



دانشکده علوم

گروه شیمی

رساله جهت اخذ درجه‌ی دکتری (PhD) در رشته شیمی گرایش تجزیه

عنوان:

توسعه و معتبرسازی روش الکتروفورز موئین تلفیق شده با تکنیک‌های نوین میکرو استخراج بر پایه‌ی فناوری نانو به منظور آنالیز برخی از داروهای خوراکی شیمی‌درمانی در نمونه‌های خون بیماران مبتلا به سرطان‌های دستگاه گوارشی

نگارش:

مهرداد فروغ

اساتید راهنما:

دکتر خلیل فرهادی – دکتر امیرعباس متین

استاد مشاور:

دکتر رضا ملک زاده

اسفند ماه ۱۳۹۵

(حق چاپ، طبع و نشر مطالب این رساله برای دانشگاه ارومیه محفوظ است)

پایان نامه دکتری آقای مهرداد فروغ به تاریخ ۱۳۹۵/۱۲/۰۴ شماره "۲۰۹-۲" با رتبه ^ل _ع و نمره -۲۵۱ (به حروف ^م _م) مورد پذیرش هیات محترم داوران قرار گرفت.

۱- استاد راهنما و رئیس هیئت داوران: دکتر خلیل فرهادی

۹۵۱۱۶۴

۲- استاد راهنمای دوم: دکتر امیرعباس متین

۳- استاد مشاور: دکتر رضا ملک‌زاده

۴- داور خارجی: دکتر حسن ملکی‌نژاد

۵- داور داخلی: دکتر رضا امام‌علی سبزی

۶- داور داخلی: دکتر مرتضی بهرام

۷- معاون تحصیلات تکمیلی: دکتر حسین پیرخراتکی

تقدیر و تشکر:

”رنجیدی حرکس را بشاس و فداکاری پنج کس را به پای دیگران گذار و مرکز د قدرشنای از فداکاری ها، کوتاهی کن“

امیرالمومنین علی علیه السلام

پروردگار متعال را بی سگرم که از روی کرم، پرورمادی فداکار نصیم ساخت تا د سیدی دخت پبار و جوشان میایم و از ریشه ی آنا شاخ و برگ کیرم و از سیدی و جوشان در راه کسب علم و دانش تلاش نمایم. والدینی که بودند تاج افتخاری است بر سرم و نشان دلیلی است بر بونعم، چرا که این دو وجود پس از پروردگار، سیدی هستی ام بوده اند؛ دتم را که رفتند و راه رفیق را د این ولای زندگی بر از فراز و نشیب آموختند. آموختارانی که برایم زندگی، بودن، فداکاری و انسانیت را معنی کردند.

اکنون که توفیق انجام و تکمیل این رساله را یافته ام به رسم ادب بر خود فرض می دانم که مراتب قدردانی و پاسنگزاری بی دریغ خود را از تمامی عزیزان، اساتید بزرگواران و سرورانی که مراد طی این مسیریاری نمودند به جای آورم.

از همسر عزیزم به پاس تمام همراهی ها، تحمل، محبت و جانتایش از صمیم قلب پاسنگزارم.

از استاد و معلم عالیقدر، جناب آقای دکتر خلیل فریادی که در طول مدت همکاری با ایشان و در کلیه ی مراحل این پژوهش با صبر و حوصله ی فراوان راهنمایم بودند، صادقانه تشکر و قدردانی می نمایم. از استاد و دکتر جناب آقای دکتر رضا ملک زاده که با مشاوره های ارزشمند خویش و مجموعه ی تحت سرپرستیشان در پژوهشکده ی جاری های گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی تهران، امکان هر چه بهتر انجام شدن این تحقیق را فراهم نمودند و همچنین از جناب آقای دکتر امین سگاری و کلیه ی اعضای محترم کمیته ی اخلاق پژوهش، پژوهشکده ی گوارش و کبد سمیه تشکر می کنم. از اساتید ارجمند گروه شیمی تجزیه دانشگاه ارومیه، آقایان دکتر رضا اماسلی سبزی، دکتر مرتضی بهرام و دکتر ناصر صمدی که منت آموختن را بر من نهادند و همچنین زحمت دلاوری داخلی و نظارت این پژوهش را بر همه کرده تشکر و قدردانی می نمایم.

از استاد فرهیخته جناب آقای دکتر حسن ملکی نژاد که در کمال سعی و تدبیر و با دقت نظر فراوان، زحمت دلاوری خارجی این رساله را عمده دار شدند پاسنگزارم.

پاس می دارم و لکری های صمیمانه، همکاری و لکهای متعانه دوستان عزیزم، آقایان دکتر رحیم مولایی، دکتر هدایت خلیل و دکتر محمود قاسمی و تمامی عزیزان دیگری که در طول مدت و کلیه ی مراحل انجام این تحقیق شوق و همراهی نمودند.

همچنین، مراتب قدردانی خود را از دوست و سرور عزیزم جناب آقای دکتر مهران مرادی به جهت زحمت و همکاری های صمیمانه شان اعلام می دارم.

همتم بدرقه راه کن ای طایر قدس که در از است ره مقصد و من نوسفرم

تقدیم به همسر:

که مهربانش سایه ساز زندگیم می باشد، او که اسوه‌ی صبر بوده و مشکلات مسیر را برایم تسهیل نمود.



چکیده:

کاربرد تکنیک الکتروفورز موئین در دهه‌ی حاضر به طور فزاینده‌ای در حوزه‌های مختلف آنالیز دارو در حال گسترش است. بر همین مبنا و با توجه به پتانسل و کارایی بالای این روش و ارائه‌ی زمانهای آنالیز کوتاه‌تر در مقایسه با سایر روشهای کروماتوگرافی، ترکیبات دارویی و پیش‌دارویی متعددی تاکنون توسط این تکنیک مورد بررسی و آنالیز قرار گرفته‌اند. با این حال، فقدان ذاتی حساسیت تشخیصی در روشهای مبتنی بر الکتروفورز موئین به ویژه در زمینه‌ی کاربرد در پیکره‌های پیچیده‌ی بیولوژیکی، از عوامل اصلی و موثر در محدود-سازی توسعه‌ی این تکنیک ارزشمند در پژوهشهای مرتبط با آنالیز ترکیبات دارویی در پیکره‌های زیستی می‌باشد. لذا در این رساله، با هدف ارائه‌ی رویکردهای جدید برای بهبود حساسیت در اندازه‌گیری کمی عوامل دارویی ضد سرطان، که کمتر توسط تکنیک مذکور مورد مطالعه قرار گرفته‌اند، تلفیق روشهای نوین آماده‌سازی نمونه با بهره‌گیری از محصولات و چشم‌اندازهای فناوری نانو با روشهای پیش‌تغلیظ داخل ستونی مورد استفاده در روش الکتروفورز موئین، مورد ارزیابی قرار گرفته و برخی از داروهای خوراکی شیمی‌درمانی پرکاربرد در درمان بیماران مبتلا به سرطانهای دستگاه گوارشی، توسط تکنیکهای پیشنهادی الکتروفورتیکی در این پژوهش، اندازه‌گیری و آنالیز شده‌اند.

بر همین اساس در بخش نخست پژوهش حاضر، توسعه و معتبرسازی یک روش ریزاستخراج خارج ستونی ساده، جدید، انتخابی و سریع به صورت تلفیق‌شده با روش تراکم توده‌ای داخل ستونی تقویت شده با میدان الکتریکی و روش الکتروفورز موئین (FASI-CE)، به-منظور اندازه‌گیری همزمان داروی کپسیتابین (CAP) و متابولیت اصلی آن (۵-فلورواوراسیل، ۵-FU) در نمونه‌های پلاسمای انسان گزارش شده است. نگاهی جامع به منابع علمی معتبر نشان می‌دهد که تا کنون مستندی مبنی بر بکارگیری ابزار مقرون بصره‌ی الکتروفورز موئین در حالت تلفیق‌شده با تکنیک‌های کوچک‌سازی شده‌ی پاکسازی و پیش‌تغلیظ نمونه، برای آنالیز و اندازه‌گیری همزمان این داروهای مهم ضد سرطان در نمونه‌های پلاسمای انسانی ارائه نشده است. لذا پژوهش پیش‌رو، با هدف مرتفع ساختن این فقدان و گزارش یک روش پیش‌تیمار خارج ستونی نمونه بر اساس ریزاستخراج فاز جامد-مایع مبتنی بر فیبر توخالی تقویت شده با نانوجاذب مزو-متخلخل AgNPs@MCM-۴۱ و به دنبال آن آنالیز کمی با تکنیک جفت شده‌ی FASI-CE، انجام شده است. جداسازی آنالیت‌ها با استفاده از الکترولیت‌زمینه‌ی با غلظت ۶۰ میلی‌مولار از بافر فسفات-تریس (pH=۷) محتوی ۱۰٪ (حجمی - حجمی) از حلال متانول به عنوان اصلاحگر آلی، انجام گرفته است و تاثیر پارامترهای مختلف بر کارایی روشهای ریزاستخراج و پیش‌تغلیظ آنالین FASI، بهینه‌سازی شده‌اند. همچنین، خصوصیات کمی تجزیه‌ای روش نظیر محدوده‌ی خطی، حساسیت، دقت، صحت، بازیابی، انتخابگری، اختصاصی بودن، پایداری و استحکام در نمونه‌های پلاسمای آغشته شده به داروهای هدف و در اثنای معتبرسازی روش، ارزیابی شدند. نتایج بدست‌آمده، نشان می‌دهد که روش تجزیه‌ای ارائه شده از مزایایی نظیر دقت و صحت قابل قبول، آماده‌سازی و استخراج نمونه‌ی کوچک‌سازی شده بدون‌نیاز به تجهیزات پیچیده، درکنار زمانهای مطلوب آنالیز بهره‌مند است. درضمن، این روش معتبرسازی‌شده برای اندازه‌گیری CAP و ۵-FU در نمونه‌های پلاسمای تعدادی از بیماران مصرف‌کننده‌ی داروی کپسیتابین، به صورت موفقیت‌آمیزی بکار گرفته شده است.

در بخش دوم این تحقیق، برای اولین بار از یک تکنیک استخراج درخور، جدید، سریع و حساس "الکتروغشایی" بر پایه‌ی استفاده از فیبر توخالی تقویت شده با نانوجاذب هیبریدی MWCNTs/ZnO در حالت پوشش‌داده شده با مایع یونی (با هدف پیش‌تغلیظ و پاک-سازی خارج ستونی نمونه) بصورت تلفیق‌شده با تکنیک تزریق توده‌ای آنالین تقویت شده با میدان الکتریکی (FASI) و همزمان با روش الکتروفورز موئین (CE)، برای اندازه‌گیری کمی داروی شیمی‌درمانی ایماتینیب میسیلات (IMM) در نمونه‌های پلاسمای انسان، استفاده شده است. جاذب نانوهیبریدی پوشش‌داده شده با مایع یونی ۱-اکتیل-۳-متیل‌ایمیدازولیوم بروماید ([OMIm]-Br) با استفاده از روش سل-ژل کاتالیز شده‌ی بازی، تهیه شده و پس از پراکنده‌سازی در حلال ۲-نیتروفنیل‌اکتیل‌اتر (NPOE)، بر اساس نیروهای موئینی و بهره‌گیری از امواج فراصوت، در خلل و فرج و منافذ یک فیبر توخالی پلی‌پروپیلنی (به عنوان واحد استخراجی) تثبیت شده و در نهایت به عنوان ترکیب مناسب غشای مایع (SLM) در فرآیند استخراج الکتروغشایی، مورد بهره‌برداری قرار گرفته است. اثرات مربوط به پارامترها و متغیرهای مختلف بر روی کلیه‌ی مراحل روش پیشنهادی برای دستیابی به بیشینه کارایی استخراج، ارزیابی و بهینه‌سازی شده‌اند. روش پیشنهادی به طور کامل و بر اساس دستورالعمل FAD معتبرسازی شده است. نتایج آزمایش‌های معتبرسازی روش، خطی بودن پاسخ‌ها در محدوده‌ی غلظتی ۲۰ تا ۱۵۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر ($R^2=0/998$) را تایید می‌نماید. همچنین، مقدار میانگین انحرافات استاندارد نسبی برای دقت (تکرارپذیری‌های) درون‌روز و بین‌روز به ترتیب ۶/۸۳٪ و ۷/۷۱٪ درصد محاسبه شده است. در نهایت این روش معتبرسازی‌شده، برای اندازه‌گیری کمی ایماتینیب میسیلات در نمونه‌های پلاسمای بیماران تحت درمان با داروی مذکور، با موفقیت مورد استفاده قرار گرفته است.

کلمات کلیدی: الکتروفورز موئین، داروهای خوراکی شیمی‌درمانی، اندازه‌گیری، معتبرسازی، آماده‌سازی نمونه، نانوفناوری، نمونه‌های بیولوژیکی، سرطان.

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه، ضرورت و پیشینه‌ی تحقیق	۱۰
۱-۱- مقدمه و پیش درآمدی بر بیماری سرطان و غربالگری داروهای ضدسرطان	۲
۱-۲- اهمیت آنالیز، اندازه‌گیری، سنجش و نظارت سطح درمانی داروهای آنتی نئوپلاستیک شیمی درمانی	۶
۱-۳- انواع داروهای خوراکی شیمی درمانی و کاربردهای درمانی آنها	۱۰
۱-۴- روش‌های مختلف تجزیه‌ای برای جداسازی و اندازه‌گیری داروهای آنتی نئوپلاست	۱۳
۱-۵- الکتروفورز موئین: تاریخچه و اصول اولیه	۱۶
۱-۵-۱- مکانیسم جداسازی در الکتروفورز موئین	۱۷
۱-۵-۲- الکتروفورز موئین ناحیه ای (CZE): اصول اساسی و دستگاهوری	۱۹
۱-۵-۳- روشهای آشکارسازی در الکتروفورز موئین	۲۱
۱-۶- روشهای آماده‌سازی نمونه: خارج ستونی	۲۲
۱-۶-۱- سیر تکاملی روش‌های استخراج، پیش تغلیظ و آماده‌سازی نمونه	۲۵
۱-۶-۱-۱- روش‌های ریزاستخراج بر اساس قطره‌ی آویزان	۲۵
۱-۶-۱-۲- روش‌های ریزاستخراج با فاز مایع با استفاده از فیبرهای توخالی (HF-LPME)	۲۷
۱-۶-۱-۳- ریزاستخراج با فاز مایع با استفاده از فیبرهای توخالی دو فاز	۲۹
۱-۶-۱-۴- ریزاستخراج با فاز مایع با استفاده از فیبرهای توخالی سه فاز	۳۰
۱-۶-۱-۵- استخراج الکتروغشایی (EME)	۳۱
۱-۶-۱-۶-۱-۳- ملاحظات عملی و کاربردهای استخراج الکتروغشایی در نمونه‌های بیولوژیک	۳۶
۱-۶-۱-۶-۱-۲- کاربردهای استخراج الکتروغشایی در سنجش سطح درمانی ترکیبات دارویی	۳۹
۱-۶-۱-۶-۱-۳- پیشرفتهای اصلاحی غیردستگاهی اخیر در استخراج الکتروغشایی	۴۱
۱-۶-۲- کاربرد مواد، ترکیبات و روشهای جدید برای آماده‌سازی و پیش تغلیظ نمونه‌ها در تکنیکهای زیست تجزیه‌ای	۴۳
۱-۶-۲-۱- جاذبه‌ای بر پایه‌ی روش سل-ژل	۴۴
۱-۶-۲-۲- کاربرد مایعات یونی در روشهای پیش تغلیظ و آماده‌سازی نمونه	۵۱
۱-۶-۲-۳- پیشرفتهای اخیر در کاربرد نانوذرات و سایر نانو ساختارها در تکنیکهای آماده‌سازی نمونه	۵۴
۱-۶-۲-۴- ساختارهای مزومتخلخل (مزوپُروس): انواع و روشهای تهیه	۶۱
۱-۷- روشهای بهبود حساسیت و پیش تغلیظ داخل ستونی در الکتروفورز موئین	۶۷
۱-۷-۱- تغلیظ و تراکم توده‌ای نمونه (FASS)	۶۸
۱-۷-۲- تزریق توده‌ای تقویت شده‌ی نمونه (FASI)	۶۹
۱-۷-۳- روش روبشی (Sweeping)	۷۰
۱-۷-۴- تغلیظ توده‌ای توسط تزریق حجمهای زیاد نمونه (LVSS)	۷۱
۱-۷-۵- ایزوتاکوفورز	۷۲

۸-۱- کاربردهای اخیر دو روش FASS و FASI در آنالیزهای دارویی توسط روش الکتروفورز موئن	۷۴
۹-۱- مروری بر مطالعات گزارش شده در مراجع علمی برای آنالیز و اندازه‌گیری انواع داروهای ضد سرطان توسط تکنیک الکتروفورز موئن	۷۵
۱۰-۱- داروهای شیمی درمانی خوراکی مورد استفاده در کار حاضر	۷۷
۱-۱۰-۱- داروی کپسیتابین (زلودا)	۷۷
۲-۱۰-۱- داروی ایماتینیب مسیلات	۸۲
۱۱-۱- اهداف پژوهش	۸۶
فصل دوم: بخش تجربی	۸۷
۱-۲- مواد، حلالها و ترکیبات شیمیایی	۸۸
۲-۲- دستگاهوری	۸۹
۳-۲- شرایط و روشهای الکتروفورتیکی	۹۱
۱-۳-۲- شرایط الکتروفورتیکی برای اندازه‌گیری همزمان کپسیتابین و FU-۵	۹۱
۲-۳-۲- شرایط الکتروفورتیکی برای اندازه‌گیری ایماتینیب مسیلات	۹۲
۴-۲- محلولهای اولیه و محلولهای استاندارد	۹۳
۵-۲- جمع‌آوری و تهیه‌ی نمونه‌های بیولوژیکی (پلاسما)	۹۴
۱-۵-۲- تهیه و آماده‌سازی نمونه‌های پلاسمای شاهد، کنترل کیفیت (QC) و جمع‌آوری نمونه‌های پلاسمای انسانی بعد از مصرف داروی کپسیتابین توسط بیماران دریافت‌کننده	۹۴
۲-۵-۲- تهیه و آماده‌سازی نمونه‌های پلاسمای شاهد و جمع‌آوری نمونه‌های پلاسمای بیماران بعد از مصرف داروی ایماتینیب مسیلات	۹۵
۶-۲- فرآیندهای ریزاستخراج و آماده‌سازی خارج‌ستونی نمونه	۹۶
۱-۶-۲- ریزاستخراج ادغامی فاز جامد- مایع متکی بر فیبر توخالی (HF-SLPME) در اندازه‌گیری همزمان کپسیتابین و ۵-فلورواوراسیل	۹۶
۱-۶-۲-۱- تهیه‌ی ترکیب مزومتخلخل MCM-۴۱ و نانوجاذب کامپوزیتی AgNPs@MCM-۴۱	۹۶
۲-۶-۲-۱- تهیه‌ی فیبر استخراج (HF-SLPME) و متدولوژی استخراج آفلاین	۹۸
۲-۶-۲-۲- فرآیند ریزاستخراج الکتروغشایی در اندازه‌گیری ایماتینیب	۱۰۱
۱-۶-۲-۲- تخلیص و عامل‌دار کردن نانولوله‌های کربنی چنددیواره	۱۰۱
۲-۶-۲-۲- تهیه‌ی کامپوزیت MWCNTs/ZnO	۱۰۱
۳-۶-۲-۲- تهیه‌ی نانوکامپوزیت MWCNT@ZnO پوشش‌داده شده با مایع یونی [OMIm]Br با استفاده از روش سل-ژل	۱۰۲
۴-۶-۲-۲- روش تهیه‌ی فیبر توخالی تثبیت شده با نانوکامپوزیت و راه‌اندازی سیستم EME	۱۰۳
۵-۶-۲-۲- روش، نحوه‌ی اجرا و مراحل ریزاستخراج الکتروغشایی (EME)	۱۰۵

۱۰۸	۸-۲- معتبرسازی روشهای پیشنهادی (Method Validation)
۱۱۰	۹-۲- کاربرد کلینیکال روشهای پیشنهادی (جمع‌آوری نمونه‌های حقیقی)
۱۱۱	فصل سوم: نتایج و بحث
۱۱۲	۱-۳- کاربرد روش ریزاستخراج فاز جامد- مایع بر پایه‌ی فیبرهای توخالی تقویت شده با سیستم نانوکامپوزیتی مزومتخلخل ($\text{AgNPs@MCM-41-HF-SLPME}$) و تلفیق آن با روش پیش‌تغلیظ توده‌ای داخل‌ستونی FASI برای اندازه‌گیری همزمان داروی ضد سرطان کپسیتابین و متابولیت اصلی آن (۵-FU) در نمونه‌های پلاسما انسان با استفاده از تکنیک الکتروفورز موئین (CE-UV)
۱۱۲	۱-۱-۳- مشخصه‌یابی ساختار نانوکامپوزیتی مزومتخلخل و فیبر توخالی تقویت شده با آن
۱۱۲	۱-۱-۱-۳- آنالیز میکروسکوپ الکترونی پویشی (SEM)، مساحت سطح ویژه (BET) و تخلخل سنجی
۱۱۶	۱-۱-۲-۳- آنالیز پراش اشعه‌ی ایکس (XRD) و میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)
۱۲۱	۲-۱-۳- مطالعات اولیه، توسعه و بهینه‌سازی روش CE-UV
۱۲۴	۳-۱-۳- بهینه‌سازی شرایط و پارامترهای ریزاستخراج $\text{AgNPs@MCM41-HF-SLPME}$ برای اندازه‌گیری همزمان کپسیتابین و متابولیت اصلی آن (۵-FU)
۱۲۵	۱-۳-۱-۳- انتخاب حلال استخراج کننده
۱۲۶	۲-۳-۱-۳- تاثیر غلظت و مقدار نانوجاذب
۱۲۷	۳-۳-۱-۳- تاثیر سرعت هم‌زدن محلول
۱۲۹	۴-۳-۱-۳- تاثیر زمان استخراج
۱۲۹	۵-۳-۱-۳- تاثیر pH فاز دهنده (ماتریکس نمونه)
۱۳۱	۶-۳-۱-۳- تاثیر قدرت یونی محلول (اثر افزایش نمک)
۱۳۱	۷-۳-۱-۳- بررسی شرایط واجدبی
۱۳۴	۴-۱-۳- بهینه‌سازی شرایط روش پیش‌تغلیظ داخل‌ستونی (FASI)
۱۳۸	۵-۱-۳- معتبرسازی تجزیه‌ای
۱۳۹	۱-۵-۱-۳- منحنی کالیبراسیون، خطی بودن و حساسیت
۱۴۰	۲-۵-۱-۳- تکرارپذیری (دقت)، صحت و درصد بازیابی
۱۴۳	۳-۵-۱-۳- اختصاصی بودن و انتخابگری روش (Selectivity & Specificity)
۱۴۶	۴-۵-۱-۳- مطالعات پایداری داروهای هدف
۱۴۷	۵-۵-۱-۳- مطالعات سختی و استحکام روش (Robustness)
۱۴۹	۶-۱-۳- کاربرد روش ارائه شده و معتبرسازی شده در نمونه‌های حقیقی و بالینی
۱۵۱	۷-۱-۳- مقایسه‌ی روش پیشنهادی با سایر روشهای اندازه‌گیری و آنالیز ترکیبات تحت مطالعه
۱۵۳	۲-۳- تکنیک الکتروفورز موئین با آشکارساز فرابنفش تلفیق شده با روش تغلیظ توده‌ای درون‌ستونی تقویت شده با میدان الکتریکی (FASI) و استخراج الکتروغشایی بر پایه‌ی فیبرهای توخالی تقویت شده با نانوکامپوزیت $[\text{OMIm}]\text{Br-MWCNT/ZnO}$ ، به‌منظور اندازه‌گیری داروی شیمی‌درمانی ایماتینیب مسیلات در نمونه‌های پلاسما
۱۵۳	۱-۲-۳- مشخصه‌یابی جاذب نانوکامپوزیتی MWCNT@ZnO پوشش داده شده با مایع یونی $[\text{OMIm}]\text{Br}$

۱۵۹.....	۲-۲-۳- توسعه‌ی روش و بهینه‌سازی شرایط الکتروفورتیکی
۱۶۱.....	۳-۲-۳- بهینه‌سازی شرایط پیش‌تغلیظ آنالین داخل‌ستونی FASI
۱۶۷.....	۴-۲-۳- بهینه‌سازی شرایط و پارامترهای استخراج الکتروغشایی
۱۶۷.....	۱-۴-۲-۳- انتخاب حلال آلی مورد استفاده به عنوان غشای مایع تثبیت شده (SLM)
۱۶۸.....	۲-۴-۲-۳- تاثیر غلظت نانوکامپوزیت (نوع و مقدار نانوجاذب)
۱۷۲.....	۳-۴-۲-۳- تاثیرات مربوط به ولتاژ و زمان استخراج الکتروغشایی
۱۷۵.....	۴-۴-۲-۳- انتخاب ترکیب شیمیایی فازهای دهنده و پذیرنده و مقادیر pH آنها
۱۷۷.....	۵-۴-۲-۳- تاثیر افزایش نمک
۱۷۸.....	۶-۴-۲-۳- تاثیر سرعت همزدن محلول نمونه
۱۷۹.....	۵-۲-۳- معتبرسازی زیست تجزیه‌ای روش پیشنهادی
۱۸۰.....	۱-۵-۲-۳- منحنی کالیبراسیون، محدوده‌ی خطی دینامیکی و حساسیت
۱۸۱.....	۲-۵-۲-۳- دقت (تکرارپذیری)، صحت و درصد بازیابی (Recovery)
۱۸۳.....	۳-۵-۲-۳- اختصاصی بودن (Specificity) و انتخابگری (Selectivity) روش
۱۸۶.....	۴-۵-۲-۳- پایداری و استحکام روش (Stability & Robustness)
۱۸۸.....	۶-۲-۳- کاربرد روش در نمونه‌های حقیقی و بالینی بیماران مبتلا به سرطان GIST
۱۸۹.....	۷-۲-۳- مقایسه‌ی روش پیشنهادی جدید با سایر روشهای گزارش شده در مراجع علمی

فصل چهارم: نتیجه‌گیری، چشم‌اندازها و پیشنهادات..... ۱۹۳

۱۹۴.....	۱-۴- نتیجه‌گیری
۱۹۷.....	۲-۴- چشم‌اندازهای تحقیق
۱۹۸.....	۳-۴- پیشنهادات برای مطالعات آتی
۲۰۰.....	منابع و ماخذ

فهرست تصاویر و اشکال

- شکل ۱-۱- نحوه‌ی ایجاد جریان الکترواسموتیک در ستون موئین..... ۱۹
- شکل ۲-۱- شمای کلی دستگاه الکتروفورز موئین..... ۲۰
- شکل ۳-۱- ساختار سرنگ و فیبر ریزاستخراج فاز جامد..... ۲۳
- شکل ۴-۱- شیوه‌های مختلف ریزاستخراج با تک قطره: (الف) ریزاستخراج با تک قطره‌ی مستقیم؛ (ب) ریزاستخراج مایع-مایع-مایع؛ (ج) ریزاستخراج با تک قطره‌ی فضای فوقانی..... ۲۶
- شکل ۵-۱- ریزاستخراج با فاز مایع با استفاده از فیبرهای توخالی: (الف) شیوه‌ی دوفازی (ب) شیوه‌ی سه فازی..... ۲۸
- شکل ۶-۱- دیاگرام شماتیک از سیستم طراحی شده برای استخراج الکتروغشایی..... ۳۲
- شکل ۷-۱- ساختار شیمیایی برخی از حلالها و افزودنیهای مورد استفاده برای SLM در استخراج الکتروغشایی..... ۳۵
- شکل ۸-۱- فرآیند سل-ژل و استراتژی‌های مختلف برای تهیه‌ی مواد هیبریدی آلی-معدنی..... ۴۵
- شکل ۹-۱- پوشش پلی‌تتراهیدروفوران (poly-THF) تهیه شده با روش سل-ژل بر روی سطح یک غشای سلولزی..... ۴۹
- شکل ۱۰-۱- کاربرد نانوذرات نقره به عنوان پروب برای استخراج و پیش‌تغلیظ آنالیت‌های مختلف؛ تحت شرایط (الف): استخراج متداول مایع-مایع (ب): روشهای ریزاستخراج تک قطره‌ای..... ۵۸
- شکل ۱۱-۱- طبقه‌بندی مواد پروس (متخلخل) به میکروپروس، مزوپروس و ماکروپروس بر اساس قطر حفرات..... ۶۱
- شکل ۱۲-۱- دو مسیر پیشنهادی (الف) و (ب) برای تشکیل MCM-41..... ۶۳
- شکل ۱۳-۱- شمای روشهای اساسی برای سنتز مواد مزوپروس؛ (الف): روش قالب‌بندی نرم، (ب): روش قالب‌بندی سخت، (ج): روش قالب‌بندی چندگانه، (د): روش قالب‌بندی درمحل (In-situ)، (ه): فرآیند بدون قالب و روش پایانی (و): تکنیک شیمی مُشَبک..... ۶۶
- شکل ۱۴-۱- دیاگرام شماتیک مدل FASS..... ۷۰
- شکل ۱۵-۱- دیاگرام شماتیک مدل پیش‌تغلیظ درون ستونی Sweeping با کمک ترکیبات مایسلی..... ۷۱
- شکل ۱۶-۱- نمایش شماتیک روش اجرایی LVSS-CE با حالت انتخابی تغییر قطبیت..... ۷۲
- شکل ۱۷-۱- دیاگرام شماتیک حالت ایزوتاکوفورز..... ۷۴
- شکل ۱۸-۱- ساختار شیمیایی (الف): کپسیتابین؛ (ب): ۵-فلورواوراسیل..... ۷۸
- شکل ۱۹-۱- زیست دگرگونی داروی کپسیتابین (CAP) به متابولیت فعال آن (۵-FU)..... ۷۹
- شکل ۱-۲- تصویر شماتیک نحوه‌ی تهیه‌ی نانوجاذب مزومتخلخل و تثبیت آن در درون فیبر توخالی اصلاح شده برای استخراج آنالیت‌های هدف توسط روش استخراج فاز جامد-مایع (HF-SLPME) پیشنهادی..... ۹۷
- شکل ۲-۲- شمای کلی مراحل اجرایی روش استخراجی پیشنهادی برای آنالیز همزمان کپسیتابین و ۵-فلورواوراسیل در نمونه‌های پلاسمای انسانی با استفاده از روش FASI-CE..... ۱۰۰
- شکل ۳-۲- تصویر و دیاگرام شماتیک فرآیندهای فیزیکی تهیه‌ی فیبر و شرایط سیستم استخراج الکتروغشایی پیشنهادی به همراه مراحل اجرایی و ملزومات آن..... ۱۰۷
- شکل ۱-۱-۳- تصویر میکروسکوپ الکترونی پویشی نوعی مربوط به ساختار مزومتخلخل MCM-۴۱ سنتز شده..... ۱۱۲
- شکل ۲-۱-۳- تصاویر ریزنگار میکروسکوپی الکترونی پویشی فیبر توخالی پلی‌پروپیلنی تقویت شده با نانوکامپوزیت AgNPs@MCM-۴۱، از زوایای دید مختلف (الف): دیواره‌ی خارجی؛ (ب): برش عرضی؛ (ج): تصویر بافت؛ (د): سطح فیبرتوخالی در بزرگنمایی دیگر..... ۱۱۴
- شکل ۳-۱-۳- نمودار ایزوترم جذب و واجذب همدمای گاز نیتروژن برای ترکیب مزومتخلخل MCM-۴۱ (نمودار آبی) و نانوکامپوزیت مزومتخلخل AgNPs@MCM-۴۱ (حاوی ۰/۱۴۹ درصد نقره، نمودار قرمز)..... ۱۱۵
- شکل ۴-۱-۳- الگوی پراش اشعه‌ی ایکس ساختار مزومتخلخل MCM-۴۱ سنتز شده..... ۱۱۷
- شکل ۵-۱-۳- الگوی WAXRD برای نانوجاذب مزومتخلخل AgNPs@MCM-۴۱ تهیه شده (الف): با بارگذاری ۰/۱۴۹ درصدی نانوذرات نقره و (ب): با بارگذاری ۱۰ درصد از نانوذرات نقره در داخل شبکه‌ی سیلیکایی..... ۱۱۹

- شکل ۳-۱-۶- ریزنگار و تصاویر HRTEM مربوط به (الف): ساپورت مزومتخلخل MCM-۴۱ خالص و (ب): نانوجاذب (نانوکامپوزیت) AgNPs@MCM-۴۱ حاوی ۰/۱۴۹ درصد نانوذرات نقره ۱۲۰
- شکل ۳-۱-۷- اثر نوع حلالهای استخراج کننده به عنوان فاز پذیرنده بر روی کارایی استخراج همزمان آنالیتهای هدف ۱۲۶
- شکل ۳-۱-۸- تاثیر غلظت نانوکامپوزیت مزومتخلخل پخش شده در حلال ۱- اکتانول (فاز پذیرنده) بر کارایی استخراج همزمان آنالیتهای هدف ۱۲۷
- شکل ۳-۱-۹- تاثیر سرعت همزدن محلول نمونه بر کارایی استخراج همزمان آنالیتهای هدف ۱۲۸
- شکل ۳-۱-۱۰- اثر زمان بر روی کارایی استخراج ۱۳۰
- شکل ۳-۱-۱۱- اثر pH فاز دهنده (محلول نمونه) بر کارایی استخراج همزمان کپسیتابین و ۵- فلورو اوراسیل ۱۳۰
- شکل ۳-۱-۱۲- بهینه سازی شرایط واجدبی: انتخاب حلال واجدبی ۱۳۳
- شکل ۳-۱-۱۳- بهینه سازی زمان واجدبی با تحریک فراصوت ۱۳۳
- شکل ۳-۱-۱۴- بهینه سازی شرایط و پارامترهای تزریق برای پیش تغلیظ توده ای تقویت شده با میدان الکتریکی (FASI) برای بهبود حساسیت: "تاثیر زمان پیش تزریق هیدرودینامیک قاج آب خالص قبل از وارد کردن نمونه"، (نشان داده شده بر حسب ارتفاع پیکها یا به عبارتی شدت سیگنال تجزیه ای و پاسخ ردیاب) ۱۳۷
- شکل ۳-۱-۱۵- بهینه سازی شرایط و پارامترهای تزریق برای پیش تغلیظ توده ای تقویت شده با میدان الکتریکی (FASI) برای بهبود حساسیت: "تاثیر ولتاژ تزریق نمونه" ۱۳۷
- شکل ۳-۱-۱۶- بهینه سازی شرایط و پارامترهای تزریق برای پیش تغلیظ توده ای تقویت شده با میدان الکتریکی (FASI) برای بهبود حساسیت: "تاثیر زمان تزریق نمونه" ۱۳۸
- شکل ۳-۱-۱۷- الکتروفورگرامهای نوعی حاصل از آنالیز FASI-CE: (الف) پلاسمای انسانی شاهد (عاری از دارو)؛ (ب) پلاسمای انسانی آغشته شده با غلظت ۲۰۰ نانوگرم بر میلی لیتر از کپسیتابین (CAP) و ۵-FU؛ (ج) نمونه پلاسمای به دست آمده ۱۸۰ دقیقه پس از مصرف خوراکی کپسول کپسیتابین (با برند زلودا) با دوز ۱۰۰۰ میلی گرمی توسط یکی از بیماران (با کد A که فقط تحت درمان با داروی کپسیتابین قرار داشت) ۱۴۵
- شکل ۳-۲-۱- تصاویر میکروسکوپ الکترونی از کامپوزیت MWCNT/ZnO تهیه شده؛ (الف): تصویر نوعی SEM (مقیاس: ۳۰۰ نانومتر) و ریزنگار HR-TEM (مقیاس: ۵۰ نانومتر) ۱۵۶
- شکل ۳-۲-۲- طیفهای FT-IR مربوط به (الف): نانولوله های کربنی چند دیواره ای خام (اصلاح نشده)؛ (ب) نانولوله های کربنی تخلیص شده و عامل دار شده با فرآیند اکسیداسیون اسیدی ۱۵۷
- شکل ۳-۲-۳- طیف FT-IR مربوط به نانوجاذب هیبریدی تهیه شده با روش سل- ژل ۱۵۷
- شکل ۳-۲-۴- تصاویر ریزنگار میکروسکوپی الکترونی پوششی (SEM) از (الف): [OMIm]Br-MWCNTs@ZnO نانوجاذب کامپوزیتی تهیه شده با روش سل- ژل (مقیاس: ۳۰۰ نانومتر)؛ و تصاویر SEM یک فیبر توخالی پلی پروپیلنی تقویت شده با نانوجاذب مذکور از زوایای دید مختلف (ب): دیواره ی خارجی (مقیاس: ۱۰۰ میکرومتر)؛ (ج): بُرش عرضی (مقیاس: ۱۰۰ میکرومتر)؛ (د): مورفولوژی سطح و تصویر بافت از فیبرتو خالی در یک بزرگنمایی دیگر، پس از تثبیت نانوجاذب پخش شده در حلال NOPE بر روی سطح فیبر (مقیاس: ۳۰۰ نانومتر) ۱۵۸
- شکل ۳-۲-۵- بهینه سازی شرایط و پارامترهای تزریق الکتروکنتیک برای پیش تغلیظ توده ای تقویت شده با میدان الکتریکی (FASI): "تاثیر ترکیب ماتریکس نمونه با افزایش غلظت حجمی- حجمی حلال رقیق ساز (متانول)"، (نشان داده شده بر حسب ارتفاع پیک آنالیت یا به عبارتی شدت سیگنال تجزیه ای و پاسخ ردیاب) ۱۶۴
- شکل ۳-۲-۶- بهینه سازی شرایط و پارامترهای تزریق الکتروکنتیک برای پیش تغلیظ توده ای تقویت شده با میدان الکتریکی (FASI): "تاثیر زمان پیش تزریق هیدرودینامیک قاج آب خالص قبل از وارد کردن نمونه" ۱۶۵
- شکل ۳-۲-۷- بهینه سازی شرایط و پارامترهای تزریق الکتروکنتیک برای پیش تغلیظ توده ای تقویت شده با میدان الکتریکی (FASI): "تاثیر زمان تزریق الکتروکنتیک نمونه" ۱۶۶
- شکل ۳-۲-۸- بهینه سازی شرایط و پارامترهای تزریق الکتروکنتیک برای پیش تغلیظ توده ای تقویت شده با میدان الکتریکی (FASI): "تاثیر ولتاژ تزریق نمونه" ۱۶۶

شکل ۳-۲-۹- بهینه‌سازی پارامترهای استخراج الکتروغشایی پیشنهادی: تاثیر افزودن مواد نانوجاذب به ترکیب غشای مایع تثبیت شده (SLM)، بر روی کارایی استخراج داروی ایماتینیب مسیلات (نشان داده شده برحسب ارتفاع پیکها یا به عبارتی شدت سیگنال تجزیه‌ای و پاسخ ردیاب).....	۱۷۰
شکل ۳-۲-۱۰- تاثیر غلظت نانوکامپوزیت IL-MWCNTs@ZnO در حلال آلی، (به عنوان نانوجاذب جامد) بر روی کارایی استخراج الکتروغشایی داروی ایماتینیب مسیلات.....	۱۷۱
شکل ۳-۲-۱۱- تاثیر ولتاژ اعمالی بر روی کارایی استخراج الکتروغشایی داروی ایماتینیب مسیلات.....	۱۷۳
شکل ۳-۲-۱۲- تاثیر زمان استخراج بر روی کارایی استخراج الکتروغشایی داروی ایماتینیب مسیلات.....	۱۷۵
شکل ۳-۲-۱۳- تاثیر سرعت همزدن و تحریک مکانیکی بر روی کارایی استخراج الکتروغشایی داروی ایماتینیب مسیلات.....	۱۷۹
شکل ۳-۲-۱۴- الکتروفروگرامهای نوعی حاصل از تکنیک پیشنهادی در شرایط بهینه: (الف) پلاسمای انسانی شاهد (عاری از دارو)؛ (ب) پلاسمای انسانی آغشته شده با ۵۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر داروی هدف (IMM)؛ (ج) نمونه پلاسمای به دست آمده پس از مصرف خوراکی داروی ایماتینیب مسیلات (با برند Gleevec®) با دوز ۲۰۰ میلی گرمی توسط بیمار شماره‌ی یک (با کد K که فقط تحت درمان با داروی ایماتینیب مسیلات قرار داشت).....	۱۸۵

فهرست جداول

جدول ۱-۱- بخشی از داروهای خوراکی ضد سرطان تایید شده توسط سازمان غذا و داروی آمریکا جهت درمان انواع سرطانها.....	۱۱
جدول ۱-۲- کاربرد استخراج الکتروغشایی به منظور استخراج و اندازه‌گیری برخی از ترکیبات دارویی در نمونه‌های بیولوژیکی مختلف.....	۳۹
جدول ۱-۳- مروری بر جاذبه‌های تهیه شده با روش سل-ژل، گزارش شده در مراجع علمی به منظور استفاده در آماده‌سازی و پیش‌تغلیظ آنالیتها و نمونه‌های مختلف از پیکره‌های بیولوژیکی.....	۴۸
جدول ۱-۴- بخشی از کاربردهای اخیر ترکیبات مختلف نانوساختار، به منظور استفاده در آماده‌سازی و پیش‌تغلیظ آنالیتها و نمونه‌های مختلف از پیکره‌های محیطی، غذایی و بیولوژیکی.....	۶۰
جدول ۱-۵- نام کامل و اختصاری برخی از مهمترین ترکیبات مزومتخلخل.....	۶۷
جدول ۱-۶- جزئیات اجرایی روشهای پیش‌تغلیظ داخل‌ستونی (آنالین) در تکنیک الکتروفورز موئین.....	۷۳
جدول ۱-۷- مروری بر کاربردهای اخیر دو روش پیش‌تغلیظ آنالین FASS و FASI؛ گزارش شده در مراجع علمی برای آنالیز برخی از ترکیبات دارویی در ماتریکسهای بیولوژیکی.....	۷۵
جدول ۱-۸- مروری بر گزارشات ارائه شده در مراجع علمی برای آنالیز برخی از مهمترین داروهای ضد سرطان با استفاده از تکنیک الکتروفورز موئین.....	۷۶
جدول ۱-۹- ساختار مولکولی و ویژگیهای فیزیکوشیمیایی ایماتینیب مسیلات.....	۸۳
جدول ۱-۱۰- میزان غلظت متوسط بارگذاری شده‌ی نقره در نانوجاذب تهیه شده بر اساس نتایج تکنیک ICP-OES.....	۹۷
جدول ۱-۱۱- خواص متنی ترکیب مزومتخلخل و نانوکامپوزیت تهیه شده.....	۱۱۶
جدول ۱-۱۲- داده‌های آزمون معتبرسازی روش پیشنهادی برای اندازه‌گیری کمی CAP و FU-۵ در نمونه پلاسمای انسان.....	۱۴۰
جدول ۱-۱۳- دقت و صحت روش برای اندازه‌گیری داروهای تحت مطالعه در نمونه‌های پلاسمای انسان.....	۱۴۲
جدول ۱-۱۴- درصدهای بازیابی نسبی بدست‌آمده با روش پیشنهادی (HF-SLPME-FASI-CE-UV) در نمونه‌های پلاسمای آغشته شده با غلظتهای ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر از هر دو آنالیت.....	۱۴۳
جدول ۱-۱۵- ارزیابی پایداری روش پیشنهادی برای استخراج و اندازه‌گیری همزمان CAP و FU-۵ در نمونه‌های کنترل کیفی (QC) پلاسمای انسان.....	۱۴۷
جدول ۱-۱۶- نتایج ارزیابی استحکام (سختی روش) برای هر دو آنالیت هدف در شش سطح مختلف از تغییرات تعمدی اعمالی در شرایط جداسازی و استخراج روش.....	۱۴۸

جدول ۱-۳-۷- مروری بر برخی از روشهای تجزیه‌ای گزارش شده در مراجع علمی برای تعیین، تشخیص و اندازه‌گیری کمی داروی کپسیتابین (CAP) و متابولیت‌های مربوطه، در پیکره‌ها و نمونه‌های مختلف؛ مقایسه با روش HF-SLPME-FASI-CE-UV ارائه شده در این تحقیق	۱۵۲
جدول ۱-۲-۳- نتایج و خصوصیات کمی معتبرسازی روش پیشنهادی EME-FASI-CE-UV برای آنالیز آنالیت هدف در نمونه‌های پلاسما	۱۸۱
جدول ۲-۲-۳- دقت و صحت روش برای اندازه‌گیری داروی مورد مطالعه در نمونه‌های پلاسمای کنترل کیفی (QC)	۱۸۳
جدول ۳-۲-۳- بازیابی‌های نسبی برای استخراج و آنالیز داروی ایماتینیب مسیلات در نمونه‌های پلاسمای آغشته به دارو در سه سطح غلظتی ۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ (با روش پیشنهادی IL-MWCNTs@ZnO-HF-EME-FASI-CE-UV)	۱۸۳
جدول ۴-۲-۳- نتایج و داده‌های حاصل از مطالعات پایداری برای استخراج و اندازه‌گیری ایماتینیب مسیلات در نمونه‌های کنترل کیفی پلاسما (QC) با استفاده از روش پیشنهادی	۱۸۷
جدول ۵-۲-۳- ارزیابی سختی و استحکام روش پیشنهادی برای استخراج و آنالیز ایماتینیب مسیلات در نمونه‌های پلاسمای آغشته شده؛ در سه سطح مختلف از تغییرات اعمال شده در شرایط جداسازی	۱۸۸
جدول ۶-۲-۳- نتایج و برخی از جزئیات نمونه‌های حقیقی (پلاسمای جدا شده از خون) مربوط به بیماران مبتلا به سرطان GIST، که برای تعیین سطح غلظتی داروی ایماتینیب مسیلات با استفاده از روش پیشنهادی، آنالیز شده‌اند	۱۸۹
جدول ۷-۲-۳- مقایسه‌ی روش پیشنهادی EME-FASI-CE-UV با سایر روشهای مبتنی بر تکنیک الکتروفورز موئین که تاکنون برای تشخیص و اندازه‌گیری داروی ایماتینیب مسیلات در مایعات بیولوژیکی (نمونه‌های انسانی)، گزارش شده‌اند	۱۹۰
جدول ۸-۲-۳- مرور و مقایسه‌ای بر برخی از روشهای تجزیه‌ای (صرفاً روشهای کروماتوگرافی) گزارش شده در مراجع علمی برای تعیین، تشخیص و اندازه‌گیری کمی داروی ایماتینیب مسیلات (IMM) در پیکره‌ها و نمونه‌های زیستی	۱۹۲

فصل اول:

مقدمه، ضرورت و پیشینه‌ی تحقیق

۱-۱- مقدمه و پیش‌درآمدی بر بیماری سرطان و غربالگری داروهای ضدسرطان

سرطان بیماری است که در مواجهه با آن، کنترل رشد در یک یا تعداد بیشتری سلول مختل می‌شود و منجر به توده‌های جامد از سلولهای درگیر، به نام تومور^۱ و یا ناهنجاری‌های درگیر کننده‌ی مایعات فیزیولوژیکی بدن مانند خون، مغزاستخوان و غیره می‌شود که در پزشکی آنها را بیشتر با نام نئوپلاسم^۲ می‌شناسند. این بیماری، دومین عامل مهم مرگ و میر بشر پس از بیماری‌های قلبی-عروقی می‌باشد و مسبب سالیانه مرگ میلیون‌ها نفر در سرتاسر جهان است. شیمی درمانی یکی از مرسوم‌ترین روشهای درمان بیماران مبتلا به سرطان می‌باشد که نقش اصلی آن تجویز داروهایی است که مسئول از بین بردن سلولهای بدخیم و در نتیجه کنترل رشد یا نابودی موقتی و یا کامل آنها می‌باشد، که این شیوه‌ی درمان اغلب زمانی توصیه می‌شود که فرد سرطان شناخته شده‌ای دارد و هدف کنترل و درمان آن بیماری است و یا هنگامی که احتمال وجود سلولهای سرطانی در بدن فرد بالاست، ولی قطعیت وجود آنها در حد امکانات تشخیصی نمی‌باشد. لذا در چنین مواردی از این تیپ درمانی برای ممانعت از احتمال عود بیماری در آینده استفاده می‌شود. شیمی درمانی شامل استفاده از داروهای با وزن مولکولی پایین برای تخریب انتخابی سلولهای توموری و یا حداقل، جلوگیری از تکثیر آنها است. بسته به نوع بیماری و دوزی که باید مصرف شود، شیمی درمانی از طریق یکی از روشهای تزریق وریدی، تزریق زیرپوستی، تزریق نخاعی، استفاده خوراکی و یا ترکیبی از روشهای یاد شده تجویز می‌گردد. در حال حاضر، بیش از ۱۸۰ نوع داروی شناخته شده برای درمان و یا پیشگیری از انواع مختلف این بیماری در انسان مورد استفاده قرار می‌گیرد که بر مبنای مکانیسم عمل در دسته‌های مختلفی از جمله عوامل آلکیل‌کننده^۳، آنتی‌متابولیت‌ها^۴، آنتی‌بیوتیک‌ها^۵، آلکالوئیدها^۶، آنتراسیکلین‌ها^۷، هورمون‌ها^۸، عوامل آنتی-تیوبلین^۹، آنتی‌بادی‌های مونوکلونال^{۱۰}، عوامل کنترل تعاملی دی-ان-ای^{۱۱}، تاکسان‌ها^{۱۲} و سایر ترکیبات بیولوژیکی طبقه‌بندی می‌شوند.

علاوه بر این، در حدود ۱۰ درصد از داروهای با پایه‌ی فلزی^{۱۳} نیز در حال تجویز و یا آزمایشات بالینی هستند. اکثر داروهای شیمی درمانی تجاری موجود، ترکیبی از نمک داروها و مواد جانبی هستند

¹ Tumor

² Neoplasm

³ Alkylating agents

⁴ Antimetabolites

⁵ Antibiotics

⁶ Alkaloids

⁷ Anthracyclines

⁸ Hormones

⁹ Antitubulin agents

¹⁰ Monoclonal antibodies

¹¹ DNA-interactive agents

¹² Taxanes

¹³ Metal-based drugs

که یون مخالف می‌تواند یک ترکیب آلی (سیترات^۱، مالئات^۲، مسیلات^۳، سوکسینات^۴، سالیسیلات^۵، فومارات^۶، تارتارات^۷ و گلوکونات^۸) و یا یک ترکیب معدنی مانند سولفات، فسفات، نیترات، بروماید، کربنات و هیدروکلراید باشد که سبب قطبیت مولکولهای دارو می‌شوند. امروزه با افزایش بروز این بیماری مهلک، درمانهای مشتمل بر مصرف عوامل دارویی سیتوتوکسیک^۹ به طور گسترده‌ای از طرف آنکولوژیست^{۱۰}ها و سایر متخصصین تجویز می‌شود. از طرفی با توجه به پیری رو به رشد جمعیت انسانی در جهان و ریسک فزاینده‌ی ابتلا به انواع سرطانها در این گروه‌های حساس و همچنین با عنایت به بسط و توسعه‌ی روشهای درمانی جدید، این انتظار می‌رود که تقاضاهای انسانی برای بهره‌مندی از خدمات مرتبط با این بیماری در مراکز درمانی، کلینیکی، دارویی و هم چنین مراکز پژوهشی به بیش از دو برابر در ۱۰ سال آینده رشد یابد. این در حالی است که حتی اگر درمانهای انتخابی جدیدتر و بیشتری در سالهای آتی کشف و توسعه یابند، باز هم الگوهای درمانی همچنان با عوامل سیتوتوکسیک کلاسیک در ارتباط خواهند بود. در حقیقت، پاسخ به عوامل شیمی درمانی در دو مقوله‌ی مهم تاثیرگذاری و تاثیرپذیری بسیار متغیر است که این امر احتمالاً به دلیل تفاوت‌های فاحش در ویژگی‌های انحصاری و مشخصه‌های مولکولی انواع تومورهاست. امروزه متخصصین فارماکوژنتیک^{۱۱} و رادیونومیکس^{۱۲} در حال بررسی این مهم هستند که چگونه مشخصه‌های ژنتیکی هر فرد می‌تواند اثرات درمانی داروها را تحت تاثیر قرار دهند بدون اینکه فرد، مستعد قرارگرفتن در ریسک اثرات جانبی آن داروها باشد. به طور خاص، تیم‌های تحقیقاتی یاد شده به همراه آنکولوژیست‌های پژوهشگر بر روی این مهم که چگونه تغییرات ساختاری در ویژگی‌های ژنتیکی هر فرد می‌تواند انتقال، رهایش، متابولیسم و برهمکنش‌های دارویی با عوامل هدف را کنترل کنند، تمرکز کرده‌اند، که بدون شک این مهم مستلزم آنالیزهای زیست تجزیه‌ای، تشخیص، تعیین و اندازه‌گیری کمی این نوع داروها و هم چنین ردیابی آنها در نمونه‌های زیستی، خونی و داخل بدنی افراد و بیماران مصرف‌کننده‌ی آنها می‌باشد. از این رو، نیاز به روشهای تجزیه‌ای برای اندازه‌گیری داروهای ضد سرطان چه در فرمولاسیون دارویی به منظور کنترل کیفیت به عنوان بخش جدایی ناپذیر توسعه و تولید داروهای با تاثیرگذاری بالا، ایمن از نظر کاهش عوارض جانبی و مقرون به صرفه و چه در شرایط فیزیولوژیکی و مایعات بیولوژیکی به عنوان یک نشانه در نحوه‌ی تجویز

¹ Citrate

² Maleate

³ Mesylate

⁴ Succinate

⁵ Salicylate

⁶ Fumarate

⁷ Tartrate

⁸ Gluconate

⁹ Cytotoxic agents

¹⁰ Oncologist

¹¹ Pharmacogenetics

¹² Radiogenomics

صحيح دوزهای دارویی و نرخ متابولیسم^۱ آن، از اهمیت بسزایی برخوردار است. شایان ذکر است همان طوری که اشاره شد، در حال حاضر تعداد بیمارانی که تحت شیمی درمانی قرار می‌گیرند و یا خواهند گرفت، رو به افزایش چشم‌گیری داشته و لذا بر مبنای سمیت و عوارض عوامل دارویی سیتوتوکسیک ضد سرطان برای انسان (نه فقط بیماران دریافت‌کننده‌ی این داروها، بلکه برای متخصصین مراقبت‌های بهداشتی)، ضرورت توسعه و بروزرسانی روشهای تجزیه‌ای قابل اعتماد و مقرون به صرفه برای آنالیز و اندازه‌گیری این دسته از ترکیبات دارویی بیش از پیش محسوس است. بی‌تردید، این ضرورت به این دلیل است که تمامی شاخه‌های مرتبط با ترکیبات دارویی، از کشف مواد جدید گرفته تا موارد مورد مصرف بیماران، با آنالیز عوامل سیتوتوکسیک در پیکرها و ماتریکس‌های مختلف مانند فرمولاسیون دارویی، نمونه‌های محیطی و مهمتر از همه نمونه‌های بیولوژیکی در ارتباط می‌باشند.

در میان ابزارهای قدرتمند و حساس تجزیه‌ای که جهت تشخیص، تعیین و آنالیز ترکیبات دارویی-هدف، بسط یافته و مورد استفاده قرار می‌گیرند، روش الکتروفورز موئین^۲ به واسطه‌ی طبیعت یونی داروهای ضد سرطان [۱]، می‌تواند انتخاب مناسبی برای تعیین کمی و اندازه‌گیری این دسته از ترکیبات باشد. از طرفی با توجه به این که روش الکتروفورز موئین یک تکنیک تجزیه‌ای سریع، مقرون به صرفه، حساس و کارآمد برای آنالیزهای دارویی می‌باشد، و از طرف دیگر توانمندی‌های خاص این دستگاه در آنالیز انواع ترکیبات دارویی و همچنین کاربردهای منحصر به فرد آن در علوم بنیادین و فناوری‌های نوین، این روش را به ابزاری رقیب، در حال گسترش و قدرتمند نسبت به سایر روشهای دستگاهی تجزیه‌ای مانند کروماتوگرافی مایع تبدیل کرده است و اهمیت کاربرد آن را به عنوان جایگزین مثبت و مناسبی نسبت به روشهای پیچیده‌تر و پرهزینه‌تر، پررنگتر ساخته است.

جستجوی دقیق در مراجع علمی معتبر که نمایانگر محبوبیت بیشتر این روش در میان آنالیست‌ها و آنکولوژیست‌ها برای آنالیز ترکیبات ضد سرطان به دلایل ذکر شده می‌باشد، شاید گواهی روشن بر این مدعا باشد که بی‌تردید افق بسیار وسیعی را برای جداسازی ترکیبات دارویی آنتی نئوپلاستیک^۳ شیمی-درمانی، زمانی که جداسازی و اندازه‌گیری با برگزیدگی بالا مورد نیاز باشد، گشوده است. لذا در حال حاضر فراهم سازی زمینه‌های تحقیقاتی مطالعاتی برای گسترش و معتبرسازی کاربردهای این روش در آنالیز و اندازه‌گیری این دسته از ترکیبات حساس دارویی خالی از لطف نیست و ضروری به نظر می‌رسد.

