can be successfully applied for the simple, inexpensive, rapid, and sensitive determination of drug compounds in biological samples.

**Keywords:** Levodopa, Ion mobility spectrometry, Magnetic iron graphene Nanocomposite, Urine sample