از طرفی دیگر، موارد بسیاری از انواع ناخالصی‌ها که به همراه ترکیبات دارویی در نمونه‌های بیولوژیکی موجود هستند، پژوهشگران را ملزم به توسعه‌ی روشهای آماده‌سازی مناسب نمونه برای اندازه‌گیری و تشخیص انتخابی و با حساسیت بالای آنها کرده است. لذا یک جنبه‌ی کلیدی در تعیین

¹ Metabolism

² Capillary electrophoresis

³ Antineoplastic

کمی و غربالگری آنالیت‌های دارویی در شرایط داخل بدنی، توسعه‌ی روشهای معتبر و ایمن از نظر زیست محیطی، برای پیش‌تغلیظ و استخراج انتخابی از پیکره‌های بیولوژیکی آنها به منظور کاهش هزینه و مخاطرات متداول در روشهای سنتی آماده‌سازی و ریزاستخراج^۱ می‌باشد. مروری بر مقالات منتشر شده در زمینه‌ی آنالیز عوامل دارویی شیمی درمانی در مراجع علمی نشان می‌دهد که اکثر این پژوهش‌های علمی، تکنیک‌های سنتی آماده‌سازی نمونه و پیش‌تغلیظ انتخابی، مانند ترسیب پروتئین^۲، استخراج مایع-مایع^۳، استخراج فاز جامد^۴ و یا ترکیبی از آنها را به عنوان راهبرد جداسازی و تغلیظ آنالیت هدف از پیکره‌های بیولوژیکی آنها مورد استفاده قرار داده‌اند. اگرچه اکثر موارد اشاره شده در نوع خود تکنیک‌های بسیار قدرتمندی در کاربردهای مرتبط با تخلیص^۵، پاکسازی^۶ و استخراج موثر و سریع داروهای هدف از نمونه‌های مختلف می‌باشند، ولی برخی از این روشها نیاز به ابزارهای پیچیده، پُرحمت و پر-هزینه و شرایط آزمایشی پرخطر و دشوار از منظر زیست محیطی را قبل از انجام آنالیزهای دستگاهی، تحمیل می‌کنند که آنها را برای آنالیزهای مرسوم (روتین) نامناسب ساخته است. این در حالی است که گسترش روز افزون علم و فناوری در عصر حاضر، تمرکز و توسعه‌ی بیشتر بر روشهای نوین ارائه شده با حداقل خطرات زیست محیطی را در کنار کارایی آنها می‌طلبد. لذا به نظر می‌رسد که برخی از اصول اولیه‌ی مطالعات فارماکوکینتیکی بالینی در اکثر این گزارشات با نقصان و یا جای سوال همراه باشد، چرا که به منظور بررسی امکان کاربرد روشهای جداسازی کارآمد در پژوهش‌های این چینی، انطباق روشهای آنالیز با پروتکل‌های سازگار با مسائل زیست محیطی، از جمله ضرورت محدودسازی کاربرد بیش از حد مجاز حلال‌های آلی پرخطر که خود یکی از ریسک فاکتورهای (عوامل خطر) ابتلا به انواع مختلفی از سرطان می‌باشند، می‌بایستی مد نظر قرارگیرد. لازم به تاکید است که با گسترش رو به رشد کاربرد فرآورده‌های نانو تکنولوژی و استقبال صنایع دارویی، بایستی تمامی ظرفیتهای بالقوه‌ی این فناوری نوین در شاخه‌های کنترل کیفیت و آنالیز دارو و به ویژه در مورد کاربرد در محصولات و سامانه‌های نوین دارویی به درستی برآورده شود تا تأثیر آن در ایجاد تحولات کیفی و کمی تجزیه‌ای مد نظر قرارگیرد. بی‌تردید، ورود فناوری نانو در عرصه‌ی علوم زیستی و زیست تجزیه‌ای در طی دهه‌ی جاری سبب تحول بزرگی در رویکرد محققان و پژوهشگران در تولید و فرمولاسیون داروها و نیز استفاده از این مواد در شاخه‌های تجزیه‌ای مرتبط با اندازه‌گیری ترکیبات دارویی شده است. لذا امروزه شناخت هر چه بیشتر این حوزه‌ی کاری برای دستیابی به مدلهای جدیدی از روشهای پیش‌تغلیظ و پاکسازی که گاهی در تضاد با تکنیکهای سنتی هستند، به صورت بسیار جدی مطرح می‌باشد.

¹ Microextraction

² Protein precipitation

³ Liquid-liquid extraction

⁴ Solid-phase extraction

⁵ Purification

⁶ Clean-up

از این رو، فناوری نانو در حیطه‌ی مذکور با این پیش شرط که معتبرسازی^۱ روشهای اندازه‌گیری و تکنیکهای پیشنهادی آماده‌سازی با بهره‌گیری از چشم اندازه‌های این رویکرد علمی، به همراه پیگیری ملزومات^۲ US, FDA (به عنوان کلیدی‌ترین جنبه در کلیه‌ی روشهای زیست تجزیه‌ای) صورت پذیرد، می‌تواند از جمله موارد رو به رشد در پژوهشهای مرتبط با آنالیز ترکیبات دارویی باشد. لذا توسعه‌ی کاربردهای کلیدی روش الکتروفورز موئین تلفیق شده با متدهای نوین استخراج فاز مایع الکتروغشایی و ریز استخراج ادغامی فاز جامد/مایع بر پایه‌ی فناوری نانو و کاربرد آنها در اهداف پیش‌تخلیظ، جداسازی و اندازه‌گیری انتخابی برخی از داروهای خوراکی شیمی درمانی و متابولیت‌های اصلی آنها به منظور ردیابی در نمونه‌های پلاسمای بیماران مصرف‌کننده به همراه بهینه‌سازی و معتبرسازی روشهای پیشنهادی، رهیافتی است که در این رساله دنبال شده است.

۲-۱- اهمیت آنالیز، اندازه‌گیری، سنجش و نظارت سطح درمانی^۳ داروهای آنتی

نوئوپلاستیک شیمی درمانی

پس از تجویز داروها به بدن انسان، فعل و انفعالات مختلفی از جمله اکسیداسیون^۴، هیدرولیز^۵ و بسیاری از تحولات محتمل دیگر صورت می‌پذیرد. برخی از داروها متابولیزه می‌شوند که نهایتاً منجر به محصولات و ترکیبات فرعی می‌شود و یا برخی از آنها به متابولیت‌های فعالشان که مسئول تاثیرات دارویی هستند، تبدیل می‌شوند. از این رو، مطالعه‌ی گام به گام تحولات دارویی در نمونه‌های زیستی یکی از جنبه‌های کلیدی در آنالیزهای دارویی است [۲]. از طرفی، از تولید عوامل سیتوتوکسیک دارویی گرفته تا شیمی درمانی یک بیمار، استفاده از روشهای تجزیه‌ای به منظور (۱) کنترل کیفیت محصولات فله‌ای و فرمولاسیون‌های تجاری (۲) کنترل کیفیت فرمولاسیون‌های رقیق شده قبل از مصرف بیمار و (۳) مطالعات بر روی فرمولاسیون نهایی، مرتبط با سازگاری و پایداری آنها، امری ضروری می‌باشد. از سوی دیگر، سنجش سطح درمانی داروها، یک موضوع بسیار مهم و کلیدی آزمایشگاه‌های تعیین و اندازه‌گیری دارویی بشمار می‌رود که پیگیری صحیح آن موجب پیشرفت در امر دارو درمانی شده، اما انجام نادرست آن، هزینه‌های آزمایشگاهی و درمانی را بدون کمک به امر درمان، نامتعادل می‌سازد [۲]. داروهای ضد-سرطان با بسیاری از معیارهای متداولی که عمدتاً تحت عنوان پیش‌نیاز برای ضرورت کاربردهای نظارت و سنجش سطح درمانی (TDM) آنها تعریف می‌شوند، سازگار می‌باشند. سنجش سطح درمانی دارو (TDM) مستلزم اندازه‌گیری و تفسیر غلظت دارویی سیستماتیک در مایعات بیولوژیکی و منفردسازی

¹ Validation

² U. S. Food and Drug Administration

³ Therapeutic drug monitoring (TDM)

⁴ Oxidation

⁵ Hydrolysis

دوزهای دارویی و یا الگوسازی برای بیشینه ساختن اثرات درمانی و به حداقل رساندن عوارض دارویی است [۳].

در وهله‌ی نخست، میزان گوناگونی فارماکوکنتیک^۱ (اثرات بدن بر روی دارو، فرایندهای فارماکوکنتیک نامیده می‌شود که این فرایندها دربرگیرنده‌ی جذب، توزیع و حذف داروها هستند و در انتخاب و تجویز یک داروی ویژه جهت یک بیماری خاص اهمیت زیادی دارند) بین فردی آنها در بسیاری از موارد، چشمگیر است. لذا مشاهده‌ی ضرایب تغییرات در کلیرانس^۲ (پاک سازی داخل بدنی) در بیش از ۵۰ درصد این دسته از داروها امری عادی به نظر می‌رسد. به علاوه، این سطح از تنوع در تغییرپذیری عمدتاً هنگامی مشاهده می‌شود که مقادیر حذف و کلیرانس به ازای هر مترمربع بدن بیمار و یا احياناً اندازه‌ی تومور مورد انتظار باشد. این در حالی است که بررسی این امر نشان می‌دهد که کلیرانس دارو در شرایط داخل بدنی بیمار، حداقل در مورد ترکیبات تیروزین کیناز، ارتباط ضعیفی با سطح موثر بدن داراست. لازم به توضیح است که کلیرانس یا پاکسازی (CL)، توانایی و قابلیت بدن در حذف دارو بوده و عاملی است که سرعت حذف دارو را در ارتباط با غلظت دارو پیش‌بینی می‌کند. لذا این اندازه تغییرپذیری فارماکوکنتیک به احتمال زیاد به تفاوت‌های ژنتیکی و همچنین تغییرات در وضعیت عملکرد دارو در بدن مرتبط است. در وهله‌ی دوم، ارتباط چشمگیری بین غلظت‌های پلاسمایی و پارامترهای فارماکودینامیکی^۳ مانند درصد کاهش تعداد نوتروفیل^۴ (بخشی از گلوبولهای سفید خون) قبل و بعد از درمان نیز وجود دارد. همچنین مناسب‌ترین پارامتر فارماکوکنتیکی برای داروهای سیتوتوکسیک، سطح زیر منحنی غلظت پلاسمایی دارو-زمان^۵ (AUC) می‌باشد که برای بیشتر عوامل دارویی سیتوتوکسیک، ارتباط بهتری نسبت به پارامترهای فارماکودینامیکی دارد تا نسبت به غلظت‌های ویژه‌ی دارو مانند بیشترین غلظت پلاسمایی در پایان تزریقات وریدی و یا غلظت‌های باقیمانده، که به طور موثری به دلیل نیمه عمر ناچیز و پایین این نوع داروها با در نظر گرفتن فاصله‌ی زمانی سه هفته‌ای در سیکل درمانی، تقریباً صفر می‌باشد. سومین پیش‌نیاز TDM (به عنوان مثال: تاخیر بین فارماکودینامیک نقطه‌ی پایان و زمان اندازه‌گیری غلظت پلاسمایی) معمولاً برآورده شده است؛ چرا که AUC عمدتاً و معمولاً به یک یا دو روز پس از مصرف دارو (بیشتر تزریق وریدی) مربوط می‌باشد و مقادیر نوتروفیل و پلاکت‌ها پس از یک الی دو هفته از شیمی درمانی مشاهده می‌شوند [۴]. لذا از نظر بالینی، پیش‌نیازهای اساسی برای TDM در موارد مربوط به شاخص درمانی پایین، تغییرپذیری و گوناگونی بین فردی گسترده، ارتباط واضح و آشکار غلظت/اثر بخشی و نهایتاً دسترسی به روشهای آزمایش قابل اعتماد، در دسترس و عملی خلاصه می‌شود.

¹ Pharmacokinetic

² Clearance

³ Pharmacodynamic

⁴ Neutrophil

⁵ Area under concentration- time Curve (AUC)

در طی سی الی ده سال گذشته، یک عصر جدید از درمان سرطان، توسط تیمار و معالجه‌ی انواع سرطانها به دور از استفاده از داروهای سیتوتوکسیک و شیمی درمانی غیراختصاصی و الزاماً به سمتِ معالجات مداوم خوراکی با درمان مولکولی هدفمند، به وجود آمده است [۵]. این نوع از درمانهای سرطان، توسط مکانیسم عمل منحصربفرد توصیف می‌شوند و برای مسیرهای یک یا چندگانه‌ی کلید سلولی زیستی دخیل در فرآیند سرطان، بسیار انتخابی عمل می‌کنند [۶]. اما بسیاری از درمانهای خوراکی هدفمند ضد سرطان، بر مبنای بازدارنده‌های تیروزین کیناز^۱ (TKIs) می‌باشند. مصرف خوراکی این نوع داروها اگرچه با کیفیت بهتر درمان و سبک زندگی بیمار در ارتباط می‌باشند، ولی سبب ایجاد یک مرحله‌ی پیچیده در فارماکوکنتیک آنها می‌شود. به علاوه این تغییر رویکرد به سمت عوامل دارویی هدفمند، الگوهای جدیدی را در مراقبتهای بیماری سرطان ایجاد کرده است که با در نظر گرفتن پایداری بیمار به درمان و نیز با افزایش تعداد داروهای شیمی درمانی خوراکی، به موضوع پراهمیتی تبدیل شده است. تنوع فاکتورهای فارماکوکنتیک در چنین مواردی اغلب زیاد بوده و گوناگونی مشاهده شده در پاسخ درمانی، نه تنها توسط ناهمگونی ژنتیکی^۲ بلکه همچنین توسط پیش زمینه و سابقه‌ی بیمار (مانند سیتوکروم P450 و انتقال دهنده‌ی پُلی فورمیسم^۳ ABC)، ویژگی‌های بیمار مانند پایداری به درمان و همچنین عوامل محیطی مانند تداخلات دارویی، تحت تاثیر قرار می‌گیرد. نتایج مطالعات قبلی نشان داده است که قرارگرفتن هدفمند در معرض اثرات دارویی در مساحت زیر منحنی غلظت پلاسمایی دارو نسبت به زمان^۴ (AUC) منعکس می‌شود که با پاسخ درمانی (کارایی اثرگذاری/عوارض جانبی) در بسیاری از سرطانها در ارتباط است. با این وجود سطح مشاهدات و مدارک سنجش و نظارت سطح درمانی دارو در اکثر این عوامل دارویی ناهمگون بوده و به نظر می‌رسد که TDM هنوز برای بسیاری از این داروها غیرمتداول می‌باشد. کاربردهای TDM در حین درمانهای هدفمند خوراکی ضد سرطان ممکن است برای موقعیت‌های ویژه مانند عدم پاسخ به درمان، عوارض و سمیت‌های شدید و غیرمنتظره، تداخلات دارویی پیش بینی شده و یا نگرانی نسبت به پایداری به درمان، به بهترین شکل مطالعه و لحاظ شود [۷]. در حال حاضر TDM برای عوامل شیمی درمانی به صورت مرسوم مورد استفاده قرار نمی‌گیرد که این امر عمدتاً به دلیل فقدان اطلاعات لازم برای دامنه‌ی غلظتهای درمانی داروها می‌باشد. همچنین تلفیق روشهای مختلف شیمی درمانی، تشخیص و تطبیق غلظتهای هدف را دشوار ساخته است؛ چرا که ارتباط غلظت- اثربخشی شدیداً به تنوع تیمارهای مختلف بستگی دارد. با این حال نظارت و سنجش سطح درمانی دارو، پتانسیل لازم برای اصلاح کاربردهای کلینیکی برخی از داروها و نیز کاهش اثرات جانبی شدید و مخرب شیمی درمانی را دارا می‌باشد [۸]. لذا غربالگری و اندازه‌گیری داروهای شیمی درمانی و به طور ویژه‌ای داروهای شیمی درمانی خوراکی طراحی شده برای درمانهای هدفمند

¹ Tyrosine kinase inhibitors (TKIs)

² Genetic heterogeneity

³ ABC transporter polymorphisms

⁴ Area under concentration-time curve (AUC)

مولکولی، جهت توسعه‌ی موفقیت آمیز انواع داروهای ضدسرطان و در عین حال کاربرد بهینه‌ی آنها در درمانهای موثر این بیماری و توسعه‌ی روشهای نوآورانه برای درمانهای فردی ضروری می‌باشد. این در حالی است که علی‌رغم این مهم که TDM رهنمودهای ارزشمندی را برای تنظیم دوز برخی از نمونه‌های متداول دارویی به عنوان مثال آنتی‌بیوتیک‌ها، داروهای تضعیف کننده‌ی سیستم ایمنی بدن (ایمونوساپرسیوها)^۱ و داروهای ضدتشنج و سایر داروهای پرکاربرد ارائه کرده است، ولی تاکنون کاربرد این پروسه‌ی پراهمیت در درمانهای سنتی و متداول سرطان، محدود و پایین‌تر از انتظار بوده است. شاید بتوان الزامات غیرعملی نمونه‌های گوناگون و چندگانه‌ی خونی را که قرارگرفتن سیستماتیک و کامل در معرض داروهای با نیمه عمر پایین را توسط تزریقات متناوب داخل وریدی محدود کرده‌اند، از جمله مهمترین موانع این امر ذکر نمود. با این حال، در مقایسه با داروهای سنتی متداول، در موارد مربوط به داروهای جدید هدفمند و خوراکی شیمی درمانی، داشتن مشخصات متنوع دوز تجویزی و نیز فارماکوکینتیک‌های مختلف، تخمین حالتهای دائمی و پایا با یک مرحله‌ی منفرد اندازه‌گیری سطوح حداقلی دارو در خون قبل از مصرف دوز بعدی را امکان پذیر می‌سازد. شواهد و پیشرفت‌های اخیر نشان می‌دهند که پارامترهای فارماکوکینتیک معین با نتایج و موفقیت‌های بالینی بسیاری از این عوامل دارویی در ارتباط می‌باشند. هر چند که مستندات فعلی برای اجرای سنجش سطح درمانی داروها در کاربردهای عملی روتین ناکافی می‌نمایند، ولی انجام تحقیقات هماهنگ برای درک جایگاه عملی و نقش اندازه‌گیری حالاتهای پایدار سطوح خونی داروها، در مراقبتهای بالینی بیماران مبتلا به سرطان ترغیب‌کننده خواهد بود [۹].

مشخصاً در حین بسط و توسعه‌ی یک دارو، داده‌های مرتبط با پایداری و یا تخریب و ناپایداری دارو، اطلاعات راجع به متابولیسم در شرایط آزمایشگاهی^۲ با استفاده از سیستمهای مصنوعی^۳ مانند میکروزومهای کبدی^۴ و همچنین تعیین مسیرهای متابولیکی شرایط داخل بدنی^۵، همگی قابل حصول می‌باشند. ولی در مورد سنجش سطح درمانی داروها در محیط‌ها و شرایط بالینی، بسیاری از فاکتورها به ضرورت استفاده از تکنیک‌های تجزیه‌ای اشاره می‌کنند که از جمله آنها می‌توان به عواملی چون جمعیت و تعداد متنوع و نامتجانس و نیز پیش‌زمینه‌ی ژنتیکی بیماران، ارزیابی فراهمی زیستی^۶ (بخشی از داروی تغییر نیافته است که متعاقب تجویز با یک روش خاص، به گردش خون عمومی می‌رسد و توانایی اثربخشی دارد)، شاخص پایین درمانی اکثر عوامل ضد سرطان، شناسایی عوامل عدم موفقیت و یا عدم پاسخ به درمان و هم چنین کارکرد و فعالیت اغلب محدود ارگانهای درگیر در کلیرانس دارو مانند کبد و

¹ Immunosuppressives

² *in vitro* metabolism

³ Artificial systems

⁴ Liver microsomes

⁵ *in vivo* metabolic pathways

⁶ Bioavailability

کلیه در بیماران سرطانی، اشاره کرد. علاوه بر این، هنگامی که یک داروی ضدسرطان در ابتدا به بیمار تجویز می‌شود، در فاز مطالعاتی اول^۱، اندازه‌گیری سطوح غلظتی داروی مادر و متابولیت‌های آن یک ضرورت روتین می‌باشد. از طرفی اکثر داروهای ضدسرطان فعال واکنشی شدید و تا اندازه‌ای ناپایدار می‌باشند؛ لذا داروی مادر، متابولیت‌ها و محصولات جانبی آن نیاز مبرمی به جداسازی، تشخیص و اندازه‌گیری کمی و ترجیحاً با استفاده از سیستم‌های تجزیه‌ای را دارند. اینجاست که دستگاه‌ها و روشهای تجزیه‌ای کارآمد می‌توانند نقش موثری را ایفا کنند [۱۰]. بنابراین و همانطوری که قبلاً نیز مورد بحث قرار گرفت، مطالعات فارماکوکنتیک و فارماکودینامیک داروهای ضدسرطان به منظور دستیابی به کارایی درمان و حداقل عوارض مرتبط با داروها کاملاً ضروری می‌باشد و در همین راستا روشهای تجزیه‌ای، نمونه‌برداری و نیز آماده‌سازی نمونه‌ها، فاکتورهای بسیار حائز اهمیتی هستند که خلوص و غلظتهای تجویزی داروها را تحت تاثیر قرار می‌دهند و می‌توانند به صورت مستقیم بر روی صحت مطالعات مذکور نقش اصلاحی موثری داشته باشند. لذا امروزه آنالیز داروهای ضدسرطان و همچنین سنجش سطح درمانی این دسته از داروها به عنوان کاربردی‌ترین راهکارهای اصلاح اثربخشی و ایمنی عوامل دارویی مورد پذیرش قرار گرفته‌اند که در همین راستا ضرورت اندازه‌گیری سطح غلظتی آنها در مایعات بیولوژیکی بدن برای ارزیابی اطلاعات مفید راجع به دوزهای تجویزی، حفظ غلظتهای دارویی در گستره‌های کاربردی و هدفمند و همچنین افزایش کارایی و کاهش عوارض جانبی آنها بیش از پیش محسوس است.

۱-۳- انواع داروهای خوراکی شیمی درمانی و کاربردهای درمانی آنها

به واسطه‌ی یک معرفی بالینی که حدود سه دهه‌ی پیش صورت گرفت، تاموکسیفن^۲ به صورت انتخابی برای تنظیم و تعدیل گیرنده‌های استروژنی^۳ بکارگرفته شد، و بنابراین می‌توان این دارو را به عنوان اولین نمونه‌ی بارز داروهای هدفمند خوراکی شیمی درمانی در نظرگرفت [۱۱]. سایر تنظیم‌کننده‌های گیرنده‌های استروژنی که تاثیر هورمون‌های استروژنی را در سلولهای پستان بلوکه می‌کنند، در سالهای اخیر توسعه داده شده‌اند که مشتمل بر دو داروی تورمیفن^۴ و رالوکسیفن^۵ می‌باشند. پس از داروهای مذکور، بازدارنده‌های آروماتاز^۶ (AIs) دسته‌ی دیگری از داروهای هدفمند ضد سرطان می‌باشند که برای درمان سرطان پستان مورد استفاده قرار گرفته‌اند و نقش آنها تداخل در آنزیم‌های مسئول تولید استروژن می‌باشد. هر دو داروی بیکالوتامید^۷ که یک مهارکننده‌ی گیرنده‌ی آندروژن^۸ است و نیز

^۱ Phase I studies

^۲ Tamoxifen

^۳ Oestrogen receptors

^۴ Toremifene

^۵ Raloxifene

^۶ Aromatase inhibitors

^۷ Bicalutamide

^۸ Androgen

ابیراترون^۱ که مهارکننده‌ی سنتز آندروژن CYP17A1 می‌باشد، برای درمان سرطان پروستات و در اصل به عنوان مکمل مجموعه درمان‌های هورمونی مورد استفاده قرار گرفته‌اند [۹]. در سال‌های اخیر، درمان هدفمند توسط بازدارنده‌های پروتئین کیناز^۲ بر علیه آنکوپروتئین^۳ها معطوف شده‌است (آنکوپروتئین یک پروتئین است که برای یک آنکوژن ویرال که درگیر تنظیم یا سنتز پروتئین‌های مرتبط با رشد سلول‌های تومورزا می‌باشد، کدگذاری می‌شود) که اجازه‌ی تلفیق و نوسان مسیرهای سیگنالی^۴ مختلف را می‌دهد [۱۲] و در نتیجه توسط عوارض محدود غیراختصاصی بیشتری مشخص می‌شود [۱۳ و ۱۴]. در حال حاضر تعداد زیادی از ترکیبات مولکولی مختلف توسط سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA) مورد تایید قرار گرفته‌اند و بیش از ۱۰ ترکیب دیگر در مراحل مختلف توسعه‌ی بالینی و اخذ مجوزهای تاییدی هستند [۶ و ۱۵]. بخشی از داروهای مورد استفاده در درمان‌های خوراکی ضد سرطان در جدول ۱-۱ لیست شده‌اند که کلیه‌ی داروهای مذکور، مثال‌های آشکاری از زمینه‌های نوظهور تخصصی دارویی هستند [۱۷] که به صورت منفرد و یا درمان ترکیبی، پتانسل لازم را برای استفاده در درمان بیماران مختلف سرطانی دارا می‌باشند [۱۸].

جدول ۱-۱- بخشی از داروهای خوراکی ضد سرطان تایید شده توسط سازمان غذا و داروی آمریکا جهت درمان انواع سرطانها.

نام دارو	برند تجاری	سال تایید	مکانیسم عمل	حیطه درمانی
تاموکسیفن	Nolvadex [®]	۱۹۷۷	مهار کننده‌ی گیرنده استروژن	سرطان پستان
تورمیفن	Fareston [®]	۱۹۹۷	گیرنده‌ی استروژن	سرطان پیشرفته پستان
رالوکسیفن	Evista [®]	۲۰۰۷	گیرنده‌ی استروژن	سرطان تهاجمی پستان
آناستروزول ^۵	Arimidex [®]	۱۹۹۶	مهار کننده‌ی آروماتاز	سرطان پیشرفته پستان
لِتروزول ^۶	Femara [®]	۱۹۹۷	مهار کننده‌ی آروماتاز	سرطان پستان
اِگزِمِستان ^۷	Aromasin [®]	۱۹۹۹	مهار کننده‌ی آروماتاز	سرطان پیشرفته پستان
بیکالوتامید	Casodex [®]	۲۰۰۳	بازدارنده‌ی آندروژن	علائم سرطان پیشرفته پروستات
ابیراترون	Zytiga [®]	۲۰۱۱	بازدارنده‌ی آندروژن	سرطان متاستاتیک پروستات

^۱ Abiraterone

^۲ Protein kinase inhibitors

^۳ Onco-proteins

^۴ Signalling pathways

^۵ Anastrozole

^۶ Letrozole

^۷ Exemestane

ادامه‌ی جدول ۱-۱

ایماتینیب ^۱	Gleevec® - Glivec®	۲۰۰۱	بازدارنده‌ی تیروزین کیناز - گیرنده فاکتور رشد مشتق از پلاکت	لوسمی میلوئید مزمن ^۲ - سرطان خون
جفیتینیب ^۳	Iressa®	۲۰۰۳	رسیپتور فاکتور رشد اپیدرمال ^۴	سرطان ریه سلول کوچک ^۵
ارلوتینیب ^۶	Tarceva®	۲۰۰۴	EGFR	سرطان ریه و پانکراس ^۷
سورافینیب ^۸	Nexavar®	۲۰۰۵	فاکتور رشد اندوتلیال عروقی ^۹	سرطان کبد
سانیتینیب ^{۱۰}	Sutent®	۲۰۰۶	تیروزین کیناز شبه Fms ^{۱۱}	تومورهای استرومایی دستگاه گوارش ^{۱۲}
داساتینیب ^{۱۳}	Sprycel®	۲۰۰۶	مهارکننده‌ی بسیاری از آنزیم‌های تیروزین کیناز	انواع مختلف سرطان خون
لاپاتینیب ^{۱۴}	Tyverb®	۲۰۰۷	گیرنده‌ی فاکتور رشد اپیدرمال انسانی ^{۱۵}	انواع جدی پیشرفته یا متاستاتیک سرطان پستان
پازوپانیب ^{۱۶}	Votrient®	۲۰۰۹	فاکتور رشد اندوتلیال عروقی	سرطان پیشرفته کلیه (از نوع RCC) و سارکوم پیشرفته بافت نرم
واندتانیب ^{۱۷}	Caprelsa®	۲۰۱۱	فاکتور رشد اندوتلیال عروقی	سرطان تیروئید ^{۱۸}
رگورافینیب ^{۱۹}	Stivarga®	۲۰۱۲	گیرنده‌ی ویژه تیروزین کیناز اندوتلیال ^{۲۰}	سرطان روده بزرگ
کپسیتابین ^{۲۱}	Xeloda®	۲۰۰۱	آنتی متابولیت	سرطان روده و پستان

¹ Imatinib

² Chronic myeloid leukaemia

³ Gefitinib

⁴ Epidermal growth factor receptor (EGFR)

⁵ Non-small cell lung cancer (NSCLC)

⁶ Erlotinib

⁷ Pancreatic

⁸ Sorafenib

⁹ Vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)

¹⁰ Sunitinib

¹¹ Fms-like tyrosine kinase 2 (FLT3)

¹² Gastrointestinal stromal tumors

¹³ Dasatinib

¹⁴ Lapatinib

¹⁵ Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)

¹⁶ Pazopanib

¹⁷ Vandetanib

¹⁸ Thyroid cancer

¹⁹ Regorafenib

²⁰ Endothelial specific receptor tyrosine kinase 2 (TIE2)

²¹ Capecitabine

ادامه‌ی جدول ۱-۱

سرطان رحم	مهارکننده‌ی رسپتور فاکتور رشد سطح سلولی	۲۰۱۳	Gilotrif®	آفاتینیب ^۱
سرطان ریه سلول غیرکوچک متاستاتیک	گیرنده‌ی فاکتور رشد سلولهای کبدی ^۳	۲۰۱۱	Xalkori®	کریزوتینیب ^۲

۴-۱- روش‌های مختلف تجزیه‌ای برای جداسازی و اندازه‌گیری داروهای آنتی‌نئوپلاست

کاربردهای اندازه‌گیری و سنجش سطح درمانی داروهای آنکولوژی، فرآیندهایی چالش برانگیز و پیچیده هستند. چرا که این مهم، مستلزم نمونه‌برداری از مقادیر بالقوه قابل توجهی از خون، سایر مایعات یا بافت‌های بیولوژیکی بدن، اقدامات احتیاطی قبل از آنالیز، ثبت دقیق داده‌های بالینی، انتقال و حمل نمونه‌های هدف از منابع مختلف به آزمایشگاه با در نظر گرفتن بُعد مسافت و زمان حمل و نقل، آنالیز با استفاده از دستگاه‌های پیچیده و پرهزینه، تحویل نتایج پس از تاخیرات زمانی قابل توجه و غیرقابل اغماض و نیز تفسیر حجم وسیعی از اطلاعات و داده‌های بدست آمده می‌باشد. لذا توسعه‌ی تکنولوژیکی و فناوریانه به سمت کوچک‌سازی آزمایشات غربالگری با بهره‌مندی از رویکردهای روز تجزیه‌ای، ممکن است به‌خوبی نشان دهنده‌ی یک رویکرد آینده‌نگر برای سهولت بخشی و امکان پذیر ساختن مطالعات TDM در مورد بیماری سرطان و داروهای متنوع مورد استفاده در درمان انواع مختلف این بیماری باشد. از این رو، نیاز به توسعه و بروزآوری تکنیک‌های تجزیه‌ای برای آنالیز و اندازه‌گیری داروهای ضدسرطان، از اهمیت قابل توجهی برخوردار است. اولین روش توسعه‌یافته برای آنالیز این ترکیبات سیتوتوکسیک، بر مبنای استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با آشکارساز فرابنفش^۴ (LC-UV) می‌باشد. این روش عملکرد و کارایی رضایت بخشی را برای آنالیز نمونه‌های حاوی غلظت‌های بالایی از ترکیبات دارویی هدف (به-عنوان مثال توسعه‌ی فرمولاسیون دارویی، مطالعات مرتبط با پایداری آنها و غیره) را تاکنون به نمایش گذاشته‌است. این در حالی است که برای کاربرد این روش در مورد نمونه‌های حاوی مقادیر پایینی از این ترکیبات سیتوتوکسیک مانند نمونه‌های محیطی و زیستی، نیاز به مرحله‌ی آماده‌سازی نمونه^۵ که امکان پیش‌تغلیظ ترکیبات مورد اندازه‌گیری را از پیکره‌ی پیچیده‌ی آنها فراهم سازد، اجتناب ناپذیر است [۷، ۳].

¹ Afatinib

² Crizotinib

³ Hepatocyte growth factor receptor

⁴ Liquid chromatography with UV detection

⁵ Sample preparation

آنچه که مسلم است، در حال حاضر در میان تکنیک‌های متنوع تجزیه‌ای، روش سریع و کارآمد کروماتوگرافی مایع تلفیق شده با طیف سنجی جرمی - جرمی^۱ (LC-MS/MS) به منظور اندازه‌گیری غلظت‌های عوامل دارویی خوراکی ضد سرطان در نمونه‌های بیولوژیکی، ترجیح داده می‌شود [۱۹-۲۱]. لذا این روش قدرتمند با کارایی جذاب و بی‌نظیر تجزیه‌ای که ارائه می‌کند، به عنوان اولین انتخاب در آنالیز داروهای شیمی درمانی مطرح می‌باشد. همچنین روشهای مبتنی بر کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) به صورت تلفیق شده با آشکارسازهای مختلفی مانند فرابنفش و یا فلورسانسی^۲ به عنوان تکنیک‌های جایگزین برای کاربردهای اندازه‌گیری کمی این دسته از داروها در آزمایشگاه‌ها و مراکز تحقیقاتی که مجهز به تجهیزات پیچیده و گران قیمت مذکور نیستند، مورد استفاده قرار می‌گیرند [۲۲-۲۴]. در عین حال، روشهای تشخیصی و آشکارسازی دیگری مانند فلوریمتری^۳، آشکارساز پراکندگی نور تبخیری (یا به عبارتی دیگر تبخیر آشکارساز پراکندگی نور)^۴ و تشخیص الکتروشیمیایی^۵ (ECD) برای اندازه‌گیری این دسته از داروها با روشهای کروماتوگرافی مایع تلفیق شده‌اند. علاوه بر این، تکنیکهای قابل اعتماد و مهم تجزیه‌ای دیگری همچون الکتروفورز موئین با آشکارساز فرابنفش (CE-UV)، الکتروفورز موئین تلفیق شده با روشهای تشخیصی و آشکارسازی آمپرومتری^۶ و یا فلورسانسی تهییج شده با لیزر^۷ (CE-LIF)، کروماتوگرافی گازی تلفیق شده با آشکارساز جرمی^۸ (GC-MS)، روش طیف سنجی رامان^۹ و طیف سنجی مادون قرمز^{۱۰} (IR) برای اندازه‌گیری داروهای ضد سرطان گزارش شده و به چاپ رسیده‌اند [۳].

تا به امروز، اکثر روشهای گزارش شده در مورد آنالیز داروهای ضد سرطان به اندازه‌گیری کمی در پیکره‌های بیولوژیکی، مطالعات بنیادی مرتبط با داروهای جدید، سنجش سطح غلظتی و درمانی آنها، مطالعات فارماکوکنتیکی و فارماکودینامیکی و یا زیست‌غیرالگری این ترکیبات در مسائل مواجهه‌ی شغلی و مربوط به متخصصان مراقبتهای بهداشتی و نیز افرادی که به واسطه‌ی موقعیت شغلی در معرض این داروها قرار می‌گیرند، معطوف شده است. برهمکنشهای بین دارو و DNA^{۱۱} نیز یکی از مهمترین جنبه‌های مطالعات بیولوژیکی در کشف و فرآیندهای توسعه‌ی این نوع داروها می‌باشد. روشهای مختلف بکارگرفته شده برای مطالعه‌ی برهمکنشهای دارو-DNA دربرگیرنده‌ی تکنیک‌های مهمی چون رزونانس

¹ Liquid chromatography tandem-mass spectrometry

² Fluorescence

³ Fluorimetry

⁴ Evaporative light scattering detector (ELSD)

⁵ Electrochemical detection (ECD)

⁶ Amperometric detection

⁷ Laser-induced fluorescence

⁸ Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

⁹ Raman spectroscopy

¹⁰ Infrared spectrometry (IR)

¹¹ Deoxyribonucleic acid

مغناطیسی هسته (NMR)، طیف‌سنجی جرمی، رامان و طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR)، مدل سازی مولکولی^۱ و الکتروفورز موئن می‌باشد [۲۵]. علاوه بر این، روشهای الکتروشیمیایی نیز توانسته‌اند دیدگاه جدیدی را نسبت به تولید و طراحی دارو فراهم کنند و موجبات درک بیشتر و مناسبتری از مکانیسم برهمکنشهای بین داروهای ضد سرطان و DNA را فراهم سازند [۲۵]. در حالت کلی می‌توان نتیجه‌گیری کرد که ضرورت به‌روزرسانی و تمرکز بر روی مطالعات فارماکوکنتیکی و فارماکودینامیکی، عمده‌ترین دلیل توسعه‌ی روشهای تجزیه‌ای برای اندازه‌گیری عوامل دارویی سیتوتوکسیک در نمونه‌های بیولوژیکی مانند ادرار، سرم، پلاسما، بافت و پیکره‌های درون سلولی می‌باشد [۲۶].

اندازه‌گیری این گروههای دارویی در چنین پیکره‌هایی با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع، علی-رغم نتایج قابل قبول و منطقی و همچنین حجم گسترده‌ی تحقیقاتی که با استفاده از این روش به چاپ رسیده‌اند، با چالشها و محدودیتهایی چون نیاز به فازهای ساکن نسبتاً گران و نیز مصرف مقادیر زیادی از حلالهای آلی پرخطر همراه است. از طرفی دیگر، تکنیک‌های پیشرفته، قدرتمند، حساس و دقیقی چون LC-MS و LC-MS/MS نیز که به صورت قابل توجهی به منظور آنالیز داروهای ضدسرطان در نمونه‌های مختلف محیطی و بیولوژیکی مورد استفاده قرار گرفته‌اند، تا اندازه‌ای پیچیده بوده و با وجود داشتن مزایا و ویژگی‌های منحصر بفرد در کاربردهای تجزیه‌ای، دستگاههایی بسیار هزینه‌بر و نسبتاً پیچیده‌ای می‌باشند که در اغلب اوقات در بسیاری از آزمایشگاه‌های تحقیقاتی قابل تهیه و دردسترس نیستند و کارایی بی‌نظیر آنها گاهاً به واسطه‌ی نیاز به مراحل و آزمایشات سخت و نیز زمان بر بودن روشهای آماده‌سازی نمونه، در کاربردهای متداول محدود می‌گردد.

در میان روشهای مبتنی بر تئوری کروماتوگرافی، الکتروفورز موئن به عنوان یک تکنیک قدرتمند و کم هزینه، برای اهداف جداسازی انتخابی و اندازه‌گیری کمی بسیاری از ترکیبات دارویی پذیرفته شده است. یکی از ویژگی‌های مهم و منحصر بفرد این روش، تطبیق پذیری آن در حالات مختلف جداسازی تجزیه‌ای می‌باشد که امکان جداسازی و اندازه‌گیری گسترده‌ی وسیعی از آنالیت‌ها از ماکرومولکولها^۲ گرفته تا یونهای کوچک را در طیف گسترده‌ای از کاربردهای متنوع مانند صنایع غذایی، محصولات دارویی، سیستم‌های کایرال^۳ و غیره فراهم کرده است. در مقایسه با سایر روشهای کروماتوگرافی مانند HPLC و GC، تکنیک الکتروفورز موئن در زمینه‌ی آنالیز دارو، از مزایایی دیگر مانند انعطاف پذیری به واسطه‌ی استفاده از راهبردهای مختلف برای آنالیز ترکیبات دارویی در نمونه‌های بیولوژیکی، تطبیق-پذیری و شرایط جداسازی سهل‌تر، قدرت تفکیک بالاتر، کارایی جداسازی مطلوب‌تر، امکان دسترسی و

¹ Molecular modelling

² Macromolecules

³ Chiral

استفاده از روشهای پیش تغلیط آنالین^۱ و مصرف حداقلی از حلالها و واکنشگرهای شیمیایی پرخطر، برخوردار است [۲۷]. در عین حال در مقایسه با سایر روشهای کروماتوگرافی، سادگی دستگاهوری، مقرون به صرفه بودن، امکان کاربرد افزودنی‌های مختلف به الکترولیت زمینه^۲ (BGE)، حساسیت، تکرارپذیری و انتخاب‌پذیری مطلوب و نیز سرعت بالای مهاجرت ترکیبات مورد آنالیز و در نتیجه زمانهای پایین آنالیز را می‌توان از دیگر مزایای این روش در شاخه‌های آنالیز و اندازه‌گیری کمی ترکیبات دارویی برشمرد [۲۸]. در ادامه، اصول اولیه و دستگاهوری و همچنین انواع مدل‌های الکتروفورتیکی مورد بحث قرار می‌گیرند.

۱-۵- الکتروفورز موئن: تاریخچه و اصول اولیه

الکتروفورز موئن شاخه‌ای تجزیه‌ای است که تمامی زمینه‌های آن مشتمل بر تئوری، مدل‌های جداسازی، دستگاهوری و کاربردهای متنوع، هنوز هم به عنوان بخشی فعال در سیستمهای تجزیه‌ای مطرح می‌باشد و رشد و توسعه‌ی فناوری آن ادامه دارد. تمامی مدل‌های مبتنی بر روش الکتروفورز موئن کاربردها و قابلیت اجرای خوبی در بسیاری از شاخه‌های علوم از جمله بیوشیمی، زیست پزشکی، مسائل مرتبط با پزشکی قانونی^۳ و علوم دارویی را دارا می‌باشند. این روش به عنوان جایگزین مناسب و یا روش مکمل برای کروماتوگرافی مایع در سیستم‌های مبتنی بر آنالیز دارو شناخته می‌شود و به دلیل کارایی مطلوب، سرعت بالای آنالیز، کاهش مصرف نمونه و واکنشگرها و همچنین هزینه‌ی مناسب‌تر، برای آنالیز پروتئین بسیاری از ترکیبات مختلف از پروتئین‌های سِرِم^۴ گرفته تا نشانگذار^۵های بیماری‌های مختلف در بسیاری از کلینیکها و مراکز تشخیصی، درمانی و پژوهشی مورد استفاده قرار می‌گیرد. الکتروفورز اولین بار توسط تیسلیوس^۶ [۲۹] در سال ۱۹۳۷ معرفی شده است که در پروژه‌ی تحقیقاتی وی، جداسازی پروتئین‌های پلاسمای خون (آلبومین^۷ آلفا و بتا و همچنین ۷- گلوبولین^۸) توسط این روش شرح داده شده است. این تحقیق پیشگامانه جایزه‌ی نوبل را در سال ۱۹۴۸ از آن خود کرده است. پس از آن، پیشرفتهای بسیاری در تئوری الکتروفورز مانند الکتروفورز ژلی^۹ و کاغذی^{۱۰} [۳۰] به چاپ رسیده‌اند. در تحقیقی که در سال ۱۹۶۷ انجام شده است، هِجرتن^{۱۱} نشان داد که انجام یک جداسازی الکتروفورتیکی در یک لوله‌ی شیشه‌ای ۳۰۰ میکرومتری به منظور شناسایی برخی از ترکیبات توسط جذب فرابنفش

¹ On-line preconcentration approaches

² Back ground electrolyte

³ Forensic

⁴ Serum proteins

⁵ Markers

⁶ Tiselius

⁷ Albumin

⁸ Globulin

⁹ Gel electrophoresis

¹⁰ Paper electrophoresis

¹¹ Hejerten

امکان پذیر است که این روش تحت عنوان الکتروفورز موئین ناحیه‌ای آزاد^۱ نام گرفت. گرچه پژوهشگران دیگری روش الکتروفورز را در شیشه، تفلون و برخی از سیستم‌های لوله‌ای بکار گرفته بودند، ولی انجام الکتروفورز در یک لوله تا سال ۱۹۸۱، هنگامی که جورگنسون^۲ و لوکاج^۳ [۳۱] نتایج تحقیق خود که در آن قدرت بالای روش الکتروفورز موئین ناحیه‌ای^۴ نشان داده شده است را به چاپ رسانیدند، شناخته شده و محبوب نبود. آنها در پژوهش خود از یک لوله‌ی موئین توخالی از جنس سیلیکای گداخته^۵ با قطر داخلی باریک (کمتر از ۱۰۰ میکرومتر) و ولتاژ ۳۰ کیلوولت و آشکارساز UV برای جداسازی گونه‌های یونی استفاده کردند و همچنین توضیحات مختصری در مورد جنبه‌های تئوریک الکتروفورز موئین را ارائه کرده و نشان دادند که الکترواسمز^۶ نقش بسیار مهمی در اندازه‌گیری تحرک^۷ گونه‌های یونی برعهده دارد که هر دو پارامتر زمان آنالیز و قدرت تفکیک را تحت تاثیر قرار می‌دهد. در سال ۱۹۸۴ تیراب^۸ و همکارانش [۳۲]، روش کروماتوگرافی الکتروکنتیک مایسلی^۹ (MEKC) را برای جداسازی ترکیبات خنثی توسط اضافه کردن یک مایسل (سدیم دودسیل سولفات^{۱۰}) به بافر جداسازی معرفی کردند. در اواخر سال ۱۹۸۸ اولین دستگاه تجاری الکتروفورز موئین به بازار عرضه شد و پس از آن بسیاری از کاربردهای پیشرفته‌ی این تکنیک ارزشمند رقم خورده است.

۱-۵-۱- مکانیسم جداسازی در الکتروفورز موئین

در روش الکتروفورز موئین، فرآیند جداسازی توسط دو فاکتور اساسی صورت می‌پذیرد؛ اولین فاکتور، حرکت گونه‌ی حل شده، تحت تاثیر یک میدان الکتریکی در داخل لوله موئین می‌باشد که عمدتاً سرعت الکتروفورتیکی^{۱۱} نامیده می‌شود. دومین عامل، جریان ایجاد شده توسط یک محلول بافری به دلیل سطح باردار دیواره‌ی لوله‌ی موئین می‌باشد که جریان الکترواسموتیک^{۱۲} (EOF) نامیده می‌شود. شرح دقیق این جنبه‌های نظری در مرجع [۳۱] ارائه شده است. حرکت یک گونه‌ی باردار از طریق یک محلول هادی به سمت و یا به دور از یک الکترود، به تحرک آن گونه و شدت میدان الکتریکی اعمالی بستگی دارد. این حرکت سرعت الکتروفورتیکی نامیده می‌شود و توسط رابطه‌ی زیر بیان می‌گردد:

$$V_{EP} = \mu_{EP} \cdot E \quad \text{رابطه‌ی (۱-۱)}$$

^۱ Free zone electrophoresis

^۲ Jorgenson

^۳ Lukacs

^۴ Capillary zone electrophoresis (CZE)

^۵ Fused silica capillary

^۶ Electroosmosis

^۷ Mobility

^۸ Terabe

^۹ Micellar electrokinetic chromatography (MEKC)

^{۱۰} Sodium dodecyl sulfate

^{۱۱} Electrophoretic velocity

^{۱۲} Electroosmotic flow

که در آن، μ_{EP} تحرک الکتروفورتیک (عکس العمل اجزای باردار نمونه‌ی حل شده در بافر به میدان الکتریکی) و E شدت میدان الکتریکی می‌باشد که حاصل تقسیم ولتاژ اعمالی به طول ستون است. تحرک الکتروفورتیک خود به ویژگی‌های گونه‌ی تحت آنالیز و بافر جداسازی وابسته بوده و بر اساس رابطه زیر بیان می‌گردد:

$$\mu_{EP} = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad \text{رابطه‌ی (۱-۲)}$$

که در این معادله، q بیانگر بار الکتریکی روی یون، η گرانیوی^۱ محیط استفاده شده برای الکتروفورز (بافر) و r شعاع گونه‌ی حل شونده (یون) می‌باشد. از این رابطه اینگونه استنتاج می‌شود که ترتیب حرکت و شستشوی کاتیونها و آنیونها بر مبنای نسبت بار به جرم آنهاست. بنابراین گونه‌های کاتیونی با بزرگترین نسبت بار به اندازه، بیشترین تحرک خالص را داشته و اولین جزئی هستند که تحت تاثیر جریان الکتروفورتیک از ستون خارج می‌شوند. این در حالی است که در مورد آنیونها بر خلاف کاتیونها، گونه‌های با بزرگترین نسبت بار به اندازه به دلیل تمایل بیشتر به الکتروند، دارای طولانی‌ترین زمان جداسازی بوده و در نهایت مواد خنثی و بدون بار تحت تاثیر جریان الکترواسموتیک به صورت یک پیک واحد نمایان می‌گردند.

جریان الکترواسموتیک [۳۳] دومین عاملی است که جابجایی و حرکت آنالیت‌ها را در درون ستون تحت تاثیر قرار می‌دهد. به مجرد اعمال میدان الکتریکی، بارهای سطحی دیواره‌ی داخلی لوله‌ی موئین سبب ایجاد یک لایه‌ی دوگانه می‌گردند. در یک لوله‌ی موئین از جنس سیلیکای گداخته، گروه‌های سیلانول سطحی (Si-OH) در pHهای بالاتر از ۳ به گروه‌های سیلانات با بار منفی (Si-O⁻) یونیزه می‌شوند. این گروه‌های با بار منفی، گونه‌های با بار مثبت را از محلول بافر به سمت خود جذب می‌کنند که سبب شکل گرفتن یک لایه‌ی درونی از کاتیونها در دیواره‌ی لوله‌ی موئین می‌شوند. ولی از آنجاییکه این کاتیونها دارای دانسیته‌ی بار کافی برای خنثی کردن تمامی بارهای منفی نمی‌باشند، بنابراین مجدداً لایه‌ی بیرونی کاتیونها تشکیل می‌شوند. در حالی که لایه‌ی درونی توسط گروه‌های Si-O⁻ به شدت نگهداری شده و ثابت می‌مانند، لایه‌ی بیرونی کاتیونها به میزان کافی نگهداری نمی‌شود؛ فلذا تحت تاثیر یک میدان الکتریکی، کاتیونهای لایه‌ی بیرونی به سمت الکتروند منفی (کاتد) کشیده شده و از آنجاییکه این کاتیونها سولواته شده^۲ هستند، محلول بافر را به همراه خود جابجا کرده و می‌کشند و سبب ایجاد جریان الکترواسموتیک می‌گردند. نحوه‌ی شماتیک ایجاد این جریان در شکل ۱-۱ نمایش داده شده است. سرعت جریان الکترواسموتیک به ترتیب از روابط زیر بدست می‌آید:

$$V_{EOF} = \frac{\varepsilon\zeta E}{4\pi\eta} \quad \text{معادله‌ی (۱-۳)}$$

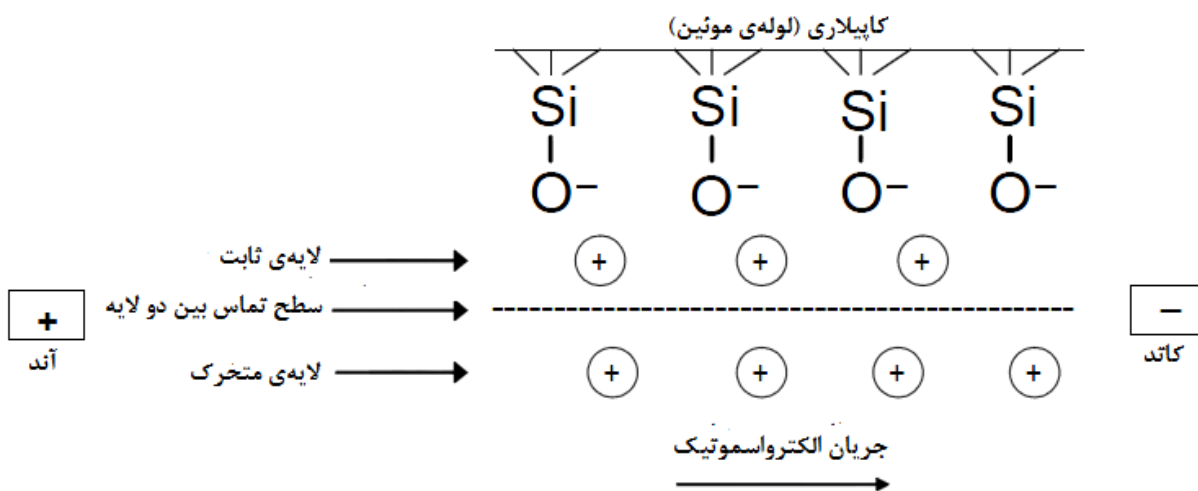
^۱ Viscosity

^۲ Solvated

$$\mu_{EOF} = \frac{\varepsilon \zeta}{4\pi\eta} \quad \text{معادله‌ی (۴-۱)}$$

که در این رابطه، به ترتیب ε ثابت دی الکتریک محلول بافر، ζ پتانسیل زتا^۱ ناشی از سطح لوله‌ی موئین و η گرانیوی بافر می‌باشند [۳۰، ۳۴]. تحرک تام^۲ ماده‌ی تحت آنالیز، از مجموع تحرکات الکتروفورتیک و الکترواسموتیک بدست می‌آید:

$$\mu_a = \mu_{EP} + \mu_{EOF} \quad \text{معادله‌ی (۵-۱)}$$



شکل ۱-۱- نحوه‌ی ایجاد جریان الکترواسموتیک در ستون موئین؛ کاتیونهای الکترولیت به سمت دیواره‌ی لوله‌ی موئین جذب می‌شوند و تشکیل یک لایه‌ی دوگانه‌ی الکتریکی را می‌دهند. هنگامی که ولتاژ اعمال می‌شود، حرکت و جابجایی خالص محلول الکترولیت به سمت کاتد، جریان الکترواسموتیک را به جود می‌آورد. گروه‌های سیلانولی اسیدی بار منفی را در سطح داخلی دیواره برقرار می‌کنند و در نتیجه یونهای مخالف به سمت کاتد مهاجرت کرده و حلال را با خود می‌کشانند [۳۳].

۱-۵-۲- الکتروفورز موئین ناحیه ای (CZE): اصول اساسی و دستگاهوری

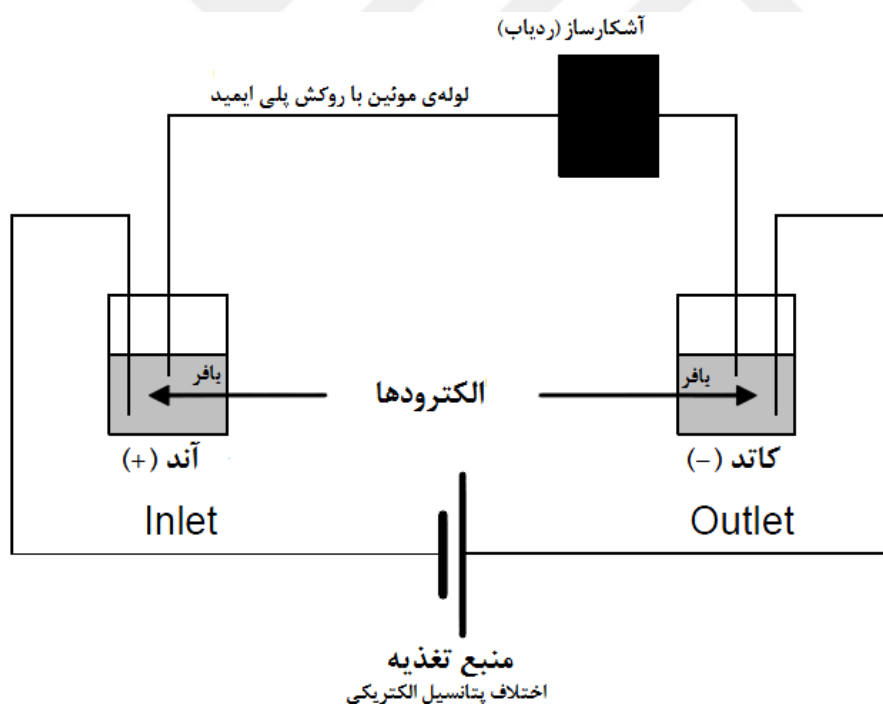
همان طوری که قبلاً اشاره شد، الکتروفورز موئین ناحیه‌ای (CZE) متداول‌ترین مدل الکتروفورز و در عین حال پرکاربردترین نسخه‌ی آن می‌باشد که در این رساله مورد استفاده قرار گرفته است. این تکنیک از سال ۱۹۸۰ توسعه یافته و مکانیسم جداسازی آن بر اساس تفاوت در نسبت‌های بار به اندازه و در نتیجه تفاوت در تحرکات الکتروفورتیکی ترکیبات مورد آنالیز می‌باشد. در CZE، جداسازی عموماً توسط مهاجرت افتراقی^۳ آنالیت‌ها، به محض برقراری جریان درون لوله‌ی موئین انجام می‌پذیرد. شکل ۱-۲ شمای یک دستگاه الکتروفورز موئین را به تصویر می‌کشد. این دستگاه مشتمل بر یک لوله‌ی موئین

¹ Zeta potential

² Version

³ Differential migration

سیلیکایی (معمولاً با قطر داخلی بین ۲۵ تا ۱۰۰ میکرومتر) در حالی که دو انتهای آن در محلولهای بافری (الکترولیت زمینه) غوطه‌ور شده است، می‌باشد. الکترودها در هر دو ویال^۱ محتوی بافرها قرار گرفته و از طریق یک منبع تغذیه ولتاژ بالا به دو انتهای لوله‌ی موئین متصل شده و اختلاف پتانسل الکتریکی را در هر دو انتهای لوله‌ی موئین اعمال می‌کنند. در آنالیزهای متداول و روتین، نمونه از سمت آندی (مثبت) به داخل ستون بارگذاری (تزریق) می‌شود و آنالیتها در اثر ولتاژ اعمالی، به سمت الکتروده منفی (کاتد) که آشکارساز در آن سمت قرار گرفته است، مهاجرت می‌کنند. تزریق معمولاً به صورت خودکار بوده و با اعمال فشار توسط گاز بر روی ویال حاوی نمونه صورت می‌گیرد. پس از برداشت نمونه به داخل ستون، لوله‌ی موئین به ویال حاوی بافر منتقل می‌شود و سرعت جریان بافر در لوله در مقادیر نانولیتتر در دقیقه می‌باشد. در انتهای مربوط به ردیاب، لوله‌ی موئین دارای پنجره‌ای است که روکش آن برداشته (سوزانده) شده و بنابراین در مقابل تشعشعات بکار رفته برای آشکارسازی نمونه‌ها، شفاف می‌باشد. منبع تغذیه عموماً توانایی اعمال ولتاژ تا ۳۰ کیلو ولت را دارا می‌باشد.



شکل ۱-۲- شمای کلی دستگاه الکتروفورز موئین.

¹ Vial

۱-۵-۳- روشهای آشکارسازی در الکتروفورز موئین

تاکنون ردیاب‌های مختلفی برای CE پیشنهاد شده‌اند، ولی فقط تعداد محدودی از آنها بصورت تجاری^۱ در دسترس می‌باشند. استانداردترین و متداولترین سیستم ردیابی و آشکارساز نصب شده روی دستگاههای تجاری الکتروفورز موئین، دتکتور جذب/طیف سنجی UV-Vis و از طریق ردیابی در یک طول موج منفرد، چندین طول موج و یا گستره‌ی وسیعی از طول موجهای مختلف با استفاده از آشکار-ساز آرایه دیودی^۲ می‌باشد. در چنین سیستمهایی، نور روی یک پنجره‌ی تعبیه شده در لوله‌ی موئین متمرکز می‌شود و از آنجائیکه حساسیت این روش از قانون بیر-لامبرت^۳ تبعیت می‌کند، بنابراین قطر در حد میکرومتری لوله‌ی موئین به دلیل مسیر بسیار کوتاه عبور نور، سبب حساسیت پایین این روش می‌گردد. لذا یکی از محدودیتهای مهم در اندازه‌گیری کمی ترکیبات دارویی توسط این روش، مربوط به حدتشخیص ضعیف علی‌الخصوص در مورد کاربرد در نمونه‌های بیولوژیکی می‌باشد که عمدتاً به دلیل یادشده (طول سل کوچک: بین ۵۰ تا ۱۰۰ میکرومتر) و نیز مقادیر بسیار کم از نمونه‌ی تزریق شده به داخل ستون (در مقایسه با سایر روشهای کروماتوگرافی مانند HPLC)، رقم می‌خورد [۳۵].

به منظور غلبه بر این محدودیتهای، برخی از راهبردهای کلیدی مانند استفاده از روشهای پیش‌تغلیظ^۴ آفلاین/آنلاین^۵ (خارج ستونی و داخل ستونی) و یا جایگزینی ردیاب UV با آشکارسازهای حساس‌تر و قدرتمندتر ظهور کرده‌اند. استفاده از آشکارسازهای با حساسیت بالا مانند طیف سنجی جرمی (MS) [۳۶]، فلورسانسی تهییج لیزری (LIF) [۳۷]، کمی لومینسانس^۶ [۳۸] و دتکتور الکتروشیمیایی (ED) [۳۹] نیز معایب خاص خود را دارند. به عنوان مثال، بسیاری از ترکیبات در حالت طبیعی فاقد گروموفور^۷ فلورسانس بوده و همچنین مراحل زمان‌بر مشتق‌سازی نمونه، برای اندازه‌گیری چنین ترکیباتی با آشکارساز LIF اجتناب‌ناپذیر است. افزون بر این، علی‌رغم حساسیت بالای این نوع ردیابها، بازهم نیاز به مراحل پیش‌ تیمار^۸ و آماده‌سازی نمونه بویژه در مورد نمونه‌های بیولوژیکی وجود دارد. در سالهای گذشته پیشرفتهای بسیاری در جهت آنالیز در حد آثار ترکیبات دارویی و بسیاری دیگر از ترکیبات آلی با استفاده از تکنیک الکتروفورز موئین صورت گرفته است. بخش عمده‌ی این پیشرفتهای به توسعه‌ی دستگاهوری اختصاص دارد. علی‌رغم این پیشرفتهای، آنالیز مستقیم نمونه‌ها به علت رقت، پیچیدگی و ناسازگاری نمونه‌ها با سیستمهای تجزیه‌ای امکانپذیر نبوده است و نیاز به یک مرحله‌ی آماده‌سازی نمونه احساس می‌شود.

¹ Commercial

² Photo diod array detector

³ Beer-Lambert Law

⁴ Preconcentration

⁵ Off-line/online

⁶ Chemiluminescence

⁷ Chromophore

⁸ Sample pretreatment

مشهود است که اکثر دستگاه‌های تجزیه‌ای قابلیت آنالیز پیکره‌های پیچیده‌ی برخی از ترکیبات (به ویژه نمونه‌های زیستی) را دارا نیستند و از این جهت، یک روش پیش‌تیمار برای حذف مزاحمت‌ها و ترکیبات ناخواسته‌ی احتمالی بسیار مفید و کاربردی است. لذا مرحله‌ی آماده‌سازی نمونه، جهت استخراج، جداسازی و تغلیظ آنالیت‌های هدف از ماتریکس پیچیده‌ی آنها مورد نیاز می‌باشد [۴۰]. این مرحله بایستی سریع، سازگار با دستگاه تجزیه‌ای انتخابی، منطبق بر اصول قابلیت انجام آسان و نیز همراه با مصرف حداقلی از حلال‌های آلی باشد. حذف مزاحمت‌ها و در عین حال رساندن آنالیت‌های هدف به مقادیر غلظتی قابل تشخیص قبل از انجام آنالیز، مهمترین ضروریات انجام مرحله‌ی آماده‌سازی و پیش‌تیمار نمونه می‌باشند. پیش‌تغلیظ خارج از ستون کپیلاری (موئین) و نیز انجام روش افزایش حساسیت آنالین^۱ (درون ستونی)، دو استراتژی کاربردی و عملی به منظور پیش‌تغلیظ نمونه‌ها در روش‌های اندازه‌گیری و جداسازی مبتنی بر الکتروفورز موئین می‌باشند که در ادامه اصول اساسی و کاربردهای آنها مورد بحث قرار می‌گیرد.

۱-۶- روش‌های آماده‌سازی نمونه: خارج ستونی (Off-line)

استخراج آنالیت مورد نظر از پیکره‌ی آن، نقش بسزایی را در موفقیت یک روش تجزیه‌ای پیشنهادی، به ویژه در حالت کاربرد در نمونه‌های زیستی به همراه دارد. روش‌های پیش‌تغلیظ off-line عمدتاً در خارج از دستگاه تجزیه‌ای انجام می‌گیرند و در میان آنها، دو تکنیک اصلی استخراج مایع-مایع^۲ (LLE) و استخراج فاز جامد^۳ (SPE) متداول‌ترین و مرسوم‌ترین آنها شناخته می‌شوند. اگرچه این روش‌ها رویکردهایی کارآمد می‌باشند، ولی تا اندازه‌ای پیچیده و خسته‌کننده بوده و کاربرد آنها مستلزم صرف وقت و هزینه‌ی گزاف و نیز استفاده از حجم زیادی از حلال‌های با درجه‌ی خلوص بالا و سمی می‌باشد [۴۱، ۴۲]. این تکنیک‌ها تکرارپذیری خوب و ظرفیت نمونه‌ی بالایی دارند ولی عمدتاً کاربرد آنها مخاطراتی را به همراه دارد. به عنوان مثال، اتلاف مقادیری از آنالیت و حتی آلودگی آن در کارتریج‌های SPE روی می‌دهد و سبب ایجاد منابع خطا در نتایج کمی آنالیز می‌گردد. در عین حال، کاربرد مقادیر زیادی از حلال‌های استخراجی در روش LLE، سبب تغییر نسبی در قطبیت محلول نمونه‌های آبی شده و امکان انحلال پذیری آنالیت‌های چربی دوست^۴ در فاز آبی را افزایش می‌دهد. به علاوه مشکلات جداسازی فاز استخراج کننده و همچنین امکان تشکیل امولسیون^۵ و عدم امکان خودکارسازی، محدودیت‌های قابل توجهی در مسیر استفاده از آنها به عنوان روش‌های تجزیه‌ای محسوب می‌شود. مشکلات مطرح شده،

^۱ On-line sample enhancing methods

^۲ Liquid-liquid extraction

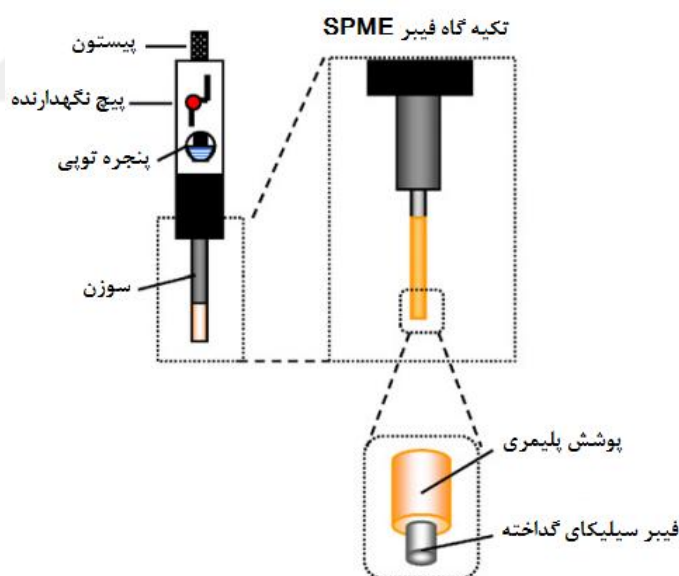
^۳ Solid-phase extraction

^۴ Cartridge

^۵ Lipophilic analytes

^۶ Emulsion

ضرورت توسعه، اصلاح، کوچک سازی^۱ و طراحی روش‌هایی با سرعت بالا، حداقل تلفات نمونه‌ای و حجم کم حلال مصرفی را پررنگتر ساخته و تلاش‌های قابل توجهی در این ارتباط صورت گرفته است. پیشرفت‌های اخیر، دو روش ریزاستخراج^۲ ساده‌تر، کم هزینه، موثر و کارا به نام های ریزاستخراج فاز جامد^۳ (SPME) و ریزاستخراج فاز مایع^۴ (LPME) را ارائه نموده است. روش SPME برای اولین بار در سال ۱۹۹۰ توسط آرتور و پاولیزین^۵ به عنوان یک روش استخراجی عاری از حلال ارائه گردید [۴۳]. در این روش که نیاز به استفاده از حجم‌های بالایی از حلال‌های آلی را کاهش داده است، آنالیت‌ها عموماً بر روی یک فیبر که مناسب و سازگار با پیکره‌هایی پیچیده مانند پلاسما می باشد، جذب می‌شوند و معمول‌ترین شیوه‌ی اجرایی آن، ریزاستخراج با فاز جامد است که از فیبرهای سیلیکای گداخته و یا فلزی پوشش یافته با یک فاز ساکن مناسب استفاده می‌کند. فاز استخراج کننده در این روش عمدتاً پلیمری است که بر روی تکیه گاه جامد (فیبر) قرار گرفته، به طور مستقیم^۶ وارد محلول آزمایشی شده و یا در معرض فضای فوقانی^۷ نمونه قرار داده می‌شود. پس از مدت زمان معین، تعادل غلظتی آنالیت‌ها بین نمونه و فاز استخراج کننده بوجود می‌آید. سپس آنالیت‌ها به نحو مقتضی از فاز استخراج کننده و جذب شده و وارد دستگاه‌های تجزیه‌ای می‌گردند. شکل ۱-۳ ساختار و ویژگیهای یک سرنگ و فیبر ریز-استخراج فاز جامد را نشان می‌دهد.



شکل ۱-۳- ساختار سرنگ و فیبر ریزاستخراج فاز جامد.

¹ Miniaturization

² Microextraction

³ Solid phase microextraction (SPME)

⁴ Liquid phase microextraction (LPME)

⁵ Arthur and Pawliszyn

⁶ Direct immersion SPME

⁷ Headspace SPME (HS-SPME)

کارایی روش استخراج به ثابت توزیع آنالیت بین فاز استخراج کننده، بافت نمونه و به نوع فاز استخراج کننده بستگی دارد. مقدار آنالیت استخراج شده در شرایط تعادلی با استفاده از اصول ترمودینامیکی می-تواند محاسبه شود، در حالی که زمان استخراج را می-توان با حل معادلات دیفرانسیلی توصیف کننده شرایط انتقال جرم در سیستم، تخمین زد.

هر دو فرمت توسعه داده شده برای این روش، توانایی تلفیق با تکنیک الکتروفورز موئن را دارا می-باشند. در روش غوطه ورسازی مستقیم، آسیب پذیری فیبرهای مورد استفاده کاهش می-یابد و در حالت کلی بیش از ۱۰۰ نمونه را می-توان توسط یک فیبر اندازه-گیری نمود [۴۴]. این در حالی است که سِوای کاربری آسان و قابلیت اجرای مطلوب در مورد نمونه‌های زیستی که جزو محاسن این روش محسوب می-شوند، گرانبها و شکننده بودن فیبرهای تجاری، عدم پایداری فیبرهای تهیه‌ای، عدم تکرارپذیری در برخی از موارد به دلیل مستهلک شدن فیبرها و نیز گرفتگی و مسدود شدن خلل و فرج فیبرهای کارتریجی را، می-توان از معایب عمده‌ی این تکنیک برشمرد.

همچنین به منظور به حداقل رساندن استفاده از حلالهای آلی در روشهای مبتنی بر استخراج مایع-مایع، مینیاتوریزه^۱ کردن (کوچک‌سازی) تکنیک LLE در سال ۱۹۹۶ صورت پذیرفت [۴۵]. ریزاستخراج فاز مایع، همانطوری که از نامش بر می-آید، در مقایسه با روشهای سنتی، صرفاً حجمهای میکرولیتری از حلالهای آلی را مصرف می-کند. تئوری پایه‌ی این روش بر مبنای استخراج آنالیت‌ها از فاز آبی به درون مقادیر ناچیزی از فاز آلی می-باشد. بنابراین در مقام مقایسه با LLE و SPE، حصول شرایط تعادلی استخراج، با این روش در مدت زمان کوتاهی اتفاق می-افتد. از آنجایی که آنالیت‌ها در حجمهای کمی از فاز پذیرنده^۲ جمع‌آوری و استخراج می-شوند، فاکتور غنی‌سازی^۳ عمدتاً بالاست و همچنین با تبخیر حلال استخراجی و بازحل کردن^۴ آنالیت باقیمانده در مقادیر کمتری از یک حامل^۵ مناسب، امکان دستیابی به فاکتورهای تغلیظ بالاتر دور از ذهن نیست. در مورد پیکره‌های پیچیده‌ای مانند نمونه‌های زیستی، فاکتور تغلیظ شدیداً با بازیابی^۶ آنالیت هدف متناسب بوده و به عبارت دیگر، موفقیت تغلیظ به توانایی پاکسازی (clean-up) روش آماده‌سازی نمونه بستگی دارد.

¹ Miniaturization

² Acceptor phase

³ Enrichment factor

⁴ Re-generation

⁵ Carrier

⁶ Recovery

۱-۶-۱- سیر تکاملی روش‌های استخراج، پیش‌تغلیظ و آماده‌سازی نمونه

همانطوری که اشاره شد، کوچک سازی و بهبود استخراج مایع- مایع چالشی بود که از سال ۱۹۹۵ توسط محققین متعدد بر عهده گرفته شد تا این که لیو و داسگوپتا^۱ [۴۶] اولین سیستم آنالیز بر پایه‌ی قطره را ارائه نمودند. با در نظر گرفتن فرآیند طبیعی جذب گازهای اتمسفری محلول، یک قطره‌ی موجود در انتهای یک لوله موئین به عنوان جمع‌کننده‌ی آمونیاک و گوگرد دی اکسید موجود در نمونه‌های گازی مورد استفاده قرار گرفت. به منظور بهبود استخراج آنالیتها، کاردوسو^۲ و داسگوپتا [۴۷] پیشنهاد کردند تا فازهای استخراجی را به جای قطره‌های کروی، به صورت لایه‌های مایعی شکل دهند تا بدین وسیله سطح تماس بیشتری را ایجاد نمایند.

۱-۶-۱-۱- روش‌های ریزاستخراج بر اساس قطره‌ی آویزان

در سال ۱۹۹۶، جیانان و کانتول^۳ [۴۸] سیستم تجزیه‌ای کوچک شده‌ی دیگری را ارائه نمودند که در آن، یک ریز قطره‌ی هشت میکرولیتری از حلال آلی، از انتهای یک میله‌ی تفلونی که مستقیماً در یک نمونه‌ی آبی در حال هم زدن فرو برده شده بود، آویزان گردیده بود. پس از اتمام فرآیند ریزاستخراج برای مدت زمان مشخص، میله‌ی تفلونی از نمونه آبی بیرون آورده شده و مقدار مشخصی از قطره‌ی آلی تغلیظ (غنی) شده به کمک یک ریزسرنگ کشیده شده و جهت تعیین و اندازه‌گیری آنالیت‌های مربوطه به دستگاه کروماتوگرافی گازی تزریق می‌شد. یکی از معایب روش مذکور، انجام جداگانه‌ی مراحل استخراج و تزریق بود. یک راه حل برای رفع این مشکل، استفاده از یک ریز سرنگ برای انجام دادن فرآیند استخراج بود که دستکاری‌های پیش از تزریق نمونه را به حداقل می‌رسانید. این روش تحت عنوان ریز استخراج با تک قطره^۴ (SDME) نامیده شد. به دلیل سادگی، تکرارپذیری بالا و هزینه‌ی پایین، این روش به عنوان یکی از موفق‌ترین روش‌های ریز استخراج ظاهر گردیده و در دو دهه‌ی گذشته صدها کاربرد جهت تعیین تعداد زیادی از آنالیت‌های مختلف با دستگاه‌های متنوع تجزیه‌ای، توسط بهره‌گیری از این روش گزارش شده است. شیوه‌های مختلفی از SDME جهت تعیین و اندازه‌گیری انواع مختلفی از آنالیتها و کاهش مزاحمت‌های احتمالی و انجام یک تمیزسازی بهتر نمونه در پیکره‌های پیچیده توسعه یافته است (شکل ۱-۴). در شیوه‌ی ریز استخراج با تک قطره‌ی مستقیم (شکل ۱-۴-الف)، یک تک قطره از فاز استخراج کننده‌ی غیر قابل اختلاط با آب که از نوک سوزن یک ریزسرنگ آویزان شده است، مستقیماً داخل نمونه- ی آبی فرو برده می‌شود. کاربرد این شیوه به طور عادی به آنالیت‌های با قطبیت متوسط و غیرقطبی محدود می‌گردد. یکی از معایب عمده‌ی ریزاستخراج با تک قطره‌ی مستقیم، ناپایداری قطره در سرعت‌های چرخش بالا است. در حالی که سرعت‌های چرخش بالاتر، باعث افزایش کارایی استخراج به علت در معرض

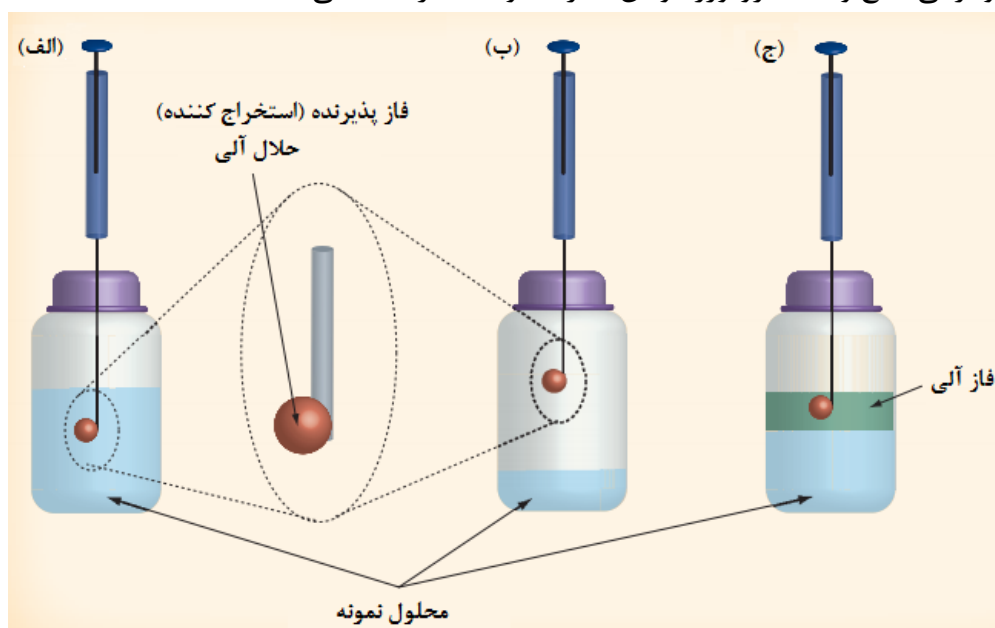
¹ Liu and Dasgupta

² Cardoso

³ Jeannot and Cantwell

⁴ Single-drop microextraction

قرارگیری پیوسته‌ی سطح استخراج با نمونه‌ی آبی تازه‌تر و در عین حال کاهش ضخامت لایه‌ی استاتیک می‌گردد. در سال 1999، ما^۱ و کانتول [۴۹] آرایش بهبود یافته‌ای از یک سیستم سه فاز را برای آنالیت‌های یونیزه شونده توسعه دادند که در آن آنالیت در فاز دهنده (محلول نمونه)، با تنظیم pH غیریونی شده و به فاز حلال آلی استخراج می‌شود، به طور همزمان فاز گیرنده‌ی آبی با تنظیم pH باعث یونی شدن آنالیت و استخراج برگشتی آنها از حلال آلی به فاز گیرنده می‌شود شکل (۱-۴-ب). این آرایش که عموماً ریزاستخراج مایع-مایع-مایع^۲ نامیده می‌شود، بخصوص هنگامیکه که فرآیند ریزاستخراج با کروماتوگرافی مایع و یا الکتروفورز موئن همراه شود، بسیار مفید می‌باشد.



شکل ۱-۴- شیوه‌های مختلف ریزاستخراج با تک قطره: (الف) ریزاستخراج با تک قطره‌ی مستقیم؛ (ب) ریزاستخراج مایع - مایع - مایع؛ (ج) ریزاستخراج با تک قطره‌ی فضای فوقانی [۴۹].

جدای از فاکتورهای غنی‌سازی بالا، تمیزسازی نمونه نیز با این روش بسیار درخور توجه است. بر-اساس مطالعات پیشین در مورد جمع‌آوری آنالیت‌های گازی، تیس و تانکویکیوت^۳ روش ریزاستخراج با تک قطره‌ی فضای فوقانی را در سال ۲۰۰۱ ارائه نمودند (شکل ۱-۴-ج). این روش، استخراج و پیش تغلیظ آنالیت‌های فرار و شبه فرار را در ضمن پایدارسازی بیشتر قطره نسبت به شیوه قبلی فراهم می‌نماید. در ریز استخراج با تک قطره‌ی فضای فوقانی، یک حلال آلی آویزان شده از نوک یک ریزسرنگ در معرض فضای فوقانی محلول نمونه قرار داده می‌شود تا آنالیت‌های فرار یا شبه فرار را استخراج نماید. در این شیوه، در واقع آنالیت‌ها در میان سه فاز (محلول آبی - فضای فوقانی - قطره‌ی آلی) توزیع می‌گردند.

^۱ Ma

^۲ Liquid- liquid- liquid microextraction

^۳ Theis and Tankeviciute

۱-۶-۲- روش‌های ریزاستخراج با فاز مایع با استفاده از فیبرهای توخالی^۱ (HF-LPME)

برای رفع مشکل پایداری ریزاستخراج با فاز مایع بر اساس قطره‌های آویزان، پدرسِن - بیجرگارد و راسموسن^۲ برای اولین بار در سال ۱۹۹۹ روش ریزاستخراج با فاز مایع بر پایه‌ی فیبرهای توخالی را معرفی نمودند. همچنان که از نام ریزاستخراج با فاز مایع بر پایه‌ی فیبرهای توخالی برمی‌آید، در این روش حجمهای میکرولیتری از فاز استخراج کننده، درون کانال یک فیبر توخالی پلی‌پروپیلنی^۳ متخلخل قرار داده می‌شود که بدین وسیله حلال استخراجی محافظت شده و پایدار می‌گردد. به علت خاصیت تخلخلی آن، سطح تماس بین حلال و نمونه‌ی آبی افزایش یافته و بنابراین کارایی استخراج افزایش می‌یابد. معمول‌ترین فیبر دارای تخلخل ۷۰ درصدی با اندازه‌ی منافذی در حدود ۰/۲ میکرومتر، ضخامت دیواره‌ی ۲۰۰ میکرومتر و قطر داخلی ۶۰۰ میکرومتر می‌باشد. آنالیت از طریق منافذ و خلل و فرج^۴ فیبرهای توخالی به فاز پذیرنده که عمدتاً مقادیری میکرولیتری از حلال مناسب می‌باشد منتقل می‌شود؛ که فرآیند انتقال به ویژگی‌های آنالیت هدف از جمله ضریب توزیع^۵ بستگی دارد. پلی‌پروپیلن یک ماده‌ی بسیار ایده‌آل برای این منظور باشد؛ چرا که این ماده در مقابل حلالهای آلی مقاوم بوده و انعطاف‌پذیری و استحکام مکانیکی لازم را دارد، فازهای آلی مورد استفاده می‌توانند به شدت در دیواره آن تثبیت شوند بدون اینکه مشکلات جذبی جدی بین آنالیت‌های مورد نظر و خود پلیمر وجود داشته باشد. با این قطر داخلی، سوزنهای باریک ریزسرنگها می‌توانند به درون کانال وارد شده و فازهای گیرنده را تزریق و یا از درون آن خارج نمایند. از طرف دیگر، ضخامت دیواره‌ی زیر ۲۰۰ میکرومتر ممکن است پایداری مکانیکی ضعیفی داشته باشند؛ در حالی که مقادیر بالاتر از ۲۰۰ میکرومتر ممکن است باعث افزایش بسیار زیاد زمانهای استخراج و کاهش بازده به دلیل افزایش حجم و ضخامت فاز آلی شوند.

با فروبردن فیبر توخالی به درون حلال آلی به مدت چند ثانیه، یک غشای مایع تثبیت شده^۶ (SLM) می‌تواند به آسانی تشکیل شود. حلال به منافذ فیبر توخالی نفوذ کرده و در اثر نیروی موئینگی^۷ به شبکه‌ی پلی‌پروپیلنی تشکیل دهنده‌ی دیواره‌ی فیبر اتصال می‌یابد. تخلخل بالا، تثبیت یک حجم قابل توجهی از حلال را به صورت یک لایه‌ی نازک مقدور می‌سازد. در ریزاستخراج با فاز مایع با استفاده از فیبرهای توخالی، آنالیت‌ها از یک نمونه‌ی آبی ابتدا به درون حلال آلی تثبیت شده و سپس به درون محلول پذیرنده-ی داخل کانال فیبر توخالی استخراج می‌شود. این محلول پذیرنده ممکن است یک حلال آلی (مشابه حلال تثبیت شده در دیواره‌ی فیبر) یا یک فاز آبی یا آلی دیگری باشد که بر این اساس سیستمهای

^۱ Hollow fiber based liquid phase microextraction (HF-LPME)

^۲ Pedersen-Bjergaard and Rasmussen

^۳ Polypropylene

^۴ Pores

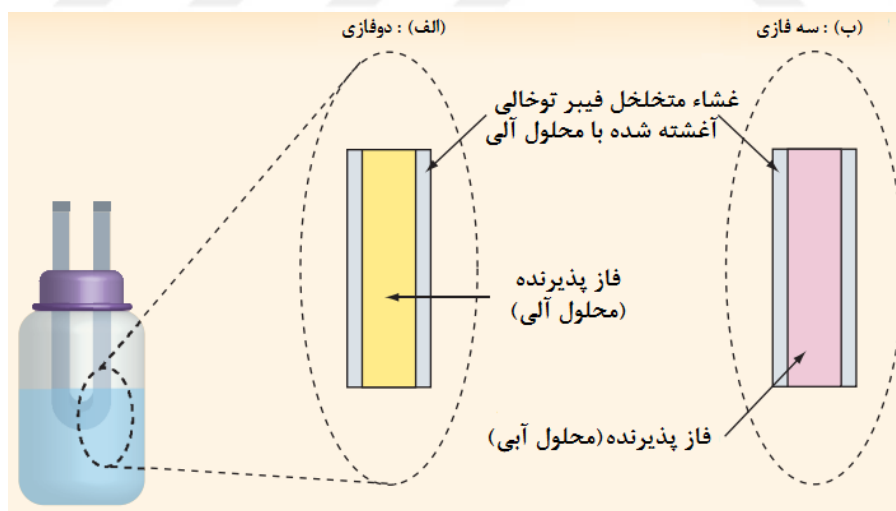
^۵ Partition coefficient

^۶ Supported liquid membrane (SLM)

^۷ Capillary force

دوفازی^۱ و سه‌فازی^۲ می‌توانند مطرح شوند (به ترتیب شکل ۱-۵ الف و ب). برای حصول شرایط استخراج بهینه، فاکتورهای زیر بایستی مورد آزمایش قرار گیرند: الف: حلال استخراج کننده (نوع و حجم)، ب: نوع و مقدار افزودنی‌ها (بافرهای کنترل کننده pH)، ج: قدرت یونی^۳ (اثر نمک)، د: زمان استخراج و نهایتاً سرعت چرخش و تلاطم محلول نمونه. به ویژه اینکه برای بهبود بازیابی آنالیت، همزدن چرخشی حلالهای استخراجی مورد استفاده نیز حائز اهمیت است. برخی از معایب LPME با استفاده از غشاهای توخالی عبارتند از:

- غشای سد مانند مابین فازهای دهنده (محلول نمونه) و آلی (حلال پذیرنده)، سرعت استخراج را کاهش داده و سبب طولانی شدن مدت زمان استخراج می‌گردد.
- در LPME دوفازی، به منظور استخراج و شستشوی آنالیت از کانال داخلی^۴ و منافذ فیبرها، مقادیر اضافی از حلال مورد نیاز است که در مجموع کل فرایند استخراج را زمان‌بر می‌سازد.
- ایجاد حبابهای هوا در سطح فیبرها سبب کاهش سرعت انتقال و نهایتاً کاهش تکرارپذیری استخراج می‌گردد.
- در نمونه‌های حقیقی مانند پلاسمای خون، ادرار و نمونه‌های محیطی و زیست محیطی مانند فاضلاب، جذب سطحی مواد آب‌گریز بر روی سطح فیبرهای مورد استفاده، گاه سبب بلوکه شدن منافذ آنها می‌شود.



شکل ۱-۵- ریزاستخراج با فاز مایع با استفاده از فیبرهای توخالی: (الف) شیوهی دوفازی (ب) شیوهی سه فازی [۴۱].

¹ Two-phase

² Three-phase

³ Ionic strength

⁴ Lumen

ریزاستخراج با فاز مایع با استفاده از فیبرهای توخالی دو فاز می‌تواند به دو شیوه اجرا گردد: استخراج غوطه‌وری مستقیم و استخراج فضای فوقانی. شیوه‌های سه فاز ریزاستخراج با فاز مایع با استفاده از فیبرهای توخالی نیز می‌تواند با سه مکانیسم مختلف به صورت گرادیان pH، انتقال توسط حامل و استخراج الکتروغشایی^۱ انجام شوند.

۱-۶-۱-۲-۱-۱-۱ ریزاستخراج با فاز مایع با استفاده از فیبرهای توخالی دو فاز

در سیستم ریزاستخراج با فاز مایع با استفاده از فیبرهای توخالی دو فاز، آنالیت‌های مورد نظر از نمونه‌ی آبی به درون حلال آلی موجود در منافذ دیواره و درون کانال فیبر توخالی (فاز گیرنده) استخراج می‌گردند. این فرآیند می‌تواند با معادله‌ی زیر نشان داده شود:

رابطه‌ی (۶-۱) $A \leftrightarrow A_{\text{گیرنده}}$ نمونه

که A آنالیت مورد نظر را نشان می‌دهد. ضریب توزیع برای آنالیت A به صورت زیر تعریف می‌شود:

$$\text{رابطه‌ی (۷-۱)} \quad \text{نمونه/گیرنده} K_D = \frac{C_{eq, \text{گیرنده}}}{C_{eq, \text{نمونه}}} = \alpha_D \cdot \text{نمونه/گیرنده}$$

که در آن $C_{eq, \text{گیرنده}}$ غلظت کل آنالیت در فاز گیرنده در حالت تعادل و $C_{eq, \text{نمونه}}$ غلظت کل آنالیت در نمونه در حالت تعادل می‌باشد. نمونه/گیرنده K ضریب تقسیم^۲ (توزیع) بین فازها است که نسبت گونه‌های قابل استخراج آنالیت در دو فاز می‌باشد. در ریزاستخراج با فاز مایع با استفاده از فیبرهای توخالی دو فاز، ضریب تقسیم یک پارامتر کلیدی است. برای یک آنالیت فاقد گروه‌های یونیزه شونده، نمونه/گیرنده K عمدتاً توسط حلال آلی انتخاب شده به عنوان محلول پذیرنده تعیین می‌شود. بنابراین، بهینه‌سازی محلول پذیرنده ممکن است برای این نوع از آنالیت‌ها ارزشمند باشد. در صورتیکه آنالیت‌های غیر یونی به شدت آبدوست باشند، ریزاستخراج با فاز مایع با استفاده از فیبرهای توخالی دو فاز می‌تواند روش انتخابی مناسبی باشد. برای ترکیبات حاوی گروه‌های اسیدی و بازی، تنظیم pH در محلول دهنده برای اطمینان از اینکه آنالیت‌ها در حالت غیریونی‌شان هستند ضروری و مهم می‌باشد. همچنین در این مورد، محلول گیرنده ممکن است یک نقش مهمی را در تعیین نمونه/گیرنده K و بازده داشته باشد. اگر ترکیبات باردار بسیار آبدوست باشند، ریزاستخراج با فاز مایع با استفاده از فیبرهای توخالی دوفازی نبایستی انتخاب شود که البته در این مورد، ریزاستخراج با فاز مایع با استفاده از فیبرهای توخالی بر اساس انتقال فعال ممکن است یک عملکرد جالبی داشته باشد.

^۱ Electromembrane extraction

^۲ Partition coefficient

$$\alpha = \frac{1}{1 + 10^{s(\text{pH} - \text{pKa})}} \quad \text{معادله ی (۸-۱)}$$

۱-۶-۱-۲-۲- ریز استخراج با فاز مایع با استفاده از فیرهای توخالی سه فازي

بایستی در درونِ کانالِ فیبر به کارگرفته شود. علاوه بر گرادیان pH، انتقالِ کمک شده با حامل^۱ نیز برای استخراج‌های غشاءِ مایع تثبیت شده، گزارش شده است. ماهیت شیمیایی برخی از آنالیت‌ها باعث ایجادِ ضرایب تقسیم (توزیع) پایین می‌شود که بدین وسیله، از استخراج آنها در سیستم‌های مبتنی بر انتشارِ تنها، ممانعت به عمل می‌آورد. در این موارد، یک حامل به محلول افزوده می‌شود. حامل مورد استفاده که خود حلالیت قابل قبولی در آب دارد، زوج یون‌های نسبتاً آبگریزی را با آنالیت‌های مورد نظر تشکیل می‌دهد که در ادامه این زوج یونها می‌توانند به درون فاز آلی موجود در منافذ فیبر توخالی استخراج شوند. در محل تماس فاز آلی و محلول پذیرنده، آنالیت‌ها از کمپلکس زوج یون به درون محلول پذیرنده رها می‌شوند، درحالی‌که یون‌های مخالف موجود در فاز گیرنده یک زوج یونی را در غلظت خیلی بالا با حامل، در این محل تماس تشکیل می‌دهند و کمپلکس زوج یون جدید، استخراج برگشتی^۲ به درون محلول انجام می‌دهد. مجدداً در محلول نمونه، حامل آزاد شده و یون مخالف انتقال یافته، یک زوج یون را با یک مولکول آنالیت جدید تشکیل داده و این چرخه به طور مرتب تکرار می‌شود. برای آنالیت‌های بازی، حامل ممکن است نوعاً یک کربوکسیلیک اسید^۳ با یک قسمت آبگریز مناسب (مانند اکتانویک اسید^۴) باشد. همچنین pH محلول طوری تنظیم می‌شود که از بودن آنالیت‌ها در حالت یونی‌شان اطمینان حاصل شود. این در حالی است که pH در فاز گیرنده معمولاً پایین انتخاب می‌شود تا از این موارد اطمینان حاصل شود که (۱) حامل در درون این فاز گیر نیفتاده است؛ (۲) پروتون‌های کافی برای نگهداری یون‌های مخالف وجود دارد. محلول گیرنده‌ی آبی غنی شده، مستقیماً جهت آنالیز نهایی با کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و الکتروفورز موئن سازگار است [۵۱].

۱-۶-۱-۲-۳- استخراج الکتروغشایی (EME)

در سال ۲۰۰۶، پدرسن - بیجرگارد و راسموسن برای اولین بار نشان دادند که یک پتانسیل الکتریکی از طریق یک غشاءِ مایع تثبیت شده (SLM) باعثِ یک استخراج تجزیه‌ای می‌شود [۵۲]. این سیستم تحت عنوان استخراج الکتروغشایی نام گرفت و در آن آنالیت‌ها از یک نمونه‌ی آبی از طریق یک محلول آلی (۲- نیتروفنیل اکتیل اتر^۵) تثبیت شده به صورت غشاءِ مایع در دیواره‌های یک فیبر توخالی متخلخل پلی‌پروپیلنی به یک محلول پذیرنده‌ی آبی موجود در درونِ کانالِ فیبر توخالی استخراج می‌شدند. اساساً این روش شبیه یک ریزاستخراج با فاز مایع بر پایه‌ی فیبرهای توخالی است که در آن مهاجرت^۶ در غشاءِ مایع تثبیت شده، بوسیله‌ی میدان الکتریکی اعمال شده توسط دو الکترود به ترتیب قرارگرفته در خارج فیبر (مستقیماً درون محلول نمونه) و درون کانالِ فیبر (حاوی فاز پذیرنده) صورت می‌گیرد. به منظور

¹ Carrier mediated transport

² Back extraction

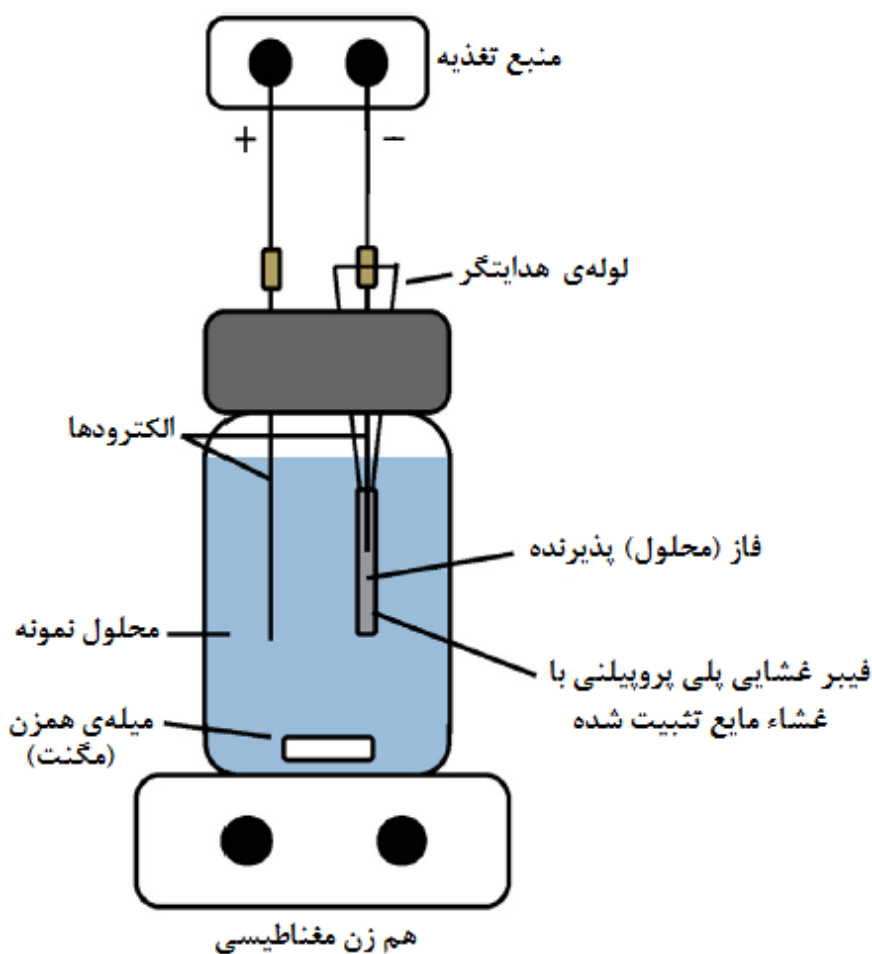
³ Carboxylic acid

⁴ Octanoic acid

⁵ 2-Nitrophenyl octyl ether (NPOE)

⁶ Migration

اطمینان از تحرک الکتروسینتیکی موثر در سیستم استخراج الکتروغشایی، pH بایستی طوری تنظیم شود که یونیزاسیون کامل آنالیت را در هر دو محلول آبی فراهم نماید. در این روش، اعمال ولتاژ مستقیم به یک غشاء مایع تثبیت شده استخراج‌های بسیار سریعی را از حجم‌های کم نمونه سبب می‌شود. دستگاه مورد استفاده برای انتقال و مهاجرت الکتروسینتیکی^۱ از میان غشاء در شکل ۱-۶ نشان داده شده است.



شکل ۱-۶- دیاگرام شماتیک از سیستم طراحی شده برای استخراج الکتروغشایی [۵۳].

در این روش، نمونه (فاز دهنده) در درون ویال استخراج قرار داده می‌شود و pH در محلول نمونه به منظور یونیزاسیون و باردار کردن آنالیت‌های هدف، تنظیم می‌گردد. یک قطعه‌ی کوچک از یک فیبر یا غشای فیبری توخالی، جهت تثبیت حلال آلی و ایجاد غشای مایع تثبیت شده (SLM) از حلال در سطح و دیواره‌ی فیبر توخالی مورد استفاده، برای مدت زمان محدودی در درون یک حلال آلی غیرقابل امتزاج با آب فروبرده شده و غوطه ور می‌گردد. کانال و حفره‌ی داخلی فیبر مذکور با محلول آبی پذیرنده

¹ Electrokinetic migration

پُر گشته و سپس در درون محلول نمونه قرار داده می‌شود. در این تکنیک، از یک منبع تغذیه^۱ مناسب به همراه دو الکترود پلاتینی با قطر و فاصله‌ی معین که یکی از آنها در داخل فاز دهنده و دیگری مستقیماً در درون کانال فیبر (فاز پذیرنده) قرار داده شده‌اند، به منظور اعمال ولتاژ استفاده می‌شود. با اعمال اختلاف پتانسیل الکتریکی بین الکترودها، گونه‌های باردار از نمونه استخراج شده و از طریق غشای مایع تثبیت شده در دیواره‌ی فیبر (SLM) به فاز پذیرنده منتقل می‌شوند. در مورد کاتیونها، کاتد در محلول پذیرنده و آند مستقیماً در محلول نمونه (فاز دهنده) تعبیه می‌شوند. در حالی که در موارد مربوط به استخراج آنیونها، قطبیت پتانسیل بایستی برعکس آرایش ذکر شده برای کاتیونها باشد. در پایان استخراج، ولتاژ اعمال شده قطع می‌شود و فاز پذیرنده از طریق یک ابزار مناسب (عمدتاً سرنگ میکرولیتری) جهت آنالیز مستقیم توسط تکنیک تجزیه‌ای انتخابی، جمع‌آوری می‌گردد. قسمت مرکزی واحد استخراج کننده، پلی‌پروپیلن متخلخل است که با گستره‌ی وسیعی از حلالهای آلی سازگاری مناسبی دارد و جهت تثبیت SLM در دیواره‌ی فیبر مورد استفاده قرار می‌گیرد. در روش EME، به منظور دستیابی به درصدهای بازیابی بالا و گزینش پذیری مطلوب تجزیه‌ای، نوع حلال مورد استفاده برای ایجاد غشای مایع تثبیت شده در دیواره‌ی فیبر، بایستی بر اساس ویژگی‌های آنالیت هدف بهینه شود. معمولاً حلالهای آلی نیترو حلقوی^۲ (مانند^۳ NPOE و اتیل نیتروبنزن^۴) برای اهداف استخراج انتخابی داروها و ترکیبات بازی مورد استفاده قرار می‌گیرند [۵۲، ۵۴، ۵۵]. این حلالها ویژگی‌های پروتون پذیری و ممان دو قطبی^۵ بالایی دارند و لذا برای استخراجهای کارآمد ترکیبات بازی بسیار مناسب هستند. این در حالی است که الکلهای آلیفاتیک^۶ زنجیر بلند^۷ (مانند ۱-کتانول^۸، شکل ۱-۷-ج) برای استخراج الکتروغشایی داروها و برخی دیگر از ترکیبات اسیدی مورد استفاده قرار گرفته‌اند [۵۸-۵۶]. همچنین بسیاری از حلالهای کتونی نیز برای اهداف استخراج الکتروغشایی مورد مطالعه قرار گرفته‌اند [۵۹]. ولتاژ اعمالی به رسانایی سیستم بستگی دارد که عمدتاً توسط انتخاب SLM، تحت تاثیر قرار می‌گیرد.

تاکنون، مبنای علمی واضحی برای انتخاب غشاء مایع تثبیت شده (SLM) و حلال مورد استفاده برای تثبیت آن ارائه نشده است؛ ولی به نظر می‌رسد که حلالهای فوق‌الذکر حلالیت و تمایل قابل قبولی را برای گونه‌های باردار آنالیت‌های بازی و اسیدی فراهم می‌کنند. لذا گونه‌های باردار به خوبی در داخل غشای مایع توزیع می‌گردند و توسط میدان الکتریکی قوی به سمت فاز استخراج کننده (فاز پذیرنده) هدایت می‌شوند که این میدان الکتریکی اعمالی، کارایی انتقال جرم بالایی را سبب می‌شود. البته قابل

¹ Power supply

² Nitro-aromatic solvents

³ 2-nitrophenyl octyl ether

⁴ Ethyl nitrobenzene

⁵ Dipole moments

⁶ Aliphatic

⁷ Long-chained alcohols

⁸ 1-octanol

توجه است که، حلالهای آلی مورد استفاده برای SLM بایستی در دمای اتاق در حالت مایع بوده و غیرقابل انحلال در آب باشند (و یا حلالیت بسیار پایینی در آب داشته باشند)، فرار نباشند و ضمناً به منظور حفظ پایداری غشای مایع تثبیت شده در سطح فیبر، گرانشی خیلی بالایی نداشته باشند. حلالیت بسیار ناچیز در آب به منظور حصول اطمینان از عدم حل شدن نسبی غشای مایع تثبیت شده در محلول نمونه در حین فرآیند استخراج ضروری می باشد. همچنین فراریت پایین حلال مورد استفاده نیز برای ممانعت از تلفات تبخیری SLM در حین مراحل مختلف استخراج بسیار حائز اهمیت است. گرانشی مناسب و تا اندازه ای پایین نیز برای بدست آوردن ضرایب توزیع بالا و تسهیل فرآیند انتقال جرم در سرتاسر غشای مایع تثبیت شده مورد نیاز می باشد. برای استخراج الکتروغشایی داروهای بازی غیرقطبی ($\log P > 2/5$) حلال NPOE مکرراً مورد استفاده قرار گرفته است [۶۰-۶۲]. ساختار شیمیایی حلال NPOE در شکل ۱-۷- الف نشان داده شده است. این حلال و برخی از حلالهای جایگزین که متعاقباً مورد بحث قرار خواهند گرفت بر اساس آزمون و خطا انتخاب شده اند. اگرچه نتایج یک مطالعه سیستماتیک که اخیراً انجام شده است [۵۹]، نشان می دهد که حلالهای با ضرایب کاملت- تافت^۱ بالا برای قطبش پذیری^۲ (π) و بازیسیته پیوند هیدروژنی^۳ (β) کارآمدترین و مناسبترین حلالها برای استخراج الکتروغشایی ترکیبات و داروهای بازی غیرقطبی هستند. این تحقیق همچنین نشان می دهد که هر دو نوع برهمکنشهای دایپل- دایپل^۴ (دو قطبی - دو قطبی) و پیوند هیدروژنی مسئول انتقال گونه های باردار آنالیت از محلول نمونه به درون حلال SLM هستند. به منظور استخراج ترکیبات با قطبیت بالاتر ($\log P < 2/5$)، غشای مایع تثبیت شده بر اساس حلالهای خالص تا کنون ناموفق عمل کرده اند. به عنوان مثال، حلال NPOE به دلیل انتقال ضعیف آنالیت های قطبی تر از محلولهای آبی به درون غشای مایع تثبیت شده با این حلال، کارایی کافی را برای استخراج آنها ندارد.

هرچندکه، افزودنی های زوج یونی^۵ به عنوان یک استراتژی ثانویه به SLM های مناسب اضافه شده و منجر به استخراج های موفق برای آنالیت های قطبی شده اند. به طور خاص، دی-(۲-تیل هگزیل فسفات)^۶، DEHP، برای آنالیت های نسبتاً قطبی و نیز آنالیت های کاتیونی خالص^۷ به خوبی عمل می کند. لذا هر دو دسته داروهای اسیدی و بازی و نیز پپتیدهای قطبی^۸ با استفاده از اضافه کردن DEHP (ساختار شیمیایی در شکل ۱-۷- ب نشان داده شده است) به غشای مایع تثبیت شده استخراج شده اند [۶۳، ۶۴]. در روش استخراج الکتروغشایی، حجم فاز پذیرنده عمدتاً بین ۱۰ تا ۳۰ میکرولیتر متغیر است

¹ Kamlet and Taft value

² Polarizability

³ Hydrogen-bond basicity

⁴ Dipole-dipole interaction

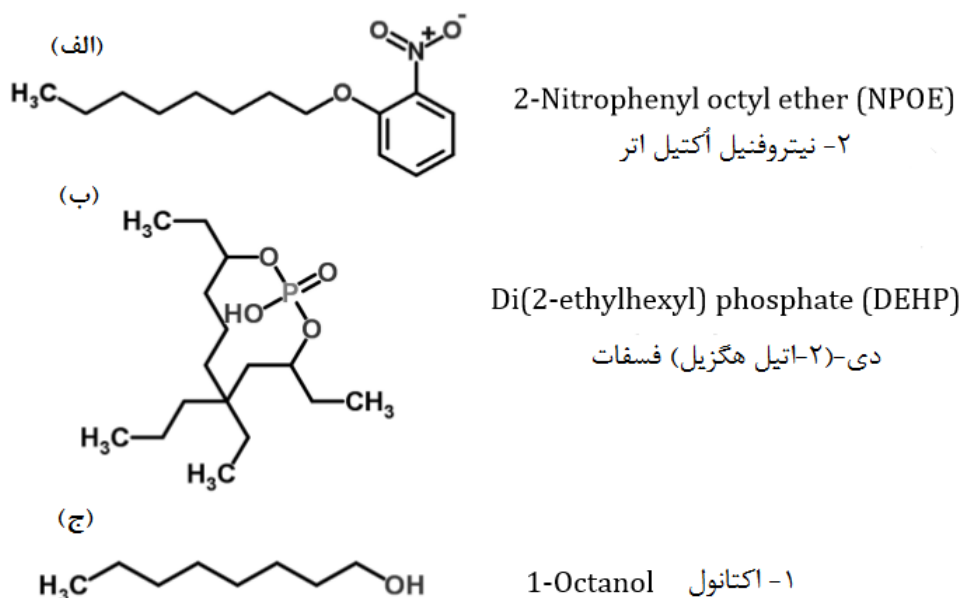
⁵ Ion-pair

⁶ Di-(2-ethylhexyl) phosphate (DEHP)

⁷ Net cationic analytes

⁸ Polar peptides

[۶۵]. حجم‌های نمونه به صورت متداول، گستره‌ی مابین ۷۰ میکرولیتر تا ۱۰ میلی‌لیتر را پوشش می‌دهند که این مقدار به شکل و اندازه‌ی ظرف نمونه نیز بستگی دارد [۶۶، ۶۷].



شکل ۱-۷- ساختار شیمیایی برخی از حلال‌ها و افزودنی‌های مورد استفاده برای SLM در استخراج الکتروغشایی.

همان‌طوری که قبلاً نیز اشاره شد، شرایط pH در نمونه و فاز پذیرنده می‌بایستی برای حصول اطمینان از یونیزاسیون آنالیت‌ها و به منظور تسهیل مهاجرت الکتروستاتیکی آنها در اثر میدان الکتریکی اعمال شده، تنظیم شوند. نوعاً در مورد آنالیت‌های بازی، هیدروکلریک اسید (HCl)، فرمیک اسید (HCOOH)، تری فلور استیک اسید^۱ (TFA) و همچنین استیک اسید (CH₃COOH) برای اسیدی کردن نمونه و فاز پذیرنده مورد استفاده قرار گرفته‌اند [۵۴، ۶۵، ۶۸]. در حالی که سدیم هیدروکسید (NaOH) در مورد آنالیت‌های اسیدی بکار گرفته شده است [۵۶]. همچنین در یک پژوهش جالبی که اخیراً صورت گرفته است یک فاز پذیرنده‌ی محتوی اتر تاجی^۲ در استیک اسید مورد استفاده قرار گرفته و روش مذکور برای استخراج بهبود یافته‌ی پلی‌آمین‌های ۳ مختلف و متعددی در بزاق دهان، گزارش شده است [۶۹]. قطعاً این مثال، گواه بارزی بر سیر تکاملی روش استخراج الکتروغشایی می‌باشد و نشان دهنده‌ی لزوم توسعه و بررسی‌های تکاملی جدی در مورد فازهای پذیرنده‌ی جدید و اختصاصی در پژوهش‌های آتی مرتبط با این شاخه‌ی تجزیه‌ای می‌باشد.

^۱ Trifluoroacetic acid (TFA)

^۲ Crown ether

^۳ Polyamine

ولتاژ اعمالی که به عنوان نیروی پیشران^۱ برای استخراج عمل می‌کند و همچنین شدت و جهت آن، به خوبی توسط یک منبع تغذیه قابل کنترل است. مقادیر بهینه‌ی شدت میدان الکتریکی در گستره‌ی بین ۹ تا ۳۰۰ ولت متغیر بوده است [۵۲، ۶۸-۶۶، ۷۰]. به نظر می‌رسد که شدت ولتاژ اعمالی به میزان زیادی به ماهیت SLM و آنالیت‌های هدف وابسته است. همچنین شایان ذکر است که ولتاژهای بالا به احتمال زیاد مشکلاتی مانند الکترولیز^۲، تولید حباب^۳ و ناپایداری آنالیت‌ها و همچنین مشکلات مربوط به پایداری جریان را به دلیل واکنش‌های ردوکس^۴ در سطح الکترودها به همراه داشته باشد.

اگرچه توجیه نظری EME به دلیل دخیل بودن هر دو فرآیند نفوذ^۵ و انتقال الکتروسینتیک پیچیده می‌نماید؛ ولی مدل تئوریک استخراج تجزیه‌ای این روش، توسط معادله‌ی اصلاح شده‌ی نرنست-پلانک^۶ ارائه شده است. کاهش زمان استخراج با این روش در مقایسه با روش‌های مبتنی بر LPME ساده، عمدتاً به دلیل فرآیند مهاجرت الکتروسینتیک از SLM و به درون فاز پذیرنده می‌باشد. ملاحظات نظری بر مبنای رابطه‌ی نرنست-پلانک (رابطه‌ی ۹-۱) فرض می‌کند که SLM از نظر الکتریکی خنثی بوده و برای غشاهای ضخیم (تا ۲۰۰ میکرومتر) معتبر است [۵۵].

$$J_j = -D_j \frac{dc_j}{dx} + \frac{D_j Z_j e E c_j}{KT} \quad \text{معادله‌ی (۹-۱)}$$

این رابطه، شار حالت پایدار^۷ (J_j) یک ماده‌ی یونی را در سرتاسر غشای مایع تثبیت شده (SLM) بیان می‌کند که این شار به ضریب نفوذ^۸ (D_j)، بار آن (Z_j)، غلظت آنالیت در غشای مایع تثبیت شده (c_j)، فاصله‌ی بین آنالیت با سطح تماس غشای مایع/محلول پذیرنده^۹ (x)، ثابت بولتزمن^{۱۰} (K)، بار اولیه^{۱۱} (e)، میدان الکتریکی (E) و دمای مطلق^{۱۲} (T) وابسته است. اولین عبارت در رابطه‌ی بالا، نفوذ آنالیت را از بافت نمونه به داخل SLM بیان می‌کند و عبارت آخر مهاجرت الکتریکی^{۱۳} را نشان می‌دهد. اگرچه فرضیات رابطه‌ی مذکور برای غشاهای نازک‌تر و هنگامی که اختلاف در غلظت‌های تعادلی یونی محلول دهنده نسبت به محلول پذیرنده وجود داشته باشد، معتبر نیست؛ ولی بدون شک متداولترین و شایع‌ترین حالت استخراج الکتروغشایی را توجیه می‌کند. در حالت کلی، مدل ارائه شده در رابطه‌ی

¹ Driving force

² Electrolysis

³ Bubble formation

⁴ Redox reactions

⁵ Diffusion

⁶ Nernst-Planck equation

⁷ Steady-state flux

⁸ Diffusion coefficient

⁹ Distance between the analyte and the SLM/acceptor solution interface

¹⁰ Boltzmann's constant

¹¹ Elementary charge

¹² Absolute temperature

¹³ Electro-migration

مذکور، نشان می‌دهد که شدت اختلاف پتانسیل الکتریکی، تعادل یونی^۱ سیستم و دمای مطلق مهمترین پارامترهایی هستند که شار آنالیت‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهند. این فرضیات، توسط آزمایشات تجربی و نیز داده‌های حاصل از پژوهشهای آزمایشگاهی مورد تایید قرار گرفته‌اند و معتبر می‌باشند [۷۱].

۱-۶-۱-۲-۳-۱- ملاحظات عملی و کاربردهای استخراج الکتروغشایی در نمونه‌های بیولوژیکی

استخراج داروهای بازی با قطبیت پایین ($\log P > 2/5$) در تعداد نسبتاً کثیری از مقالات منتشر شده در سالهای اخیر، گزارش شده است. در تعداد قابل توجهی از این گزارشات، EME برای اهداف استخراج انتخابی آنالیت‌های دارویی و نیز آماده‌سازی نمونه قبل از آنالیز در محیطهای مختلفی چون پلاسما، سرم، شیر، بزاق دهان^۲ و نمونه‌های زیست محیطی مورد استفاده قرار گرفته است. این حجم وسیع مقالات نشان دهنده‌ی سازگاری مطلوب و کافی تکنیک استخراج الکتروغشایی با بسیاری از نمونه‌ها و مایعات بیولوژیکی می‌باشد. همان طوری که قبلاً نیز به تفصیل اشاره شد، NPOE حلالی است که بیشترین کاربرد را به عنوان ترکیب SLM در مطالعات مذکور به خود اختصاص داده است. این در حالی است که دو حلال ۱- اتیل-۲- نیتروبنزن^۳ (ENB) و ایزوپروپیل نیتروبنزن^۴ (IPNB) دو ترکیبی هستند که به عنوان جایگزین حلال ۲- نیتروفنیل‌اکتیل‌اتر، به منظور کاربردهای مربوط به استخراج الکتروغشایی با ولتاژهای پایین، در بسیاری از مقالات معرفی شده‌اند. در اکثر موارد، حلالهای خالص به عنوان غشای مایع تثبیت شده مورد استفاده قرار گرفته‌اند و استفاده از افزودنی‌های حاملی به حلال SLM برای استخراج ترکیبات هدف، کمتر گزارش شده است. ولتاژهای مورد نیاز برای استخراج ترکیبات مورد نظر در این گزارشات در محدوده‌ی ۱۰۰ تا ۳۰۰ ولت با حلال NPOE گزارش شده است؛ در حالی که در استفاده از حلالهای ENB و IPNB، ولتاژهای کمتر از ۱۵ ولت اعمال شده است. زمانهای استخراج نیز نوعاً مابین پنج تا بیست دقیقه متغیر بوده است. درصدهای بازیابی گزارش شده برای داروهای غیرقطبی و با قطبیت پایین به طور قابل ملاحظه‌ای در گزارشات منتشر شده متفاوت بوده‌اند. این تفاوت در نتایج تجزیه‌ای حاصل، ناشی از شرایط مختلف آزمایشی و ویژگی‌های شیمیایی و فیزیکی ترکیبات مورد آنالیز بوده است. اگرچه به نظر می‌رسد که با روش استخراج الکتروغشایی، درصدهای بازیابی در محدوده‌ی ۵۰ تا ۸۰ درصد مطلوب خواهد بود.

هنگام استخراج ترکیبات هدف از نمونه‌های زیستی، فاکتورهای تحمیل شده توسط یک پیکره‌ی پیچیده بایستی مد نظر قرار گیرد. در حالت کلی با استفاده از استخراج الکتروغشایی، اجزای بسیار کمی از پیکره‌ی بیولوژیکی به فاز پذیرنده منتقل می‌شوند؛ بنابراین اثرات ماتریکس^۵ مشاهده شده در دستگاه-

¹ Ion balance

² Saliva

³ 1-Ethyl-2-nitrobenzene

⁴ Isopropyl nitrobenzene

⁵ Matrix effects

های آنالیزی کم است [۷۲، ۷۳]. اگرچه فاکتورهای بسیار مهمی مانند محتوای نمک^۱ در محلول نمونه، گرانروی بسیار بالای پلاسما^۲ و اتصال آنالیت به پروتئین^۳ و اجزای نمونه‌های بیولوژیکی وجود دارند که کارایی استخراج را به شدت تحت تاثیر قرار می‌دهند. در ماتریکس‌های بیولوژیکی پیچیده‌ای مانند پلاسما و خون، گرانروی بالا می‌تواند سینتیک استخراج را از طریق کاهش اثرات همرفت^۴ و نفوذ در سل محتوی نمونه، تحت تاثیر قرار دهد و نهایتاً سبب افزایش زمان لازم برای رسیدن به بازیابی‌های استخراج حالت پایدار^۵ در محلول پذیرنده شود. رقیق سازی مناسب نمونه سبب کاهش اثرات فوق الذکر می‌گردد [۶۵]. علاوه بر این، چنین پیکره‌هایی خصوصیات امولسیون کنندگی^۶ بالایی را دارند که می‌تواند غشای مایع تثبیت شده (SLM) را از طریق حل کردن حلالهای آلی مختل سازد که این اثر به نوبه‌ی خود بی-نقصی و تمامیت^۷ غشای مذکور را با مشکل مواجه ساخته و نهایتاً استخراجهای ناپایداری را رقم می‌زند [۶۵]. لذا انتخاب حلال مورد استفاده برای SLM بایستی به دقت صورت گیرد و آزمایشات تکمیلی و تستهای اولیه‌ی لازم بایستی بر روی پیکره‌های مربوطه و مناسب، قبل از کاربرد در نمونه‌های حقیقی انجام پذیرد. بسیاری از نمونه‌ها و ماتریکسهای بیولوژیکی می‌توانند منجر به اتصالات بالای دارو به پروتئین شوند که در چنین شرایطی، دسترسی به آنالیت‌های آزاد در محلول نمونه کاهش می‌یابد و سینتیک‌های استخراجی پایین و محدودیتهای بالقوه در بازیابی آنالیت‌ها در حین فرآیند استخراج، رخ می‌دهد. اگرچه، استفاده از میدان الکتریکی مانند آنچه که در تکنیک استخراج الکتروغشایی صورت می‌پذیرد، اتصالات داروها به پروتئین را به طرز چشمگیری کاهش می‌دهد؛ که این امر می‌تواند به عنوان برتری ویژگی‌های تئوریک^۸ روش EME نسبت به سایر روشهای ریزاستخراج بر پایه‌ی فیبرهای توخالی تلقی شود. بسیاری دیگر از نمونه‌های بیولوژیکی مانند ادرار، محتوی غلظتهای بالایی از نمک و سایر الکترولیت‌ها می‌باشند که سیستم استخراجی را تحت تاثیر قرار می‌دهند. مطابق مدل مکانیکی شار یون در EME، وجود این نمک‌ها می‌تواند اثرات نابجا و منفی را بر نسبت‌های مربوط به غلظت یونی در دو فاز ایجاد کرده و رقابت در مهاجرت آنالیت‌ها را با مشکل مواجه کرده و سبب کاهش شدید کارایی استخراج گردد. اثر انتقال جرم بالای یونهای زمینه^۸ به صورت جریانهای بالا در سیستم منعکس می‌گردد و پایداری سیستم‌های استخراجی را با چالش روبرو می‌نماید. لذا اهمیت تست‌های مربوط به چنین سیستم‌های استخراجی در پیکره‌های منطبق و مشابه با نمونه‌های حقیقی قابل تاکید و تأمل است.

¹ Salt content

² Plasma

³ Protein binding

⁴ Convection

⁵ Steady state extraction recovery

⁶ Emulsifying properties

⁷ Integrity

⁸ Mass transfer of background ions

۱-۶-۱-۲-۳-۲- کاربردهای استخراج الکتروغشایی در سنجش سطح درمانی ترکیبات دارویی

بخش اعظمی از مقالات منتشر شده و پژوهشهای صورت گرفته در مورد EME، بر روی استخراج ترکیبات دارویی از پیکره‌های بیولوژیکی متمرکز شده است. با این حال، در بسیاری از این مطالعات، داروهای هدف و پیکره‌های مربوطه به منظور نشان دادن اصول پایه‌ای این روش، مورد آزمایش قرار گرفته‌اند و تمرکز اصلی بر روی کاربردهای کلینیکال آن مغفول مانده است. جدول ۱-۲ یک بررسی اجمالی از کاربردهای منتشر شده استخراج الکتروغشایی داروهای مختلف در نمونه‌های بیولوژیکی به صورت تلفیق شده با دستگاه‌های مختلف تجزیه‌ای از جمله الکتروفورز موئن را به همراه ویژگی‌های آنالیت‌های مربوطه، ملزومات مورد استفاده برای استخراج و همچنین نتایج تجزیه‌ای مربوطه ارائه می‌کند. بررسی دقیق مراجع علمی معتبر نشان می‌دهد که تاکنون پژوهشی مبنی بر استفاده از این تکنیک به منظور استخراج انتخابی ترکیبات دارویی ضد سرطان که موضوع اصلی این رساله می‌باشد، به چاپ نرسیده است. لذا به ناچار در جدول مذکور به پیشینه‌ی کلی مطالعات مربوط به این شاخه‌ی تجزیه‌ای در استخراج و اندازه‌گیری سایر ترکیبات دارویی در پیکره‌های زیستی اشاره شده است.

جدول ۱-۲- کاربرد استخراج الکتروغشایی به منظور استخراج و اندازه‌گیری برخی از ترکیبات دارویی در نمونه‌های بیولوژیکی مختلف.

آنالیت	Log P	ماتریکس	فاز دهنده	pH فاز پذیرنده	حلال SLM	ولتاژ اعمال شده	درصد بازیابی ^۱	مرجع
آمی‌تریپتیلین ^۲	۴/۱	پلاسما	خنثی	۲/۹	ENB	۹ ولت	۱۳	[۶۷]
آملودیپین ^۳	۲/۲	پلاسما	اسیدی	۲/۰	NPOE	۲۰۰ ولت	۶۳	[۷۴]
آملودیپین	۲/۲	ادرار	اسیدی	۲/۰	NPOE	۲۰۰ ولت	۷۴	[۷۴]
سیتالوپرام ^۴	۳/۷	پلاسما	خنثی	۲/۹	ENB	۹ ولت	۲۲	[۶۷]
فلوکستین ^۵	۴/۱	پلاسما	خنثی	۲/۹	ENB	۹ ولت	۱۲	[۶۷]
فلوکسامین ^۶	۳/۱	پلاسما	خنثی	۲/۹	ENB	۹ ولت	۱۷	[۶۷]
هالوپریدول ^۷	۳/۲	پلاسما	خنثی	۲/۰	ENB	۱۰ ولت	۴۲	[۶۵]
نالمفن ^۸	۲/۶۵	پلاسما - ادرار	اسیدی	۲/۰	NPOE+DEHP	۱۰۰ ولت	۹۵	[۷۵]
پروپرانولول ^۹	۳/۱۰	پلاسما - ادرار	اسیدی	۲/۰	NPOE	۲۰۰ ولت	۹۲	[۷۶]
دوکسپین ^{۱۰}	۳/۸۶	پلاسما - ادرار	اسیدی	۲/۰	NPOE	۲۴۰ ولت	گزارش نشده	[۷۷]

¹ Recovery (%)

² Amitriptyline

³ Amlodipine

⁴ Citalopram

⁵ Fluoxetine

⁶ Fluvoxamine

⁷ Haloperidol

⁸ Nalmefene

⁹ Propranolol

¹⁰ Doxepine

آنالیت	Log P	ماتریکس	فاز دهنده	فاز پذیرنده	حلال SLM	ولتاژ اعمال شده	درصد بازیابی	مرجع
لوپرامید ^۱	۵/۲	پلاسما	خنثی	۲/۰	ENB	۱۰ ولت	۲۹	[۶۵]
لوپرامید	۵/۲	خون	خنثی	۲/۰	ENB	۱۰ ولت	۱۹	[۶۵]
لوپرامید	۵/۲	ادرار	اسیدی	۲/۰	IPNB ^۲	۱۰ ولت	۵۰	[۷۰]
لوپرامید	۵/۲	شیر ^۳	اسیدی	۲/۰	IPNB	۱۰ ولت	۴۹	[۷۰]
متادون ^۴	۲/۱	پلاسما	خنثی	۲/۰	ENB	۱۰ ولت	۵۶	[۶۵]
متادون	۲/۱	ادرار	اسیدی	۲/۰	IPNB	۱۰ ولت	۴۸	[۷۰]
نورتریپتیلین ^۵	۱/۷	پلاسما	خنثی	۲/۰	ENB	۱۰ ولت	۴۰	[۶۵]
نورتریپتیلین	۱/۷	خون	خنثی	۲/۰	ENB	۱۰ ولت	۲۳	[۶۵]
نورتریپتیلین	۱/۷	ادرار	اسیدی	۲/۰	IPNB	۱۰ ولت	۴۱	[۷۰]
پتدین ^۶	۲/۷	پلاسما	خنثی	۲/۰	ENB	۱۰ ولت	۶۳	[۶۵]
پتدین	۲/۷	خون	خنثی	۲/۰	ENB	۱۰ ولت	۵۱	[۶۵]
پتدین	۲/۷	ادرار	اسیدی	۲/۰	IPNB	۱۰ ولت	۳۷	[۷۰]
تولترودین ^۷	۵/۷۷	پلاسما - ادرار	اسیدی	۰/۳	NPOE	۵۴ ولت	۶۲	[۷۸]
آمی تریپتیلین ^۸	۴/۹۲	پلاسما	اسیدی	۳/۲	NPOE	۲۵۰ ولت	۸۹	[۷۹]
سوفنتانیل ^۹	۳/۳۸	پلاسما - ادرار	اسیدی	۱/۰	NPOE	۱۹۰ ولت	۵۸	[۸۰]
دکسترومتورفان ^{۱۰}	۴/۱۱	پلاسما - ادرار	خنثی	۱/۰	NPOE	۱۱۰ ولت	۷۶	[۸۱]

همانطوری که مشاهده می‌شود، جدول بالا کاربردهای اخیر استخراج الکتروغشایی مربوط به آنالیزهای دارویی و بیومدیکال^{۱۱} را برجسته ساخته است. براساس نتایج بدست آمده از مطالعات متعدد، مناسب‌ترین و ایده‌آل‌ترین آنالیت‌ها برای EME، گونه‌ها و ترکیبات آلی کاتیونی و آنیونی با قطبیت پایین می‌باشند. برای برخی از گونه‌ها، درصد‌های بازیابی و گزینش‌پذیری مطلوب و بالایی مورد انتظار بوده است. برای ترکیبات با قطبیت خیلی زیاد، گونه‌های با بارهای چندگانه^{۱۲} و همچنین ترکیبات با وزن مولکولی بالا، استخراج الکتروغشایی چالش برانگیز بوده و دو پارامتر مهم بازیابی و گزینش‌پذیری ممکن است ایده‌آل و مطلوب نباشند. تحت شرایط بهینه، روش EME بازیابی‌ها و زمانهای استخراج قابل

¹ Loperamide

² Isopropyl nitrobenzene (IPNB)

³ Breast milk

⁴ Methadone

⁵ Nortriptyline

⁶ Pethidine

⁷ Tolterodine

⁸ Amitriptyline

⁹ Sufentanil

¹⁰ Dextromethorphan

¹¹ Pharmaceutical and biomedical analysis

¹² Multiple-charged species

مقایسه‌ای را با سایر تکنیکهای آماده‌سازی نمونه مانند استخراج مایع- مایع، استخراج فاز جامد و ریزاستخراج فاز مایع بر پایه‌ی فیبرهای توخالی را ارائه می‌کند؛ ولی پاکسازی (clean-up) حاصل از این روش بسیار راضی کننده‌تر است. هم چنین، کاربرد حلالهای آلی توسط این روش به حداقل مقدار خود می‌رسد. با این حال و مهمتر از همه، استفاده از یک پتانسیل الکتریکی در EME، امکان منحصر به فردی را در انطباق گزینش‌پذیری استخراج ارائه می‌کند که مشابه آن در روشهای سنتی استخراج، به راحتی قابل حصول نبوده است و نیست. در حیطه‌ی آنالیز دارویی، تعداد زیادی از داروهای اسیدی و بازی توسط این روش و در گستره‌ی وسیعی از قطبیت‌های دارویی استخراج شده‌اند و در شاخه‌ی آنالیز بیومدیکال و زیست‌پزشکی، آمینواسیدها^۱ و پپتیدها^۲ ترکیباتی هستند که تاکنون به طور موفقیت‌آمیزی با این روش استخراج شده‌اند.

به قطع و به یقین، لزوم استفاده از SLM و میدانهای الکتریکی، فرآیند آماده‌سازی و پیش‌تیمار نمونه را با استفاده از این روش، در مقایسه با روشهای LPME، ترسیب پروتئین^۳ و استخراج مایع- مایع پیچیده‌تر ساخته است. ولی آنچه که قابل توجه می‌نماید؛ این مهم است که نتایج منحصربفرد حاصل از این روش، ارزش دشواری شرایط آزمایشی پیچیده‌تر آن را به دوش می‌کشد. لذا کاربردهای آتی این روش ارزشمند می‌بایستی در سه موضوع مهم و اساسی متمرکز شود؛ (۱) کوچک‌سازی دستگاه‌ها، سیستم و تجهیزات مورد استفاده (۲) چگونگی بسط غشاهای مایع پایدار و با گزینش‌پذیری بالا و (۳) چگونگی پایداری تغییرات pH در سیستم در حین فرآیند استخراج.

۱-۶-۱-۲-۳-۳- پیشرفتهای اصلاحی غیردستگاهی اخیر در استخراج الکتروغشایی

تلاشهای بسیاری در چند سال گذشته برای بروزرسانی و اصلاح روش استخراج الکتروغشایی از مراحل بنیادی محدود به سمت درک تئوریک گسترش یافته است و حوزه‌های کاربردی جدیدی در این ارتباط پا به عرصه‌ی وجود گذاشته‌اند. در این بخش به چند پژوهش صورت گرفته‌ی اخیر برای اصلاح کارایی روش EME به‌ویژه در توسعه‌ی ترکیب و ساختار غشاهای مایع، اشاره‌ی کوتاهی شده است. یکی از شاخه‌های مهم در توسعه‌ی استخراج الکتروغشایی، اصلاح ساختار و ترکیب و همچنین بررسی- های تکنیکی جدید بر روی SLMهای بکارگرفته شده در این روش و در عین حال، نقش ولتاژ اعمالی در ترکیب با غشاهای مایع مختلف بوده است. همان طوری که قبلاً نیز مورد بحث قرارگرفت، هنوز هم فقدان اصول شفاف دانش نظری در مورد نقش یک غشای مایع تثبیت شده در فرآیند استخراج الکتروغشایی خودنمایی می‌کند. لذا جهت یافتن راه حل‌ها و روشهای اصولی‌تر برای این نقیصه و نیاز، مطالعات گسترده‌ای صورت گرفته است. از جمله‌ی این تلاشها یک مطالعه خلاقانه‌ای می‌باشد که اخیراً

¹ Amino acids

² Peptides

³ Protein precipitation

به چاپ رسیده است [۸۲]؛ که در آن غربالگری گسترده‌ای راجع به ترکیبات مختلف و متنوع SLM، از حلالهای آلی خالص گرفته تا حلالهای آلی با افزودنی‌های مختلف، مورد بررسی دقیق قرار گرفته است. در این مقاله کارایی استخراج غشاهای مایع تثبیت شده‌ی بکارگرفته روی هشت ترکیب مدل پیتیدی انجام شده است و نتایج جالبی حاصل شده است. همچنین یک رویکرد جدید در مورد نقش افزودنی‌ها و مواد اصلاحگر جامد در غشاهای مایع، توسط هاشمی نسب^۱ و همکارانش تبیین شده است [۸۳]. در این کار پژوهشی، یک فیبر توخالی پلی‌پروپیلنی که به صورت متداول در استخراجهای الکتروغشایی مورد استفاده قرار می‌گیرد، با یک فیبر اصلاح شده و تقویت شده^۲ با نانولوله‌های کربنی (CNTs) جایگزین شده است. جاذب حد واسطه جدید به منظور استخراج دو داروی اسیدی ضدالتهاب غیراستروئیدی^۳ (ایبوپروفن^۴ و ناپروکسن^۵) از پیکره‌های مختلف بیولوژیکی و محیطی مورد استفاده قرار گرفته است. به دلیل نسبت سطح به حجم بالای نانولوله‌های کربنی و همچنین ظرفیت جذب سطحی بالای ارائه شده توسط آنها، نتایج مطلوبی در افزایش ضرایب توزیع کلی آنالیت‌ها، فاکتورهای غنی‌سازی بالا و درصدهای بازیابی ایده‌آل در مقایسه با روشهای متداول استخراج الکتروغشایی، بدست آمده است. همچنین نتایج مشابهی در یک تحقیق موازی که توسط همان گروه صورت گرفته حاصل گردیده است، که در آن داروی بوپرنورفین^۶، توسط تلفیق نانولوله‌های کربنی با روش EME به خوبی از نمونه‌های ادرار استخراج شده است [۸۴]. در این روش، ترکیبات نانوساختار مورد استفاده پس از فرآیند عامل‌دار کردن اسیدی و قبل از تثبیت غشای مایع در دیواره‌ی فیبرهای مورد استفاده، در حلال آلی انتخابی پراکنده^۷ شده‌اند.

یک چالش دیگر در این زمینه، بررسی راهکارهای افزایش مقاومت مکانیکی SLM‌های مورد استفاده بوده است. با اینکه حلالیت ترکیبات آلی متداول مورد استفاده برای غشای مایع، در آب بسیار پایین می‌باشد، ولی با اینحال برخی از حلالها تحت شرایط همزدن و در حین اعمال میدان الکتریکی به محلول آبی نمونه نشت کرده‌اند [۸۵]. به نظر می‌رسد که در مقایسه با روشهای ساده‌ی EME، اصلاح کارایی روش با نانوساختارها و جاذب‌های جدید، درصدهای بازیابی بهتری را در زمانهای کوتاه‌تر سبب می‌شود؛ که بدون شک این مهم در نتیجه‌ی سطح موثر بالای سیستم‌های نانوساختاری می‌باشد. همچنین اخیراً نانولوله‌های کربنی برای استخراج الکتروغشایی دو فازي و به منظور استخراج دو داروی ترامادول^۸ و متادون در مایعات فیزیولوژیکی بدن و توسط آنالیز با دستگاه کروماتوگرافی گازی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. در این تحقیق، نانولوله‌های کربنی در حلال ۱- اکتانول پراکنده (دیسپرس) شده و این مخلوط

¹ Hasheminasab

² Reinforced

³ Nonsteroid anti-inflammatory drugs (NSAIDs)

⁴ Ibuprofen

⁵ Naproxen

⁶ Buprenorphine

⁷ Disperse

⁸ Tramadol

به‌طور همزمان به عنوان SLM و فاز پذیرنده مورد استفاده قرار گرفته است [۸۶]. تلفیق کاربردی نانوساختارها با روش استخراج الکتروغشایی سبب دربرگیری مزایای هر دو روش EME و SPME شده و درنهایت، افزایش سرعت استخراج و نتایج تجزیه‌ای شایسته‌ای را به همراه داشته است [۸۳].

درعین حال، کاربرد نانوذرات نقره^۱ (AgNPs) به صورت اتصال یافته به فیبرتوخالی پلی پروپیلنی به عنوان پوشش SLM توسط راموسپیان^۲ و همکارانش ارائه شده است [۸۷]. در این روش، حلال ۱- اکتانول به عنوان SLM مورد استفاده قرار گرفته و تکنیک تلفیق شده AgNPs-EME، به منظور استخراج برخی از داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی از حجمهای ۱۰ میلی‌لیتری از محلولهای آبی (pH=۱۲) به ۵۰ میکرولیتر فاز پذیرنده آبی (pH=۱۲)، در مدت زمان هفت دقیقه و با اعمال ولتاژ ۱۰ ولت، مورد استفاده قرار گرفته است. پژوهش‌های یاد شده نمایانگر این حقیقت هستند که در مقایسه با روشهای استخراج الکتروغشایی متداول و سنتی، اصلاح ساختار و ترکیب غشاهای مایع مورد استفاده در این روش با مواد نانوساختار منجر به استخراج سریع‌تر و کارآمدتر (۳۰ درصد کاهش در زمان استخراج) و افزایش عملکرد استخراج با ضرایب و فاکتورهای ۱/۲ الی ۲ برابر می‌شود.

۱-۶-۲- کاربرد مواد، ترکیبات و روشهای جدید برای آماده‌سازی و پیش‌تغلیظ نمونه‌ها در

تکنیکهای زیست تجزیه‌ای

آنالیز نمونه‌های بیولوژیکی به دو دلیل و موضوع مهم که اساساً مکمل یکدیگرند، فرآیندی دشوار و پیچیده محسوب می‌شود: الف) پیچیده بودن بیش از حد بسیاری از پیکره‌های بیولوژیکی و ب) لزوم اندازه‌گیری و تشخیص مقادیر ناچیز و محدود از مواد فعال و آلاینده‌ها به همراه عوامل مزاحم در چنین نمونه‌های پیچیده‌ای. لذا به منظور موفقیت در تلاش برای آماده‌سازی بهینه‌ی این دسته از نمونه‌ها و آنالیز دستگاهی آنها، معمولاً سه مرحله از اقدامات و روشهای تجزیه‌ای به همراه متدولوژی‌های جامع مورد نیاز و انتظار می‌باشد: پیش‌آماده‌سازی نمونه، جداسازی نمونه‌ها (اغلب با استفاده از یک تکنیک کروماتوگرافی) و در نهایت آنالیز کیفی و کمی آنالیت‌های هدف. از طرفی، به دلیل ماهیت پیچیده‌ی نمونه‌های زیستی و همچنین غلظت بسیار پایین قابل اندازه‌گیری ترکیبات هدف در چنین نمونه‌هایی، روشهای انتخابی آماده‌سازی نمونه جهت غلبه بر مشکلات تحمیل شده توسط محدودیت‌های مذکور، ضروری است. در طی دهه‌ی گذشته، روشها و مباحث نوین سنتز شیمیایی مانند سل-ژل^۳ و تکنولوژی حکاکی مولکولی^۴ توسعه یافته‌اند که امکان تهیه‌ی مواد و جاذب‌های جدیدی را برای اهداف آماده‌سازی نمونه فراهم ساخته‌اند. از جمله‌ی این ترکیبات جدید می‌توان به انواع نانوساختارها، نانوکامپوزیت‌ها^۵،

¹ Silver nanoparticles

² Ramos-Payán

³ Sol-gel

⁴ Molecularly imprinting technologies

⁵ Nanocomposite

انواع ترکیبات کربنی در ابعاد نانو و مشتقات آنها، نانومواد مغناطیسی، مایعات یونی^۱، سپارهای حکاکی مولکولی^۲ و بسیاری دیگر اشاره کرد. هم چنین روشهای آماده‌سازی نمونه در انواع متنوعی از گزینه‌های جدید، از سیالهای تحت فشار^۳ گرفته تا روشهای ریزاستخراج و همچنین روشهای مبتنی بر مایکروویو^۴ و نهایتاً سیستمهای کاملاً خودکارسازی شده‌ی آنلاین، توسعه یافته‌اند. با این حال تایید روشهای مذکور و غربالگری آنها، سبب گرایش به سمت استفاده از روشهای تهیه و آماده‌سازی نمونه بر مبنای مواد جاذب جامد و با هدف حصول گزینش‌پذیری مطلوب‌تر و بهتر در مراحل تجزیه‌ای و نیز آسان‌سازی مراحل بعدی آنالیز شده است. در نتیجه، روشها و مواد بسیار زیادی در طی چند سال گذشته در مراجع علمی ظاهر و معرفی شده‌اند که امکان تهیهی جاذب‌های بسیار کارآمد و موثری را برای تکنیکهای مدرن آماده‌سازی نمونه فراهم ساخته‌اند. در این بخش، مرور کوتاهی بر روشها و مواد جدید مورد استفاده در تکنیکهای خارج ستونی (off-line) آماده‌سازی نمونه و کاربردهای برجسته‌ی آنها در حیطه‌ی آنالیزهای زیستی ارائه شده است.

۱-۶-۲-۱- جاذبهای بر پایه‌ی روش سل-ژل

امروزه از تکنولوژی سل-ژل در برنامه‌های کاربردی متنوعی اعم از کاتالیز فرآیندهای شیمیایی، فناوری زیستی، رسانش دارو^۵ و تکنیک‌های جداسازی استفاده می‌شود [۸۸]. در زمینه‌ی آماده‌سازی نمونه، هدف اصلی از استفاده از این فناوری، رسیدن به مواد بسیار انتخابگر برای دستیابی به کارایی‌های بالاتر و کاهش اثرات زمینه^۶ می‌باشد. این رویکرد یک استراتژی پرتفردار به منظور توسعه‌ی جاذب‌های جدید برای فرآیند آماده‌سازی نمونه می‌باشد؛ چرا که طراحی و مهندسی پلیمرهای انتخابگر در این تکنولوژی میسر می‌باشد [۸۹]. فناوری سل-ژل بر اصول واکنش‌های هیدرولیز^۷ و چگالش^۸ آلکوکسید^۹های فلزی در حضور کاتالیزور و حلال‌های مناسب، قبل از شکل‌گیری شبکه‌ی پلیمری استوار بوده است که غالباً در شرایط واکنشی بسیار ملایم انجام می‌پذیرد [۹۰]. ویژگی‌های نهایی پلیمرها با انجام اصلاحات و طراحی‌های دقیق شرایط انجام واکنش در مراحل سنتز، نظیر نوع و غلظت آغازگرها، دما، حلال، کاتالیزور، pH، زمان واکنش و فرآیند خشک‌کردن نمونه، تعیین می‌شوند. به عنوان مثال، کاتالیزور اسیدی منجر به تولید زنجیره‌های پلیمری طولانی با اتصالات عرضی کم می‌شود؛ در حالیکه کاتالیزورهای بازی، به دلیل کارایی بالاتر در فرآیند هیدرولیز، زنجیره‌های پلیمری با اتصالات عرضی زیاد

¹ Ionic liquids

² Molecularly imprinted polymers

³ Pressurized fluids

⁴ Microwave

⁵ Drug delivery

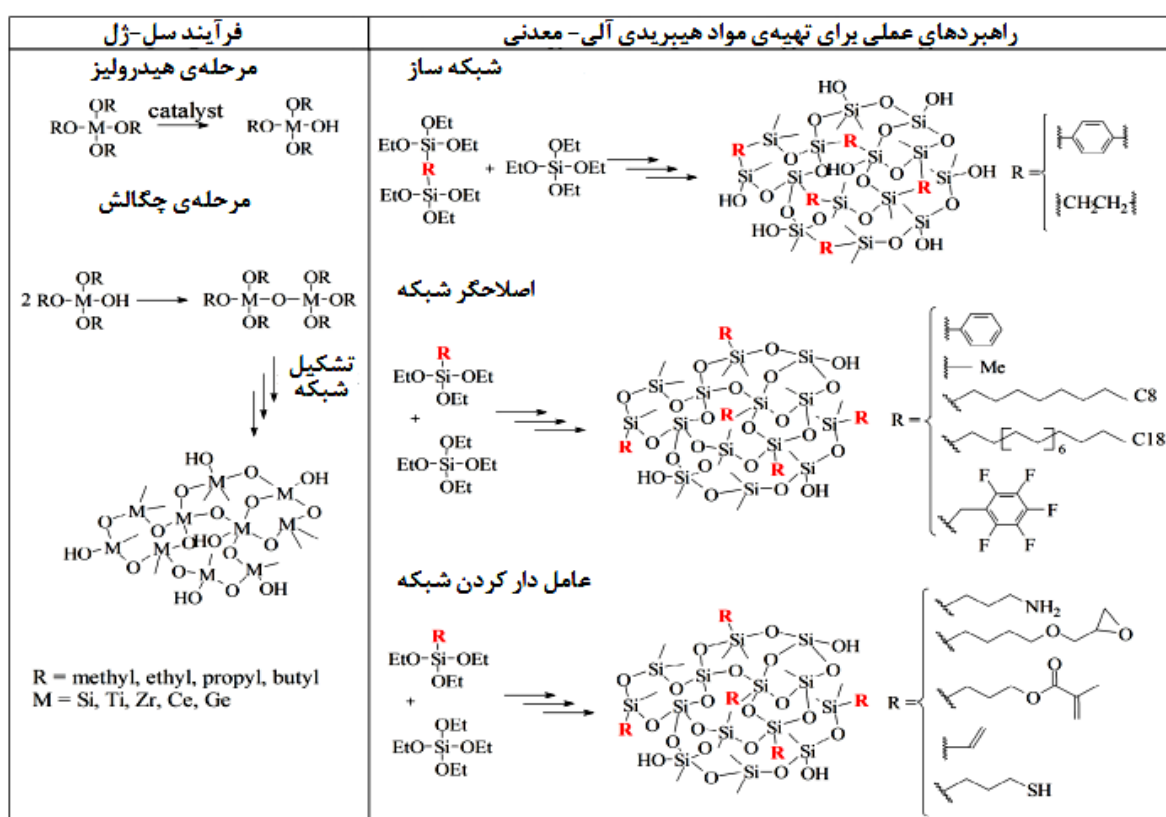
⁶ Matrix effect

⁷ Hydrolysis

⁸ Condensation

⁹ Alkoxides

ایجاد می‌کند [۹۱]. مطابق مستندات منتشر شده، اگرچه در ساخت مواد جاذب از اکسیدهای معدنی (تیتانیوم و زیرکونیوم) و بعضاً از مخلوط پلیمرهای معدنی استفاده می‌شود؛ ولی غالباً برای تهیه‌ی مواد جاذب در پروسه‌های جداسازی از ترکیبات با پایه‌ی سیلیکا (SiO_2) بهره‌گرفته می‌شود [۹۱، ۹۲]. از طرف دیگر، جاذب‌های بدست آمده از مواد هیبریدی^۱ به عنوان یک زمینه‌ی تحقیقاتی جذاب مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است؛ چرا که این دسته از ترکیبات با تغییر مهندسی شده‌ی قطبیت و انتخابگری، کارایی به مراتب توسعه‌یافته‌تری را برای جاذب ایجاد می‌کنند. این گروه از پلیمرهای هیبریدی که از واکنش آغازگرهای آلی و معدنی تهیه می‌شوند، در سه زیرگروه سازنده‌های شبکه^۲ (شبکه‌سازها)، پلیمرهای اصلاحگر^۳ و شبکه‌های عاملدارکننده^۴ طبقه‌بندی می‌شوند (شکل ۱-۸).



شکل ۸-۱- فرآیند سل-ژل و استراتژی‌های مختلف برای تهیه‌ی مواد هسپریدی آلی- معدنی [۹۳].

- ¹ Hybrid materials
- ² Builder network
- ³ Modifier polymer
- ⁴ Network functionalizer

به عنوان مثال، اتصال دو مولکول تری‌آلکوکسی‌سیلان^۱ با یک گروه آلی (به عنوان پل ارتباطی)، بخشی از یک توده‌ی پلیمر در نظر گرفته می‌شود. چنانچه گروه آلی برای اتصالات بیشتر در دسترس نباشد، پلیمر را اصلاح‌گر می‌نامند. به طریق مشابه، در صورتیکه ترکیبات آلی آغازگر دارای گروه‌های عاملی فعال باشند (آمین^۲، اپوکسی^۳، آلکن^۴، تیول^۵ و کربونیل^۶) و این عوامل فعال، جایگاه انجام واکنش-های شیمیایی باشند، به آنها عامل‌دارکننده‌ی شبکه اطلاق می‌شود [۹۴]. بر اساس تعداد زیاد آغازگرهای آلی و معدنی مورد استفاده، امکان سنتز جاذب‌های هیبریدی مختلف و با ویژگی‌های متنوع وجود دارد (جدول ۱-۳).

در سال ۲۰۱۵ نذاف^۷ و همکارانش از نانولوله‌های کربنی اصلاح شده با کِگین پلی‌اکسومتالات^۸ درون پلیمر سیلیکا برای اندازه‌گیری ناپروکسین در نمونه‌های مو استفاده کردند. بکارگیری ریزاستخراج فاز جامد بر پایه‌ی فیبر توخالی^۹ (HF-μ-SPE) ترکیب شده با طیف سنجی فلورسانس (FS)، حد تشخیص ۷۲ نانوگرم بر لیتر را نشان می‌داد [۹۵]. در تحقیقی دیگر، تیتانیوم به عنوان آغازگر برای تهیه‌ی کامپوزیت نانوفیبرسرامیکی بکار گرفته شد. باقری^{۱۰} و همکارانش در این پژوهش از جاذب نانوفیبرسرامیکی برای میکرواستخراج فاز جامد جفت شده با کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (μ-SPE-HPLC) به منظور اندازه‌گیری ناپروکسن و کلسترول^{۱۱} موجود در نمونه‌های ادرار و پلاسما استفاده کردند؛ که به حد تشخیص‌های به ترتیب ۰/۳ و ۲ میکروگرم بر لیتر دست یافتند [۹۶]. برای استخراج یونی^{۱۲}، ژانگ^{۱۳} و همکارانش یک نانوپلیمر TiO₂/SiO₂ به صورت اصلاح شده‌ی شیمیایی با ۴-آمینوفنیل‌آرسونیک اسید^{۱۴} را برای استخراج فاز جامد (SPE) آلومنیوم در نمونه‌های ادرار انسان معرفی کردند که برای اندازه‌گیری از تکنیک دستگاهی ICP-OES بهره‌گرفته شده است [۹۷].

آلکوکسی‌سیلان‌ها از جمله آغازگرهای سیلیکاته^{۱۵} می‌باشند که به دلیل حضور مقادیر پایین فلز در شبکه‌ی پلیمری، کاربرد وسیعی در فرآیند سل-ژل دارند. با این حال، سایر آغازگرهای سیلیکاته نیز

¹ Trialkoxysilane

² Amine

³ Epoxy

⁴ Alkene

⁵ Thiol

⁶ Carbonyl

⁷ Naddaf

⁸ Keggin polyoxometalate

⁹ Hollow-fiber micro-solid phase extraction

¹⁰ Bagheri

¹¹ Clobetasol

¹² Ion extraction

¹³ Zheng

¹⁴ 4-aminophenylarsonic acid

¹⁵ Silica precursors

مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته‌اند. نازریو^۱ و همکارانش در سال ۲۰۱۴، جاذب C18 را با استفاده از محلول سیلیکات به عنوان پیش‌ماده تهیه کردند. این پژوهشگران، جاذب مذکور را برای استخراج فاز جامد (SPE) آفلاین فلوکستین و نوروفلوکستین^۲ در پلاسمای انسان مورد استفاده قرار دادند [۹۸].

مراجعه به منابع علمی نشان می‌دهد که از فناوری سل-ژل در فرآیندهای استخراج غشایی نیز با هدف دسترسی به جاذب‌های جدید، استفاده شده است. در همین زمینه لیانگ^۳ و همکارانش، غشاء هیبریدی پلی‌وینیلیدن‌فلوراید/سیلیکات^۴ (PVDF/SiO₂) را برای جداسازی پروتئین‌های آلبومین-سر-گاوی^۵ و هموگلوبین-گاوی^۶ معرفی نمودند [۹۹]. کومار^۷ و همکارانش، از فرآیند سل-ژل برای ساخت غشای سلولزی پوشش‌یافته با پلی‌تتراهیدروفوران^۸ برای استخراج ۱۷ α -تینیل‌استرادیول^۹، بتا-استرادیول^{۱۰} و بیسفنول A^{۱۱} از نمونه‌های ادرار استفاده نمودند (شکل ۱-۹). جاذب جدید مورد استفاده در این پژوهش پایداری شیمیایی بسیار خوبی را نشان می‌داد که این امر ناشی از تشکیل پیوندهای کووالانسی بین آغازگر سیلیکات و الیاف سلولز می‌باشد. فاکتور تغلیظ بدست آمده در این پژوهش ۱۴ برابر بوده و حد تشخیص در گستره‌ی ۲۰ تا ۴۲ نانوگرم در لیتر گزارش شده است [۱۰۰]. در جدول زیر، به بخشی از گزارشات منتشر شده در منابع متعدد علمی، توسط استفاده از جاذب‌های تهیه شده بر پایه-ی روش سل-ژل به همراه کاربردها، تکنیک‌های بکار رفته و همچنین نتایج تجزیه‌ای آنها اشاره شده است.

¹ Nazario

² Fluoxetine and norfluoxetine

³ Liang

⁴ Polyvinylidene fluoride/silica

⁵ Bovine serum albumin

⁶ Bovine hemoglobin

⁷ Kumar

⁸ Polytetrahydrofuran (poly-THF)

⁹ 17 α -ethynylestradiol

¹⁰ β -estradiol

¹¹ Bisphenol A

جدول ۱-۳- مروری بر جاذب‌های تهیه شده با روش سل-ژل، گزارش شده در مراجع علمی به منظور استفاده در آماده‌سازی و پیش‌تغلیظ آنالیت‌ها و نمونه‌های مختلف از پیکره‌های بیولوژیکی.

پیش ماده‌ها و آغازگر	آنالیت	ماتریکس	روش آماده‌سازی نمونه	روش تجزیه‌ای	LOQ (ng/mL)	درصد بازیابی	مرجع
MWCNTs, K7[PW11NiO40], TEOS	ناپروکسن	مو	HF-μ-SPE	FL	۲۴	۹۵-۱۰۳	[۹۵]
TTIP, PVP, Mn, Fe, Ni, Co	ناپروکسن-کلسترول	پلاسما-ادرار	μ-SPE	HPLC-UV	۵ و ۱	۵۵-۹۴	[۹۶]
MTMS, TTIP, APTMS, 4-APAA	آلمونیوم	بیولوژیکی	SPE	ICP-OES	۰/۰۶	۹۶-۱۰۱	[۹۷]
MTMS, poly-THF	استروژنها ^۱	ادرار	استخراج غشایی	HPLC-FLD	۰/۰۶۶-۰/۱۴	۹۰-۹۱	[۱۰۰]
سدیم سیلیکات ^۲	فلوکستین	پلاسمای انسان	SPE	HPLC-UV	۱۵	۸۵-۱۰۵	[۹۸]
OH-PDMS, PMHS	بلاکرها ^۳	بزاق	SPME	GC-MS/MS	۰/۵-۱	۱۰۵-۱۲۰	[۱۰۱]
TMOS, TEOS, APTES, EDS	آدنوزین ^۴	پلاسمای انسان	SPME	HPLC-MS/MS	۱/۵	۸۱-۸۴	[۱۰۲]
TEOS, C18	بنزودیازپین ^۵ ها	پلاسمای انسان	SPME	HPLC-MS/MS	۱/۵-۲/۵	۱۱-۸۳	[۱۰۳]
MTMOS, CNPrTEOS	NSAIDs ^۶	ادرار	SBSE ^۷	<u>CE-UV</u>	۳۵-۴۱	۸۳-۹۹	[۱۰۴]

4-APAA = 4-aminophenylarsonic acid; APTES = (3-Aminopropyl) triethoxysilane; APTMS = aminopropyltrimethoxysilane; CNPrTEOS = 3-cyanopropyltriethoxysilane; EDS = 1-ethyl-3(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide; FL= fluorescence spectrophotometry; MTMS = methyltrimethoxysilane; MWCNT = multiwalled carbon nanotube; NSAIDs = non-steroidal anti-inflammatory drugs; OH-PDMS = hydroxyl-terminated polydimethylsiloxane; PMHS = polymethylhydrosiloxane; poly-THF = polytetrahydrofuran; PVP = poly(vinylpyrrolidone); TEOS = tetraethoxyorthosilicate; TMOS = tetramethylorthosilicate; TTIP = titanium(IV) tetraisopropoxide.

¹ Estrogens

² Sodium silicate

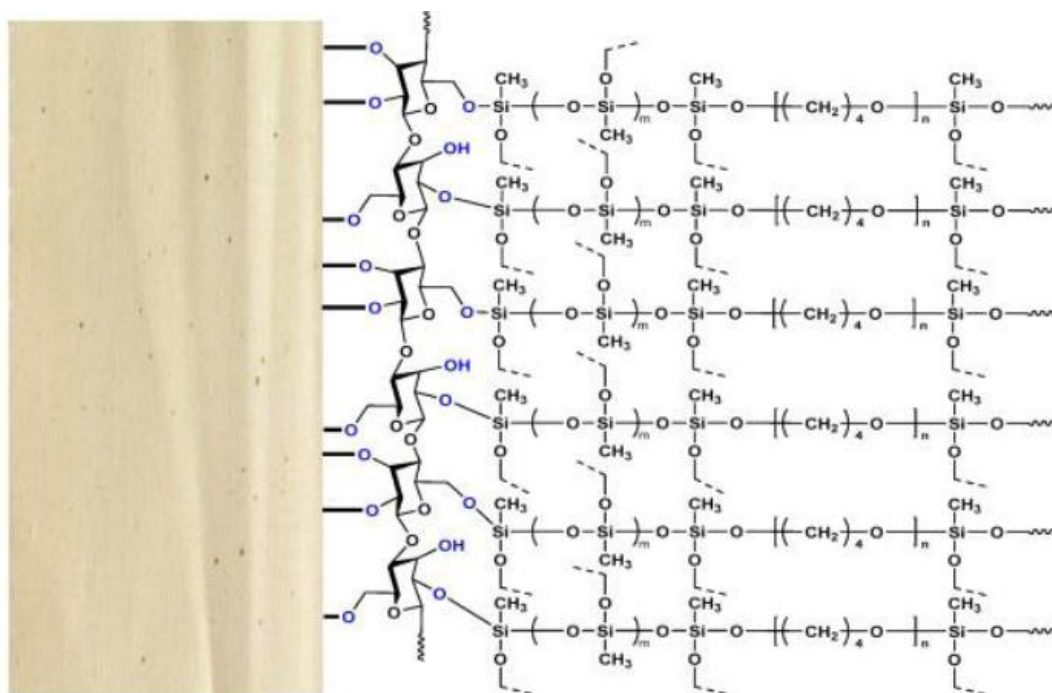
³ Blockers and agonists drugs

⁴ Adenosine

⁵ Benzodiazepines

⁶ Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)

⁷ Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE)



شکل ۱-۹- پوشش پلی‌تتراهیدروفوران (poly-THF) تهیه شده با روش سل-ژل بر روی سطح یک غشای سلولزی [۱۰۰].

فیبرهای SPME پوشش یافته‌ی تجاری (نظیر دی‌وینیل‌بنزن^۱، کربوکسن^۲، پلی‌اتیلن‌گلیکول^۳ و پلی‌آکریلات^۴) و ترکیبی از آن‌ها، اغلب جوابگوی استخراج آنالیت‌ها با قطبیت‌های متمایز می‌باشند [۱۰۵]. با این وجود، برای این فیبرها برخی محدودیت‌ها مانند زمان ماندگاری کم، حساسیت استخراج ضعیف، پایداری حرارتی محدود و آماس‌شدگی^۵ (تورم) در حضور حلال‌های آلی عنوان می‌شود [۱۰۶]. چانگ^۶ و همکارانش اولین مقاله درباره‌ی استفاده از فناوری سل-ژل برای تهیه‌ی جاذب SPME را منتشر کردند [۱۰۷]. فیبر متیل‌تری‌متوکسی‌سیلان/پلی‌دی‌متیل‌سیلوکسان^۷ هیدروکسیله شده، پایداری حرارتی تا ۳۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد را نشان می‌داد و بنابراین قابلیت استفاده از این فیبر برای آنالیت‌های با فشار بخار پایین را فراهم نموده است. در تحقیقی دیگر، لیو^۸ و همکارانش فیبر SPME متیل‌تری-متوکسی‌سیلان/پلی‌متیل‌هیدروکسی‌سیلوکسان تهیه شده با روش سل-ژل را توسعه داده‌اند که برای آنالیز β -بلاکرها^۹ و β -آگونیست‌ها^{۱۰} مورد استفاده قرار گرفته است [۱۰۱]. در سال ۲۰۱۳،

¹ Divinylbenzene - DVB

² Carboxen - CAR

³ Polyethylene glycol - PEG

⁴ Polyacrylate - PA

⁵ Swelling

⁶ Chong

⁷ Hydroxylated polydimethylsiloxane/ methyltrimethoxysilane

⁸ Liu

⁹ β -blockers

¹⁰ β -agonists

سرافراز یزدی^۱ و همکارانش، یک جاذب پلی‌اتیلن‌گلیکول/نانولوله‌های کربنی (PEG/CNT) را برای استخراج آمین‌های تک حلقه‌ای^۲ در نمونه‌های ادرار گزارش کردند [۱۰۸]. نتایج حاصل از این پژوهش ثابت می‌کند که فیبر تهیه شده از PEG/CNT کارایی به مراتب بالاتری از PEG داشته و درصد بازیابی جاذب پیشنهادی بالاتر از ۶۳٪ بود. در سال ۲۰۱۵ در یک کار پژوهشی انجام شده توسط همان گروه، فیبر SPME برپایه‌ی استفاده از PEG و نانوذرات اکسید مس برای استخراج بنزن^۳، تولوئن^۴، اتیل‌بنزن^۵، زایلن^۶ در نمونه‌های موی انسان مورد ارزیابی قرار گرفته است که قابلیت تشخیص این آنالیت‌ها تا سطح نانوگرم در لیتر را ارائه می‌دهد [۱۰۹].

همچنین مطالعات انجام شده در پایگاه‌های علمی معتبر نشان می‌دهد که از فناوری سل-ژل به منظور بهبود جداسازی ترکیبات قطبی و توسعه‌ی انتخابگری فرآیند جداسازی در تکنیک میله‌ی-چرخان^۷ نیز استفاده شده است [۱۱۰]. در گزارشی دیگر، فان^۸ و همکارانش با استفاده از فناوری سل-ژل، اقدام به تهیه‌ی یک جاذب میله‌ی چرخان (PEG/OH-PDMS/ γ -MPTS^۹) نمودند که از آن برای جداسازی تیروکسین‌های آمفوتری^{۱۰} و متابولیت‌های آن در نمونه‌های ادرار انسان استفاده کردند [۱۱۱]. بازده بدست آمده از روش پیشنهادی این محققین، بسیار بالاتر از جاذب‌های تجاری و دیگر جاذب‌های ساخته شده از تک-تک پیش ماده‌های طرح پیشنهادی بود.

در پژوهش دیگری که با استفاده از دستگاه الکتروفورز موئین در سال ۲۰۱۵ انجام شده است، از آغاز گر^۳-سیانوپروپیل‌تری‌اتوکسی‌سیلان^{۱۱} به منظور تهیه‌ی یک پلیمر هیبریدی به عنوان جاذب میله‌ی چرخان پوشش‌یافته برای استخراج داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی از نمونه‌های ادرار انسان بهره گرفته شده است؛ که از جمله خصوصیات روش پیشنهادی، درصدهای بازیابی ۸۳/۵-۹۸/۹٪ و خطای کوچکتر از ۶٪ را می‌توان عنوان کرد [۱۰۴]. همچنین یک تحقیق دیگر با توسعه‌ی تکنیک جاذب میله‌ی چرخان پوشش‌یافته با ترکیب نانوذرات تیتانیوم اکسید/پلی‌استیرن سولفون‌شده^{۱۲} برای اندازه‌گیری برخی از آمینواسیدها و اولیگوپپتیدها^{۱۳} در نمونه‌های بیولوژیکی گزارش شده است [۱۱۲].

¹ Sarafraz-Yazdi

² Monocyclic amines

³ Benzene

⁴ Toluene

⁵ Ethylbenzene

⁶ Xylene

⁷ Stir bars

⁸ Fan

⁹ Gamma-methacryloxypropyltrimethoxysilane

¹⁰ Amphoteric thyroxines

¹¹ 3-cyanopropyltriethoxysilane (CNPrTEOS)

¹² Sulfonated polystyrene/TiO₂

¹³ Oligopeptides

۱-۶-۲- کاربرد مایعات یونی در روشهای پیش‌تغلیظ و آماده‌سازی نمونه

در سال‌های اخیر، تلاش‌ها برای بهره‌گیری از مایعات یونی در تکنیک‌های آماده‌سازی نمونه در حوزه‌های مختلف زیست محیطی، بیولوژیکی، صنایع غذایی، بالینی، پزشکی و دیگر زمینه‌ها افزایش یافته است [۱۱۳-۱۱۵]. مایعات یونی در حقیقت نمک‌هایی هستند که در دمای اتاق (25°C) مایع بوده، در حالیکه نقطه جوشی کمتر از 100°C درجه‌ی سانتی‌گراد را دارند [۹۳]. برتری مایعات یونی بر سایر فازهای استخراج کننده را به ساختار شیمیایی این ترکیبات نسبت می‌دهند. این دسته از مواد از کاتیون‌های آلی (مشتق شده از بازهای لوئیس^۱) و آنیون‌های چنداتمی با ساختارهای آلی و معدنی متفاوت تشکیل شده‌اند [۹۳]. به دلیل قابلیت ترکیب آنیون‌ها و کاتیون‌های متفاوت در این مایعات، در برخی از مراجع علمی به آن‌ها لقب "حلال‌های قابل طراحی"^۲ اطلاق شده است. همچنین امتزاج‌پذیری با آب و یا سایر حلال‌های آلی در کنار گرانروی قابل کنترل، این لقب را برای آن‌ها توجیه‌پذیر کرده است [۱۱۶]. کاربرد اصلی مایعات یونی در شیمی تجزیه به تکنیک‌های جداسازی انتخاب شده وابسته است؛ خواه این ترکیب به عنوان فاز ساکن در HPLC یا GC مورد استفاده قرارگیرد و یا به عنوان پوششی برای فیبرهای SPME و در عین حال به عنوان حلال استخراج کننده در LLE و DLLME^۳، و خواه در نقش اصلاح‌گر الکتروود و یا جاذب در روشهای SPE ظاهر شود، همگی جزو کاربردهای تجزیه‌ای این حلالهای سبز و ارزشمند محسوب می‌شوند [۱۱۷].

مکانیسم‌های استخراجی مایعات یونی بصورت جامع توسط گروه آرمسترانگ^۴ مورد بررسی قرار گرفته است [۱۱۸]. این گروه در پژوهش خود رفتارهای ۳۸ ترکیب آلی را در آب/[PF₆][C₄MIM] و در اکتانول/[PF₆][C₄MIM]، هدف مطالعه‌ی خود قرار دادند. نتایج بدست آمده، نشان می‌داد که مکانیسم استخراج با استفاده از مایعات یونی بر اساس فرآیند توزیع و تفکیک برای ترکیبات آلی و فرآیند مبادله‌ی یون برای یون‌های فلزی می‌باشد. همچنین یافته‌های آن‌ها نشان می‌داد که در برخی موارد استثناء، هر دو مکانیسم در پروسه‌ی استخراج نقش ایفا می‌کنند. استفاده از مایعات یونی در تکنیک‌های آماده‌سازی نمونه در دو حوزه بیشتر مورد توجه قرار گرفته است؛ تکنیک‌های بر پایه‌ی استخراج فازهای مایع نظیر (LLME, SDME, HF-LPME, DLLME) و استخراج‌های بر اساس فازهای جاذب جامد مانند (MDSPE^۵, MEPS^۶, PT-SPE^۷) و غیره [۱۱۹].

^۱ Lewis bases

^۲ Designable solvents

^۳ Dispersive liquid-liquid microextraction

^۴ Armstrong's group

^۵ Matrix dispersion solid phase extraction

^۶ Microextraction by packed sorbent

^۷ Pipette tip solid-phase extraction

اخيراً گزارش‌هایی با بهره‌گیری از مایعات یونی در تکنیک میکرواستخراج مایع-مایع پخشی^۱ برای اندازه‌گیری‌های نمونه‌های بیولوژیکی گزارش شده است. در روش IL-DLLME، از یک مخلوط حاوی مقدار جزئی از مایع یونی به عنوان حلال استخراج کننده و یک حلال پخش‌کننده برای استخراج و پیش‌تغلیظ ترکیبات هدف استفاده می‌شود [۱۲۰]. لی^۲ و همکارانش از تکنیک IL-DLLME برای اندازه‌گیری و ارزیابی باقیمانده‌ی ایربساتان^۳ و والسارتان^۴ در نمونه‌های ادرار انسان استفاده کردند [۱۲۱]. این تحقیق با مقایسه‌ی مایعات یونی مختلف ($[C_2MIM][PF_6]$ ، $[C_4MIM][PF_6]$ و $[C_8MIM][PF_6]$)، مقادیر بهینه، نوع و حجم حلال پخش‌کننده در استخراج را مورد مطالعه قرار می‌دهد.

یکی دیگر از کاربردهای جذاب برای استفاده از مایعات یونی در روشهای آماده‌سازی نمونه توسط سان^۵ و همکارانش معرفی شده است [۱۲۲]. آنها دریافتند که استفاده از دماهای بالا، قدرت پخش-شدگی مایعات یونی در محیط‌های مایی را بالا برده و از این طریق حجم مورد استفاده از مایع یونی در فرآیندهای استخراج، به طرز معنی‌داری کاهش می‌یابد. این تکنیک که بصورت اختصاری TC IL-DLLME نامیده می‌شود، ریزاستخراج مایع-مایع پخشی با مایع یونی در شرایط کنترل شده‌ی دمایی می‌باشد. در این پژوهش، از ۱- هگزیل-۳- متیل‌ایمیدازلیوم‌هگزا فلوروفسفات^۶ به عنوان حلال استخراج‌کننده برای اندازه‌گیری داروی پیروکسیکام^۷ در نمونه‌های بیولوژیکی و اشکال دارویی استفاده شده است و محققان آن، در دمای ۴۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به حد تشخیص ۰/۰۴۶ میلی‌گرم در لیتر دست یافته‌اند. در همان مقاله، یک روش برای اندازه‌گیری پلاستی‌سایزر DEHP و متابولیت آن مونو(۲- اتیل‌هگزیل) فتالات^۸ (MEHP) در نمونه‌های ادرار انسان گزارش شده است که در آن از دو نوع مایع یونی $[C_8MIM][PF_6]$ و $[C_6MIM][PF_6]$ استفاده شده بود. حد تشخیص برای اندازه‌گیری DEHP و MEHP به ترتیب ۳/۲ و ۰/۹۶ میلی‌گرم در لیتر گزارش گردیده است [۱۲۲].

شایان ذکر است که استفاده از مایعات یونی برای اندازه‌گیری مقادیر آثار ترکیبات معدنی و آلی در تکنیک HF-LPME به نتایج بسیار عالی مَنج شده است. معمولاً در این تکنیک‌ها، مایعات یونی در یک فیبر توخالی تثبیت شده و نگه‌داشته می‌شوند و یا به عنوان گونه‌ی حد واسطه حامل بکار برده می‌شوند.

¹ Dispersive Liquid Liquid microextraction

² Li

³ Irbesartan

⁴ Valsartan

⁵ Sun

⁶ 1-hexyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate

⁷ Piroxicam

⁸ Mono (2-ethylhexyl) phthalate (MEHP)

به عنوان مثال، در سال ۲۰۱۰، منظوری^۱ و همکارانش از روش HF-LPME برای اندازه‌گیری سرب و نیکل در نمونه‌های زیست‌محیطی و بیولوژیکی استفاده کرده‌اند [۱۲۳].

مروری جامع‌تر بر مقالات و مراجع علمی، کاربردهای دیگری از مایعات یونی از جمله استفاده در تکنیک استخراج الکتروغشایی را ارائه می‌دهد. به عنوان نمونه، شی^۲ و همکارانش در یک پژوهش ثابت کردند که استفاده از IL-EME (استخراج الکتروغشایی با استفاده از مایعات یونی به عنوان SLM) به جای روش رایج EME برای اندازه‌گیری استریچنین^۳ و بروسین^۴ در نمونه‌های ادرار انسان، کارایی استخراج را بسیار بهبود می‌بخشد [۱۲۴].

مایعات یونی همچنین به عنوان یک استراتژی مناسب و جایگزین، جهت عامل‌دارکردن مواد گوناگون نظیر ذرات سیلیکا، پلیمرها، گرافن^۵، نانولوله‌های کربنی، سیلیکای گداخته و نانوذرات مغناطیسی با هدف استفاده از خصوصیات ویژه‌ی آن‌ها، بکار گرفته شده‌اند. اگرچه مایعات یونی با داشتن ویژگی‌هایی منحصر بفرد، نظیر پایداری شیمیایی و حرارتی بالا که منجر به افزایش کارایی فرآیندهای استخراج می‌شود، می‌توانند به عنوان ترکیباتی کارآمد برای اهداف استخراج و پیش‌تغلیظ انتخابی محسوب شوند؛ ولی تاکنون مطالعات محدودی درباره‌ی کاربرد آنها به عنوان جاذب و یا اصلاح‌گر برای آماده‌سازی نمونه‌های زیستی گزارش شده است. آنچه که در این مقوله حائز اهمیت می‌باشد این است که از میان طیف وسیعی از مایعات یونی در دسترس، گونه‌هایی که حاوی کاتیون ایمیدازولیوم^۶ هستند، اغلب برای آنالیز نمونه‌های زیستی مورد استفاده قرار می‌گیرند. این مواد جاذب، عموماً برای تعیین آنالیت‌های نیمه‌قطبی و یا غیرقطبی موجود در نمونه‌ها بکار برده می‌شوند [۱۳۰-۱۲۵].

اخیراً بهره‌گیری از مایعات یونی به عنوان پوشش در تکنیک SPME مورد توجه ویژه‌ی محققین قرار گرفته است. این جذابیت، از پایداری حرارتی بالا و همچنین قابلیت تغییر آسان در ساختار مایع یونی برای دستیابی به کارایی بالاتر، ناشی می‌شود. آرمسترانگ و اندرسون^۷ از یک مایع یونی در فیبرهای جدید برای کاربردهای مختلف از جمله اندازه‌گیری مخلوط‌های حاوی ترکیبات آب‌گریز و نیمه قطبی استفاده نموده‌اند [۱۳۱، ۱۳۲].

به عنوان مثالی دیگر، هی^۸ و همکارانش در سال ۲۰۰۹، فیبر SPME جدیدی با اتصال مایع یونی [EeMim][NTf₂] بر روی سطح سیلیکای گداخته معرفی کرده و از آن برای اندازه‌گیری متامفتامین^۱ و

¹ Manzoori

² Shi

³ Strychnine

⁴ Brucine

⁵ Graphene

⁶ imidazolium cation

⁷ Anderson

⁸ Hi

آمفتامین^۲ در نمونه‌های ادرار انسان استفاده کردند [۱۳۳]. همچنین در سال ۲۰۱۱ ابراهیمی^۳ و همکارانش، اقدام به سنتز نانوذرات با استفاده از مایعات یونی نموده و در مرحله‌ی بعدی، این نانوذرات را به درون فیبر توخالی پلی‌پروپیلنی تعبیه نمودند [۱۱۳]. این محققین سپس از جاذب آماده شده، برای تکنیک IL-LPME جهت اندازه‌گیری آفت‌کش‌ها^۴ در نمونه‌ی موی انسان استفاده کردند. نوآوری معرفی شده در این پژوهش، استفاده از مایعات یونی برای سنتز نانوذرات و بارگذاری آن‌ها در درون فیبرهای توخالی بوده که منجر به فاکتورهای پیش‌تغلیظ بسیار مطلوبی شده بود.

تطبیق‌پذیری و سازگاری مایعات یونی، این دسته از مواد را به ترکیباتی پرتعداد برای تکنیک‌های مختلف آماده‌سازی نمونه تبدیل کرده است. معرفی مایعات یونی در کوچک‌سازی و مینیاتوریزه کردن روش‌های آماده‌سازی به‌مراه توسعه‌ی پارامترهای تجزیه‌ای نظیر انتخاب‌گری مطلوب و حساسیت فوق‌العاده، در کنار فاکتورهای تغلیظ و پیش‌تغلیظ بهبود یافته، افق جدیدی از کاربرد مواد دوست‌دار محیط زیست را نزد محققین علوم زیستی و تجزیه‌ای گشوده است. علیرغم این خصوصیات منحصر بفرد، استفاده از مایعات یونی در تکنیک‌های برپایه‌ی جاذب‌ها در مقابل استخراج‌های مایع-مایع کمتر مورد پذیرش قرار گرفته است. برای بررسی جامع‌تر روش‌های گزارش شده در منابع علمی بر پایه‌ی کاربرد مایعات یونی در تکنیک‌های نوین پیش‌تغلیظ و آماده‌سازی نمونه‌های بیولوژیکی، مطالعه‌ی مراجع [۸۹، ۹۳] توصیه می‌شود.

۱-۶-۲-۳- پیشرفتهای اخیر در کاربرد نانوذرات و سایر نانو ساختارها در تکنیکهای آماده‌سازی نمونه

همگام با آهنگ شتابناک رشد و توسعه‌ی فناوری نانو در علم مواد، بسیاری از محصولات این رویکرد علمی (علی‌الخصوص انواع نانو ساختارها) با کاربردهای ویژه و مفید، در شیمی تجزیه و علوم جداسازی تجزیه‌ای مورد استفاده و بهره‌برداری قرار گرفته و توسعه یافته‌اند. با بهره‌جستن از نسبت سطح به حجم بالا که عمدتاً به عنوان بارزترین خصیصه‌ی این ترکیبات مهم تلقی می‌شود؛ و همچنین مدنظر قرار دادن برخی دیگر از خصوصیات آنها همچون ویژگی‌های منحصر به فرد و بی‌نظیر فیزیکی و شیمیایی، فعالیت‌های سطحی افزایش یافته و غیره، پتانسیل بالای این مواد برای کاربردهای آماده‌سازی موثر و سریع نمونه‌های مختلف زیست محیطی و بیولوژیکی، به شدت مورد استقبال پژوهشگران قرار گرفته است. در این بخش، تلاش شده است تا برخی از کاربردهای اخیر نانومواد مختلف در روشهای پیش‌تغلیظ و آماده‌سازی نمونه از پیکره‌های زیستی، مورد اشاره و بحث قرار گیرد. عمدتاً دو دسته‌ی نانومواد و مواد متخلخل به دلیل ویژگی‌های غیرمعمول خود، در تکنیک‌های آماده‌سازی و پیش‌تیمار نمونه‌های متنوع، مورد ارزیابی و استفاده قرار می‌گیرند. ترکیبات گوناگون و نیز امکان عامل‌دار کردن انتخابی این مواد،

¹ Methamphetamine

² Amphetamine

³ Ebrahimi

⁴ Pesticides

حیطه‌ی استفاده از آنها را در کاربردهای تجزیه‌ای پررنگ‌تر ساخته است. همچنین اندازه، شکل و مورفولوژیهای متنوع نانوذرات به همراه آرایه‌های واضح و مجزای مواد متخلخل و نیز امکان به‌گزینی ساختاری آنها، توانایی قابل وصفشان را در تکنیکهای مذکور به رخ کشیده است. کاربرد این دسته از ترکیبات در روشهای آماده‌سازی و پیش‌تغلیظ، از چندین جنبه قابل بررسی و طبقه‌بندی است که از جمله‌ی آنها می‌توان به ترکیب ساختار نانومواد، گونه‌های مولکولی آنالیت‌های هدف و مدل‌های جداسازی گوناگون اشاره کرد.

نگاهی موشکافانه به مراجع علمی نشان می‌دهد که انواع نانومواد با ترکیبهای شیمیایی مختلف، مشتمل بر نانوساختارهای کربنی، نانوذرات فلزی و اکسید فلزی، نانوذرات سیلیکون/سیلیکا^۱ و نانومواد پلیمری در طیف گسترده‌ای از کاربردهای استخراجی و آماده‌سازی نمونه، مورد استفاده قرار گرفته‌اند [۱۳۴]. نانوساختارهای کربنی با آلوتروپهای مختلف مانند فلورن^۲، نانولوله‌های کربنی، گرافن و نانوشاخه‌های کربنی^۳ مهمترین و پرکاربردترین زیرگروه‌های نانوساختاری می‌باشند که بمنظور اهداف تجزیه‌ای و استخراجی مورد بهره‌برداری قرار گرفته‌اند. پیش‌تغلیظ مقادیر آثار سرب توسط یک ریزستون فلورنی که در سال ۱۹۹۴ توسط والکارسل^۴ و همکارانش [۱۳۵] گزارش شده است، اولین کاربرد منتشر شده‌ی نانوساختارهای کربنی در روشهای آماده‌سازی نمونه بود. سپس، نانولوله‌های کربنی (CNTs) و گرافن (G) به دلیل دسترسی آسان، روشهای تهیه‌ی مقرون به صرفه و نیز سهولت در امکان عامل‌دار کردنشان، به محبوب‌ترین و پراستفاده‌ترین نانوترکیبات کربنی مورد استفاده در روشهای پیش‌تیمار نمونه تبدیل شدند. بیشتر ترکیبات نانوساختاری کربن، شباهتهای ساختاری و ویژگی‌های مشابه قابل توجهی را به دلیل دربرداشتن حلقه‌های شش عضوی متوالی و نیز وجود الکترونهای π غیرمستقر، دارا هستند؛ که چنین ویژگی‌های ساختاری، سبب تمایل بالای آنها به مولکولهای هدف و از طریق برهمکنشهای آب‌گریز و $\pi - \pi$ شده است. با این حال، به سبب خاصیت آبگریزی بالای این ترکیبات، تجمع و لختگی^۵ خود به خودی آنها در محلولهای آبی، اجتناب ناپذیر است که ممکن است مراحل آزمایشی را با چالش‌های عدیده‌ای روبرو سازد [۱۳۶]. لذا به منظور بهبود در قابلیت استفاده از نانوساختارهای کربنی و همچنین تبدیل آنها به ابزارهایی انعطاف‌پذیر در اهداف آماده‌سازی نمونه، استراتژی‌های اصلاح و عامل‌دار کردن، مورد استفاده قرار گرفته‌اند. اکسیداسیون^۶ نانوذرات کربنی که ساده‌ترین راه برای آراستن آنها به گروه‌های آب‌دوست^۷ مانند گروه‌های کربوکسیل^۸، هیدروکسیل^۹ و اپوکسی^۱ می‌باشد، پراکنده‌سازی^۲

^۱ Silicon/silica nanoparticles

^۲ Fullerene

^۳ Carbon nanohorn

^۴ Valcarcel

^۵ Spontaneous aggregation

^۶ Oxidation

^۷ Hydrophilic groups

^۸ Carboxyl

^۹ Hydroxyl

آنها را در محلولهای آبی بهبود بخشیده و انواع جدیدی از مکانیسمهای جذبی و جذب سطحی مانند تعویض یون، پیوند هیدروژنی و برهمکنش الکترواستاتیکی^۳ را به ارمغان می‌آورد. اگرچه اکسید کردن، یک راهبرد کاملاً موثر برای فراهم‌سازی گزینش‌پذیری کافی و قابل توجه نسبت به تمام آنالیت‌های معین و مورد نظر نمی‌باشد؛ ولی با این حال این فرآیند راهی را به سمت عامل‌دار کردن نانوساختارهای کربنی با گروه‌های عاملی انتخابی و ویژه، از طریق انجام اصلاحات بیشتر با سایر گروه‌های دارای اکسیژن فعال، گشوده است.

برهمن اساس، پژوهشگران در اکثر مطالعات منتشر شده‌ی اخیر، نانولوله‌های کربنی و یا سایر ساختارهای نانویی کربن را با فیبرهای توخالی پلی‌پروپیلنی تلفیق نموده و از آنها غالباً به منظور افزایش کارایی روشهای استخراجی HF-LPME، HF-SPME و EME بهره‌گرفته‌اند. در روش SPME، گرافن و یا نانولوله‌های کربنی (در دو حالت اصلاح سطح شده و یا بدون فرآیند اصلاح و عامل‌دار کردن) عمدتاً در درون کانالهای فیبرهای توخالی با اندازه‌ها و مقادیر مختلف تعبیه شده و یا روی خلل و فرج سطح و دیواره‌ی آنها تثبیت می‌شوند و به عنوان تِرپ^۴ (تله) برای آنالیت‌های متعدد به خدمت گرفته می‌شوند؛ که در نهایت منجر به افزایش فاکتورهای غنی‌سازی و نیز گزینش‌پذیری روشهای استخراجی انتخابی می‌گردند. [۱۳۷]. اما در روش LPME، ساختارهای کربنی اکثراً به عنوان فاز پذیرنده در درون کانالهای فیبرهای توخالی قرار داده می‌شوند که افزودن این نانوجاذب‌ها به فازهای استخراج کننده، سبب افزایش چشمگیر ظرفیت جذب آنالیت‌های مورد نظر می‌شود. اخیراً در یک مدل استخراجی جدید تحت عنوان ریزاستخراج فاز جامد/مایع^۵ (HF-SLPME)، نانوساختارهای کربنی و یا سایر نانومواد، در درون ساختار متخلخل (خلل و فرج) فیبرهای توخالی قرار داده می‌شوند که این کار سبب فراهم شدن یک مسیر مازاد برای انتقال آنالیت‌های حل‌شده در پیکره‌های مختلف شده و به عنوان جاذبهایی کارآمد عمل می‌کنند. در این روش، مواد نانوجاذب انتخابی، محل‌هایی (سایتهایی) را ارائه می‌کنند که در آنها، مولکولهای آنالیت می‌توانند به سهولت از فاز دهنده به فاز پذیرنده استخراج شوند. بدین‌صورتکه در ابتدا، مولکولهای آنالیت هدف روی سطح جاذب بکارگرفته شده جذب سطحی می‌شوند و سپس به درون فاز استخراج کننده واجذب می‌گردند. در این حالت، مکانیسم انتقال جرم از مزایای هر دو روش استخراجی فاز جامد و مایع بهره‌مند می‌گردد.

¹ Epoxy

² Dispersity

³ Electrostatic interaction

⁴ Trap

⁵ Solid/liquid phase microextraction

در زیرگروه نانوذرات فلزی، نانوذرات طلا (AuNPs) و نانوذرات نقره (AgNPs) مهمترین نانوساختارهای فلزی هستند که به دلایل متعددی نظیر خصوصیات ایده‌آل فیزیکی و شیمیایی و همچنین فراهم‌سازی سطح موثر بالا، به منظور اهداف بیوآنالیز و جذب زیستی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. برهمکنش بین بیومولکولهای حاوی گروه‌های گوگرد و تیول با نانوذرات طلا، نقش قابل‌توجهی را در تشخیص‌های بیوزیستی از طریق پیوندهای نقره-گوگرد ایفا می‌کند. در حالت کلی، این روش به طور خاصی به ترکیبات با گروه‌های دارنده‌ی گوگرد محدود می‌شود. با این حال، عامل‌دار کردن سطح بر مبنای پیوندهای مذکور، سکوه‌های تشخیصی گسترده‌تری را برای آنالیزهای تطبیق‌پذیر فراهم نموده است. در همین راستا و به عنوان مثال، یک روش ساده و حساس توسط پورقازی^۱ و همکارانش [۱۳۸] برای استخراج، پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری پروژسترون^۲ و تستوسترون^۳ با استفاده از نانوذرات طلای پیوند یافته (گرفت‌شده) با نانوساختارهای مغناطیسی عامل‌دار شده با تیول^۴، در مایعات بیولوژیکی (پلاسما و ادرار انسان) گزارش شده است. گستره‌ی خطی وسیع در حدود ۲۰۰-۱ ng/mL با این روش حاصل شده است که در حدود سه برابر نتیجه‌ی حاصل از پژوهش‌های مشابهی است که در آنها؛ از استخراج مایع-مایع ساده [۱۳۹]، استخراج فاز جامد معکوس^۵ [۱۴۰] و یا استخراج فاز جامد معکوس دیسکی^۶ [۱۴۱] برای تعیین ترکیبات یاد شده، تاکنون با روش کروماتوگرافی مایع گزارش شده است.

همچنین، گزارش شده است که نانوذرات نقره، پروبهای ایده‌آلی برای اهداف استخراج LPME پروتئین‌ها و پپتیدها می‌باشند [۱۴۲]. بدین‌صورتکه، نانوذرات نقره با گروه‌های عاملی که برهمکنش با پروتئین را از طریق تعاملات الکترواستاتیک و آگریز ترویج می‌بخشند، مشتق‌سازی شده و در فرآیند استخراج شرکت می‌کنند. به عنوان نمونه، شکل ۱-۱۰ گوناگونی استخراجهای بکار رفته در چنین مواردی را به تصویر می‌کشد.

¹ Pourghazi

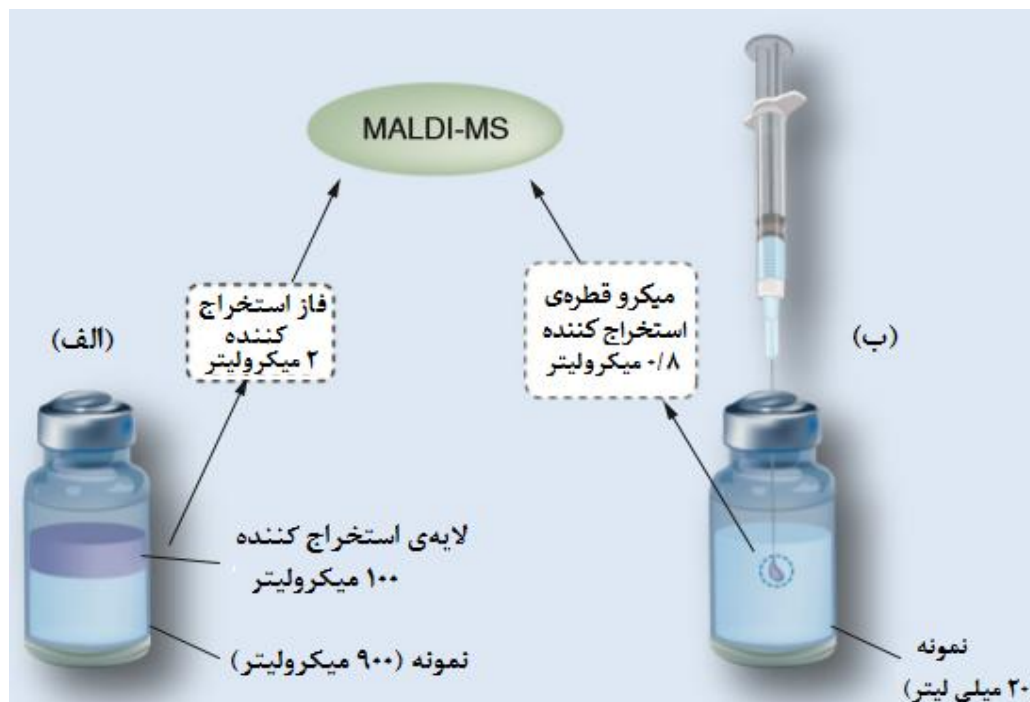
² Progesterone

³ Testosterone

⁴ AuNPs grafted thiol modified magnetic nanoparticles

⁵ Reversed-phase solid phase extraction (RP-SPE)

⁶ Reversed-phase solid phasedisk extraction (RP-SPDE)



شکل ۱-۱۰- کاربرد نانوذرات نقره به عنوان پروب برای استخراج و پیش تغلیظ آنالیت‌های مختلف؛ تحت شرایط (الف): استخراج متداول مایع - مایع (ب): روشهای ریزاستخراج تک قطره‌ای [۱۴۲].

در حالت متداول (شکل ۱-۱۰-الف)، نانوذرات نقره‌ی اصلاح شده، در تولوئن دیسپرس (پراکنده) شده و سپس چند میلی‌لیتر از این مخلوط مستقیماً وارد محلول نمونه شده و در آن غوطه‌ور می‌گردد. در این شرایط، پروتئین‌ها و پپتیدها از بطن محلول نمونه به درون فاز پذیرنده استخراج می‌شوند که در نهایت امکان جداسازی و پیش‌تغلیظ آنها را فراهم می‌آورد. سپس، لایه‌ی آلی برای آنالیز متعاقب با روش 'AP-MALDI-MS'، با آلفا-سیانو-۴-هیدروکسی سینامیک اسید^۲ مخلوط می‌شود. در روشی دیگر که متعاقب این تکنیک عمومی پیشنهاد شده است، نانوذرات نقره‌ی آب‌گریز که از طریق واکنش سطحی با اکتا دکانتیول^۳ حاصل شده‌اند، برای استخراج گرامیسیدین^۴ از ادرار و پلاسمای انسان مورد استفاده قرار گرفته‌اند و حدتشخیص‌های به ترتیب برابر ۰/۱۳ و ۰/۱۶ میکرومولار را سبب شده‌اند [۱۴۳]. متودولوژی مذکور، قابلیت تعمیم روش را برای اندازه‌گیری سایر ترکیبات از جمله پروتئین‌های مختلف مانند میوگلوبین^۵ و آلبومین سرم گاوی را امکان پذیر ساخته است. در این حالت، برهمکنش‌های ضعیف آبگریز بین نانوذرات نقره و پروتئین‌ها، سرعت‌های استخراج را بسیار کند می‌کند که این نقیصه را می‌توان توسط

^۱ Atmospheric pressure-Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry

^۲ α -cyano-4-hydroxycinnamic acid

^۳ Octadecanethiol

^۴ Gramicidin D

^۵ Myoglobin

اصلاح شیمی برهمکنشهای انتخابی برطرف کرد. در یک مطالعه‌ی دیگر، سودیر^۱ و همکارانش [۱۴۴] استفاده از نانوذرات نقره را به عنوان حسگرهای الکترواستاتیک، برای آنالیز پپتیدها تحت شرایط ریزاستخراج تک قطره‌ای (SDME) پیشنهاد کرده‌اند (شکل ۱-۱۰-ب). برای این منظور، نانوذرات نقره-ی اصلاح شده و پوشش داده شده با تترا آلکیل آمونیوم بروماید^۲، سنتز شده و سپس در حلال تولوئن پراکنده شده‌اند. نانوذرات مذکور که دارای بار سطحی جزئی مثبت می‌باشند، توانایی استخراج آنالیت-های هدف را فقط در عرض چند دقیقه و در مقادیر pH بالای نقطه‌ی ایزوالکتریک^۳ ترکیبات هدف، دارا می‌باشند.

از نگاهی دیگر، نانوذرات اکسیدفلزی نیز به دسته‌ای از ترکیبات نوید بخش برای تغلیظ مولکولهای بیولوژیکی حاوی گروه‌های ویژه و یا ترکیبات دارای سایتهای اتصال خاص، تبدیل شده‌اند [۱۴۵]. به واسطه‌ی پیوندهای دو دندانه‌ای شلاته‌کننده^۴ مابین گروه‌های فسفات و مواد مختلف، نانوساختارهای اکسید فلزی به صورت تنها و یا در داخل ساختارهای کامپوزیتی، به طور گسترده‌ای برای تغلیظ برخی از آنالیت‌های دارای گروه‌های فسفات مورد استفاده قرار گرفته‌اند. همچنین تعداد متعددی از نانوذرات اکسید فلزی مانند نانوذرات تیتانیوم اکسید (TiO₂) [۱۴۶]، نانوذرات زیرکونیوم اکسید (ZrO₂) [۱۴۷]، نانوذرات اکسید قلع (SnO₂) [۱۴۸] و نانوذرات مغناطیسی آهن (Fe₂O₃) [۱۴۹]، برای اهداف استخراج انتخابی فسفوپپتیدها^۵ بکار گرفته شده‌اند.

علاوه بر موارد یاد شده، ساختارها و مواد مزومتخلخل^۶ و همچنین چهارچوبهای آلی-فلزی^۷ (MOFs) نیز برای اهداف آماده‌سازی و پیش‌تغلیظ نمونه‌ها مورد استفاده قرار گرفته‌اند. برخی از مواد مزومتخلخل، از نظر اندازه‌ی ذرات و یا سایز مربوط به کانالها و آرایه‌های منظمشان، جزو دسته‌ی سیستمهای نانوساختاری با سطح موثر مطلوب قرار می‌گیرند، این در حالی است که خصوصیات نشأت گرفته از ساختارهای متمایز تخلخلی این مواد، در همتهای ذره‌ای و جامد آنها قابل مشاهده نبوده است. برهمکنشهای $\pi - \pi$ ، نقش مهمی را در استخراج ترکیبات آروماتیک توسط این ساختارهای ارزشمند ایفا می‌کنند. در حالی که، تاثیرات متقابل مولکولی و نیز پدیده‌ی الک مولکولی^۸ اثرات شگفت انگیزی بر روی استخراج ترکیبات آلیفاتیک توسط مواد مذکور را ایجاد کرده است [۱۵۰]. برخی از کاربردهای اخیر انواع ترکیبات نانوساختار در روشهای آماده‌سازی نمونه، در جدول ۱-۴ خلاصه شده است.

¹ Sudhir

² Tetraalkylammonium bromide

³ Isoelectric points

⁴ Chelating bidentate bonds

⁵ Phosphopeptide

⁶ Mesoporous materials

⁷ Metal organic frameworks (MOFs)

⁸ Molecular sieving effect

جدول ۱-۴- بخشی از کاربردهای اخیر ترکیبات مختلف نانوساختار، به منظور استفاده در آماده‌سازی و پیش‌تغلیظ آنالیت‌ها و نمونه‌های مختلف از پیکره‌های محیطی، غذایی و بیولوژیکی.

مرجع	روش تجزیه‌ای	آنالیت	روش آماده-سازی نمونه	ماتریکس	روش اصلاح	نانوساختار
نانوساختارهای کربنی						
[۱۵۱]	ETAAS ^۱	فلزات سنگین	SPE	سرم انسان	اکسیداسیون	MWCNT
[۱۵۲]	CE-DAD	آنتی بیوتیک‌های کینولون ^۳	DSPE ^۲	آب	اکسیداسیون	MWCNT
[۱۵۳]	HPLC-UV	ترکیبات استروئیدی	SPE	شیر	آمین‌دار کردن	MWCNT
[۸۳]	CE-UV	ناپروکسن و ایبuprofen	HF-EME	پلاسما- ادرار	اکسیداسیون	MWCNT
[۸۴]	CE-UV	داروی بوپرنورفین	EME	ادرار انسان	اکسیداسیون	MWCNT
[۱۵۴]	HPLC-DAD	هورمون‌های گیاهی	HF-EME	گوجه فرنگی	کربوکسیلاسیون	CNTs
[۱۵۵]	HPLC-UV	علف کش ^۴	HF-LPME	شیر	-	گرافن
[۱۵۶]	HPLC-DAD	علف کش	HF-SLPME	آب و شیر گاو	اکسیداسیون	MWCNT
[۱۵۷]	HPLC-UV	PAEs ^۵	SPE	آب آشامیدنی	-	گرافن
[۱۵۸]	GC-MS	داروی مترونیدازول ^۶	SPME	شیر	اکسیداسیون	MWCNT
[۱۵۹]	HPLC-FL ^۷	بتا بلاکرها	HF-SLPME	ادرار	اکسیداسیون	MWCNT
نانو ذرات فلزی و اکسید فلزی						
[۱۳۸]	HPLC-UV	پروژسترون و تستوسترون	-	پلاسما- ادرار	گرفت کردن	AuNPs
[۸۷]	HPLC-DAD	NSAIDs	HF-EME	آب	-	AgNPs
[۱۶۰]	LC-MS-MS	بیومارکر ^۸ و لیپوپروتئین ^۹	-	پلاسما	اصلاح با آنتی‌بادی	AuNPs
[۱۶۱]	MALDI-MS ^{۱۱}	والینومایسین ^{۱۰}	LPME	پلاسما	سلنیدسديم	AgNPs
[۱۶۲]	HPLC-DAD	NSAIDs	HF-SLPME	موی انسان	مغناطیسی کردن	SiO ₂ /TiO ₂ nanocomposite
[۱۶۳]	HPLC-UV	بنزودیازپین‌ها ^{۱۲}	HF-SLPME	مو- ادرار	اصلاح با مایع یونی	TiO ₂
ترکیبات مزومخلخل						
[۱۶۴]	HPLC-DAD	علف کش	HF-LPME	آب	کلکسینه کردن	کربن مزومخلخل (MCM41)
[۱۶۵]	HPLC-FL	هیدروکربن‌های پلی آروماتیک ^{۱۳}	SPE	آب‌های محیطی	-	MOF-5

¹ Electrothermal atomization atomic absorption spectrometry

² Dispersive solid phase extraction

³ Quinolone antibiotics

⁴ Herbicides

⁵ Phthalic acid esters

⁶ Metronidazole

⁷ High-performance liquid chromatography with fluorescence detection

⁸ Biomarkers

⁹ Oxidized low-density lipoproteins (OxLDLs)

¹⁰ Valinomycin

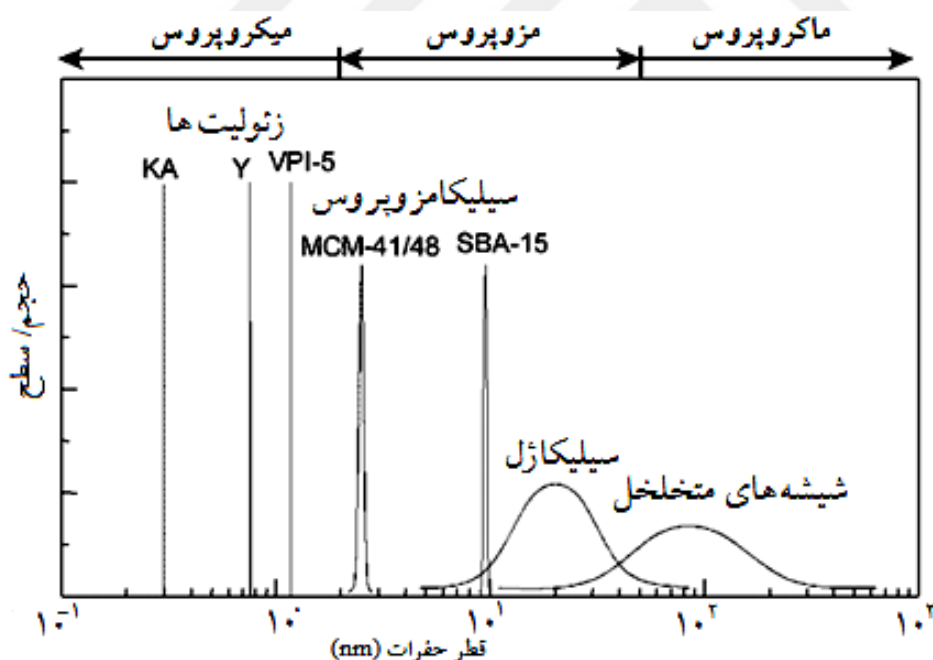
¹¹ Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry

¹² Benzodiazepine

¹³ Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)

۱-۶-۲-۳-۱- ساختارهای مزو متخلخل (مزوپروس): انواع و روشهای تهیه

تردیدى وجود ندارد که فناوری نانو و تکنولوژی‌های وابسته به آن سهم قابل توجهی را در پیشرفت دنیای کنونی دارند. در دهه‌های اخیر، ابداع و توسعه‌ی مواد متخلخل در حوزه‌های مختلفی نظیر انرژی، اپتیک الکترونیک، پزشکی، محیط‌زیست و برنامه‌های کاربردی زیست‌فناوری، توجه متخصصان را به خود جلب کرده است. در واقع، این اقبال روزافزون به دلیل خصوصیات مبتنی بر مساحت افزایش یافته‌ی سطح و ساختار منظم منافذ در مواد متخلخل است که آنها را به عنوان نامزد مناسبی برای فرایندهای جذب/واجدبی، حذف، جداسازی و حسگر معرفی می‌کند [۱۶۹-۱۶۶]. در منابع علمی، طبقه‌بندی‌های مختلفی برای مواد مختلف بر اساس ترکیب شیمیایی، هندسه، اندازه‌ی منافذ و درجه‌ی کریستالیزاسیون^۱ (تبلور) آنها گزارش شده است [۱۷۰]. اما، بر طبق تعریف ارائه شده توسط انجمن شیمی محض و کاربردی (IUPAC)، مواد متخلخل بر اساس اندازه‌ی منافذ در سه دسته‌ی مهم طبقه‌بندی می‌شوند: مواد متخلخل ریز^۲ دارای منافذ با قطر کمتر از ۲ نانومتر، مواد متخلخل مزو با منافذ در ابعاد بین ۲ تا ۵۰ نانومتر، متخلخل‌های درشت^۳ با اندازه منافذی بزرگتر از ۵۰ نانومتر (شکل ۱-۱۱) [۱۷۱].



شکل ۱-۱۱- طبقه‌بندی مواد پروس (متخلخل) به میکروپروس، مزوپروس و ماکروپروس بر اساس قطر حفرات [۱۷۱].

¹ Crystallization

² Microporous

³ Macroporous

تا قبل از دهه‌ی پایانی قرن بیستم، مواد متخلخل در محدوده‌ی مزو، نظیر سیلیکاژل و کربن فعال، اندازه‌ی حفرات نامنظم با توزیع بسیار وسیعی را داشتند. اولین گزارش از سنتز مواد متخلخل مزو توسط کورودا^۱ و همکارانش گزارش شد و کمتر از دو سال بعد، در سال ۱۹۹۲ برای اولین بار دانشمندان گروه تحقیقاتی موبیل^۲ توانستند یک خانواده از مزوسیلکات‌های متقارن و با اندازه‌ی حفرات بسیار یکنواخت^۳ تا ۱۰ نانومتری تولید کنند [۱۷۰]. از آن تاریخ به بعد، استفاده از مزوپروس‌ها در دستور کار اغلب متخصصان قرار گرفت و تمایل به کشف موارد جدیدتری از مواد، ساختارها و کاربردهای مزوپروس‌ها افزونی یافت. برخلاف طبقه‌ی مواد متخلخل میکرو پروس نظیر زئولیت‌ها که کاربرد آن‌ها به دلیل اندازه-ی ریز خلل و فرج، محدود شده است، کاربردهای زیرگروه دوم مواد متخلخل، سهم بسیار بیشتری در زمینه‌ی فعالیت‌های تحقیقاتی و کاربردی را به خود اختصاص داده است؛ چرا که اندازه‌ی منافذ آن، با اغلب مواد شیمیایی، مولکول‌های پیچیده و حتی مولکول‌های زیستی سازگار است. این سازگاری شامل خصوصیات نظیر اتصال راحت، حرکت، انتشار و تغییرات انعطاف‌پذیری است که در این ساختارها حفظ می‌شود [۱۶۹].

در دهه‌ی گذشته، سنتز طیف وسیعی از مواد متخلخل مزوپروس، بسیاری از فرصت‌های جدید در طراحی و برنامه‌های کاربردی برپایه‌ی استفاده از این دسته ترکیبات را فراهم کرده است. نکته‌ی کلیدی در این روند توسعه‌ای، روش‌های متنوع تهیه و آماده‌سازی مزوپروس‌ها می‌باشد. انتخاب پیش‌ماده‌ها و شرایط مختلف انجام واکنش، منجر به تولید محصولاتی با مشخصه‌های مقتضی خواهد شد. مروری در مراجع علمی نشان می‌دهد که روش‌های متعددی برای سنتز مزوپروس‌ها ارائه شده است [۱۷۰، ۱۷۲]، که به برخی از آنها به اختصار اشاره می‌شود:

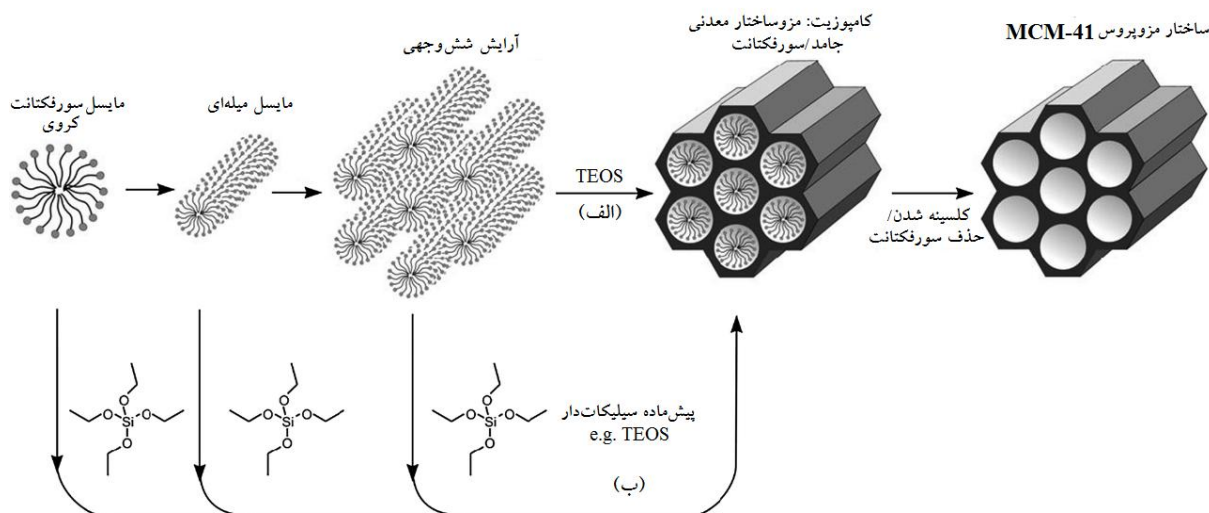
- سنتز قلیایی^۳

در این روش، ذرات مزو از دو راهکار مشابه تهیه می‌شوند که شمای کلی آنها در شکل ۱-۱۲ نشان داده شده است. در مدل اول (شکل ۱-۱۲-الف)، پیشنهاد می‌شود که فاز کریستال مایع آب-سورفکتانت به عنوان عنصر اصلی ساختاری بکار گرفته شود. در این مدل، درصد حجمی سورفکتانت، بسیار جزئی و حدود ۱٪ در نظر گرفته می‌شود. اما در مدل دوم (شکل ۱-۱۲-ب)، استفاده از واسطه سیلیکات برای آرایش شش وجهی مایسل‌های سورفکتانت توصیه می‌شود. در این روش، پیوندهای چنددندانه‌ی بین سورفکتانت‌های کاتیونی و الیگومرهای سیلیکاتی دارای بار منفی در آن، باعث پلیمریزاسیون سیلیکات‌ها در سطح شده و چگالی بار قرار گرفته در سطح سیلیکات-سورفکتانت، سبب تشکیل کامپوزیت‌های آلی-معدنی با شکل‌بندی مزو می‌شود [۱۷۳].

¹ Kuroda

² Mobil

³ Base Synthesis



شکل ۱-۱۲- دو مسیر پیشنهادی (الف) و (ب) برای تشکیل MCM-41^۱ [۱۷۰].

- سنتز اسیدی^۲

اساس فرآیند شکل‌گیری ساختارهای متخلخل مزو در این روش بر برهمکنش گونه‌های معدنی (سیلیکا) کاتیونی و سورفکتانت‌های کاتیونی در محیط اسیدی انجام می‌گیرد. در این پروتکل، عموماً هالیدها به عنوان واسطه واکنش بین دو گروه کاتیونی بکار برده می‌شوند [۱۷۰].

- سنتز خنثی^۳

در گزارشی که پیناویا^۴ و همکارانش در سال ۱۹۹۶ منتشر کردند، از آلکیل‌آمین‌های خنثی به عنوان الگو برای سنتز مزوپروس سیلیکای نامنظم استفاده کرده بودند. آن‌ها این محصول را الک مولکولی شش‌وجهی^۵ نامیدند. مکانیسم تشکیل این مزوپروس براساس برهمکنش میسل‌های آمین خنثی و پیش-ماده معدنی خنثی بود که ارتباط بین دو گونه با یک پیوند هیدروژنی توجیه می‌شد. این روش سنتز به دلیل بکارگیری آغازگرهای خنثی، به سنتز خنثی شهرت دارد. در موارد مشابهی استفاده از سورفکتانت-های آمفی‌فیل^۶ با پلی‌اتیلن اکسید نیز برای سنتز مزوپروس‌ها استفاده شده است [۱۷۴].

¹ Mobil composition of matter No. 41

² Acid Synthesis

³ Neutral Synthesis

⁴ Pinnavaia

⁵ Hexagonal molecular sieves (HMS)

⁶ Amphiphil

- مکانیسم قالب‌بندی کمک‌شده با لیگاند^۱
در سال ۱۹۹۶ یک روش جدید برای تهیه مواد مزوپروس ابداع شد. در این روش که قالب کمک شده با لیگاند (LAT) نامگذاری شده بود، پیوند کووالانسی بین پیش‌ماده‌ی آلکوکسید نیوبیوم^۲ و یک لیگاند آمین‌دار برقرار می‌شود. سپس، دستورکار هیدرولیز و چگالش انجام شده و محصول مزوپروس به-دست می‌آید. در واقع، این رویکرد قادر خواهد بود که با کنترل نسبت فلز-لیگاند، ترکیبات متخلخل مزو برای اکسیدفلزات انتقالی تولید کند [۱۷۵].
- مکانیسم قالب‌بندی مستقیم کریستال مایع^۳
با توجه به کلیه‌ی روش‌هایی که در بندهای قبلی به آن‌ها اشاره شد، در سیستم آب-سورفکتانت، غلظت سورفکتانت بسیار جزئی در نظر گرفته می‌شود و طبعاً فاز کریستال ایجاد شده، بسیار رقیق بود. در چنین شرایطی، برهمکنش گونه‌های آلی و معدنی عموماً مربوط به فعل و انفعالات سطحی بوده است. مطابق یافته‌های متخصصان، هرچقدر این برهمکنش‌ها قوی‌تر باشد، نظم ایجاد شده در ساختار مزوپروس، بیشتر خواهد بود. در این زمینه، گروهی از دانشمندان در تحقیقات خود از غلظت‌های بالای سورفکتانت به عنوان پیش‌ماده استفاده کرده‌اند؛ بطوریکه اصلاً نیازی به استفاده از ترکیبات معدنی در واکنش‌ها نبود. فاز کریستال مایع در این روش‌ها اغلب سورفکتانت‌های غیریونی نظیر اکتا اتیلن‌گلیکول-مونو دودسیل اتر^۴ ($C_{12}EO_8$) یا اکتا اتیلن‌گلیکول مونو هگزا دسیل اتر^۵ ($C_{16}EO_8$) بودند که نقش قالب را بر عهده داشتند. به چنین تکنیک‌هایی اصطلاحاً قالب‌بندی مستقیم کریستال مایع اطلاق می‌شود [۱۷۶].
- خودمونتاژ القاشده‌ی تبخیری^۶
آخرین و ساده‌ترین روش ابداعی برای تهیه‌ی ساختارهای متخلخل مزو، بهره‌گیری از یک فرآیند تبخیر برای تولید سریع مزوپروس‌های در الگوهای گوناگون، مانند فیلم‌ها، فیبرها و غیره می‌باشد. در این تکنیک، از یک محلول همگن سیلیکا-سورفکتانت در حلال اتانول استفاده می‌شود و با تبخیر اتانول، غلظت سورفکتانت به تدریج افزایش یافته و خودمونتاژی مایسل‌های سورفکتانت-سیلیکا القا می‌شود. نتایج گزارش شده نشان می‌دهد که با تغییر نسبت مولی بین الکل/آب/سورفکتانت، ساختارهای متنوعی از ترکیبات مزوپرس نظیر شش‌وجهی دوبعدی، مکعبی و شش‌وجهی سه‌بعدی تولید خواهند شد [۱۷۷].

¹ Ligand-assisted Templating Mechanism

² niobium alkoxide

³ Direct Liquid Crystal Templating Mechanism

⁴ Octaethylene glycol monododecyl ether

⁵ Octaethylene glycol monohexadecyl ether

⁶ Evaporation-induced Self-assembly (EISA)

در یک تقسیم‌بندی متفاوت، روش‌های مختلف سنتز مواد مزوپروس در شش زیرگروه جای می‌گیرند که در اغلب موارد، تشکیل حفرات مزو درون پیکره‌ی مواد توده می‌باشد (شکل ۱-۱۳) [۱۷۸]. همانگونه که در شکل ۱-۱۳ (الف) مشاهده می‌شود، در فرآیند قالب نرم^۱، مولکول‌های سورفکتانت و گونه‌های مهمان در ساخت کامپوزیت‌های با ساختار مزو شرکت می‌کنند. در این روش برهمکنش سورفکتانت و گونه‌های مهمان، در شکل‌گیری حفرات نقش تعیین‌کننده‌ای داشته و پس از حذف قالب، مواد مزوپروس با حفرات خالی و مورفولوژی‌های کنترل‌شده، بدست می‌آید. از مزیت‌های عمده‌ی این روش، قابلیت اجرای بدون محدودیت در محیط‌های آبی و آلی و حتی تحت فرآیندهای هیدروترمال می‌باشد. در روش قالب‌بندی سخت که در مراجع علمی از آن به نانوریخته‌گری نیز یاد می‌شود، از قالب‌های سخت نظیر مزوپروس سیلیکا و یا مزوپروس کربن و یا نانوذرات تجمع‌یافته استفاده می‌شود. شکل ۱-۱۳ (ب)، طرح شماتیک استفاده از این تکنیک را نشان می‌دهد. نکته‌ی بسیار مهم در قالب‌بندی سخت، لزوم کنترل هیدرولیز و تراکم گونه‌های مهمان، برهمکنش آن‌ها با سورفکتانت و در نهایت، اطمینان از خالی بودن تمامی حفرات مزو می‌باشد. اگرچه این روش نیز به عنوان یک رویکرد قابل استناد برای تهیه‌ی ساختارهای تک کریستالی و بلورهای بسیار منظم می‌باشد، با این حال محدودیت‌هایی نظیر زمان‌بر بودن و پیچیدگی پارامترهای کنترلی برای این روند تهیه‌ی نانوساختارهای پروس، عنوان شده است.

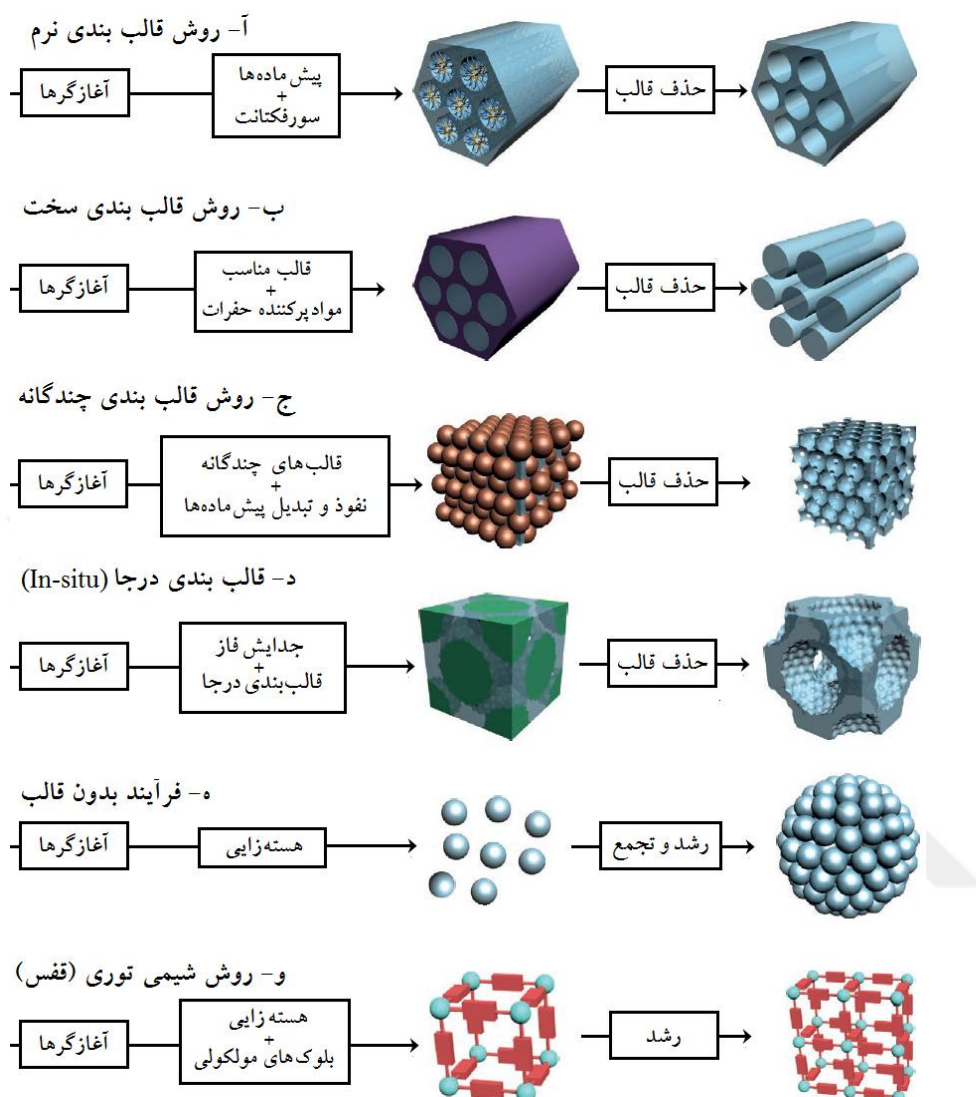
شکل ۱-۱۳ (ج)، تکنیک شناخته‌شده‌ی دیگری برای تهیه نانوساختارهای مزوپروس را با ترکیب دو روش قالب‌بندی نرم و سخت معرفی می‌کند؛ که اغلب برای ساختارهای مورد استفاده در صنایع باتری و ذخیره‌کننده‌های انرژی کاربرد دارد. در تکنیک روش قالب‌بندی چندگانه، با استفاده از الگوهای زیستی، کریستالی و همچنین قالب‌های با حالت فوم، موادی تحت نام مواد پروس‌هایرایکال^۲ تهیه می‌شوند. با این وجود این دسته از مواد عموماً شکل‌بندی و حفرات نامنظم دارند. فرآیند قالب‌بندی در روش بعدی است (شکل ۱-۱۳ (د)، که قابلیت کنترل و طراحی قالب، مقدار، محل قرارگیری گونه‌ها و همچنین فرآیند حذف قالب را به عنوان پارامترهای اصلی داراست. از طرف دیگر، روش‌های بدون قالب نیز بصورت گسترده‌ای در سنتز مواد مزوپروس مورد استناد قرار می‌گیرند. در این روش‌ها، عموماً تجمع واحدهای ساختاری نانوذرات منتج به تولید این دسته از مواد می‌شود (شکل ۱-۱۳ (ه). در نهایت و در تقابل با استراتژی‌های بیان شده، استفاده از شیمی مشبک^۴ است که از واحدهای ساختمانی مولکولی (نظیر مولکول‌های آلی، خوشه‌های معدنی و کمپلکس‌ها) برای تهیه‌ی چهارچوبهای آلی-فلزی و چهارچوبهای آلی-کووالانسی استفاده شده و مجدداً از این ترکیبات برای مواد مزوپروس دارای حفراتی با دیواره‌ی کریستالی بهره‌گرفته می‌شود (شکل ۱-۱۳ (و).

¹ Soft templating

² Hierarchical

³ In-situ templating route

⁴ Reticular chemistry



شکل ۱-۱۳- شمای روش های اساسی برای سنتز مواد مزوپروس؛ (الف): روش قالب بندی نرم، (ب): روش قالب بندی سخت، (ج): روش قالب بندی چندگانه، (د): روش قالب بندی درمحل (In-situ)، (ه): فرآیند بدون قالب و روش پایانی (و): تکنیک شیمی مُشبک.

لازم به توضیح است که، تنوع در مواد متخلخل مزو بسیار وسیع بوده و بر اساس کاربردهای مختلفی که برای این دسته از مواد متصور می شود، ساختارهای مورد نیاز نظیر ترکیبات شش وجهی، مکعبی و غیره آماده می شوند. شایان ذکر است که مواد مزو، اساساً با استفاده از ترکیبات سیلیکاته تهیه می شود. در جدول ۱-۵، لیست برخی از مهم ترین مواد مزوپروس آورده شده است که در اغلب موارد، نام گذاری ترکیبات یادشده بر اساس نام تیم تحقیقاتی طراح ساختار، اقتباس و خلاصه شده است [۱۶۶].

جدول ۱-۵- نام کامل و اختصاری برخی از مهمترین ترکیبات مزومتخلخل.

نام کامل	مواد مزوپروس
Michigan State University	MSU
Santa Barbara Amorphous	SBA
Mobil Crystalline Matter/ Mobil Composite Matter	MCM
Hollow Mesoporous Silica	HMS
Ordered Mesoporous Silica	OMS
Technische Universiteit Delft	TUD
Meso Cellular Form	MCF
Folded Sheet Mesoporous	FSM

همان‌گونه که عنوان شد، پژوهشگران شرکت موبایل کامپوزیت^۱ که اولین گزارش برای سنتز خانواده‌ی جدیدی از مواد را گزارش کردند، نام کلی M_{41S} را برای محصول خود معرفی کردند که مجموعه‌ای از مواد با توزیع منظم حفرات در اندازه‌های ۱۰-۲ نانومتر و با نام‌های MCM-۴۱ شش-ضلعی، MCM-۴۸ مکعبی و MCM-۵۰ لایه‌لایه، در این خانواده از مواد جای می‌گیرند [۱۷۹]. فرآیند سنتز این دسته از مواد مزوساختار، بر دو پدیده‌ی معتبر استوار است، دانش سل-ژل و دانش سورفکتانت (قالب‌بندی). مولکول‌های آلی حلال‌پوشی شده و یا یون‌های فلزی حلال‌پوشی شده، هرگز به عنوان عوامل قالب‌بندی محسوب نمی‌شوند، بلکه یک آرایه‌ی مولکولی سورفکتانتی که همان عامل خودمونتاژ است، الزامی می‌باشد [۱۷۹]. مواد مزو شش وجهی که از آن‌ها به MCM-۴۱ یاد می‌شود، دارای آرایه‌هایی بسیار منظم از کانال‌های یکنواخت (از نظر اندازه) می‌باشند که قطر آن‌ها بسته به قالب مورد استفاده و ترکیبات آلی کمکی افزوده شده و شرایط انجام واکنش، در محدوده‌ی ۱۰۰-۱۵ آنگستروم قرار می‌گیرد [۱۸۰]. منافذ این مواد جدید، از لحاظ نظم، مشابه زئولیت‌ها می‌باشند (شکل ۱-۱۱)؛ با این تفاوت که از نظر اندازه بطور قابل توجهی بزرگتر از کریستال‌های زئولیت می‌باشند، از این‌رو فرصت‌های نوینی در استفاده از این مواد در زمینه‌های کاتالیزوری، جداسازی و تجزیه‌ی شیمیایی و کاربرد در مواد کامپوزیتی پیشرفته، در اختیار علاقمندان قرار می‌دهد. جستاری کوتاه در پایگاه‌های علمی نشان می‌دهد که این عضو خانواده‌ی مزوپروس‌ها نسبت به سایر اعضای آن بیشتر مورد مطالعه و تحقیق قرار گرفته است که دلیل آن را می‌توان به سادگی فرآیند تهیه و پایداری حرارتی و مکانیکی بالای MCM-۴۱ نسبت داد [۱۸۱].

۷-۱- روش‌های بهبود حساسیت و پیش‌تغلیظ داخل‌ستونی در الکتروفورز موئین

مهمترین محدودیت در آنالیزهای الکتروفورز موئین برای اندازه‌گیری مقادیر جزئی و یا آثار ترکیبات مختلف در پیکره‌های پیچیده‌ای مانند نمونه‌های بیولوژیکی، حساسیت غلظتی پایین دستگاه‌های

¹ Mobil Composite Matter

الکتروفورز موئین مجهز به ردیابهای UV می‌باشد. در همین راستا، برخی از تکنیک‌های مهم برای پیش-تغلیظ ترکیبات هدف و همچنین بهبود غلظتی میزان آنالیت‌هایی که امکان بارگذاری به درون ستونهای کپیلاری بدون افت کارایی روش را دارند، گسترش یافته‌اند. همچنین بسیاری از گزارشات علمی، بر مبنای کاربرد روشهای معتبر منطبق بر اصول الکتروفورتیکی نیز در دسترس می‌باشند. در این بخش، روش‌های مختلف بهبود حساسیت و پیش‌تغلیظ داخل ستونی که در سالهای اخیر مورد استفاده قرار گرفته‌اند، بررسی می‌شود. روشهای مذکور معمولاً بر اساس مکانیسم اجرایی به دو گروه تکنیکهای الکتروفورتیکی و تکنیکهای کروماتوگرافیکی طبقه بندی می‌شوند. ذکر این نکته ضروری به نظر می‌رسد که دستگاه الکتروفورز موئین به دو دلیل عمده، دارای محدودیتهای تشخیصی نسبت به سایر روشهای کروماتوگرافی مانند HPLC می‌باشد. اولین عامل این است که طول سل در تکنیک CE بسیار باریک می‌باشد (در حدود ۲۰ الی ۱۰۰ میکرومتر)؛ در حالی که در روش HPLC، طول سل در محدوده‌ی بین ۵ تا ۱۰ میلی‌متر متغیر است (لذا طول سل در روش CE در حدود ۱۰۰ برابر کمتر از HPLC می‌باشد). این مورد، به دلیل اینکه جذب طبق قانون بیر-لامبرت مستقیماً متناسب با طول و اندازه‌ی سل نمونه-گیری می‌باشد، محدودیت تشخیصی بالایی را برای این تکنیک ایجاد کرده است. دومین عامل که از مورد اول نیز پر اهمیت‌تر است؛ این است که در روش HPLC، حجمهای نسبتاً زیادی از غلظتهای پایین نمونه، قابلیت تزریق به داخل ستون و یا پیش‌تغلیظ در ابتدای ستون را دارا می‌باشند. در این حالت، نمونه پس از تزریق، توسط یک جریان گرادیانی از فاز متحرک شسته و حمل می‌شود که این عامل به خودی خود سبب افزایش حساسیت روش می‌گردد. ولی در روش الکتروفورز موئین، افزایش در حجمهای تزریقی نمونه عمدتاً منجر به کاهش کیفیت جداسازی و ظاهر شدن پیک‌های بدشکل، نامتقارن و پهن می‌گردد. در ادامه به مهمترین و پرکاربردترین روشهای پیش‌تغلیظ داخل ستونی مورد استفاده در تکنیک الکتروفورز موئین به همراه مکانیسم اجرایی آنها اشاره شده است. شایان ذکر است که سه مکانیسم عمده برای پیش‌تغلیظ داخل ستونی در روشهای مبتنی بر الکتروفورز موئین عبارتند از: تغلیظ (تراکم) توده‌ای نمونه^۱، تزریق توده‌ای تقویت شده‌ی نمونه^۲ (FASI) و ایزوتاکوفورز^۳ (ITP).

۱-۷-۱- تغلیظ و تراکم توده‌ای نمونه^۴ (FASS)

روش Stacking، متداول‌ترین روش افزایش حساسیت و پیش‌تغلیظ داخل ستونی در تکنیک الکتروفورز موئین است که اولین بار در سال ۱۹۷۹ توسط میکرز^۵ و همکارانش [۱۸۲] ارائه شده است. در این روش، نمونه معمولاً به گونه‌ای تهیه و یا اصلاح ترکیب می‌شود که رسانایی^۶ کمتری از محلول

^۱ Sample Stacking

^۲ Field Amplified Sample Injection (FASI)

^۳ Isotachophoresis (ITP)

^۴ Field-Amplified Sample Stacking (FASS)

^۵ Mikkers

^۶ Conductivity

بافر داشته باشد. نمونه به صورت هیدرودینامیک^۱ (تزریق فشاری) به داخل ستون تزریق می‌شود و هنگامی که ولتاژ پس از بارگذاری نمونه اعمال می‌شود، شرایط پیش‌تغلیظ فراهم می‌گردد. در حالت کلی، هنگامی که نمونه در آب خالص، حلال و یا بافر رقیق شده حل شود، قدرت یونی قاچ نمونه^۲ به طور قابل توجهی کمتر از سایر قسمت‌های ستون خواهد بود. لذا، قاچ با رسانایی پایین تزریق شده از نمونه، مقاومت بالاتری را نسبت به سایر قسمت‌های ستون تجربه خواهد کرد. در چنین شرایطی، هنگامی که ولتاژ در سرتاسر ستون مؤین اعمال شود، شدت و قدرت میدان در قاچ نمونه محسوس‌تر و به مراتب بیشتر خواهد بود. تحت شرایط مذکور، یونهای نمونه در ابتدا با سرعت بیشتری حرکت (مهاجرت) خواهند کرد؛ ولی به محض رسیدن به نقطه‌ی تلاقی و حدواسط با بافر در داخل ستون، سرعت آنها به دلیل کاهش شدت میدان، به طرز چشمگیری کند می‌شود. از اینرو هنگامی که ولتاژ اعمال می‌شود، حجم و محتوای قاچ نمونه به صورت الکتریکی متمرکز^۳، متراکم و تغلیظ می‌شود که این امر سبب کاهش اندازه و طول قاچ نمونه و نهایتاً تغلیظ داخل ستونی می‌گردد. لذا اصول اجرایی روش FASS بدین صورت است که، نمونه بایستی در حلال و یا محلول‌هایی که غلظت کمتری از بافر زمینه داشته باشند، تهیه گردد. در صورت فراهم شدن این پیش‌شرط، ولتاژ اعمالی سبب مهاجرت یونهای آنالیت به سمت ناحیه‌ی بافر زمینه و متراکم شدن آنها می‌شود. تراکم نمونه قبل از آشکارسازی بنا به دلایل یاد شده، باعث تغلیظ در داخل ستون و متعاقب آن سبب افزایش شدت سیگنال تجزیه‌ای می‌گردد [۱۸۳]. در شکل ۱-۱۴، اصول اجرایی روش مذکور به صورت شماتیک نشان داده شده است.

۱-۷-۲- تزریق توده‌ای تقویت شده‌ی نمونه (FASI)

اصول اجرایی روش FASI مشابه روش Stacking معمولی می‌باشد [۱۸۴]. تنها تفاوت بین دو روش مذکور، در نحوه‌ی تزریق و فرآیند متمرکز شدن آنالیت در داخل ستون می‌باشد. در روش نرمال، تزریق فشاری (هیدرودینامیک) مورد استفاده قرار می‌گیرد و متمرکز شدن آنالیت‌ها هنگامی که ولتاژ بهینه‌ی جداسازی اعمال می‌شود، صورت می‌پذیرد. ولی در روش FASI، تزریق الکتروکینتیک^۴ انجام می‌گیرد و فرآیند متمرکز شدن آنالیت‌ها، بیشتر در حین تزریق روی می‌دهد. بنابراین در این روش، هر دو فرآیند مهاجرت الکتروکینتیک یونهای باردار نمونه و جریان الکترواسمو تیک محلول نمونه در بارگذاری نمونه به داخل ستون مشارکت می‌کنند. این روش تزریق، سبب افزایش ورود گونه‌های باردار و در عین حال محدود کردن ورود گونه‌های بی‌بار به داخل لوله‌ی مؤین می‌شود. افزون بر این، رسانایی پایین نمونه نیز مقدار آنالیت‌های باردار تزریقی به داخل ستون را افزایش می‌دهد [۱۸۵]. بنابراین، یونهای آنالیت در درون یک ناحیه‌ی باریک از الکترولیت زمینه‌ی جلویی (بافر جلوی قاچ نمونه) که هدایت بیشتری دارد تغلیظ

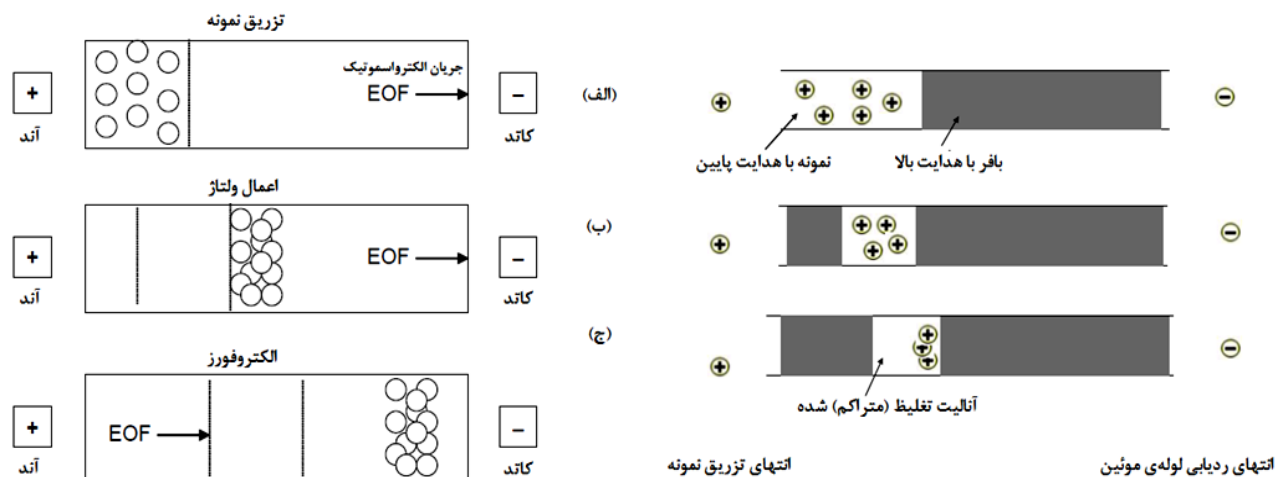
¹ Hydrodynamic Injection

² Sample zone

³ Electrically Focused

⁴ Electrokinetic

می‌شوند. گزارش شده است که تزریق الکتروکینتیک منجر به حساسیت‌های بهبود یافته‌تری نسبت به تزریق فشاری می‌شود [۱۸۶].



شکل ۱-۱۴- دیگرام شماتیک مدل FASS؛ (الف): در ابتدا، نمونه در یک محیط و یا واسطه‌ی با رسانایی پایین‌تر از الکترولیت زمینه تهیه شده و به داخل ستون تزریق می‌شود؛ (ب): به محض اعمال میدان الکتریکی، نمونه در درون ستون موئین مهاجرت کرده و متراکم می‌شود. (ج): آنالیت‌های تغلیظ شده به سمت ردیاب (آشکارساز) حرکت می‌کنند [۱۸۳].

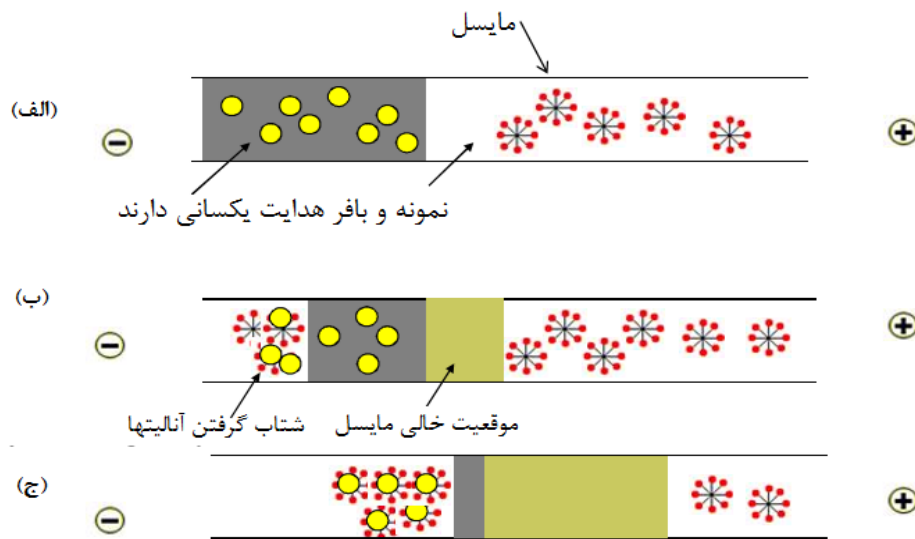
۱-۷-۳- روش روبشی (Sweeping)

این روش به عنوان پدیده‌ای که در آن آنالیت‌ها با کمک یک فاز شبه‌ساکن^۱ نظیر (مایسلها)^۲ و ترکیبات سیکلودکسترینی^۳ جمع‌آوری، جاروب و تغلیظ می‌شوند؛ شناخته می‌شود [۱۸۷]. رسانایی محلول نمونه در این روش، بایستی دقیقاً با رسانایی الکترولیت زمینه یکسان باشد. بنابراین در کل قسمتهای ستون، هدایت همگون و یکسانی حاکم خواهد بود. بر خلاف روش stacking که در آن، تغلیظ هنگامی صورت می‌گیرد که رسانایی‌های الکتریکی مربوط به قاچ نمونه و بافر متفاوت باشند، در این مدل پیش‌تغلیظ داخل‌ستونی (Sweeping)، هدایت نمونه مطرح نیست [۱۸۷]؛ ولی اثرات ماتریکس‌های بیولوژیکی بایستی به دقت مد نظر قرار گرفته و بررسی شوند [۱۸۸]. حالت شماتیک این روش در شکل ۱-۱۵ ارائه شده است.

^۱ Pseudostationary phase

^۲ micelles

^۳ Cyclodextrins



انتهای تزریق نمونه

انتهای ردیابی لوله‌ی موئین

شکل ۱-۱۵- دیاگرام شماتیک مدل پیش‌تغلیظ درون‌ستونی Sweeping با کمک ترکیبات مایسلی؛ (الف): الکترولیت زمینه (BGE) دربرگیرنده‌ی یک فاز شبه‌ساکن (به عنوان مثال: یک سورفکتانت غیر یونی و خنثی) و الکترولیت‌های لازم جهت تشکیل یک بافر مایسلی می‌باشد؛ این در حالی است که نمونه (فرضاً یک گونه‌ی بدون بار) در یک بافر بدون سورفکتانت حل می‌شود. (ب): پس از تزریق BGE و محلول نمونه به داخل ستون، ولتاژ جداسازی برقرار می‌گردد و نمونه‌ها توسط سورفکتانت جمع‌آوری و جاروب می‌شوند. به دلیل اینکه تحرک فاز شبه‌ساکن بیشتر از فرم ترکیب شده‌ی آن با آنالیت و نمونه می‌باشد، یک فضای خالی تشکیل می‌شود. (ج): آنالیت‌های تغلیظ شده (گیر افتاده در پشت فضای خالی) به سمت ردیاب (آشکارساز) رانده می‌شوند [۱۸۷].

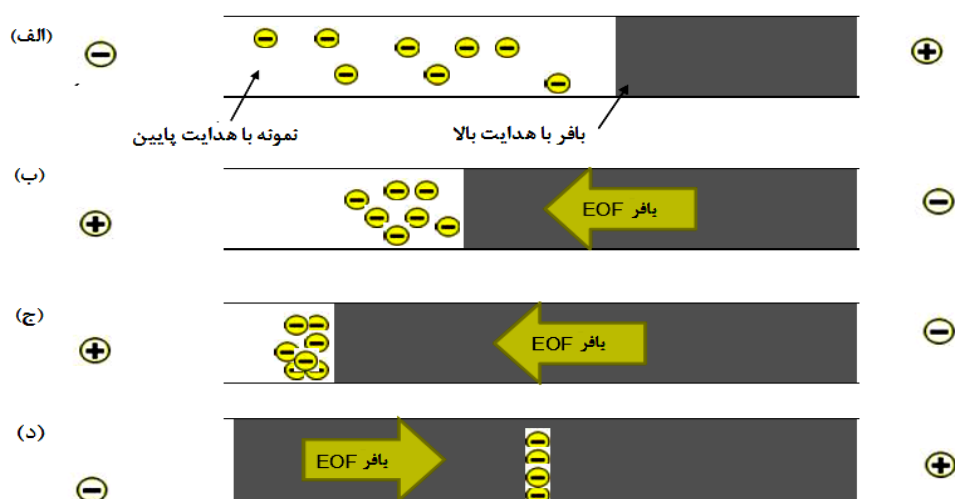
۴-۷-۱- تغلیظ توده‌ای توسط تزریق حجم‌های زیاد نمونه^۱ (LVSS)

در این روش، به منظور بهبود حساسیت و حد تشخیص و بر خلاف روش‌های تزریق نرمال و متداول، حجم‌های زیادی از نمونه (حل‌شده در یک بافر با رسانایی الکتریکی پایین) به درون ستون موئین بارگذاری می‌شود که LVSS نام گرفته است. تزریق حجم زیادی از پیکره‌ی نمونه به داخل ستون، سبب ممانعت از تراکم و تغلیظ توده‌ای آنالیت‌ها می‌شود و در نتیجه ماتریکس نمونه می‌بایستی برای افزایش حساسیت، از ستون خارج گردد (شکل ۱-۱۶). بر همین اساس، این تکنیک به دو شیوه توسعه یافته است و قابل اجراست: حذف پیکره‌ی نمونه از ستون (۱) با تغییر قطبیت میدان الکتریکی (اعمالی و ۲) بدون تغییر و سویچ کردن^۲ قطبیت میدان. در حالت انتخابی تغییر قطبیت، معمولاً قطبیت میدان پیش از متراکم شدن و Stacking آنالیت‌ها و به منظور بیرون راندن تحت فشار پیکره و ماتریکس نمونه از ستون، معکوس می‌شود. سپس، قطبیت میدان الکتریکی اعمالی مجدداً به حالت اولیه و نرمال تغییر داده می‌شود که در نتیجه آنالیت‌های تغلیظ شده با کمک جریان الکترواسموتیک به سمت آشکارساز

^۱ Large volume sample stacking (LVSS)

^۲ Switching

مهاجرت می‌کنند [۱۸۹]. معکوس کردن و تغییر شرایط قطبیت میدان الکتریکی ممکن است برای همه-ی دستگاه‌های تجاری الکتروفورز موئین در دسترس و یا مقرون به صرفه نباشد. همچنین ممکن است در برخی از موارد، تغییر فوری و در لحظه‌ی جهت و قطبیت میدان الکتریکی مقدور نباشد، که این امر موجب حصول نتایج تکرارناپذیر و آنالیزهای ناموفق می‌گردد.



انتهای تزریق نمونه

انتهای ردیابی لوله‌ی موئین

شکل ۱-۱۶- نمایش شماتیک روش اجرایی LVSS-CE با حالت انتخابی تغییر قطبیت؛ (الف): یک حجم زیادی از نمونه (حل شده در بافر با رسانایی الکتریکی پایین) به صورت فشاری به ستون موئین تزریق می‌شود. (ب و ج): قطبیت میدان برای یک لحظه معکوس می‌شود که جریان الکترواسموتیک حاصل از این کار، منجر به بیرون راندن ماتریکس نمونه‌های با بار منفی می‌گردد و سپس آنالیت‌های با بار منفی تحت تأثیر تراکم تقویت شده با میدان الکتریکی، در یک نوارمییانی باریک و تیز متمرکز می‌شوند. (د): هنگامی که ماتریکس نمونه تقریباً به صورت کامل از ستون حذف گردید، قطبیت میدان مجدداً به حالت اولیه و نرمال برگردانده می‌شود و در نهایت آنالیت‌ها توسط الکتروفورز موئین منطقه‌ای جداسازی می‌شوند [۱۸۹].

۱-۷-۵- ایزوتاگوفورز

تکنیک ایزوتاگوفورز (ITP)، یکی از مشهورترین و شناخته‌شده‌ترین حالات اجرایی در روش CE می‌باشد. برخلاف سایر روشهای تغلیظ و تراکم آنلاین نمونه، این روش در حضور دو نوع بافر با رسانایی-های الکتریکی متفاوت انجام می‌شود که تحت عنوان بافرهای پیشران^۱ (عقب ران) و جلوران^۲ نامیده می‌شوند و ناحیه (قاچ) نمونه، توسط این بافرها احاطه می‌گردد. پس از وارد کردن الکترولیت‌ها و نمونه به داخل ستون، ولتاژ اعمال می‌شود. در صورتیکه تحرک نمونه حدواسط بین تحرکات الکترولیت‌های مذکور باشد، آنالیت‌ها بین دو بافر گیرافتاده و متراکم می‌شوند. توضیح جامع‌تر اینکه، آنالیت بین دو بافر متفاوتی قرار می‌گیرد که الکترولیت جلوران (حاوی یونهای با تحرکات بیشتر از آنالیت) در سمت

^۱ Lagging electrolyte

^۲ Leading electrolyte

آشکارساز واقع شده است و بافر عقب‌ران (حاوی یونهای با تحرکات کمتر از آنالیت) در سمت تزریقی قرار دارد [۱۹۰]. در این شرایط و به محض اعمال ولتاژ، یک پتانسیل گرادیانی در سرتاسر لوله‌ی موئین شکل می‌گیرد و در نهایت آنالیت‌ها بر اساس تحرکاتشان، در بین نواحی مختلف توزیع می‌گردند. شرایط عملی این روش به منظور اهداف پیش‌تغلیظ، در تکنیکهای مبتنی بر الکتروفورز ناحیه‌ای (مانند CZE و EKC^۱) قابل اجراست که ایزوتاگوفورز موقت^۲ (t-ITP) نیز نامیده می‌شود [۱۸۴]. در یک روش دیگر بنام شبه‌ایزوتاگوفورز^۳ (p-ITP)، که بیشتر تحت عنوان تغلیظ توده‌ای بر پایه‌ی استونیتریل^۴ (AS) شناخته می‌شود، حلال استونیتریل در نقش شبه‌یونهای آهسته‌ی عقب‌ران ظاهر شده و از طرفی دیگر ترکیبات نمکی در نقش یونهای با تحرک بالای جلوران ظاهر می‌شوند؛ که این روش دارای دو مزیت عمده است: (۱) حذف پروتئینها و (۲) سازگاری مناسب با نمونه‌های دارای محتوای نمک بالا. همچنین این روش برای آندسته از تکنیکهای آماده‌سازی نمونه‌ی خارج ستونی، که قابلیت جفت‌شدن با الکتروفورز موئین را دارا باشند (مانند DLLME) و در عین حال، کاربرد آنها مستلزم استخراج آنالیت‌های هدف در حلالهای ویسکوزتر و با فشار بخار کمتر می‌باشد، سازگاری کافی دارد. دیاگرام شماتیک اصول اجرایی این روش در شکل‌های ۱-۱۷ (الف) تا (ج)، نشان داده شده است. همچنین خلاصه‌ای از جزئیات بیشتر در مورد مهمترین و پرکاربردترین روشهای پیش‌تغلیظ داخل‌ستونی (آنالین) در تکنیک الکتروفورز موئین، در جدول ۱-۶ لیست شده است.

جدول ۱-۶- جزئیات اجرایی روشهای پیش‌تغلیظ داخل‌ستونی (آنالین) در تکنیک الکتروفورز موئین.

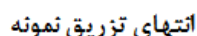
روش	اصول کلی و اجرایی	ملاحظات عمومی
FASS	در حالت Stacking، آنالیت‌ها از نمونه‌ی با رسانایی کمتر به سمت منطقه‌ی با رسانایی بالاتر مهاجرت کرده و تغلیظ می‌شوند.	این روش، صرفاً برای جداسازی کاتیونها و آنیونها در یک مرحله (ران) می‌باشد و برای آنالیت‌های بی‌بار و خنثی قابلیت اجرا ندارد. مزیت اصلی روش، سهولت اجرا توسط امکان تغییرات در رسانایی الکتریکی نمونه و الکتروولت زمینه می‌باشد.
LVSS	در این حالت، نمونه‌ها به سمت یک ناحیه‌ی با رسانایی بالاتر مهاجرت کرده و تغلیظ می‌شوند. حذف و بیرون راندن ماتریکس نمونه از داخل ستون، توسط معکوس کردن قطبیت میدان الکتریکی اعمالی صورت می‌پذیرد.	این روش، صرفاً برای جداسازی کاتیونها و آنیونها در یک مرحله (ران) می‌باشد و برای آنالیت‌های بی‌بار و خنثی، قابلیت اجرا ندارد.
Sweeping	برخلاف دو روش قبل، رسانایی محلول نمونه و بافر تقریباً یکسان است و به محض اعمال میدان الکتریکی در لوله‌ی موئین، آنالیت‌ها توسط شبه فاز ساکن، جاروب و متراکم می‌شوند.	این روش هم برای گونه‌های خنثی و هم برای آنالیت‌های باردار، کاربردی است. محدودیت اصلی آن، در دسترس نبودن شبه فازهای ساکن مناسب برای آنالیت‌های مختلف می‌باشد.
ITP	آنالیت‌ها مابین دو منطقه با تحرکات الکتروفورتیکی متفاوت؛ جلوران (تحرک بیشتر) و عقب‌ران (تحرک کمتر) مهاجرت می‌کنند.	آنالیز ترکیبات خنثی با این روش ممکن نیست؛ برای نمونه‌های با اثرات ماتریکس یونی بالا، مناسب است؛ برای نمونه‌های با رسانایی پایین از طریق افزودن یونهای جلوراندن مناسب است؛ برای آنالیزهای مستقیم پس از ترسیب پروتئین مناسب است.

¹ Electrokinetic chromatography

² Transient-ITP

³ Pseudo-isotachopheresis (p-ITP)

⁴ Acetonitrile stacking (AS)



انتہای ردیابی لولہ، موئین

۱-۸- کاربردهای اخیر دو روش FASS و FASI در آنالیزهای دارویی توسط روش

الكتروفورز مؤين

१५

جدول ۱-۷- مروری بر کاربردهای اخیر دو روش پیش تغلیظ آنالین FASS و FASI؛ گزارش شده در مراجع علمی برای آنالیز برخی از ترکیبات دارویی در ماتریکسهای بیولوژیکی (توضیحاً اینکه: هیچ یک از داروهای جدول زیر جزو دسته‌ی ترکیبات ضدسرطان نیستند).

آنالیت هدف	ماتریکس نمونه	روش	LOD	EF	کاربرد آنالیز	توضیحات آنالیز	مرجع
بتابلاکرها	سرم و ادرار	FASS-CZE-UV	۲/۲-۳/۵ nM	۲۶-۳۸	دارویی	-	[۱۹۱]
فیدرین و سودو فیدرین ^۱	ادرار	FASS-CZE-UV	۰/۲۱-۰/۲۳ µg/mL	۵۰	دارویی	تلفیق با روش تزریق در جریان ^۲	[۱۹۲]
پوزاکونازول ^۳	پلاسما	FASS-CZE-UV	۱۰ ng/mL	-	دارویی	-	[۱۹۳]
سیرترالین ^۴	ادرار	FASS-CZE-UV	۲/۵ nM	۸۱۴	دارویی	تلفیق با DLLME	[۱۹۴]
NSAIDs	شیر	FASS-CZE-UV	۳-۱۳/۱ µg/kg	۴۶-۲۲۹	دارویی	تلفیق با DLLME	[۱۹۵]
کارودیلول ^۵	پلاسما	FASI-CE-DAD	۴ ng/mL	-	انانتیومری ^۶	تلفیق با DLLME	[۱]
وراپامیل ^۷	پلاسما	FASI-CE-DAD	۱۵ ng/mL	-	کایرال ^۸	تلفیق با DLLME	[۱۸۶]
آریپیزازول ^۹ و متابولیت مربوطه	پلاسما	FASI-CE-DAD	۲-۲/۵ ng/mL	-	دارویی	-	[۱۹۶]
داروهای آندروژنی ^{۱۰}	ادرار	FASS-CZE-UV	۷۵ nM	۴	دارویی	ستون کوت شده با نانوذرات طلا	[۱۹۷]
متوپرولول ^{۱۱}	ادرار انسان	FASS-CE-DAD	۰/۰۰۵ µg/mL	۶/۴	دارویی	تلفیق با LLE	[۱۹۸]
پروپرانولول	سرم انسان	FASI-CE-DAD	۲/۵ µg/mL	-	کایرال	تلفیق با LLE	[۱۹۹]

۱-۹- مروری بر مطالعات گزارش شده در مراجع علمی برای آنالیز و اندازه‌گیری انواع

داروهای ضد سرطان توسط تکنیک الکتروفورز موئین

همانطوری که پیش‌تر نیز اشاره شد، تکنیک ارزشمند الکتروفورز موئین به صورت تلفیق شده با ردیابهای مختلف، مزایای آشکاری را در مطالعات مربوط به برهمکنشهای دارویی، مطالعات سنجش سطح درمانی و اندازه‌گیری مقادیر غلظتی بسیاری از ترکیبات دارویی ارائه می‌کند. لذا این روش، به ویژه در طی دهه‌ی گذشته، پیشرفتهای چشمگیر و قابل توجهی در حوزه‌ی آنکولوژی و در عین حال آنالیز و اندازه‌گیری داروهای ضدسرطان در پیکره‌های متنوع را به خود اختصاص داده است. جدول ۱-۸، مرور جامعی بر برخی از ترکیبات دارویی ضدسرطان که در سالهای اخیر توسط این تکنیک به صورت تلفیق-

¹ Ephedrine & pseudoephedrine

² Flow injection

³ Posaconazole

⁴ Sertraline

⁵ carvedilol

⁶ Enantiomeric separation

⁷ Verapamil

⁸ Chiral

⁹ Aripiprazole

¹⁰ Endogenous compounds

¹¹ metoprolol

شده با آشکارسازهای مختلف، مورد آنالیز و اندازه گیری قرار گرفته اند را به همراه شرایط الکتروفورسیکی و جداسازی انتخابی و بخشی از نتایج تجزیه ای و تشخیصی حاصل، ارائه می کند.

جدول ۸-۱- مروری بر گزارشات ارائه شده در مراجع علمی برای آنالیز برخی از مهمترین داروهای ضد سرطان با استفاده از تکنیک الکتروفورز موئین.

آنالیت	ماتریکس	فاز ساکن و ستون	الکترولیت زمینه	زمان آنالیز (دقیقه)	آشکارساز و حد تشخیص $\mu\text{g/mL}$	مرجع
تموزولامید ^۱	سرم بیمار	۶۰ سانتی متر طول؛ ۵۰ میکرومتر قطر داخلی - طول موثر: ۵۲ سانتی متر	۲۵ میلی مولار بافر فسفات محتوی ۴۰ میلی مولار SDS	۱۲	DAD-۰/۶۳	[۲۰۰]
اتوپوزاید ^۲	پلاسمای انسان	۳۶۳ میکرومتر قطر خارجی؛ ۵۰ میکرومتر قطر داخلی - طول موثر: ۵۵ سانتی متر	۱۵۰ میلی مولار بافر بورات تنظیم شده در pH=۷	<۱۳	LIF-گزارش نشده	[۲۰۱]
کمپلکسهای روتنیوم (III) ^۳	پلازما	۴۸ سانتی متر طول؛ ۵۰ میکرومتر قطر داخلی - طول موثر: گزارش نشده	۲۰ میلی مولار بافر فسفات محتوی ۱۵۰ میلی مولار NaCl	گزارش نشده	UV-گزارش نشده	[۲۰۲]
متوتروکسات ^۴	مایع مغزی - نخاعی	۵۰/۲ سانتی متر طول؛ ۵۰ میکرومتر قطر داخلی - طول موثر: ۴۰ سانتی متر	۶۰ میلی مولار بافر فسفات محتوی ۱۰۰ میلی مولار SDS و ۱۵٪ pH=۳, THF	۳۰	UV-۰/۱	[۲۰۳]
تیوگوانین ^۵	نمونه های بیولوژیکی	-	مخلوطی از ۲۰ میلی مولار بافر بورات (pH=۹/۶)، محتوی ۱۸ میلی مولار SDS و ۴۰٪ بافر سدیم کربنات (pH=۱۲)	<۸۰	CL ^۶ -۰/۰۱	[۲۰۴]
دوکسوروبیسین ^۷	پلاسمای انسان	۶۰ سانتی متر طول؛ ۷۵ میکرومتر قطر داخلی - طول موثر: ۵۰/۲ سانتی متر	۱۵۰ میلی مولار بافر پتاسیم فسفات تنظیم شده در pH=۷/۴	۴	LIF-۰/۱	[۲۰۵]
۵- فلورواوراسیل ^۸	پسابهای بیمارستانی ^۹	ستون موئین کوت شده با پلی آکریلامید ^{۱۰} ؛ ۶۰/۸ سانتی متر طول؛ ۷۵ میکرومتر قطر داخلی	۱۶۰ میلی مولار بافر سدیم بورات محتوی ۲۰٪ استونیتریل، pH=۹/۵	۲۱	DAD-۱/۷۲	[۲۰۶]

¹ Temozolomide

² Etoposide

³ Ruthenium complexes

⁴ Methotrexate

⁵ Tioguanine (6-TG)

⁶ Chemiluminescence

⁷ Doxorubicin

⁸ 5-Fluorouracil (5-FU)

⁹ Hospital effluents

¹⁰ Polyacryl amide

بلئومایسین ^۱	In vitro	گزارش نشده	گزارش نشده	۹	LIF-گزارش نشده	[۲۰۷]
سیتارابین ^۲	پلازما	۲۶ سانتی متر طول؛ ۷۵ میکرومتر قطر داخلی - طول موثر: گزارش نشده	۴۰ میلی مولار بافر سیترات تنظیم شده در pH=۲/۵	۵	۰/۵-UV	[۲۰۸]
۵- فلورو اوراسیل	فرمولاسیون دارویی	۵۰ سانتی متر طول؛ ۷۵ میکرومتر قطر داخلی - طول موثر: ۴۰ سانتی متر	۳۰ میلی مولار بافر فسفات تنظیم شده در pH=۸/۰	۳	۷/۹-UV	[۲۰۹]
تیوگوانین	ادرار	۶۰/۲ سانتی متر طول؛ ۷۵ میکرومتر قطر داخلی - طول موثر: ۵۰ سانتی متر	۴۵ میلی مولار بافر بورات تنظیم شده در pH=۹/۲	۸	۱/۶-DAD	[۲۱۰]
تگافور ^۳	فرمولاسیون دارویی	۵۰ سانتی متر طول؛ ۷۵ میکرومتر قطر داخلی - طول موثر: ۴۰ سانتی متر	۳۰ میلی مولار بافر فسفات تنظیم شده در pH=۸/۰	۳	۶/۵-UV	[۲۰۹]

۱-۱۰- داروهای شیمی درمانی خوراکی مورد استفاده در کار حاضر

۱-۱۰-۱- داروی کپسیتابین (زلودا)^۴

در بین دسته‌ی داروهای آنتی‌نئوپلاست خوراکی، کپسیتابین (شکل ۱-۱۸-الف) با نام تجاری زلودا یا اکسلودا (N⁴-pentyloxycarbonyl-5-deoxy-5-fluorocytidine, Xeloda[®], CAP)، یک آنتی-متابولیت و جزو مهمترین داروهای شیمی درمانی متعلق به گروه فلوروپیریمیدین کربامات^۵ (FLC) است که با تداخل در تولید پروتئین‌های لازم برای رشد سلول‌های سرطانی، از تکثیر و گسترش آنها در بدن بیمار جلوگیری می‌کند. این دارو برای درمان سرطان پستان، معده، کولون یا رکتوم که به سایر نقاط بدن گسترش یافته است، تجویز می‌شود. همچنین این دارو در درمان انواع خاصی از سرطان‌های نادر معده، روده‌ی بزرگ، کولورکتال و سایر انواع تومورهای بدخیم گوارشی پس از عمل جراحی و حذف اولیه‌ی تومور، پیشنهاد می‌گردد. زلودا ممکن است به تنهایی یا در ترکیب با سایر داروهای ضدسرطان و یا پرتودرمانی، مورد استفاده قرارگیرد. کلاس درمانی داروی مذکور، آنتی‌نئوپلاستیک عامل و کلاس دارویی آن آنتی‌متابولیت می‌باشد [۲۱۱]. این دارو به گونه‌ای طراحی شده است که در داخل بدن و در بافت تومور به متابولیت اصلی خود که عامل دارویی سیتوتوکسیک فعال ۵-فلورو اوراسیل (۴۲-دی-هیدروکسی-۵-فلوروپیریمیدین، ۵-FU) می‌باشد، تبدیل شود [۲۱۲] (شکل ۱-۱۸-ب). رویکرد موفقیت‌آمیز استفاده از این دارو در محدوده‌ی وسیعی از بدخیمی‌های ناشی از انواع تومورهای پیشرفته و اولیه به اثبات رسیده است. سازمان غذا و داروی ایالات متحده آمریکا (FDA) در سال ۲۰۰۱، این دارو

¹ Bleomycin

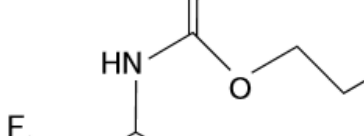
² Cytarabine

³ Tegafur

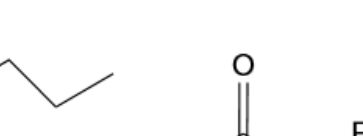
⁴ Xeloda

⁵ Fluoropyrimidine Carbamate (FLC)

⁶ 2,4-dihydroxy-5-fluoropyrimidine (5-Fluorouracil, 5-FU)



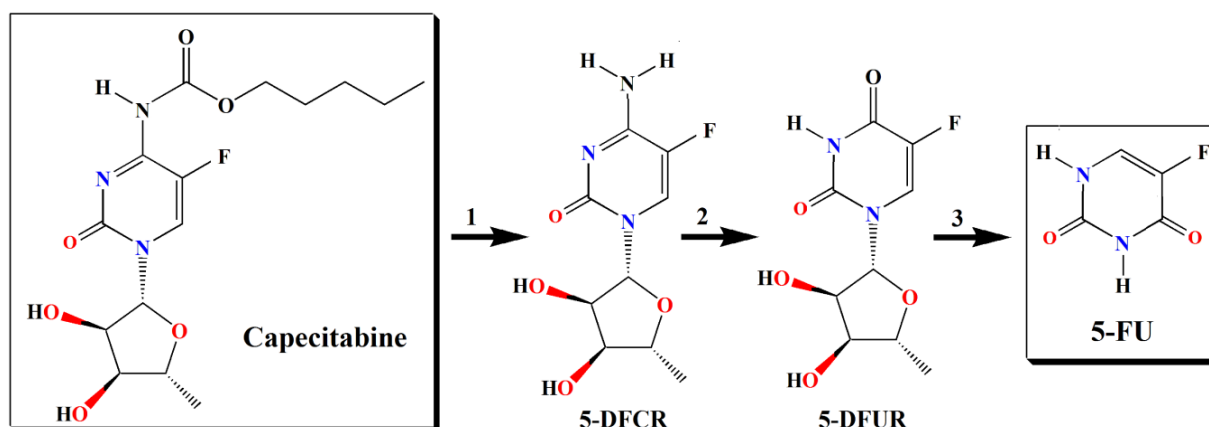
 (الف)



 (ب)

۷۸

دی‌آمیناز^۱ (CDA) موجود در کبد سالم و بافت تومور و طی یک فرآیند آمین‌زدایی^۲ به ۵-دِاکسی-فلوریدین^۳ (۵-DFUR) تبدیل می‌گردد [۲۱۸، ۲۱۹]. در مرحله سوم، ترکیب میانی ۵-DFUR توسط آنزیم تایمیدین فسفوریلاز^۴ (TP) که صرفاً به صورت انتخابی و در سطوح مقداری بالا در سایتهای تومور قرار دارد، به ۵-FU تبدیل می‌شود. این امر بدلیل مهار کردن سنتز RNA، و ایجاد نقص و اختلال در تولید DNA سبب کند شدن روند رشد تومور می‌گردد [۲۲۰]. این فرآیند به صورت تئوری اجازه‌ی فعالیت انتخابی و به حداقل رساندن سمیت سیستماتیک را به دارو می‌بخشد [۲۲۱]. شکل ۱-۱۹، مسیر شماتیک زیست دگرگونی^۵ کپسیتابین به ۵-FU را بعد از مصرف خوراکی آن در شرایط فرضی داخل بدنی به تصویر می‌کشد.



شکل ۱-۱۹- زیست دگرگونی داروی کپسیتابین (CAP) به متابولیت فعال آن (۵-FU): مرحله (۱): کپسیتابین توسط آنزیم CES به ۵-DFCR متابولیزه می‌شود و در مرحله (۲): فرآیند متابولیسمی متعاقب به ۵-DFUR توسط آنزیم CDA کاتالیز می‌شود و در نهایت در مرحله (۳): آنزیم TP موجود در سایتهای تومور تشکیل ۵-FU را سبب می‌شود.

در حالت کلی، غلظت این دارو و متابولیت آن در پلاسمای بیماران مصرف‌کننده، به دلیل متابولیسم سریع آنها در کبد و سلولهای سرطانی بسیار پایین است [۲۲۲]، بنابراین توسعه‌ی روشهای زیست-تجزیه‌ای حساس برای اندازه‌گیری کمی این دسته‌ی دارویی و بسیاری دیگر از ترکیبات شیمی‌درمانی، در راستای کمک به مطالعات فارماکولوژیکی بالینی ضروری به نظر می‌رسد. با در نظر گرفتن اهمیت بالای پیش‌داروی آنالوگی کپسیتابین و نقش کلیدی متابولیت اصلی آن در درمان بسیاری از تومورهای دستگاه گوارشی، پیشنهاد و ارائه‌ی روشهای تجزیه‌ای مقرون بصره و مناسب و در عین حال معتبر برای تعیین کمی و اندازه‌گیری میزان داروی مادر و متابولیت کلیدی آن در نمونه‌های پلاسمای انسان، خالی

¹ Cytidinedeaminase

² Deamination

³ 5-deoxy-fluorouridine (5-DFUR)

⁴ Thymidinephosphorylase (TP)

⁵ Biotransformation

از لطف نبوده و نیست. در سالهای اخیر روشهای متنوع تجزیه‌ای برای اندازه‌گیری کپسیتابین، چه به صورت منفرد و چه به همراه متابولیت‌های مختلف و ترکیبات حدواسطی آن، در پیکره‌های بیولوژیکی گزارش شده‌اند که شامل استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)، تلفیق شده با سیستم‌های آشکارسازی UV-Vis، طیف‌سنجی جرمی (MS) و طیف‌سنجی جرمی-جرمی (MS-MS) می‌باشند [۲۲۳-۲۲۸]. اکثر روشهای گزارش‌شده، تکنیکهای قدرتمندی برای آنالیز مواد و ترکیبات ضدسرطان مزبور می‌باشند؛ اما عملکرد بی‌نقص آنها گاهاً مستلزم صرف زمان و هزینه‌های گزاف و همچنین استفاده از آشکارسازهای گران قیمت و دستگاه‌های پیچیده است که حداقل در کشور ایران به سهولت قابل دسترسی نمی‌باشند. علی‌رغم توسعه‌ی روشهای قدرتمند تجزیه‌ای مورد اشاره در مراجع علمی، در حال حاضر هنوز هم نیاز رو به‌رشدی برای اهداف اندازه‌گیری داروهای متعدد حوزه‌ی آنکولوژی و داروهای خوراکی شیمی‌درمانی در مقیاسهای تجزیه‌ای، مطالعات سنجش سطح‌درمانی آنها، بهینه‌سازی دارودرمانی و نیز فارماکوکنتیک و فارماکودینامیک آنها بمنظور به حداقل رساندن اثرات جانبی، با استفاده از روشهای جدید احساس می‌شود. لذا بسط و معتبرسازی روشهای تجزیه‌ای ساده‌تر ممکن است مفید واقع گردد.

تکنیک الکتروفورز موئن در مقایسه با روشهای کروماتوگرافی گازی و کروماتوگرافی مایع برای اندازه‌گیری و آنالیز ترکیبات دارویی، مزایای چون کوتاهی زمان آنالیز، شرایط آزمایشگاهی و تجزیه‌ای ملایم، قدرت تفکیک بیشتر و کارایی جداسازی مطلوب‌تر را ارائه می‌نماید [۲۷]. نگاهی جامع به مراجع علمی، آشکار می‌سازد که، تاکنون به جز یک مورد که در سال ۲۰۰۳، از تکنیک الکتروفورز موئن برای بررسی نفوذ داروی کپسیتابین و متابولیت‌های آن به بافت‌های توموری استفاده شده بود [۲۲۹]، گزارشی مبنی بر آنالیز و تعیین این دارو به همراه متابولیت یا متابولیت‌های مربوطه در پیکره‌های بیولوژیکی، فرمولاسیون دارویی و حتی سایر ماتریکس‌های محیطی با بهره‌گیری از این روش، به انتشار نرسیده است. این در حالی است که روش الکتروفورز موئن بصورت تلفیق شده با تکنیک‌های تراکم و تغلیظ داخل-ستونی مناسب نمونه، از کارایی مطلوبی برای آنالیزهای تجزیه‌ای برخوردار می‌باشد. شایان ذکر است که، یکی از محدودیتهای اصلی روشهای تغلیظ توده‌ای آنالین، عدم سازگاری با ماتریکس‌های پیچیده‌ی بیولوژیکی می‌باشد؛ بنابراین کاربرد یک روش تلفیقی آماده‌سازی خارج ستونی (آفلاین) به منظور اهداف پیش‌تغلیظ و پاکسازی، بایستی مد نظر قرار گیرد.

از طرفی دیگر، بررسی دقیق‌تر بر روشهای مختلف گزارش شده در مراجع علمی برای اندازه‌گیری، آنالیز و تعیین داروی کپسیتابین و متابولیت‌های مربوطه در پیکره‌های مختلف، نشان می‌دهد که اغلب از روشهای استخراج، پیش‌تغلیظ، پاکسازی و آماده‌سازی سنتی و متداول نمونه، به منظور توسعه‌ی روشهای تجزیه‌ای پیشنهادی بهره‌گرفته شده است [۲۳۰] و کاربرد تکنیک‌های ایمن‌تر و مقرون بصره‌تر

ریزاستخراج و پاکسازی اولیه‌ی نمونه (clean-up)، برای آنالیز همزمان^۱ دو ترکیب دارویی کپسیتابین و ۵-فلورواوراسیل، چندان مورد مطالعه قرار نگرفته است.

با توجه به غلظت و نیز فراهمی زیستی نسبتاً پایین پیش‌داروی کپسیتابین در مایعات فیزیولوژیکی بدن و همچنین برخی از محدودیتهای آشکارسازی تکنیک الکتروفورز موئین که قبلاً به آنها اشاره شده است، آنالیز این دارو و متابولیت اصلی آن با استفاده از روش CE-UV، نیاز به روشهای استخراجی و بهبود حساسیت کارآمد و با فاکتور تغلیظ بالا دارد.

امروزه روشهای استخراجی میناتوریزه شده، کارا، سریع و دوستدار محیط زیست که کاهش استفاده از حلالهای آلی در آنها به طور قابل ملاحظه‌ای لحاظ شده باشد، مورد توجه پژوهشگران حوزه‌ی آنالیز دارو قرار گرفته است [۲۳۱]؛ که در این میان، روشهای نوین آماده‌سازی نمونه بر پایه‌ی فناوری نانو نیز از جذابیت ویژه‌ای برخوردار هستند. با عنایت به قیمت مناسب، سهولت دسترسی، یکبار مصرف بودن، مصرف حداقلی از حلالهای آلی، رقم زدن فاکتورهای غنی‌سازی بالا، به حداقل رسیدن اثرات مزاحمت، داشتن ساختار متخلخل و سایر ویژگی‌های بارز، فیبرهای پلی‌پروپیلنی توخالی، کاربردهای بی‌نظیری را در روشهای استخراج فاز مایع (LPME) به خود اختصاص داده‌اند. استفاده از فیبرهای توخالی، به دلیل خاصیت غشایی که منجر به نگهداری ریزقطرات فاز استخراج‌کننده به عنوان تکیه‌گاه (ساپورت) می‌شود، آنها را تبدیل به نامزدهای مناسبی برای اهداف پیش‌تیمار مناسب نمونه در پیکره‌های مختلف نموده است و تکنیک استخراج فاز مایع مبتنی بر فیبرهای توخالی (HF-LPME) را به روشی پرکاربرد تبدیل نموده است [۲۳۲-۲۳۴]. در چند سال گذشته، مبحث و رویکرد جدیدی از HF-LPME؛ تحت عنوان ریزاستخراج فاز جامد/مایع مبتنی بر فیبرهای توخالی (HF-SLPME)، وارد بحث ریزاستخراج شده است؛ که در این رویکرد جدید، عموماً از جاذبه‌های جامد، علی‌الخصوص نانوساختارهای مختلف در خلل و فرج و تخلخلات فیبرهای توخالی به عنوان اصلاحگر فاز پذیرنده استفاده می‌شود. به گفته‌ی پژوهشگران، این امر سبب افزایش ظرفیت جذب سطحی آنالیت هدف در فیبرها شده و امکان انتقال بهتر آنالیت را فراهم می‌آورد. استفاده از مواد نانوساختاری به دلیل نسبت بالای سطح به حجم آنها، مکانهایی را فراهم می‌کند که مولکولهای هدف می‌توانند از طریق آنها، از فاز دهنده وارد فاز پذیرنده شوند؛ که این امر منجر به گزینش‌پذیری و تغلیظ بالای آنالیت می‌شود. در این مورد، مکانیسم انتقال جسم حل‌شونده دربرگیرنده‌ی مزایای هر دو روش استخراج فاز جامد و استخراج فاز مایع، می‌باشد [۱۳۷].

لذا در بخش اول این کار پژوهشی، برای اولین بار تکنیک الکتروفورز موئین مجهز به ردیاب فرابنفش، به صورت جفت شده با روش تراکم توده‌ای تقویت شده با میدان الکتریکی (FAEI) به عنوان روش تغلیظ آنالین، با یک روش سریع و حساس ریزاستخراج فاز جامد/مایع بر پایه‌ی فیبرهای توخالی

¹ Simultaneous analysis

(HF-SLPME) (به عنوان روش پاکسازی و پیش‌تغلیظ خارج‌ستونی) اصلاح شده با نانوساختارهای مزومتخلخل، همراه شده و برای آنالیز و مطالعه‌ی کمی داروی مذکور و متابولیت اصلی آن در نمونه‌های بیولوژیکی (پلاسمای بیماران مصرف کننده)، مورد تمرکز واقع شده است. در روش پیشنهادی حاضر، با هدف بهبود کارایی استخراج و حصول فاکتورهای تغلیظ بالا و نیز افزایش گزینش‌پذیری روش ریزاستخراج آفلاین HF-SLPME، اصلاح سطح و کانال داخلی فیبرهای توخالی مذکور، توسط تعبیه‌ی یک ساختار نانوکامپوزیتی مزو متخلخل (MCM-41 حاوی نانوذرات نقره، $AgNPs@MCM-41$) صورت گرفته است. به زعم نگارنده که در بخشهای بعدی مورد بررسی اصولی قرار خواهد گرفت، استفاده از این ساختار نانوکامپوزیتی به منظور تقویت ساختار غشایی فیبرهای پلی‌پروپیلنی توخالی، و پس از آزمودن انواع ترکیبات نانوساختار به صورت اصلاح‌شده و اصلاح‌نشده و همچنین انواع دیگری از ترکیبات نانوکامپوزیتی، جهت اهداف استخراج انتخابی و پیش‌تغلیظ آنالیت‌های تحت مطالعه، انتخاب شده و مورد تایید قرار گرفته است؛ به دلیل بهره‌مند بودن از خواص منحصر بفرد نانوذرات نقره نظیر برهمکنشهای ویژه و انتخابی با برخی از گروه‌های عاملی [۸۷] و همچنین خواص ویژه‌ی ترکیب مزومتخلخل انتخابی [۲۳۵]، بواسطه‌ی اختلاط ذرات جاذب با فاز استخراج‌کننده، سبب افزایش همگونی سایتهای جذبی فعال گردیده و توانمندی روش پاکسازی و استخراج خارج‌ستونی نمونه را برای اهداف استخراج اختصاصی مورد نظر، مقدور ساخته است.

پیشینه‌ی تحقیق و بررسی‌های دقیق منابع معتبر علمی نشان می‌دهد که تاکنون گزارشی مبنی بر اندازه‌گیری و استخراج همزمان این دو ترکیب مهم ضدسرطان با روش الکتروفورز موئن در ماتریکس پلاسمای انسانی، منتشر نشده است. در نهایت، بهینه‌سازی پارامترهای موثر بر کارایی روشهای استخراج خارج‌ستونی و تغلیظ داخل‌ستونی، نیز بدقت مورد بررسی قرار گرفته و روش جدید ارائه شده، بر اساس دستورالعمل و گزاره‌های سازمان غذا و داروی ایالات متحده آمریکا (US FDA)، معتبرسازی شده است. همچنین، روش مذکور بطور موفقیت‌آمیزی جهت اندازه‌گیری همزمان کپسیتابین و متابولیت اصلی آن (۵- فلورواوراسیل) در نمونه‌های جمع‌آوری شده‌ی پلاسمای بیماران مبتلا به سرطانهای دستگاه گوارشی که داروی مادر کپسیتابین را مصرف کرده بودند، مورد استفاده قرار گرفته است.

۱-۱۰-۲- داروی ایماتینیب مسیلات^۲

ایماتینیب مسیلات (IMM) با نام تجاری گلوپیک^۳ یکی از مهمترین داروهای ضدسرطان خوراکی می‌باشد که در حقیقت مشتق سنتزی ۲- فنیل آمینو- پیریمیدین^۴ است و اولین ترکیب شناخته شده از

¹ MCM-41-anchored silver nanoparticles($AgNPs@MCM-41$)

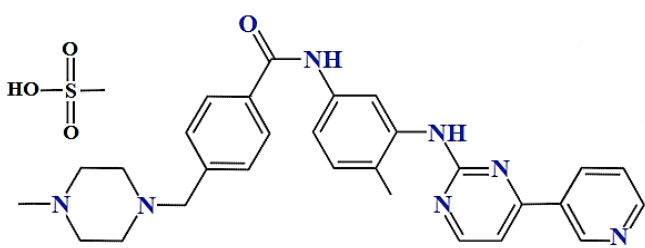
² Imatinib mesylate (Imatinib, IMM)

³ Gleevec® or Glivec®

⁴ 2-phenylamino-pyrimidine

کلاس دارویی جدید عوامل آنتی تکثیری^۱ (آنتی پروليفراتیو- مشهور به مهارکننده‌های هدایت سیگنال^۲) می‌باشد که مسیرهای سیگنال رشد سلولهای توموری را مختل می‌سازد [۲۳۶]. اطلاعات مربوط به فرمول شیمیایی، نام ایوپاک، وزن و ساختار مولکولی، سطوح درمانی^۳، مقادیر pK_a و $\log P$ این ترکیب دارویی در جدول ۱-۹ خلاصه شده است.

جدول ۱-۹- ساختار مولکولی و ویژگی‌های فیزیوشیمیایی ایماتینیب مسیلات.

	
$C_{30}H_{35}N_7SO_4$	فرمول شیمیایی
4-[(4-methyl-piperazin-1-yl)methyl]-N-[4-methyl-3-(4-pyridin-3-yl-pyrimidin-2-yl)amino] phenyl]-benzamide mono methane sulfonate)	نام ایوپاک
۵۸۹/۷۲	وزن مولکولی (g/mol)
[۲۳۷] ۵۰۰ - ۱۰۰۰	سطح درمانی دارو (ng/mL)
[۲۳۸] ۳/۱۱	$\log P$
[۲۳۹] ۱/۵۲ - ۸/۰۷	pK_a

ایماتینیب مسیلات در اصل یک داروی مهارکننده‌ی تیروزین کیناز است که در درمان سرطان خون مزمن (لوسمی میلوئیدی حاد^۴) و تومورهای بدخیم استرومایی (بافت همبندی) متاستاتیک^۵ (GIST) یا تومورهای گوارشی غیرقابل جراحی، به صورت خوراکی تجویز می‌شود. در مصرف این دارو، دوزهای تجویزی بایستی همراه با غذا و حجم زیادی از مایعات مورد استفاده قرارگیرند تا عوارض گوارشی آن به حداقل برسد. مطالعات آزمایشگاهی نشان می‌دهد که ایماتینیب مهارکننده‌ی آنزیم c-KIT است که در سلولهای تومورهای بافت همبندی دستگاه گوارش موجود هستند. به همین دلیل، این دارو به عنوان خط اول درمان این نوع سرطان شناخته شده است [۲۴۰]. این دارو گوناگونی و تغییرپذیری

¹ Anti-proliferative

² Signal transduction inhibitors

³ Therapeutic level

⁴ Myeloid leukemia

⁵ Metastatic malignant gastrointestinal stromal tumors (GIST)

فارماکوکنتیکی جامع و چشمگیری را در بین افراد مختلف دریافت‌کننده نشان می‌دهد؛ این در حالی است که تغییرپذیری فارماکوکنتیکی پایینی را در یک فرد مشخص مصرف‌کننده با یک کارایی غلظتی ثابت، به نمایش می‌گذارد که ضرورت نیاز به روشهای مناسب سنجش سطح درمانی (TDM) آنرا برای دستیابی به پاسخهای درمانی بهینه و کاهش اثرات و عوارض جانبی آن، به چالش کشیده و پررنگ می‌سازد. لذا به منظور دستیابی به پاسخهای درمانی بهینه، اصلاح دوزهای تجویزی و همچنین بررسی رابطه‌ی غلظت/سمیت، سطح سرمی داروی مذکور به ویژه در گروه‌های مختلف دریافت‌کننده‌ی آن، بایستی مورد پایش قرارگیرد [۲۴۱]. دوز تجویزی ایماتینیب در بیماران مبتلا به GIST، شامل یک رژیم درمانی ۱۰۰ تا ۴۰۰ میلی گرم در هر روز می‌باشد [۲۳۸]؛ اما سطح سرمی این دارو در افراد مختلف بسته به فاکتورهای بالینی و بیولوژیکی همانند تغییرات ذاتی در متابولیسم دارو، کاهش جذب (عمدتاً دلیل اختلالات گوارشی بیمار)، برهمکنشهای دارویی، فعالیتهای نفوذی و پخشی^۱، عملکرد کلیه‌ها، وزن، سن و جنسیت بیمار، می‌تواند متغیر باشد [۲۴۲، ۲۴۳]. علاوه بر موارد مذکور در فوق، گوناگونی فارماکوکنتیکی و عدم رعایت رژیم درمانی تجویزی نیز پارامترهای مهمی هستند که روی پاسخ درمان با داروی مذکور و سطح سرمی آن تاثیرگذار می‌باشند [۲۴۴]. بنابراین، پایش سطح سرمی ایماتینیب در بیماران مبتلا به سرطان، بسیار حائز اهمیت است و بر اساس نتایج حاصل از آن و TDM این دارو در بیماران مختلف، می‌توان روند آتی درمان و در عین حال کارآمدی درمان را مشخص نمود.

در سالهای گذشته روشهای تجزیه‌ای و زیست‌تجزیه‌ای متعددی برای اندازه‌گیری کمی و آنالیز داروی ایماتینیب در پیکره‌های مختلفی چون فرمولاسیون دارویی و نمونه‌های بیولوژیکی حیوانی و انسانی (نظیر: خون، پلاسما، سرم، ادرار، محیط کشت، مغز استخوان و مایع مغزی-نخاعی) در مراجع علمی معتبر، گزارش شده‌اند [۲۱، ۲۵۵-۲۴۵]. گزارشات مذکور مشتمل بر تکنیکهای متنوع تجزیه‌ای و جداسازی مانند^۲ HPTLC [۲۴۶]، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا تلفیق‌شده با سیستمهای آشکارسازی UV [۲۵۷، ۲۵۶]، طیف‌سنجی جرمی [۲۵۵، ۲۵۸]، طیف‌سنجی جرمی-جرمی [۲۵۹، ۲۶۰]، UPLC [۲۶۱]، طیف‌سنجی جرمی شتاب‌دهنده^۳ (AMS) [۲۶۲]، روشهای ولتامتری [۲۶۳] و الکتروفورز موئن [۲۶۴] می‌باشند.

بدون‌شک آماده‌سازی نمونه، یک مرحله‌ی حیاتی و مهم در آنالیز ترکیبات دارویی در پیکره‌های زیستی می‌باشد. بررسی دقیق‌تر روشهای تجزیه‌ای یاد شده برای آنالیز ایماتینیب، نشان می‌دهد که در اکثر آنها از تکنیک‌های متنوع آماده‌سازی نمونه مانند ترسیب پروتئین (PP) [۲۶۵]، استخراج مایع-مایع (LLE) [۲۶۶]، استخراج فاز جامد (SPE) [۲۶۷] و یا تلفیقی از موارد مذکور [۲۶۸] برای اهداف

¹ Influx/efflux transporter activities

² High performance thin layer chromatography (HPTLC)

³ Accelerator mass spectrometry (AMS)

پیش‌تغلیظ و یا پاکسازی و آماده‌سازی نمونه، استفاده شده است. علی‌رغم توانمندی نوعی و فوق‌العاده‌ی این روشها در فراهم نمودن حساسیت‌های بهتر برای آنالیز آنالیت‌های هدف، برخی از محدودیت‌های روشهای استخراج مایع- مایع و استخراج فاز جامد نظیر استفاده از حجمهای بالایی از حلالهای آلی، گزینش‌پذیری پایین و هدررفت بخش اعظمی از حلالهای آلی مورد استفاده، آنها را برای آنالیزهای روتین نامناسب ساخته است [۲۶۹]. بررسی دقیق مراجع علمی گویای این حقیقت است که مطالعات کلینیکال و فارماکولوژیکی برای اندازه‌گیری داروی ایماتینیب، هنوز نیازمند روشهای تجزیه‌ای آسان، حساس و مقرون به‌صرفه‌تر به لحاظ اقتصادی و زمانی و در عین حال روشهای قابل اعتماد و با ریسک کمتر از منظر زیست محیطی، برای اهداف پیش‌آماده‌سازی و تغلیظ آنالیت مربوطه از پیکره‌های مختلف بیولوژیکی می‌باشد. از اینرو، توسعه و معتبرسازی رویکردهای تجزیه‌ای جدید با در نظر گرفتن موارد مطروحه، برای اندازه‌گیری و سنجش سطح درمانی داروی مذکور در نمونه‌های زیستی، حائز اهمیت بوده و می‌تواند به عنوان انگیزه‌ای برای بهبود روشهای گزارش شده‌ی قبلی قلمداد شود. از آنجایی که تکنیک الکتروفورز موئین و روش استخراج الکتروغشایی، هر دو بر پایه‌ی مکانیسم مهاجرت الکتریکی هستند، تلفیق این دو روش منطقی به نظر رسیده و می‌تواند منجر به حصول نتایج قابل توجهی شود.

لذا در بخش دوم این کار پژوهشی، برای اولین بار تلفیق روش استخراج الکتروغشایی (EME) با روش تغلیظ توده‌ای تقویت شده با میدان الکتریکی (FASI) مورد ارزیابی قرار گرفته و از تلفیق روشهای یاد شده برای آنالیز داروی ضد سرطان ایماتینیب مسیلات در نمونه‌های پلاسمای انسانی با استفاده از تکنیک الکتروفورز موئین، بهره‌برداری شده است. لازم به توضیح است که از یک نانوکامپوزیت هیبریدی نانولوله‌های کربنی/نانوذرات اکسیدروی (MWCNT/ZnO nano-hybrid composite) پوشیده شده با یک مایع یونی (۱- اکتیل-۳- متیل ایمیدازولیوم بروماید^۱، [OMIm]Br or [C8mim]Br)، که با روش سل- ژل تهیه شده است، برای اصلاح ترکیب غشای مایع تثبیت شده (SLM) استفاده شده و نانوکامپوزیت مذکور به صورت پراکنده شده در حلال SLM انتخابی، در خلل و فرج فیبر توخالی پلی- پروپیلنی، تثبیت شده است. استفاده از روش FASI به منظور افزایش هرچه بیشتر حساسیت و غلبه بر محدودیت‌های معلوم روش الکتروفورز موئین مورد ارزیابی قرار گرفته است. تمامی مراحل آزمایشی به دقت مورد بررسی قرار گرفته و بهینه‌سازی شده است. در نهایت، روش جدید پیشنهادی بر اساس دستورالعمل و گزاره‌های سازمان غذا و داروی ایالات متحده آمریکا (FDA) معتبرسازی شده و امکان کاربرد روش در مطالعات کلینیکی بر روی نمونه‌های پلاسمای بیماران سرطانی دریافت‌کننده‌ی این دارو، مورد بررسی قرار گرفته است. لازم به توضیح است که تاکنون هیچ گزارشی مبنی بر اندازه‌گیری داروی هدف با استفاده از روش پیشنهادی IL-MWCNT@ZnO-HF-EME-FASI-CE-UV، مشاهده نشده است. در

¹ 1-octyl-3-methylimidazolium bromide

عین حال گزارشی مبنی بر اصلاح ترکیب غشاهای مایع تثبیت شده در روش استخراج الکتروغشایی با تکنیک سل-ژل، یافت نشده است.

۱۱-۱- اهداف پژوهش

در این رساله، با عنایت به برخی از پیش‌فرضهای کلیدی نظیر: اهمیت آنالیز داروهای خوراکی شیمی‌درمانی در کاربردهای بالینی و درمانی، امکان کاربرد بهینه‌ی تکنیک الکتروفورز موئین در آنالیزهای دارویی، حساسیت پایین تکنیک مذکور در حالت جفت شده با آشکارساز UV، لزوم اندازه‌گیری غلظت‌های پایین داروهای شیمی‌درمانی خوراکی در مایعات بیولوژیکی بدن و همچنین لزوم بسط و توسعه‌ی روشهای ریزاستخراج در کاربردهای بالینی و معتبرسازی آنها؛ مهمترین اهداف پژوهشی کار حاضر، بر مبنای رهیافت‌های ذیل پایه‌گذاری شده است:

- توسعه و کاربرد روش‌های نوین ریزاستخراج با فاز مایع در حالت جفت شده با تکنیک الکتروفورز موئین؛
- امکان سنجی بهره‌گیری از محصولات مختلف و کلیدی فناوری نانو در توسعه‌ی روشهای آماده‌سازی آفلاین (خارج ستونی) نمونه، به ویژه بررسی استفاده از سیستمهای نانوکامپوزیتی و مزومتخلخل در روشهای مبتنی بر فیبرهای توخالی و استخراجهای فاز مایع؛
- پیشنهاد و توسعه‌ی روشهای نوین برای اهداف پیش‌تغلیظ و آماده‌سازی نمونه و پاکسازی نمونه‌های بیولوژیکی با حداقل مصرف حلالهای آلی؛
- آنالیز داروهای انتخابی شیمی‌درمانی (ضد سرطان) با استفاده از تکنیک ارزشمند الکتروفورز موئین به دلیل فقدان یا کمبود روشهای بروز مبتنی بر تکنیک CE برای اندازه‌گیری آنها در مایعات فیزیولوژیکی بدن؛
- امکان سنجی تلفیق روشهای تغلیظ توده‌ای داخل ستونی (آنلاین) با روشهای توسعه یافته‌ی آماده‌سازی نمونه مانند استخراج الکتروغشایی (EME) برای دستیابی به فاکتورهای تغلیظ مطلوب که تاکنون گزارش نشده است؛
- معتبرسازی کامل روشهای پیشنهادی پس از انجام مراحل بهینه‌سازی شرایط استخراجی و آزمایشی، بر اساس دستورالعمل سازمان غذا و داروی ایالت متحده آمریکا (FDA) و ارزیابی ویژگی‌های کمی تکنیکهای توسعه یافته؛
- کاربرد روشهای پیشنهادی معتبرسازی شده برای اهداف کلینیکال و در نهایت، اندازه‌گیری ترکیبات دارویی هدف در نمونه‌های حقیقی (پلاسما) جمع‌آوری شده از بیماران سرطانی پس از مصرف خوراکی داروهای انتخابی به منظور بررسی پتانسیل کاربردهای بالینی روشهای ارائه شده.

فصل دوّم:

بخش تجربی

(مواد، تجهیزات و روش کار)

۲-۱- مواد، حلالها و ترکیبات شیمیایی

استاندارد مربوط به ترکیبات دارویی مورد استفاده، به طرق زیر تهیه گردیدند:

استاندارد مرجع داروی کپسیتابین ($C_{15}H_{22}N_3O_6F$ ، CAS# ۱۵۴۳۶۱-۵۰-۹) با وزن مولکولی ۳۵۹/۳۵ گرم بر مول و استاندارد مرجع داروی ایماتینیب مسیلات (CAS# ۲۲۰۱۲۷-۵۷-۱) هر دو اهدایی توسط شرکت صنایع شیمیایی دارویی ارسطو^۱ (تهران، ایران) بوده و استاندارد تجزیه‌ای ترکیب ۵-فلورواوراسیل (CAS# ۵۱-۲۱-۸، $C_4H_3FN_2O_2$) با وزن مولکولی ۱۳۰/۰۸ گرم بر مول از شرکت سیگما^۲ (ایالات متحده آمریکا) خریداری شد.

حلالهای آلی n-هپتان، n-هگزان، متانول، اتانول، استونیتریل (ACN) و استون با درجه‌ی خلوص کروماتوگرافی از شرکت‌های کلدون^۳ (جرج تاون^۴، کانادا)، مرک^۵ (دارمشتات^۶، آلمان) و شارلو^۷ (بارسلونا^۸، اسپانیا) خریداری شده بودند. سایر حلالهای مورد استفاده از قبیل سیکلوهاگزانول، ۱-دودکانول، ۱-آندکانول، ۱-اکتانول، دی اتیل اتر، سیکلوهاگزان، اتیل استات، ۱-هپتانول، نیتروبنزن، ۲-نیتروبنیل-اکتیل اتر (NPOE)، ایزوپروپیل نیتروبنزن (IPNB) و اتیل نیتروبنزن (ENB) از شرکت فلوکا^۹ خریداری شدند.

نمک نقره نیترات (۹۹/۸% $AgNO_3$) با جرم مولکولی برابر با ۱۶۹/۸۷ گرم بر مول، سدیم-هیدروکسید، سدیم کلرید، فسفریک اسید، تری اتانول آمین (TEA)، سدیم دی هیدروژن فسفات (NaH_2PO_4)، دی سدیم هیدروژن فسفات (Na_2HPO_4)، تریس (هیدروکسی متیل) آمینومتان^{۱۰} ($Tris, C_4H_{11}NO_3$)، آمونیوم هیدروکسید، هیدروکلریک اسید، نیتریک اسید، سولفوریک اسید و سدیم بوروهیدرید (۹۸٪ $NaBH_4$) از شرکت‌های مرک و AppliChem خریداری شدند.

سورفکتانت ستیل تری متیل آمونیوم بروماید^{۱۱} (CTAB) از شرکت شیمیایی BHD انگلستان تهیه شده است. تترا اتیل اورتوسیلیکات (TEOS) و متیل تری متوکسی سیلان (MTMOS) از شرکت سیگما-آلدریچ^{۱۲} خریداری شدند. فیبرهای غشایی (Accurel Q3/2) توخالی از جنس پلی پروپیلن (PPHF) با قطر

¹ Arasto Pharmaceutical Chemicals Inc.

² Sigma

³ Caledon

⁴ Georgetown

⁵ Merck

⁶ Darmstadt

⁷ Scharlau

⁸ Barcelona

⁹ Fluka

¹⁰ Tris (hydroxymethyl) aminomethane

¹¹ Cetyltrimethylammonium bromide(CTAB)

¹² Sigma-Aldrich

داخلی ۶۰۰ میکرومتر، ضخامت دیواره‌ی ۲۰۰ میکرومتر و اندازه‌ی قطرِ منافذ (سایزِ حفرات) ۰/۲ میکرومتر با تخلخل ۷۵ درصد از شرکت ممبرانا^۱ (ووپرتال^۲، آلمان) سفارش داده شده بودند. در ضمن، مایع یونی ۱- اکتیل-۳- متیل ایمیدازولیوم بروماید ($[OMIm]Br$, $C_{12}H_{23}BrN_2$) از شرکت تکنولوژیهای مایعات یونی^۳ (هایلبرون^۴، آلمان) خریداری شده است. نانوذرات روی اکسید (ZnO) از شرکت (مرکز) تحقیقاتی نانومواد^۵ (هوستون^۶، آمریکا) تهیه شده است. در نهایت، نانولوله‌های کربنی چند دیواره (MWCNTs) با مشخصات: (قطر خارجی کمتر از ۱۵ نانومتر، طول متوسط تقریباً ۱۰ میکرومتری، اندازه‌ی سطح موثر کمتر از ۶۰۰ مترمربع برگرم و خلوص بالاتر از ۹۵٪)، از پژوهشگاه صنعت نفت ایران^۷ (تهران، ایران) تهیه گردیده است.

۲-۲- دستگاهوری

کلیه‌ی جداسازیهای الکتروفورتیکی بر روی یک دستگاه الکتروفورز موئین پرینس^۸ (PrinCE) مدل CE-۴۶۰ (امن^۹، هلند) مجهز به یک ردیاب فرابنفش لامبدا^{۱۰} مدل ۱۰۱۰ (محدوده‌ی طول موجی: ۸۰۰-۱۹۰ nm) و پهنای باند نوری ۶ نانومتر ساخت شرکت بیشاف^{۱۱} (لئونبرگ^{۱۲}، آلمان) انجام گرفته است. از یک نرم افزار داکس^{۱۳} (DAX) ورژن ۸ (توصیه شده توسط شرکت سازنده) برای کنترل دستگاهی، جمع‌آوری، پردازش و آنالیز داده‌ها استفاده گردید. کنترل دمای ستون موئین و آون، توسط یک ترموستات جت استریم^{۱۴} انجام می‌گرفت. سایر تجهیزات، وسایل و دستگاه‌های مورد استفاده در این مطالعات، در ذیل لیست شده‌اند.

- ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۱ میلی گرم ساخت شرکت A&D انگلستان.
- دستگاه التراسونیک^{۱۵} مدل EUROSONIC ۴D (مونتاکیو^{۱۶}، ایتالیا) با فرکانس ۵۰ kHz جهت ایجاد پراکندگی نانو ساختارها، استفاده در آماده‌سازی نمونه و گاززدایی در تهیه‌ی بافرها و محلول‌ها.
- pH متر ساخت شرکت متروم^۱ سوییس، جهت تنظیم و بررسی pH بافرها و محلول‌ها.

¹ Membrana

² Wuppertal

³ Ionic Liquids Technologies GmbH

⁴ Heilbronn

⁵ US Research Nanomaterials, Inc

⁶ Houston

⁷ Research Institute of the Petroleum Industry

⁸ PrinCE 460 capillary electrophoresis instrument (Prince Technologies)

⁹ Emmen, The Netherlands

¹⁰ Lambda

¹¹ Bischoff

¹² Leonberg

¹³ DAX software

¹⁴ Jetstream

¹⁵ Ultrasonic

¹⁶ Montecchio Precalcino

- همزن مغناطیسی (هات‌پلیت) لایینکو^۲ مدل L-۸۱ ساخت کشور هلند، مورد استفاده در مراحل آماده‌سازی نمونه.
- دستگاه سانتریفیوژ^۳ دیجیتالی با دور بالا ساخت شرکت هتیش^۴ آلمان، مدل UNIVERSAL ۳۲۰R برای انجام فرایندهای ریزاستخراج و مراحل پروتئین‌زدایی.
- دستگاه لایه نشانی طلای Sputter coater مدل SCD-۰۰۵ ساخت شرکت BAL-TEC کشور سوئیس جهت لایه نشانی سطوح نمونه‌های نانوساختاری (نانوکامپوزیتی و نانومتخلخل) سنتزی و فیبرهای توخالی اصلاح شده، به‌منظور آماده‌سازی برای تصویربرداری میکروسکوپی و جلوگیری از اثر شارژ ساکن.
- دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی^۵ (SEM)، LEOZEISS، محصول مشترک کشورهای آلمان و انگلستان (مدل ۱۴۳۰VP) جهت تصویربرداری‌های میکروسکوپی و مشخصه‌یابی سطوح فیبرها، نانوکامپوزیت، ترکیبات مزومتخلخل و نانوجاذب‌های تهیه‌شده.
- مطالعات پراش اشعه‌ی ایکس (XRD) با استفاده از دستگاه Siemens D۵۰۰۰ ساخت کشور آلمان، مجهز به پراش دهنده‌ی اشعه‌ی ایکس $K\alpha$ مس ($\lambda=1/54\text{\AA}$ ، ۴۰KV، ۳۰mA)، مستقر در مرکز مطالعات زمین‌شناسی شمال غرب کشور، انجام شد.
- بررسی مساحت سطوح ترکیبات مزومتخلخل تهیه‌شده، با تکنیک BET توسط دستگاه Belsorb II ساخت کشور ژاپن و بر اساس ایزوترم‌های همدمای جذب و واجذب گاز نیتروژن در دمای ۷۷ کلوین انجام شده است.
- طیف‌نگار نشری پلاسمای جفت شده القایی^۶ (ICP) شرکت واریان^۷ مدل OES-۷۳۰ محصول کشور آمریکا، برای بررسی ترکیب درصد اتمی نقره‌ی بارگذاری شده در نمونه‌های مزومتخلخل اصلاح‌شده، بکارگرفته شد.
- دستگاه FT-IR ساخت شرکت Thermo Nicolet مدل Nexus-۶۷۰[®] در محدوده‌ی اعداد موجی $4000-450\text{ cm}^{-1}$ جهت بررسی گروه‌های عاملی مورد استفاده قرار گرفت.
- دستگاه میکروسکوپ الکترونی عبوری^۸ (TEM) مدل Philips-CM۳۰ ساخت کشور هلند، با ولتاژ شتاب دهنده‌ی ۳۰۰ کیلوولت، متعلق به گروه فنی - مهندسی دانشگاه تهران که به منظور ارزیابی نانوساختارهای مورد استفاده و فیبرهای توخالی اصلاح شده با آنها از نظر اندازه، شکل، مورفولوژی و پراکندگی توزیع ذرات، استفاده شده است.

¹ Metrohm

² Labinco

³ Centrifuge

⁴ Hettich

⁵ Scanning electron microscopy

⁶ Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy

⁷ Varian

⁸ Transmission electron microscopy

- همزن و رتکس Dragon Lab مدل MX-S محصول کشور آمریکا، برای همگن سازی مخلوطها، مراحل ترسیب پروتئین و آماده سازی نمونه های بیولوژیکی بکار گرفته شد.
- دستگاه الکتریکی منبع تغذیه ی DC مدل PV-600 ساخت شرکت مبتکران آریایی جی^۱ (زنجان، ایران) با ولتاژ قابل برنامه ریزی در محدوده ی ۵-۶۰۰ ولت و بیشینه خروجی جریان ۵۰۰mA، در روش استخراج الکتروغشایی مورد استفاده قرار گرفت.
- سیم های پلاتینی با قطر ۰/۲ میلی متر به عنوان الکترودهای آند و کاتد، در روش استخراج الکتروغشایی استفاده شد.

۲-۳- شرایط و روشهای الکتروفورتیکی

۲-۳-۱- شرایط الکتروفورتیکی برای اندازه گیری همزمان کپسیتابین و FU-۵

کلیه ی جداسازی ها و آزمایشات الکتروفورتیکی در این بخش، با استفاده از یک ستون موئین از جنس سیلیکای گداخته (uncoated fused-silica capillary)، خریداری شده از شرکت آجیلنت^۲ (والدبرون^۳، آلمان) با قطر داخلی ۵۰ میکرومتر، طول ۶۰ سانتی متر و طول موثر (مفید تا ردیاب) ۴۸/۵ سانتی متر انجام شده است.

آماده سازی ستون های موئین جدید، قبل از استفاده در فرایندهای آنالیز و برای اولین بار، طبق پروتکل زیر و با شویشهای متوالی در فشار حداکثری دستگاه (flushing) انجام شد:

متانول (۱۰ دقیقه)، آب دیونیزه (۲ دقیقه)، محلول سدیم هیدروکسید ۱ مولار (۶۰ دقیقه)، محلول سدیم هیدروکسید ۰/۱ مولار (۱۵ دقیقه)، آب دیونیزه (۳۰ دقیقه) و الکترولیت زمینه (۴۵ دقیقه). همچنین در آغاز روزانه ی فرایندهای جداسازی و بین هر اجرای جداگانه، ستون موئین مطابق دستورالعمل مقابل آماده سازی شد: شویش متوالی و با فشار ۲۵۰۰ میلی بار از محلول سدیم هیدروکسید ۰/۱ مولار (۲ دقیقه)، آب دیونیزه (۲ دقیقه) و الکترولیت زمینه ی اجرایی^۴ (۵ دقیقه).

محلول بافر فسفات ۶۰ میلی مولار با pH=۷ (تنظیم pH با استفاده از محلول ۰/۵ مولار تریس^۵ انجام شده است) حاوی ۱۰٪ حجمی - حجمی متانول (به عنوان اصلاحگر آلی) به عنوان ترکیب شیمیایی الکترولیت زمینه در نظر گرفته شده است. لازم به ذکر است که pH بافر، قبل از افزودن اصلاحگر آلی تنظیم می گردید. به منظور جلوگیری از گرفتگی ستون موئینه، کلیه ی محلول های مورد استفاده اعم از

^۱ Mobtaker Aryaei J

^۲ Agilent

^۳ Waldbronn

^۴ Background electrolyte

^۵ Tris

محلول‌های بافری و نمونه، پس از عبور دادن از فیلترهای سرسرنگی^۱ ۰/۲۲ میکرونی (ساخت شرکت میلی‌پور^۲ کشور آمریکا) و گازدایی با دستگاه فراصوت (التراسونیک) به مدت ۱ دقیقه، مورد استفاده قرار می‌گرفتند. همچنین، به منظور تعیین عملکرد و کارایی تکنیک FASI، نمونه‌ها در مخلوط ۵۰٪ از استونیتریل - آب تهیه شده و در یخچال نگهداری شد. لازم به ذکر است که تزریق کلیه‌ی نمونه‌ها به درون ستون موئین بصورت الکتروکینتیکی^۳ و پس از بارگذاری یک پلاگ (قاچ) باریک از آب که بصورت هیدرودینامیکی^۴ و با فشار ۵۰ mBar (به مدت ۳ ثانیه) به داخل ستون هدایت می‌شد، صورت می‌گرفت. زمان تزریق الکتروکینتیکی ۲۵ ثانیه، ولتاژ تزریق ۱۵ kV و ولتاژ مورد نیاز برای جداسازی در ۱۸ kV تنظیم شده بودند که جداسازی‌های انجام گرفته در ولتاژ ۱۸ کیلوولت، شدت جریان‌هایی در محدوده ۱۶۰-۱۴۰ میکروآمپر را تولید می‌کردند. در کلیه‌ی آزمایشات انجام گرفته، دمای ستون از طریق ترموستات محفظه‌ی نگهدارنده‌ی ستون موئینه در ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد تنظیم می‌شد. آشکارسازی آنالیت‌ها در طول موج ۲۴۵ نانومتر انجام گرفت که در این طول موج هر دو آنالیت پاسخ جذبی کافی و به تبع آن بیشترین حساسیت را دارا می‌باشند [۲۷۰]. در نهایت اینکه، در هر بار تکرار و اجرای آنالیز، بافرها به منظور حصول اطمینان از تکرارپذیری روش، تعویض می‌شدند.

۲-۳-۲- شرایط الکتروفورتیکی برای اندازه‌گیری ایماتینیب مسیلات

کلیه‌ی جداسازی‌ها و آزمایشات الکتروفورتیکی در بخش دوم، با استفاده از یک ستون موئین از جنس سیلیکای گداخته، خریداری شده از شرکت اجیلنت (والدبرون، آلمان) با قطر داخلی ۵۰ میکرومتر، طول ۶۵ سانتی‌متر و طول موثر (مفید تا ردیاب) ۵۳/۵ سانتی‌متر انجام شده است. آماده‌سازی اولیه‌ی ستون و نیز آماده‌سازی ستون بین هر اجرای جداگانه، مطابق مراحل ذکر شده در قسمت قبلی انجام شده است.

محلول بافری NaH_2PO_4 (سدیم دی‌هیدروژن فسفات) با غلظت ۱۰۰ میلی مولار (pH=۲) به عنوان الکترولیت زمینه مورد استفاده گرفته است. به منظور جلوگیری از گرفتگی ستون، تمام محلول‌های مورد استفاده اعم از محلول‌های بافری و نمونه بعد از عبور دادن از فیلترهای سرسرنگی ۰/۴۶ میکرونی و گازدایی با دستگاه فراصوت (التراسونیک) به مدت ۱ دقیقه، مورد استفاده قرار می‌گرفتند. تزریق کلیه‌ی نمونه‌ها به درون ستون کپیلاری بصورت الکتروکینتیکی و پس از بارگذاری یک پلاگ (قاچ) باریک از آب که بصورت هیدرودینامیکی^۵ و با فشار ۵۰ mBar (به مدت ۲ ثانیه) به داخل ستون هدایت می‌شد، صورت می‌گرفت. زمان تزریق الکتروکینتیکی ۳۵ ثانیه، ولتاژ تزریق ۱۵ kV و ولتاژ مورد نیاز برای

^۱ PTFE syringe filter membranes

^۲ Millipore

^۳ Electrokinetic

^۴ Hydrodynamic

^۵ Hydrodynamic

جداسازی در ۲۰ kV تنظیم شده بودند که جداسازی‌های انجام گرفته در ولتاژ ۲۰ کیلوولت، شدت جریان‌هایی در حدود ۱۳۵ میکروآمپر را تولید می‌کردند. در کلیه‌ی آزمایشات انجام گرفته، دمای ستون از طریق ترموستات محفظه‌ی نگهدارنده‌ی ستون موئینه در 15 ± 0.2 درجه‌ی سانتی‌گراد تنظیم می‌شد. ردیابی آنالیت در طول موج ۲۴۱ نانومتر انجام گرفت. حلال متانول به مقدار ۳۵ درصد حجمی - حجمی نسبت به فاز پذیرنده، پس از اتمام فرایند الکتروغشایی و جمع‌آوری فاز پذیرنده، به عنوان مناسب‌ترین ترکیب رقیق‌سازی نمونه‌های استخراجی و به منظور تعیین و بهینه‌سازی عملکرد تزریق توده‌ای آنالیت (FASI)، با فاز پذیرنده مخلوط می‌شد. در نهایت اینکه در هر بار تکرار و اجرای آنالیز، بافرها به منظور حصول اطمینان از تکرارپذیری روش، تعویض می‌شدند.

۲-۴ - محلول‌های اولیه^۱ و محلول‌های استاندارد

محلول‌های اولیه (مادر) کپسیتابین و ۵-فلورواوراسیل به طور جداگانه با غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در متانول تهیه و در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد و به دور از نور نگهداشته شدند. برای هر کدام از آنالیت‌ها، دو محلول مادر با غلظت ۱ mg/mL که یکی از آنها برای استانداردهای کالیبراسیون (توسعه-ی روش) و دیگری برای نمونه‌های مورد استفاده در معتبرسازی روش (مطالعات معتبرسازی) مورد استفاده قرار می‌گرفت، تهیه شدند. همچنین یک مخلوط از کپسیتابین و ۵-فلورواوراسیل با غلظت ۵۰۰ µg/mL از محلول‌های مادر هر دو آنالیت تهیه گردید. محلول‌های استاندارد با رقیق‌سازیهای بعدی محلول اولیه با حجم‌های مناسب از متانول آماده شدند. برای تهیه‌ی روزانه و تازه‌ی محلول‌های کاری با غلظت‌های متفاوت، حجم‌های مناسبی از محلول‌های استاندارد با محلول ۵۰٪ متانول - آب‌دیونیزه رقیق شدند.

محلول اولیه از ایماتینیب مسیلات در غلظت 1000 میکروگرم بر میلی‌لیتر در حلال متانول تهیه شده و در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد و بدور از نور نگهداشته شد. سپس یک محلول حدواسط^۲ با غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به صورت هفتگی در اثر رقیق کردن مناسب محلول اولیه با متانول تهیه می‌شد. محلول‌های استاندارد رقیق‌تر و محلول‌های کاری بصورت روزانه در اثر رقیق‌سازی مناسب محلول‌های حدواسط^۲ مورد نظر با محلول آبی متانول ۵۰٪ v/v در محدوده‌ی ۵۰۰-۵۰۰۰۰ µg/mL آماده و در صورت لزوم در اثر افزودن مقادیر مورد نیاز از محلول‌های استاندارد تهیه شده به نمونه‌های پلاسما، تهیه می‌شدند.

¹ Stock solution

² Intermediary solution

۲-۵- جمع آوری و تهیهی نمونه‌های بیولوژیکی (پلاسما)

۲-۵-۱- تهیه و آماده‌سازی نمونه‌های پلاسمای شاهد، کنترل کیفیت (QC) و جمع آوری نمونه-

های پلاسمای انسانی بعد از مصرف داروی کپسیتابین توسط بیماران دریافت‌کننده

نمونه‌های پلاسمای انسانی عاری از دارو^۱ (تهیه شده از نمونه‌های خون داوطلبان سالم)، با هدف تهیهی نمونه‌های کنترل کیفی (QC)، از مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون^۲ مرکز ارومیه تهیه و پس از انتقال به میکروتیوب‌های پلی‌پروپیلنی^۳ در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد منجمد و نگهداری شدند. نمونه‌های استاندارد برای کالیبراسیون و نمونه‌های کنترل کیفی در پلاسمای انسانی هپارین‌دار^۴ و عاری از دارو (کنترل) به صورت جداگانه قبل از استفاده، به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند ($RCF^5=2000 \times g$). نمونه‌های استاندارد برای کالیبراسیون به صورت روزانه و با اضافه کردن حجم‌های مناسبی از محلولهای کاری مخلوط دو دارو (تهیه شده در محدوده‌های غلظتی مختلف)، به $500 \mu l$ پلاسمای شاهد و با هدف تهیهی غلظت‌های نهایی از دو آنالیت تحت مطالعهی کپسیتابین و ۵- فلورواوراسیل (CAP/5-FU) در محدوده‌ی سطح غلظتی درمانی پلاسمایی^۶ این داروها ($25-2500 \text{ ng/mL}$ برای هر دو ترکیب) تهیه شدند [۲۱۸]. همچنین به منظور انجام مطالعات و آزمایشات درصد بازیابی^۷، مقادیر متناسبی از محلولهای استاندارد داروهای مذکور به 500 میکرولیتر (0.5 میلی‌لیتر) از پلاسمای شاهد اضافه می‌گردید و پس از همگن‌سازی، مراحل ترسیب پروتئین با افزودن $1/2$ میلی‌لیتر از مخلوط متانول- استونیتریل ($50:50 \text{ v/v}$) به میکروتیوب حاوی نمونه‌های پلاسما و سپس ورتکس این مخلوط به مدت 30 ثانیه و بلافاصله سانتریفیوژ در $4190 \times g$ به مدت 10 دقیقه، دنبال می‌شد. در نهایت، سایر مراحل پس از ترسیب پروتئین برای آماده‌سازی نمونه‌ها و پیش‌تغلیظ و استخراج آنها از پیکره‌ی پلاسمای پروتئین‌زدایی شده که در بخشهای بعدی به تفصیل مورد بحث قرار خواهد گرفت، صورت می‌پذیرفت.

همچنین، نمونه‌های حقیقی (خون) از بیماران مبتلا به سرطان روده‌ی بزرگ (کولورکتال)^۸ و معده^۹ (بیماران مصرف‌کننده‌ی داروی کپسیتابین)، که فرم‌های رضایت‌نامه‌ی شرکت در تحقیق^{۱۰}، تایید- شده در کمیته‌ی اخلاق^{۱۱} مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد^{۱۲} دانشگاه علوم پزشکی تهران

¹ Drug-free human plasma

² Blood Transfusion Research Center

³ Propylene micro-tubes

⁴ Heparinized

⁵ Relative centrifugal force

⁶ Therapeutic plasma levels

⁷ Recovery experiments

⁸ Colorectal cancer

⁹ Gastric cancer

¹⁰ Consent forms

¹¹ Ethics committee

¹² Digestive Disease Research Center, Tehran University of Medical Sciences

(تهران- ایران) را امضاء و تایید نموده بودند، جمع‌آوری شده است. نمونه‌های خون بیماران، در لوله‌های مخصوص هپارین‌دار جمع‌آوری شده و بلافاصله به مدت ۱۰ دقیقه تحت سانتریفوژ در شرایط $2000 \times g$ قرار گرفته و در نهایت بخش‌های (کسر) پلاسمایی آن‌ها جداسازی گردیده و تا زمان آنالیز، در دمای 22°C - درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شده‌اند.

لازم به توضیح است که در این مطالعه و به منظور حفظ حقوق بیماران، محققین در تمامی مراحل پژوهش به اصول عهدنامه‌ی هلسینکی^۱ متعهد بودند. نام و اطلاعات بیماران در نزد محققین محفوظ مانده است. همچنین تمامی بیماران، پیش از انجام مطالعه از شرایط تحقیق آگاه شده و رضایت کتبی خویش را اعلام نموده بودند. هیچکدام از بیماران از درمان ضروری خود محروم نشدند و رضایت شخصی خانواده‌ی آنها برای نمونه‌گیری نیز اخذ شد. در عین حال، محققین در تمامی مراحل تحقیق و جمع‌آوری و انتشار داده‌ها به اصول صداقت و امانت‌داری متعهد بوده و لذا از ذکر جزئیات مربوط به حریم خصوصی و اطلاعات محرمانه‌ی بیماران، در انتشار نتایج خودداری شده است.

۲-۵-۲- تهیه و آماده‌سازی نمونه‌های پلاسمای شاهد و جمع‌آوری نمونه‌های پلاسمای بیماران بعد از مصرف داروی ایماتینیب مسیلات

در این مطالعه، نمونه‌های شاهد پلاسمای انسانی عاری از دارو (جمع‌آوری شده از داوطلبان سالم) از سازمان انتقال خون ایران، مرکز مهاباد^۲ (مهاباد- ایران) تهیه و در میکروتیوب‌های پروپیلنی در دمای 22°C - درجه‌ی سانتی‌گراد منجمد و ذخیره شدند. نمونه‌های حقیقی خون، از چهار نفر بیمار مبتلا به بیماری سرطان GIST (مصرف‌کننده‌ی داروی ایماتینیب مسیلات) که فرم‌های رضایت‌نامه‌ی شرکت در تحقیق، تاییدشده در کمیته‌ی اخلاق مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی تهران را امضاء و تایید نموده بودند، جمع‌آوری شد. نمونه‌ها بلافاصله بعد از انتقال به لوله‌های هپارین‌دار، ورتکس شده و به مدت ۱۰ دقیقه در $2000 \times g$ تحت سانتریفوژ قرار گرفتند. سپس کسر پلاسمایی آن‌ها جداسازی و تا زمان آنالیز در دمای 22°C - نگهداری شد. در حین آزمایشات روزانه و قبل از شروع، نمونه‌های پلاسمای منجمد شده، جهت ذوب شدن، در دمای اتاق به حال خود رها شدند و برای تهیه‌ی غلظت‌های مختلف از آنالیز هدف در پیکره‌ی پلاسما (استانداردهای کالیبراسیون در پلاسما) مقادیر مناسب از محلول‌های استاندارد کاری آن با 400 میکرولیتر پلاسمای عاری از دارو (شاهد) مخلوط شدند.

¹ Declaration of Helsinki

² Iranian Blood Transfusion Organization (Mahabad, Iran)

۲-۶- فرآیندهای ریزاستخراج و آماده‌سازی خارج‌ستونی نمونه

۲-۶-۱- ریزاستخراج ادغامی فاز جامد- مایع متکی بر فیبر توخالی (HF-SLPME) در

اندازه‌گیری همزمان کپسیتابین و ۵-فلورواوراسیل

۲-۶-۱-۱- تهیه‌ی ترکیب مزومتخلخل MCM-۴۱ و نانوجاذب کامپوزیتی AgNPs@MCM-۴۱

ساختار مزوپرس خالص MCM-۴۱ در آزمایشگاه و بر اساس اصلاحات جزئی صورت گرفته در روش گزارش شده توسط سلوکانن^۱ و همکارانش [۲۷۱]، تهیه شده است. در این فرآیند، از تترا اتیل-اورتوسیلیکات (TEOS) به عنوان منبع سیلیس^۲ و از سورفکتانت سیتیل تری متیل آمونیوم بروماید (CTAB) به عنوان عامل الگویی و قالب‌بندی^۳ سنتز استفاده شده است. مطابق دستورالعمل ارائه شده با اندکی اصلاحات، ۰/۸۵ گرم CTAB به عنوان یک الگوی (قالب) آلی به ۱۸۰ گرم آب دیونیزه تحت شرایط دمایی ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد افزوده شده و به دنبال آن، به مخلوط آماده شده، قطره قطره محلول آمونیوم هیدروکسید (۲۵٪) برای بالابردن و تنظیم pH مخلوط، اضافه گردید. در مرحله‌ی بعدی، پس از افزودن ۴/۳۷ گرم از TEOS به مخلوط فوق، واکنش به مدت ۲۴ ساعت تحت دمای ۸۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و همزدن شدید قرار گرفت. سپس، محصول جامد ته‌نشین شده و بدست آمده، پس از صاف کردن و شستشوی دقیق با آب دیونیزه، به مدت ۱ شب در دمای ۱۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد رها شد. در نهایت پودر حاصله برای مدت زمان ۷ ساعت تحت دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد کلسینه شد، تا باقی-مانده‌ی سورفکتانت آلی حذف شده و ماده مزومتخلخل MCM-۴۱ حاصل شود. این ماده‌ی خالص در مراجع علمی و همچنین در برخی از قسمتهای این رساله، به منظور رعایت اختصار، به جای MCM-۴۱ تحت عنوان (as-M۴۱) نیز شناخته می‌شود.

نانوکامپوزیت (نانوجاذب) AgNPs@MCM-۴۱ مطابق روش ارائه شده در مراجع [۲۷۲-۲۷۴] با برخی تغییرات جزئی که به آن اشاره خواهد شد، تهیه گردید. بدین‌صورتکه، ۱ گرم از as-M۴۱ به ۳۰ میلی‌لیتر محلول آبی نقره نیترات با غلظت ۱/۵ میلی‌مولار به عنوان منبع یون‌های Ag⁺ اضافه شده (دیسپرس شد) و در دمای اتاق و شرایط تاریک، به مدت ۱۲ ساعت بهم‌زده شد. رسوب حاصله پس از عبور دادن از فیلتر، چندین بار با آب دیونیزه شستشو گردید و سپس پودر بدست آمده بدون فرآیند خشک کردن، با افزایش قطره به قطره از محلول تازه تهیه شده از سدیم بوروهیدرید (۰/۰۱ M) (به عنوان عامل کاهنده) احیاء شد که منجر به تولید محصول زرد رنگی شد. رسوب حاصل پس از صاف-کردن و شستشوی متناوب با آب دیونیزه و اتانول خالص، در دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد تحت جریان ملایمی از گاز نیتروژن به مدت ۲ ساعت خشک گردید.

¹ Selvakannan

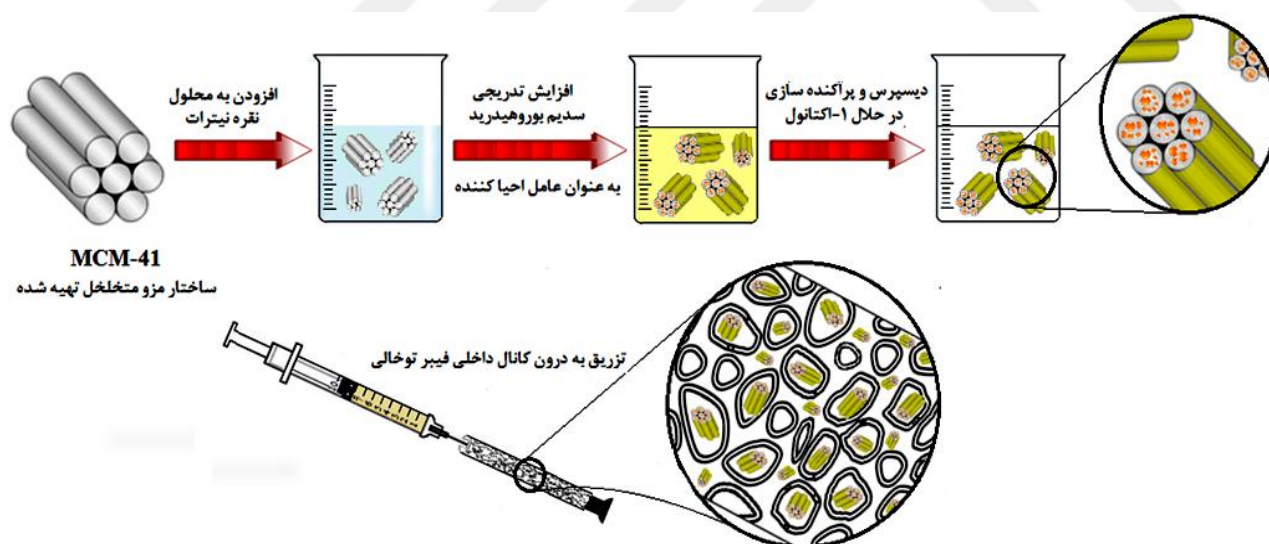
² Silica source

³ Template agent

محصول بدست آمده (نانوجاذب AgNPs@MCM-41) که به اختصار Ag/M41 نیز نامیده می‌شود، پس از سرد شدن و رسیدن به دمای اتاق با استفاده از تکنیک‌های مختلفی نظیر SEM، TEM، BET، XRD و ICP-OES مشخصه‌یابی گردید. با توجه به نتایج بدست آمده از آنالیز ICP-OES درصد بارگذاری نقره در درون نانوکامپوزیت مزومتخلخل، پس از فرآیندهای احیاء و فیلتراسیون، در حدود ۰/۱۴۹ درصد تعیین گردید (جدول ۱-۲). در نهایت نانوکامپوزیت سنتز شده مطابق پروتکل تشریح شده در قسمت بعدی، در ساختار متخلخل (دیواره و کانال داخلی) فیبر توخالی پلی پروپیلنی تثبیت گردیده و به منظور استخراج آنالیت‌های هدف از نمونه‌های پلاسمای انسانی، مورد بهره‌برداری قرار گرفت. مراحل شماتیک ذکر شده در بالا به صورت خلاصه، در شکل ۱-۲ به تصویر کشیده شده است.

جدول ۱-۲- میزان غلظت متوسط بارگذاری شده‌ی نقره در نانوجاذب تهیه شده بر اساس نتایج تکنیک ICP-OES.

نمونه	عنصر هدف (EI)	طول موج	غلظت محاسبه شده (ppm)
AgNPs@MCM-41	Ag	۳۲۸/۰۶۸	۱۴۹۰/۸



شکل ۱-۲- تصویر شماتیک نحوه‌ی تهیه‌ی نانوجاذب مزومتخلخل و تثبیت آن در درون فیبر توخالی اصلاح شده برای استخراج آنالیت‌های هدف توسط روش استخراج فاز جامد- مایع (HF-SLPME) پیشنهادی.

۲-۶-۱-۲- تهیه فیبر استخراج (HF-SLPME) و متدولوژی استخراج آفلاین

پس از تهیه و مشخصه‌یابی نانوجاذب، چینش آزمایشگاهی برای روش ریز استخراج فاز جامد- مایع مبتنی بر فیبر پلی‌پروپیلنی توخالی (HF-SLMPE) طبق مراحل ذیل صورت گرفته است:

۱- فیبرهای توخالی پلی‌پروپیلنی به صورت دستی به قطعات با اندازه‌ی (طول) ۱/۲ سانتی‌متر بریده شد.

۲- قطعات آماده‌شده، قبل از استفاده و به منظور حذف آلودگی‌های احتمالی، به مدت ۱۰ دقیقه در داخل حلال استون غوطه‌ور شده و تحت امواج فراصوت قرار گرفتند و متعاقب آن مستقیماً توسط جریان هوا (در دمای اتاق) خشک شدند.

۳- از آنجایی که حلال ۱- اکتانول با ساختار غشایی پلی‌پروپیلنی فیبرهای توخالی سازگاری مطلوب و کافی داشته و براحتی منافذ آنها را اشغال می‌کند و در عین حال شرایط اشباع‌سازی کامل و تثبیت در دیواره‌های منافذ جهت تامین حداکثر میزان انتقال آنالیتها به درون حلال آلی را فراهم نماید [۲۷۵]، فیبرهای مذکور پس از خشک شدن، به مدت ۲۰ ثانیه در حلال ۱- اکتانول غوطه‌ور شدند تا تمامی حفرات و خلل و فرج آنها با این حلال آغشته و اشباع شود.

۴- در مرحله‌ی بعد، با هدف حذف مقادیر اضافی حلال آلی از سطح و داخل، فیبرهای مورد استفاده به- آرامی با آب دیونیزه شستشو داده شدند.

۵- سپس، فیبرهای حاصل از مرحله‌ی قبلی، به مدت یک ساعت در مخلوط دیسپرس (پخش) شده‌ی نانوکامپوزیت (۵ میلی‌گرم از جاذب Ag/M۴۱ در ۵ میلی‌لیتر حلال ۱- اکتانول) غوطه‌ور گردید تا بر اساس پدیده موئینگی و با کمک فراصوت، حفرات فیبرهای توخالی با نانوکامپوزیت مورد نظر پر و اشغال شوند.

۶- در نهایت فیبرهای مذکور، از مخلوط نانوکامپوزیت در حلال ۱- اکتانول بیرون آورده شده و به مدت یک‌ساعت در دمای اتاق، برای خشک‌شدن به حال خود رها شدند. لازم به توضیح است که برای اطمینان کامل از تثبیت یکنواخت نانوجاذب در خلل و فرج فیبرهای توخالی، مراحل غوطه‌ورسازی و خشک شدن، ۳ بار تکرار شد.

۷- در مرحله‌ی بعدی، هشت میکرولیتر از مخلوط پخش شده (دیسپرس شده) که در بالا به آن اشاره شد، بدقت و بوسیله‌ی یک سرنگ میکرولیتری، به عنوان فاز پذیرنده به داخل فیبر تزریق شده و هر دو انتهای فیبر مذکور توسط قطعاتی با ابعاد ۱/۲ × ۰/۶ mm از یک سنجاق استیل (محصول شرکت کاملیا^۱، چه‌جیانگ^۲، کشور چین)، به عنوان نگهدارنده‌ی مغناطیسی مسدود شده و برای فرآیند ریزاستخراج گردید. ذکر این نکته حائز اهمیت می‌باشد که به دلیل هزینه‌ی پایین فیبرهای پلی‌پروپیلنی و مهمتر از

^۱ Camellia

^۲ Zhejiang

آن بمنظور حذف اثرات حافظه‌ی^۱ احتمالی در فرآیند استخراج، فیبرهای تهیه شده به صورت یکبار مصرف مورد استفاده قرار گرفته و پس از هر بار استفاده، بیرون انداخته شدند.

قبل از آغاز آزمایش‌های روزانه، نمونه‌های پلاسمای شاهد به مدت ۲۵ دقیقه در دمای اتاق به حال خود رها شدند (فرایند تاوشدن^۲). سپس مراحل زیر به ترتیب انجام شدند:

نمونه‌های پلاسمای یخ‌زدایی شده (۵۰۰ میکرولیتر) پس از آغشته کردن با ترکیبات دارویی هدف در غلظت‌های مشخص (افزایش محلول استاندارد دارو به پلاسما یا به اصطلاح فرایند اسپایک^۳) و اختلاط (همزدن و مخلوط کردن یکنواخت) شدید با استفاده از دستگاه ورتکس (به مدت ۶۰ ثانیه)، به میکروتیوب‌های مخصوص منتقل شده و قبل انجام مراحل استخراجی، تحت فرآیند پروتئین‌زدایی قرار گرفتند. در واقع، پروتئین‌زدایی یک مرحله‌ی ضروری در پاک‌سازی (clean-up) سریع نمونه است که در عین حال موجب شکافتگی^۴ و شکستن پیوند دارو-پروتئین^۵ می‌شود [۲۷۶]. در پروسه‌ی استخراج، ابتدا پروتئین‌های پلاسما با افزایش ۱/۲ میلی‌لیتر از مخلوط متانول - استونیتریل (۵۰:۵۰ v/v) به میکروتیوب حاوی نمونه‌های پلاسما و سپس ورتکس این مخلوط به مدت ۳۰ ثانیه و بلافاصله سانتریفیوژ کردن تحت شرایط ۴۱۹۰×g به مدت ۱۰ دقیقه، رسوب داده شدند. پس از فرآیند ترسیب پروتئین، ۱ میلی-لیتر از محلول رویی^۶ جمع‌آوری شده و به یک ویال شیشه‌ای ته‌صاف^۷ تمیز (ویال ۵ میلی‌لیتری) منتقل گردیده و به دنبال آن با ۴ میلی‌لیتر آب قلیایی شده (تنظیم شده در pH=۱۱ توسط محلول ۱ مولار سدیم هیدروکسید) رقیق‌سازی شده است. سپس برای شروع فرآیند استخراج خارج‌ستونی، فیبرهای آماده‌شده در مرحله‌ی قبلی (پس از اطمینان از مسدود بودن دو انتهای آن)، در درون محلول نمونه‌ی آماده‌شده غوطه‌ور و مجاور گشته و فرآیند استخراج پس از تعبیه‌ی درپوش پلاستیکی ویال نمونه، به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق و تحت شرایط همزدن مغناطیسی با سرعت ۵۰۰ دور در دقیقه، انجام شده است. مطابق تئوری استخراج‌های فاز جامد-مایع با استفاده از فیبرهای توخالی [۱۳۷]، در این مرحله آنالیت‌ها تحت شرایط تعادلی از فاز دهنده به فاز استخراج‌کننده نفوذ (انتشار) می‌کنند؛ و در واقع آنالیت‌ها به طور همزمان در فاز پذیرنده‌ی جامد-آلی^۸ به دام می‌افتند (ترپ می‌شوند). در انتهای فرآیند استخراج، فیبرها پس از خارج کردن از ظرف نمونه توسط یک پنس (آنبرک^۹) استریل^۹ تمیز و خارج کردن آرام نگهدارنده‌های استیل از دو انتهای آن، به یک میکروتیوب (اپندورف^{۱۰}) ۰/۵ میلی‌لیتری محتوی ۱۰۰

¹ Memory effects

² Thaw

³ Spike

⁴ Cleavage

⁵ Protein-drug binding

⁶ Supernatant

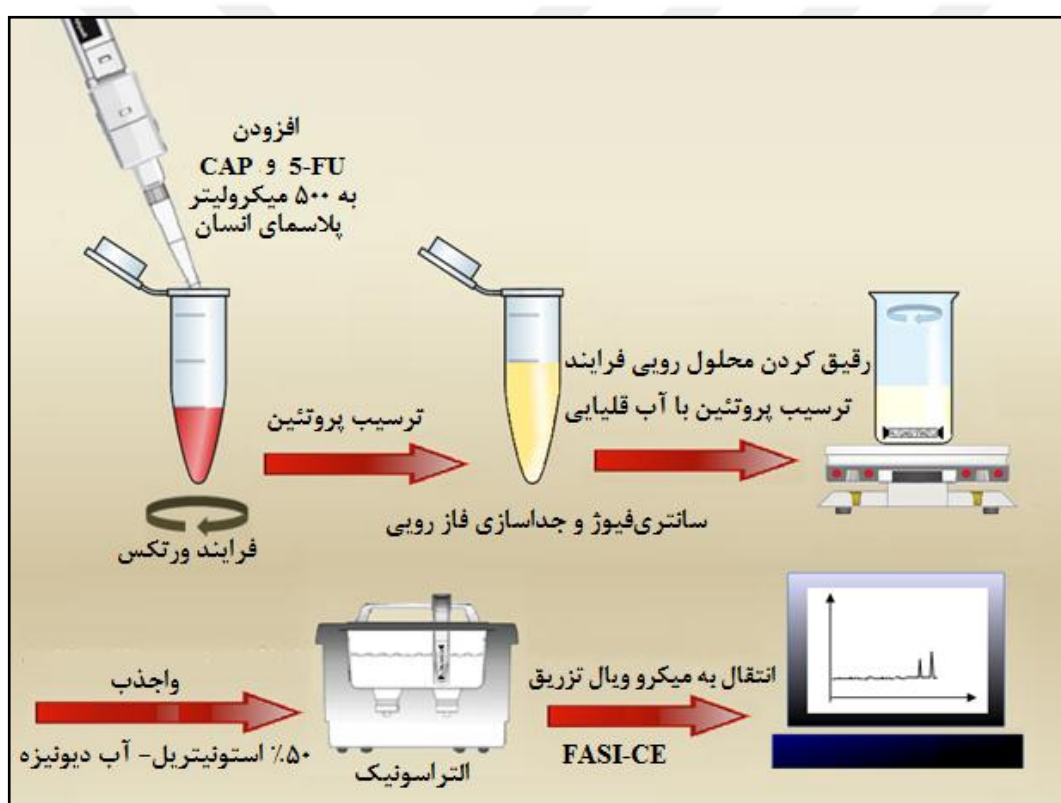
⁷ Flat bottom glass vial

⁸ Solid/organic acceptor

⁹ Clean forceps

¹⁰ Eppendorf

میکرولیتر محلول استونیتریل - آب (۵۰٪ حجمی - حجمی) منتقل شده و آنالیت‌ها با تکنیک تحریک فراصوت^۱ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق، از فیبرها واجذب می‌شوند. در نهایت محلول واجذبی - استخراجی، توسط یک ریزسرنگ جمع‌آوری شده و به منظور آنالیز با تکنیک FASI-CE، به میکروویال مخصوص تزریق نمونه در دستگاه الکتروفورز موئینه‌ای منتقل می‌شود. کلیه‌ی مراحل ذکر شده در بالا، به صورت دیاگرام شماتیک ساده شده، در شکل ۲-۲ قابل مشاهده می‌باشد. لازم به تاکید است که تمام آزمایشات ۳ بار تکرار شدند و مقادیر میانگین حاصل از نتایج، در محاسبات مربوطه لحاظ گردیده است. همچنین نمونه‌های جمع‌آوری شده‌ی پلاسمای بیماران (نمونه‌های کلینیکال حقیقی)، دقیقاً مشابه نمونه‌های کنترل کیفی^۲ و نمونه‌های استاندارد کالبراسیون و طبق پروتکل شرح داده شده، آنالیز شدند.



شکل ۲-۲- شمای کلی مراحل اجرایی روش استخراجی پیشنهادی برای آنالیز همزمان کپسیتابین و ۵- فلورواوراسیل در نمونه‌های پلاسمای انسانی با استفاده از روش FASI-CE.

^۱ Ultrasonic agitation

^۲ Quality control (QC) samples

نیتروژن، کلسینه شد. نانوکامپوزیت تولید شده پس از اتمام فرآیند کلسینه شدن، تا رسیدن به دمای اتاق و سرد شدن کامل به حال خود رها گردید و در نهایت توسط روشهای SEM و TEM از نظر سطح، مورفولوژی و ترکیب ساختار، مورد بررسی قرار گرفته و مشخصه‌یابی گردید.

۲-۶-۲-۳- تهیه نانوکامپوزیت MWCNT@ZnO پوشش داده شده با مایع یونی [OMIm]Br با استفاده از روشی سل-ژل

در ابتدا، نانوکامپوزیت هیبریدی سل-ژل، مطابق با هر دو روش کاتالیز اسیدی^۱ و کاتالیز بازی^۲ گزارش شده در مراجع علمی تهیه شد [۱۱۳، ۲۷۵، ۲۸۰]. نتایج آزمایشات انجام شده نشان می‌داد که روش کاتالیز بازی برپایه‌ی هیدرولیز^۳ یک پیش‌ماده‌ی سیلیکاتی آلی-فلزی^۴ در حضور یک نانوساختار در نقش هسته^۵ و تحت شرایط قلیایی، نتیجه‌ی مطلوب‌تری را در راستای اهداف این مطالعه رقم می‌زند؛ و بنابراین در این پژوهش، از روش کاتالیز بازی برای تهیه‌ی نانوکامپوزیت مورد نظر و مطابق پروتکل مرحله‌ای زیر استفاده شده است:

- در ابتدا، محصول آماده شده‌ی مرحله‌ی قبلی (کامپوزیت MWCNTs/ZnO، بخش ۲-۶-۲-۲) با مایع یونی [OMIm]Br به صورت زیر پوشش داده شد: ۰/۷۵ گرم از مایع یونی در ۱۰ میلی‌لیتر استون حل شده و ۵۰۰ میلی‌گرم از کامپوزیت فوق‌الذکر توسط امواج فراصوت در آن پخش (دیسپرس) گردید. سپس میزان حلال اضافی، با استفاده از دستگاه تبخیرکننده‌ی روتاری^۶ و تحت شرایط خلاء و بدور از نور مستقیم، ظرف مدت ۳ ساعت (در دمای غیرمستقیم ۵۰ درجه‌ی سانتی-گراد) تبخیر شده (حذف گردید) و رسوب حاصل برای مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفت.
- در وهله‌ی بعدی، ۶۵۰ میکرولیتر از TEOS به مخلوط ۱ میلی‌لیتر از متانول و ۰/۳ میلی‌لیتر از متیل‌تری‌متوکسی‌سیلان (MTMOS) افزوده شده و بعد از آن ۳۰۰ μl از محلول تریس (۵٪ حجمی - حجمی در آب) به عنوان کاتالیز قلیایی، اضافه گردید. به منظور انجام فرآیند هیدرولیز، مخلوط فوق به مدت ۱۵ دقیقه تحت امواج فراصوت قرار گرفته و متعاقب آن، ۷۵ میلی-گرم از مایع یونی [OMIm]Br (مقدار بهینه‌شده‌ی مایع یونی در ماتریکس سل-ژل هیبریدی)، ۰/۶ گرم از محصول مرحله‌ی قبلی (مقدار بهینه) و ۳۰ μl آمونیوم هیدروکسید غلیظ به آن اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۲۵ دقیقه در دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد تحت امواج فراصوت قرار گرفت و بعد از آن برای تحریک و ترویج فرآیند ژل‌شدگی^۷ به مدت ۴ ساعت (بهینه زمان همزدن در مرحله-

¹ Acidic catalyzed procedure

² Basic catalyzed procedure

³ Hydrolysis

⁴ Organometallic silica precursor

⁵ Core nanostructure

⁶ Rotary evaporator

⁷ promote gel aging process

ی تهیه‌ی سل-ژل) هم‌زده شد. سپس، مخلوط حاصل در $g \times 4200$ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. بعد از فرآیند سانتریفوژ، محلول شفاف رویی آن دور ریخته شد و نهایتاً ژل ته‌نشین شده جمع‌آوری شده و به منظور حذف مواد واکنش نداده و مازاد کاتالیزور، چندین بار با آب دیونیزه شستشو داده شد. در مرحله‌ی پایانی، کامپوزیت هیبریدی تهیه شده در دمای محیط خشک گردیده و به منظور استفاده در اصلاح ترکیب غشای مایع تثبیت شده (پراکنده‌سازی در حلال انتخابی SLM و تقویت فیبرهای توخالی) در فرآیند استخراج الکتروغشایی، مورد استفاده قرار گرفت. لازم به توضیح است که برای مشخصه‌یابی سل-ژل نانو هیبریدی تهیه شده، از تکنیکهای میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) و طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (FT-IR) استفاده شد.

۲-۶-۲- روش تهیه‌ی فیبر توخالی تثبیت شده با نانوکامپوزیت و راه‌اندازی سیستم EME

فرآیند تهیه‌ی فیبرهای غشایی تقویت‌شده با نانوکامپوزیت (یا به عبارتی تثبیت سیستم نانوکامپوزیتی در حفرات و خلل و فرج فیبرهای توخالی پلیمری) مطابق مراحل زیر انجام شد:

- ابتدا یک رشته از PPHF به صورت دستی به قطعاتی با طول ۶ سانتی‌متر برش داده شد و به منظور حذف آلودگی و ناخالصی‌های احتمالی، به مدت ده دقیقه تحت امواج فراصوت قرار گرفت و در نهایت در اتمسفر هوا خشک گردید.
- سپس ۱۰ میلی‌گرم از نانوکامپوزیت هیبریدی تهیه‌شده در ۲/۵ میلی‌لیتر حلال ۲- نیتروفنیل اکتیل اتر (NPOE) پخش شده و برای دستیابی به مخلوط همگن، به مدت ۴۵ دقیقه تحت امواج فراصوت قرار گرفت.
- در مرحله‌ی سوم، برای پُر شدن و اشباع حفرات فیبر توخالی غشایی، حجم مناسبی (در حد میکرولیتر) از سوسپانسیون تهیه شده در قسمت قبلی، با استفاده از یک سرنگ تمیز HPLC به آرامی و با احتیاط به درون کانال داخلی فیبر، هدایت شد. این عمل برای اطمینان از تثبیت یکنواخت و همچنین تضمین پایداری^۱ و بازآشباع^۲ غشای مایع بر روی سطح داخلی و خارجی فیبر توخالی در حین استخراج الکتروغشایی انجام می‌گیرد که قبلاً نیز در مطالعات مختلف منتشر شده در مراجع علمی در مورد استخراج‌های الکتروغشایی نمونه‌های حقیقی^۳ و با هدف بهبود عملکرد این روش استخراجی، انجام شده و به آن استناد شده است [۶۵].
- در مرحله‌ی چهارم، به منظور تثبیت نانوجاذب کامپوزیتی در داخل حفرات دیواره‌ی فیبر توخالی، قطعات فیبر به مدت ۳۰ دقیقه (زمان تقریبی لازم برای پخش یکنواخت نانوکامپوزیت بر پایه‌ی سل-ژل در داخل حفرات) در دمای اتاق در سوسپانسیون فوق

¹ Stabilization

² Replenishment

³ Real samples

کاملاً غوطه‌ور شده و تحت امواج فراصوت قرار گرفتند. در این مرحله، نانوجاذب تهیه شده تحت نیروی موئینگی^۱ و امواج فراصوت، به‌طور موفقیت‌آمیزی در داخل حفرات فیبر توخالی، بارگذاری شد.

- سپس، قطعات فیبرهای مذکور با استفاده از یک پنس استریل از داخل سوسپانسیون مذکور خارج‌گشته و به منظور حذفِ اضافیِ باقی‌مانده بر روی سطح آنها، با آب دیونیزه شستشو داده شدند.
- در نهایت، فیبرهای توخالی اصلاح شده که در مراحل بعدی به عنوان بخشی از زیرمجموعه-ی استخراج الکتروغشایی (واحد استخراجی^۲) مورد استفاده قرار خواهند گرفت، قبل از استفاده، به مدت ۱ ساعت در دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد خشک شدند و به منظور اطمینان و اثبات تثبیت موفقیت‌آمیز نانوکامپوزیت هیبریدی در داخل حفرات و تخلخلات آنها، با استفاده از روش SEM و ثبت تصاویر میکروسکوپی از زوایای مختلف، مشخصه‌یابی شدند.

فرآیند استخراج الکتروغشایی با استفاده از یک منبع تغذیه‌ی DC با ولتاژ قابل برنامه‌ریزی در محدوده‌ی ۵-۶۰۰ ولت و بیشینه خروجی جریان ۵۰۰mA انجام‌گرفته است که در اثنای فرآیند استخراج، جریان عبوری به صورت مداوم با استفاده از یک مولتی‌متر^۳ کنترل و اندازه‌گیری می‌شد. دو سیم پلاتینی با قطر ۰/۲ میلی‌متر به عنوان الکترودهای کاتد و آند با فاصله‌ی متوسط تقریبی ۰/۵ سانتی‌متر از یکدیگر در محلول‌های نمونه و فاز پذیرنده بکار برده شدند. در این آرایش دستگاهی، یک ویال شیشه‌ای با حجم ۵ میلی‌لیتر با درب پوششی پلاستیکی به عنوان محفظه (سل نمونه) استفاده شده است که ارتفاع آن ۶۹ میلی‌متر و قطر خارجی آن ۱۴/۵ میلی‌متر بود (شرکت سازنده: نامعلوم). به منظور تعبیه‌ی الکترودها، دو سوراخ ریز به فاصله‌ی نیم سانتی‌متری به صورت دستی در درب پلاستیکی سل نمونه ایجاد شد؛ و سل نمونه در حین فرآیند استخراج با استفاده از یک گیره‌ی فلزی بر روی همزن مغناطیسی ثابت گردید تا انجام اختلاط و ایجاد شرایط همزدن، با استفاده از یک میله‌ی مغناطیسی به ابعاد ۵×۲ mm صورت پذیرد.

^۱ Capillary forces

^۲ Extraction unit

^۳ Multi-meter

۲-۶-۲-۵- روش، نحوه‌ی اجرا و مراحل ریزاستخراج الکتروغشایی (EME)

قبل از آزمایشات منظم روزانه‌ی EME، نمونه‌های پلاسمای شاهد به منظور فرآیند یخ‌زدایی و ذوب شدن، به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق به حال خود رها شدند و سپس با هدف تهیه‌ی غلظت‌های دلخواه از داروی هدف در نمونه‌های پلازما و آماده‌سازی نمونه‌های QC و عیارسنجی (کالیبراسیون)، مقادیر مناسبی از محلول‌های استاندارد کاری داروی ایماتینیب که در محدوده‌های غلظتی مختلف تهیه شده بودند، به $400 \mu\text{l}$ از نمونه‌های پلاسمای عاری از دارو^۱ اضافه شدند. سپس، نمونه‌های تازه تهیه شده‌ی آغشته شده به دارو^۲، پس از ۳۰ ثانیه اختلاط شدید با دستگاه همگن‌ساز وُرتکس، توسط افزودن مقدار $3/6$ میلی‌لیتر از یک محلول آبی اسیدی که pH آن توسط مقادیر متناسبی از هیدروکلریک اسید (10 mM) در مقدار برابر $2/0$ تثبیت شده بود، 10 برابر رقیق‌سازی شده و بعد از هم‌زدن متناوب و همگن‌سازی مجدد برای مدت ۶۰ ثانیه، به محفظه‌ی (سل) در نظرگرفته شده برای انجام فرایند استخراج منتقل‌گردیده و نهایتاً پس از انجام مراحل و اقدامات اجرایی لازم که متعاقباً توضیح داده خواهد شد، تحت فرآیند ریزاستخراج الکتروغشایی قرار گرفتند.

اجرای آزمایشات استخراج الکتروغشایی، مطابق با پروتکل مرحله‌ای ذیل (به ترتیب مراحل ذکر شده) انجام گرفته است؛

۱- در ابتدا، سل (ظرف) نمونه‌ی EME محتوی محلول دهنده (فاز استخراج شونده، DP^3)، توسط یک گیره بر روی همزن مغناطیسی ثابت می‌شود.

۲- انتهای فوقانی^۴ فیبر توخالی اصلاح‌شده و تقویت شده با نانوکامپوزیت هیبریدی تهیه شده با روش سل-ژل (بخش ۲-۶-۲-۴)، به قطعه‌ی کوچکی (8 میلی‌متر) از نوک یک سرسمپلر^۵ به عنوان نگهدارنده‌ی (گارد و لوله‌ی هدایت‌کننده)^۶ فیبر توخالی اصلاح شده با نانوکامپوزیت، متصل می‌شود.

۳- فیبر توخالی اصلاح شده مجدداً به منظور شکل‌گیری غشای مایع تثبیت شده (SLM) و اشباع‌شدن حفرات آن به مدت ۱۵ ثانیه بطور کامل در مخلوط پراکنده شده‌ی نانوکامپوزیت در حلال NPOE (ترکیب انتخاب شده و بهینه شده برای SLM) غوطه‌ور شده و بعد از خارج کردن فیبر، مازاد حلال آلی بدقت توسط یک پد الکلی بهداشتی^۷، ترجیحاً بدون پُرز از سطح خارجی آن پاک می‌شود.

¹ Drug-free plasma

² Freshly prepared spiked samples

³ Donor Phase

⁴ Upper end

⁵ Pipette tip

⁶ Guiding tube

⁷ Medical tissue

- ۴- همچنین، حذف مازاد حلال از کانال داخلی فیبر با دمیدن^۱ هوا به کمک یک ریزسرنگ مناسب انجام می‌شود. سپس، انتهای دیگر (پایینی) فیبر مذکور به صورت مکانیکی (با پنس داغ) و اعمال حرارت ملایم مِهروموم و مسدود می‌شود تا یک حجم داخلی تقریبی ۳۵ میکرولیتری فراهم شود.
- ۵- در مرحله‌ی بعد، ۳۰ میکرولیتر از محلول هیدروکلریک اسید (۱۵/۵mM، pH=۱/۸) به عنوان فاز پذیرنده، با استفاده از یک ریزسرنگ به کانال داخلی فیبر توخالی وارد شده و سپس فیبر محتوی فاز پذیرنده و دربرگیرنده‌ی SLM (غشای مایع در سطح خارجی تثبیت شده است)، به همراه لوله‌ی نگهدارنده (گارد) بعد از گذراندن از مسیر ایجاد شده در درب پلاستیکی ویال، وارد سل استخراج (ویال محتوی نمونه) می‌گردد.
- ۶- قبل از اتصال الکترودها به منبع تغذیه، الکترود منفی (کاتد) پس از عبور دادن از لوله‌ی هدایت کننده، مستقیماً وارد فاز پذیرنده (AP^۲، مستقر در کانال داخلی فیبر) گشته و الکترود مثبت (آند) با گذراندن از مسیر دوم ایجاد شده در درپوش پلاستیکی ویال نمونه، به صورت مستقیم در محلول نمونه (فاز دهنده، DP) غوطه‌ور می‌گردد. ذکر این نکته حائز اهمیت است که فاصله‌ی تقریبی بین دو الکترود، به طور متوسط در حدود ۰/۵ cm از یکدیگر حفظ شده است.
- ۷- در مرحله‌ی بعدی، پس از اتصال الکترودها به منبع تغذیه، استخراج الکتروغشایی با اعمال ولتاژ از پیش تعیین شده^۳ (۱۰۵V) بین دو الکترود و تحت شرایط همزدن با سرعت ۸۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه انجام می‌شود.
- ۸- در نهایت، پس از تکمیل فرآیند استخراج و به تعادل رسیدن مهاجرت الکتریکی^۴، ولتاژ اعمالی قطع شده و فیبر توخالی از سل نمونه خارج گردید. سپس، فاز پذیرنده با استفاده از یک ریزسرنگ تمیز، با احتیاط جمع‌آوری و مستقیماً به ویال میکرولیتری مخصوص تزریق نمونه در دستگاه CE منتقل شد. به دنبال آن، ۱۰/۵μl حلال متانول (مقدار بهینه‌شده‌ی حلال رقیق‌سازی نمونه‌های استخراج-شده^۵)، برای آماده‌سازی شرایط ماتریکس نمونه‌ی مورد نیاز در آنالیز FASI-CE، به ویال میکرولیتری مخصوص الکتروفورز موئن افزوده شده و به مدت ۱۰ ثانیه تحت شرایط اختلاط با دستگاه همگن‌ساز وُرتکس قرار گرفت و نهایتاً در شرایط بهینه شده، به ستون موئن تزریق شد. دیاگرام شماتیک کلی فرآیند فیزیکی تهیه‌ی فیبر استخراجی به همراه سیستم اجرایی بکارگرفته-شده برای استخراج الکتروغشایی پیشنهادی در این مطالعه، در شکل ۲-۳ به تصویر کشیده شده است. لازم به توضیح است که با توجه به نتایج تجربی کسب شده در پژوهش حاضر، افزایش ۱۰/۵ میکرولیتر متانول (۳۵ v/v) به محلول خروجی فاز پذیرنده‌ی استخراج الکتروغشایی که شرایط

¹ Blowing air

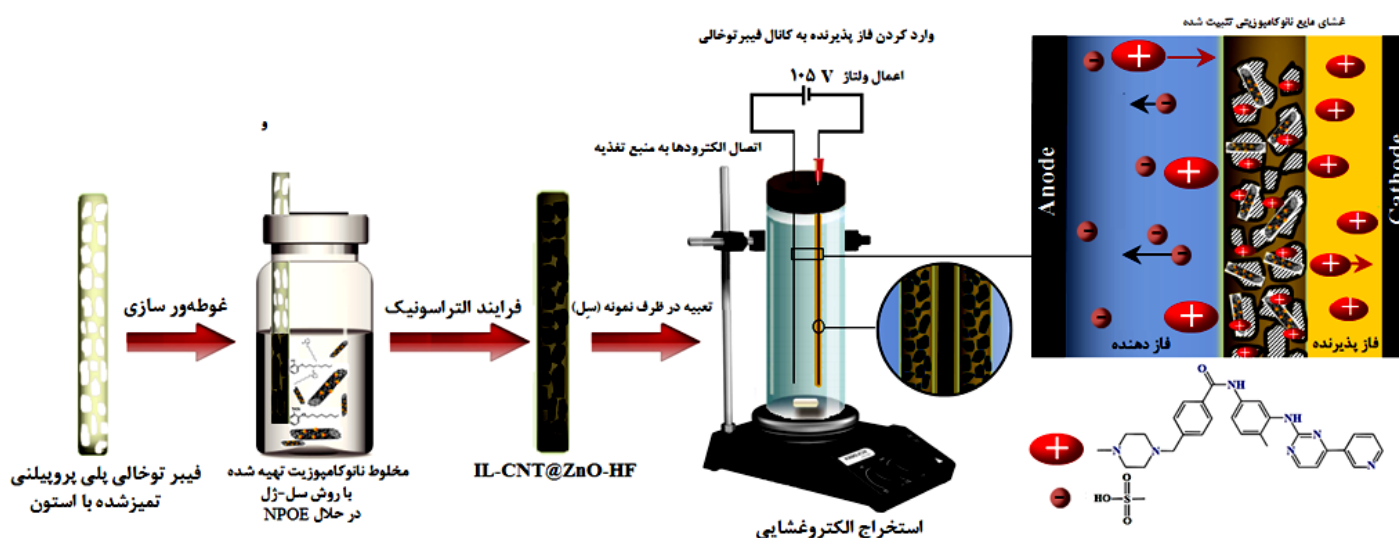
² Acceptor phase

³ Predetermined voltage

⁴ Electromigration

⁵ Optimized extracted sample dilution solvent

اسیدی و به تبع آن رسانایی بالایی دارد، موجب تعدیل و معکوس کردن اثرات نامتعادل و مضر (رسانایی بالای قاچ (پلاگ) نمونه در مقایسه با الکترولیت زمینه؛ که با اصول اجرایی تغلیظ توده‌ای آنالین نمونه، مغایرت دارد) فاز پذیرنده‌ی اسیدی و کاهش رسانایی الکتریکی آن می‌شود که این امر منجر به تسهیل و فراهم شدن شرایط لازم برای پیش‌تغلیظ (تراکم) توده‌ای نمونه در ستون (FASI)، بوسیله‌ی تزریق الکتروکنتیک می‌گردد.



شکل ۲-۳- تصویر و دیاگرام شماتیک فرآیندهای فیزیکی تهیه‌ی فیبر و شرایط سیستم استخراج الکتروغشایی پیشنهادی به همراه مراحل اجرایی و ملزومات آن.

لازم به توضیح است که کلیه‌ی آزمایش‌های EME در دمای محیط انجام گرفته و سه بار تکرار شدند و مقادیر میانگین حاصل از نتایج، در محاسبات لحاظ شده است. آنالیز نمونه‌های پلاسمای جمع‌آوری شده از بیماران، دقیقاً مشابه پروتکل شرح داده شده برای نمونه‌های کنترل کیفی (QC) و نمونه‌های استاندارد کالیبراسیون، انجام گرفته است. ضمناً به منظور بررسی اثر اصلاح ترکیب غشای مایع (حلال SLM) با سیستم نانو کامپوزیتی مورد استفاده و مقایسه با استخراج الکتروغشایی معمولی (بدون استفاده از نانوساختار در حلال SLM)، استخراج ساده‌ی HF-EME نیز انجام شده است. بدین منظور، یک رشته-ی فیبر توخالی پلی پروپیلنی، مجدداً به قطعات ۶ سانتی متری بریده شده و برای حذف آلودگی و ناخالصیهای احتمالی، در حلال استون تحت امواج فراصوت قرار گرفته و سپس در دمای اتاق خشک گردید. سپس فیبر توخالی مذکور، برای تثبیت غشای مایع (حلال NPOE) به مدت ۱۵ ثانیه در حلال ۲- نیترو فنیل اکتیل اتر غوطه‌ور گشته و پس از اشباع حفرات فیبر با حلال مذکور و شکل‌گیری SLM بر روی سطح و دیواره‌ی جانبی آن، از ظرف محتوی حلال مورد استفاده خارج گردیده و پس از وارد کردن

فازپذیرنده (AP) و تعبیه‌ی الکتروود منفی در کانال داخلی آن، مطابق مراحل ذکر شده در توضیحات بالا وارد چرخه‌ی استخراج الکتروغشایی شده است. آماده‌سازی نمونه‌های خروجی و حاصل از روش استخراج HF-EME دقیقاً مطابق روش فوق‌الذکر IL-MWCNTs/ZnO-HF-EME انجام شده است و در نهایت نمونه‌های استخراج شده پس از تزریق الکتروکننتیکی به ستون موئین، در معرض آنالیز با روش توسعه داده شده‌ی FASI-CE قرار گرفته‌اند. شایان ذکر است که با توجه به مقرون بصره بودن و هزینه‌ی پایین فیبرهای توخالی پلی‌پروپیلنی و به‌منظور حذف اثرات حافظه‌ی احتمالی در فرآیند استخراج الکتروغشایی، از فیبرهای تازه تهیه شده در هر مرحله از اجرای استخراج، استفاده شده است.

۷-۲- محاسبه‌ی فاکتور تغلیظ^۱ و بازده استخراج^۲

در روش ریزاستخراج الکتروغشایی ارائه شده برای اندازه‌گیری داروی ایماتینیب مسیلات در نمونه‌های پلاسما، کارایی استخراج با محاسبه‌ی فاکتور غنی‌سازی (EF)، که به صورت نسبت غلظت نهایی آنالیت در فاز پذیرنده به غلظت اولیه‌ی آن در محلول نمونه تعریف می‌شود، تعیین می‌گردد [۱۵۴]. در این مطالعه EF و درصد راندمان (بازده) استخراج (ER%)، به ترتیب و بر اساس معادلات زیر محاسبه شدند:

$$EF = \frac{C_{a,final}}{C_{d,initial}} \quad \text{معادله‌ی (۱-۲)}$$

$$ER (\%) = EF \times \frac{V_a}{V_d} \times 100 \quad \text{معادله‌ی (۲-۲)}$$

که در آنها، $C_{a,final}$ و $C_{d,initial}$ به ترتیب غلظت‌های نهایی آنالیت در فاز پذیرنده (غلظت آنالیت در فاز گیرنده بعد از استخراج) و غلظت اولیه‌ی آنالیت در نمونه (قبل از انجام استخراج)، می‌باشند. همچنین V_a و V_d به ترتیب حجم‌های فازهای پذیرنده و دهنده می‌باشند.

۸-۲- معتبرسازی^۳ روشهای پیشنهادی (Method Validation)

معتبرسازی روشهای پیشنهادی در هر دو بخش این مطالعه، مطابق با گزاره‌ها و دستورالعمل سازمان غذا و داروی ایالات متحده‌ی آمریکا (FDA) در آنالیزهای زیست تجزیه‌ای انجام شده است [۲۸۱]. کالیبراسیون خطی^۴ (خطی بودن منحنی کالیبراسیون)، حدتشخیص^۵ (LOD)، حد پایین اندازه‌گیری (LLOQ^۶)، حد بالای اندازه‌گیری (ULOQ^۱)، گزینش‌پذیری^۲ (انتخابگری)، دقت^۳ (تکرارپذیری) در یک

^۱ Enrichment Factor

^۲ Extraction Recovery

^۳ Validation

^۴ Calibration linearity

^۵ Limit of detection

^۶ Lower limit of quantification

روز و در بین روزها (آزمایشات تکرارپذیری درون روز^۴ و بین روزهای^۵ مختلف)، صحت^۶، درصد بازیابی استخراج^۷، پایداری^۸ (مطالعات پایداری دمای اتاق^۹ دارو (پایداری دمایی کوتاه مدت) و مطالعات پایداری انجماد و ذوب^{۱۰}) و استحکام^{۱۱} (سختی) روش از جمله مولفه‌هایی هستند که مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفتند. برای تعیین اختصاصی بودن^{۱۲} روش آنالیز برای هر دو بخش این مطالعه، نمونه‌های پلاسمای انسانی شاهد از شش فرد مختلف، مورد آنالیز قرار گرفته است.



¹ Upper limit of quantification

² Selectivity

³ Precision

⁴ Intra-day precisions

⁵ Inter-day precisions

⁶ Accuracy

⁷ Extraction recovery

⁸ Stability

⁹ Room temperature stability

¹⁰ Freeze-thaw stability

¹¹ Robustness

¹² Specificity

۲-۹- کاربرد کلینیکال روشهای پیشنهادی (جمع آوری نمونه‌های حقیقی)

کاربرد روش توسعه‌یافته و معتبرسازی شده برای اندازه‌گیری داروی کپسیتابین و متابولیت اصلی آن، در نمونه‌های کلینیکی (نمونه‌های حقیقی)، در پلاسمای جداسازی شده از نمونه‌های خون ۱۰ فرد بیمار که فقط داروی کپسیتابین دریافت می‌کردند، مورد ارزیابی قرار گرفت. نمونه‌ها از بیماران واجد شرایط (بخش ۲-۵-۱) که داروی کپسیتابین را دوبار در روز و در دوزهای مختلف ۸۲۵ تا ۲۳۰۰ میلی-گرم دریافت می‌نمودند، قبل از بلع دارو و ۱۸۰ دقیقه بعد از مصرف دارو، جمع‌آوری گردید. نمونه‌ها بلافاصله در دمای چهار درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفیوژ شده و پس از انجام فرآیندهای جداسازی پلاسما که قبلاً شرح داده شده است، منجمد گردیدند. برای این نمونه‌های حقیقی، آنالیز و اندازه‌گیری آنالیت‌های هدف، مطابق پروتکل‌های ارائه شده در قسمت‌های قبلی انجام شد.

کاربرد روش توسعه‌یافته و معتبرسازی شده برای اندازه‌گیری داروی ایماتینیب مسیلات، در نمونه‌های کلینیکی (نمونه‌های حقیقی)، در پلاسمای جداسازی شده از نمونه‌های خون ۴ فرد بیمار مبتلا به تومور استرومایی معده (سرطان GIST) که فقط داروی ایماتینیب دریافت می‌کردند، مورد ارزیابی قرار گرفت. نمونه‌های حقیقی خون، از بیماران واجد شرایط (بخش ۲-۵-۲) که داروی مذکور را در ۲ تا ۴ دوز ۱۰۰ میلی‌گرمی و به صورت یکجا دریافت می‌نمودند، قبل از بلع دارو و سه ساعت پس از مصرف جمع‌آوری شد. نمونه‌ها بلافاصله بعد از انتقال به لوله‌های هپارین‌دار، ورتکس شده در دمای چهار درجه-ی سانتی‌گراد سانتریفیوژ شده و پس از انجام فرآیندهای جداسازی پلاسما که قبلاً شرح داده شده است، منجمد گردیدند. برای این نمونه‌های حقیقی، آنالیز و اندازه‌گیری داروی هدف، مطابق پروتکل‌های ارائه شده در قسمت‌های قبلی انجام شده است.

فصل سوّم:

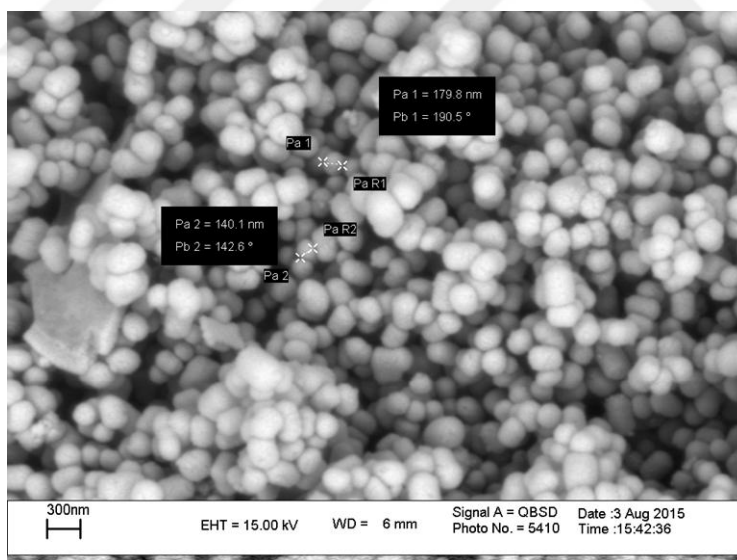
نتایج و بحث

۳-۱-کاربرد روش ریزاستخراج فاز جامد- مایع برپایه‌ی فیبرهای توخالی تقویت شده با سیستم نانوکامپوزیتی مزومتخلخل (AgNPs@MCM-41-HF-SLPME) و تلفیق آن با روش پیش‌تغلیظ توده‌ای داخل‌ستونی FASI برای اندازه‌گیری همزمان داروی ضد سرطان کپسیتابین و متابولیت اصلی آن (FU-۵) در نمونه‌های پلاسمای انسان با استفاده از تکنیک الکتروفورز موئین (CE-UV)

۳-۱-۱- مشخصه‌یابی^۱ ساختار نانوکامپوزیتی مزومتخلخل و فیبر توخالی تقویت شده^۲ با آن

۳-۱-۱-۱- آنالیز میکروسکوپ الکترونی پویشی^۳ (SEM)، مساحت سطح ویژه^۴ (BET) و تخلخل سنجی^۵

تصویر SEM مربوط به ساختار مزومتخلخل MCM-۴۱ در شکل ۳-۱-۱ نشان داده شده است. همان طوری که به وضوح در تصویر مشخص است، ساختار مزومتخلخل سیلیکایی MCM-۴۱ تهیه شده، دارای مورفولوژی کروی^۶ بوده و مزوکره‌های تشکیل شده با اندازه‌ی مابین ۱۰۰ تا ۳۰۰ نانومتر مشهود می‌باشند.



شکل ۳-۱-۱- تصویر میکروسکوپ الکترونی پویشی نوعی مربوط به ساختار مزومتخلخل MCM-۴۱ سنتز شده.

^۱ Characterization

^۲ Reinforced hollow fiber

^۳ Scanning electron microscopy

^۴ Specific surface area

^۵ Porosimetry

^۶ Spherical morphology

همچنین مطالعه‌ی سطح و مورفولوژی فیبر توخالی پلی‌پروپیلنی تقویت شده با نانوکامپوزیت $\text{AgNPs}@MCM-41$ ، توسط تکنیک میکروسکوپ الکترونی پویشی مورد بررسی قرار گرفته و تصاویر مربوطه در شکل ۳-۱-۲ ارائه شده است. همانطوری که مشاهده می‌شود، تصاویر SEM فیبر اصلاح شده از زوایای دید مختلف؛ مشتمل بر تصاویر الکترونی دیواره‌ی خارجی^۱ (شکل ۳-۱-۲-الف) و برش عرضی^۲ (شکل ۳-۱-۲-ب) به همراه تصاویر ریزنگار^۳ مربوط به سطح دیواره در بزرگنمایی‌های مختلف^۴ (شکل‌های ۳-۱-۲-ج، ۳-۱-۲-د)، شواهد آشکاری از ساختار متخلخل ترکیب نانوکامپوزیتی مزوپروس تهیه شده و تثبیت شده در خلل و فرج دیواره‌ی فیبرهای توخالی را به تصویر کشیده و تقویت بهینه و مطلوب فیبرهای مذکور را با ترکیب نانوکامپوزیتی انتخابی، تایید می‌نماید.

از سویی دیگر، اندازه‌گیری دقیق مساحت سطح و تخلخل در بسیاری از کاربردها به ویژه، نانو-جاذب‌ها، ترکیبات و افزودنی‌ها، مواد دارویی و همچنین در نانوساختارهایی نظیر ترکیبات مزو، نانوذرات فلزی، نانولوله‌ها، نانوالیاف و غیره از اهمیت بالایی برخوردار است. از بین روش‌های مورد استفاده در تعیین میزان تخلخل، روش بُرونر-امت-تِلر^۵ (BET) که مبتنی بر جذب می‌باشد، بسیار مورد توجه قرار دارد. در این روش، یک لایه‌ی کامل از مولکول‌های ماده‌ی جذب شونده روی سطح بوجود می‌آید. با دانستن ضخامت متوسط یک مولکول، می‌توان سطحی که یک مولکول اشغال می‌نماید را محاسبه نمود و براساس میزان ماده‌ی جذب شده، مساحت سطح کل نمونه را اندازه‌گیری کرد [۲۸۲]. این تئوری که گسترده شده‌ی تئوری لانگمیر^۶ است، بر اساس جذب چند لایه‌ای مولکول‌های گاز، توسط ماده استوار است.

سیستم BET بر اساس سنجش حجم گاز نیتروژن جذب و واجذب شده توسط سطح ماده در دمای ثابت نیتروژن مایع (۷۷ کلوین) عمل می‌کند. پس از قرار گرفتن سلول حاوی نمونه‌ی مورد نظر در مخزن نیتروژن مایع، با افزایش تدریجی فشار گاز نیتروژن، در هر مرحله میزان حجم گاز جذب شده توسط ماده‌ی تحت مطالعه محاسبه می‌شود. سپس با کاهش تدریجی فشار گاز، میزان واجذب ماده اندازه‌گیری می‌شود و در نهایت نمودار حجم گاز نیتروژن جذب و واجذب شده توسط ماده، براساس فشار نسبی در دمای ثابت رسم می‌شود. نمودار BET که نمودار جذب و واجذب همدم^۷ نیز نامیده می‌شود، یک نمودار خطی است که میزان سطح موثر ماده از آن استخراج می‌گردد. جذب معمولاً از طریق ایزوترم‌هایی بیان می‌گردد که معادل میزان ماده‌ی جذب شونده بر روی سطح جاذب است که تابعی از میزان فشار (در

¹ Side wall

² Cross section

³ Micrograph

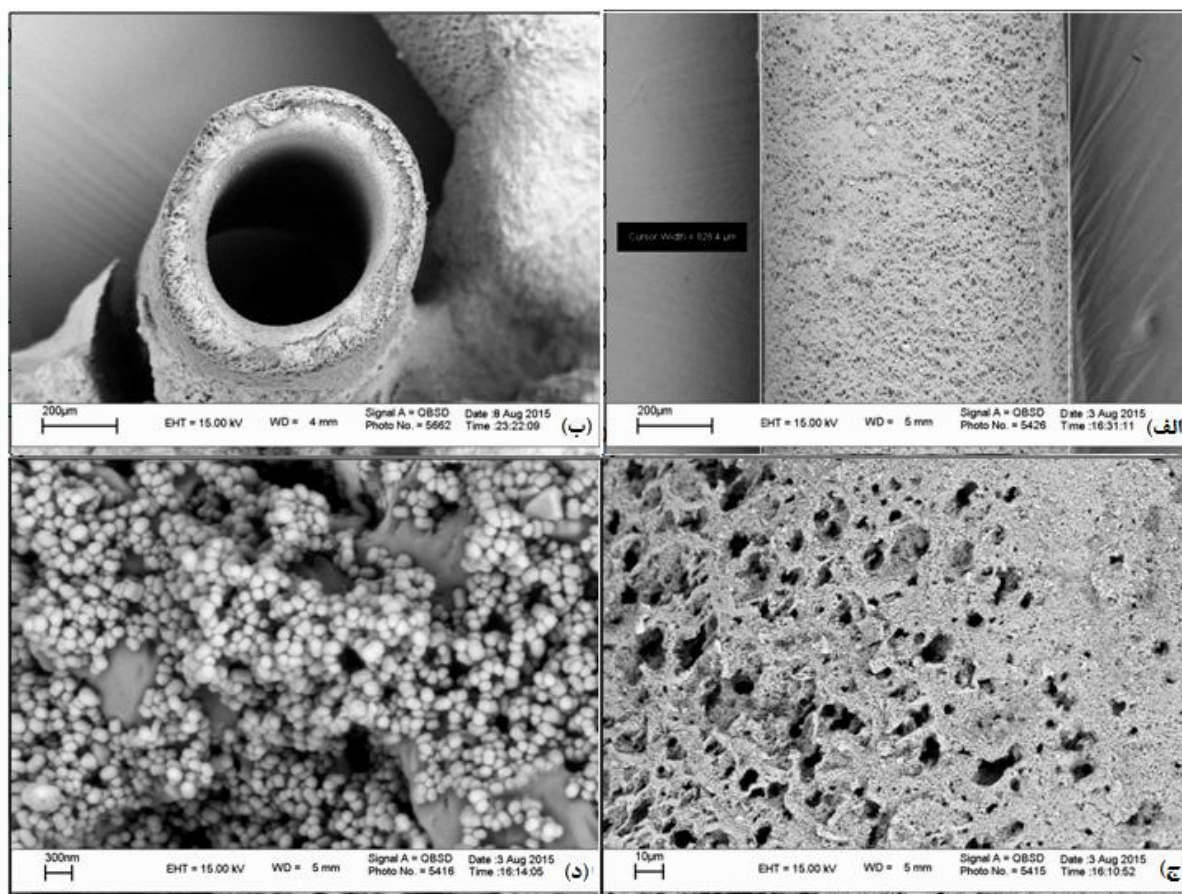
⁴ Different magnifications

⁵ Brunauer-Emmett-Teller

⁶ Langmuir

⁷ Adsorption/Desorption Isotherm

مورد گازها) و یا غلظت (در مورد مایعات) ماده‌ی جذب شونده در شرایط دمای ثابت می‌باشد. بلعکس، ایزوترم واجذب بوسیله‌ی اندازه‌گیری مقدار گاز واجذب شده حاصل می‌شود.



شکل ۳-۱-۲- تصاویر ریزنگار میکروسکوپی الکترونی پوششی فیبر توخالی پلی پروپیلنی تقویت شده با نانوکامپوزیت $AgNPs@MCM-41$ ، از زوایای دید مختلف (الف): دیواره‌ی خارجی (مقیاس: ۲۰۰ میکرومتر)؛ (ب): برش عرضی (مقیاس: ۲۰۰ میکرومتر)؛ (ج): تصویر بافت^۱ (مقیاس ۱۰ میکرومتر)؛ (د): سطح فیبرتوخالی در بزرگنمایی دیگر (مقیاس: ۳۰۰ نانومتر).

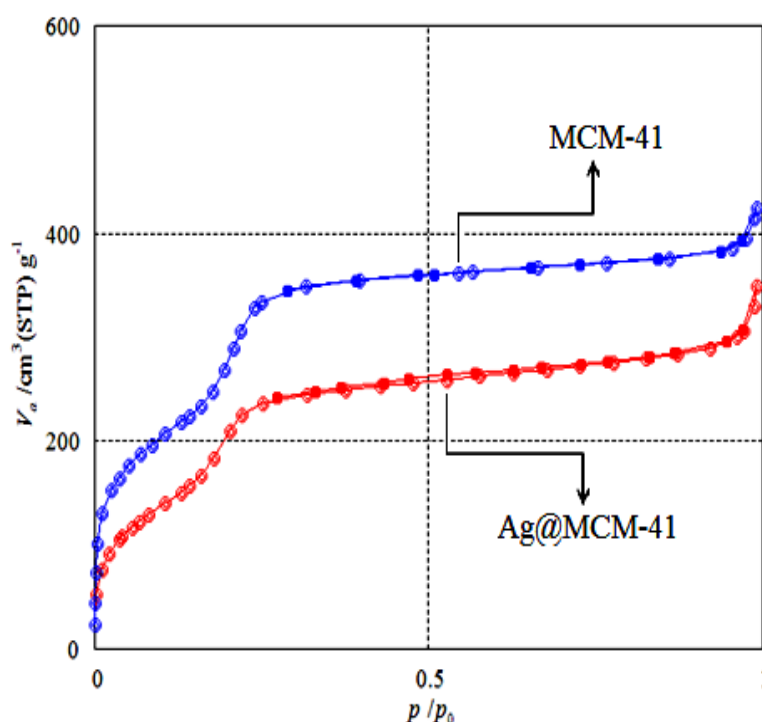
لذا با عنایت به اینکه در بررسی بسیاری از مواد مزومتخلخل و همچنین مطالعه‌ی تأثیرگذاری عوامل مختلف بر فعالیت سطحی جاذب گونه‌ی آنها، مطالعات مربوط به مساحت سطح^۲ بسیار حائز اهمیت است، به منظور بررسی ویژگی‌های مساحت سطحی نانوکامپوزیت مزومتخلخل تهیه شده، ایزوترم‌های جذبی نوع (IV)^۳ مطابق طبقه‌بندی آیوپاک برای ترکیب مزومتخلخل $MCM-41$ و نانوکامپوزیت

¹ Textural image

² Surface area

³ Type IV nitrogen sorption isotherms

مزومتخلخل AgNPs@MCM-41 ، به همراه توزیع اندازه‌ی منافذ^۱ آنها مورد بررسی قرار گرفته است [۲۸۳]، که در شکل ۳-۳ قابل مشاهده می‌باشد. پیش‌بینی و تعیین میزان نفوذ مؤثر مولکولهای واکنش-دهنده به‌درون حفرات و همچنین محاسبه‌ی میزان دسترسی مکانهای فعال نانوجاذب به این مولکولها که در اثر پدیده‌ی نفوذ روی می‌دهد، دارای اهمیت است. برای این منظور می‌توان از دو روش جذب فیزیکی گاز و تخلخل‌سنجی استفاده نمود. لازم به توضیح است که مساحت سطح نمونه‌ها با تکنیک BET و از طریق سنجش جذب فیزیکی گاز نیتروژن در ۷۷ کلوین محاسبه شده است؛ در حالی که اندازه‌ی توزیع منافذ از طریق منحنی ایزوترم واجذبی و با استفاده از روش بارت - جوینر - هالند^۲ (BJH) بدست آمده است (شکل ۳-۱-۳).



شکل ۳-۱-۳- نمودار ایزوترم جذب و واجذب همدمای گاز نیتروژن برای ترکیب مزومتخلخل MCM-41 (نمودار آبی) و نانوکامپوزیت مزومتخلخل AgNPs@MCM-41 (حاوی ۱۴۹ درصد نقره، نمودار قرمز).

¹ Pore size distribution

² Barrett-Joyner-Halenda (BJH)

همان طوری که مشاهده می شود، شاخه های نسبتاً تیز (شارپ) واحدهای ایزوترمی جذب و واجبی مواد مذکور، نشان دهنده ی توزیع اندازه ی باریک نانوکامپوزیت مزومتخلخل سنتز شده می باشد. مطابق نتایج بدست آمده، نانوکامپوزیت مزومتخلخل AgNPs@MCM-41 مذکور، دارای مساحت سطح BET برابر $689 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ و حجم منافذ $0.53 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ می باشد. خواص متنی^۱ هر دو ترکیب مزومتخلخل خالص سیلیکایی MCM-41 و نانوکامپوزیت مزومتخلخل AgNPs@MCM-41 در جدول ۱-۳ خلاصه شده است.

جدول ۱-۳- خواص متنی ترکیب مزومتخلخل و نانوکامپوزیت تهیه شده.

نمونه	$S_{\text{BET}} (\text{m}^2/\text{g})$	$V_{\text{BJH}} (\text{cm}^3/\text{g})$	حجم منافذ (cm^3/g)	قطر منافذ (nm)
MCM-41	۹۲۲	۰/۴۹۷	۰/۶۵	۲/۷
AgNP@MCM-41	۶۸۹	۰/۴۳۶	۰/۵۳	۳/۱

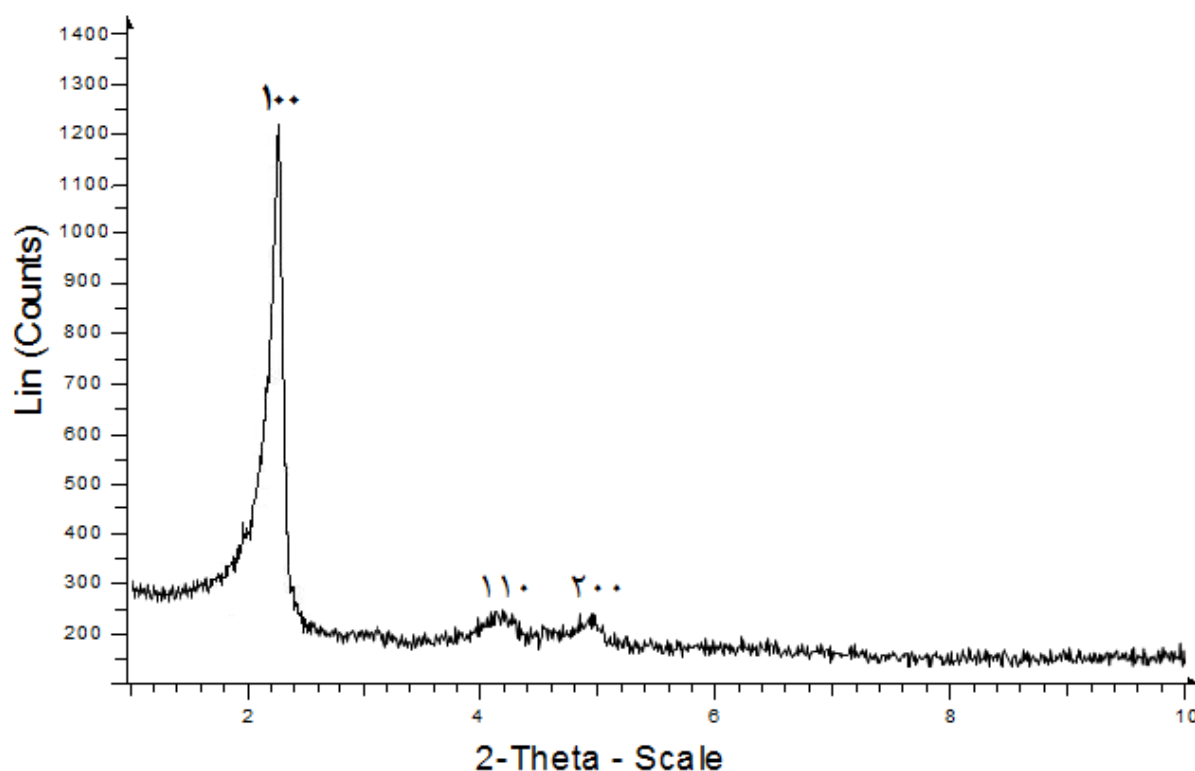
از نتایج حاصل چنین برمی آید که، تعبیه ی نانوذرات نقره در درون کانالها و آرایه های ترکیب مزومتخلخل MCM-41، مساحت سطح BET و حجم منافذ و تخلخل کل BJH ترکیب مزوپروس خالص را کاهش داده است. از سویی دیگر، کاهش اندازه ی منافذ پس از بارگذاری نانوذرات نقره، نشان دهنده ی کاهش حجم متوسط منافذ می باشد که این امر به خودی خود گواه دیگری بر سنتز موفقیت آمیز نانوذرات مذکور در درون کانالهای ترکیب مزو متخلخل سیلیکایی MCM-41 می باشد [۲۷۲]. همچنین به صورت هماهنگ با نتایج حاصل از آنالیز SEM، ایزوترم های جذب و واجبی همدمای گاز نیتروژن برای ترکیبات مورد نظر حاصل نیز موید بی عیبی و صحت سنتز ترکیبات با ساختارهای مزومتخلخل مناسب می باشد.

۳-۱-۱-۲- آنالیز پراش اشعه ی ایکس (XRD) و میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)

تکنیک XRD، یا همان پراش اشعه ی ایکس (X-Ray Diffraction) تکنیکی پرکاربرد در بررسی خصوصیات کریستال ها و ساختارهای مزومتخلخل می باشد. در این قسمت، از پراش اشعه ی ایکس توسط نمونه جهت بررسی ویژگی های آن بهره گرفته شده است. معمولاً در پراش اشعه ی ایکس توسط ساختارهای کریستالی، مشاهده می شود که شدت اشعه ی ایکس بازتابیده از کریستال، که در هر اتم بصورت الاستیک پراکنده شده اند (بدون تغییر طول موج)، در زوایای خاصی ماکسیمم خواهد بود و در بقیه ی زوایا، شدت اشعه ی پراشیده شده مقدار قابل ملاحظه ای ندارد. منظور از پراش همین رفتار اشعه- ی ایکس می باشد. در حالت کلی، اطلاعات بدست آمده از پراش یک ساختار بلوری شامل زاویه ی قله ی ماکسیمم، شدت نسبی ماکسیمم ها و همچنین پهنای هر قله می باشد. این اطلاعات اساس XRD را

¹ Textual properties

تشکیل می‌دهند. تایید ساختار منظم مزومتخلخل MCM-41 توسط پراش اشعه‌ی ایکس با زاویه‌ی کم^۱ مورد بررسی قرار گرفته است. الگوی پراش اشعه‌ی ایکس هر دو ساختار مزومتخلخل MCM-41 و نانوکامپوزیت AgNPs@MCM-41، و اطلاعات ثبت شده در پراش نمونه‌های مذکور به ترتیب در زوایای کم و زیاد در شکل‌های ۳-۱-۴ و ۳-۱-۵ نشان داده شده است.



شکل ۳-۱-۴- الگوی پراش اشعه‌ی ایکس ساختار مزومتخلخل MCM-41 سنتز شده.

برای یک نمونه‌ی مزومتخلخل سیلیکایی قله‌های خاصی در زوایای پایین و با شدت‌های متفاوت می‌تواند ظاهر شود. هر کدام از این قله‌ها مربوط به صفحه‌ای خاص از نمونه می‌باشد و زاویه‌ی هر قله وابسته به فاصله‌ی بین صفحه و شدت قله‌ی مربوط به آرایش اتم‌ها در صفحات می‌باشد. همان‌طوری که مشاهده می‌شود، پیک‌های (قله‌های) شاخص و ویژگی‌های قله‌های مذکور مربوط به مواد با آرایش آرایه‌ای شش‌وجهی در نواحی با زوایای پایین دیده می‌شوند که مربوط به صفحات^۲ (۱۰۰)، (۱۱۰) و (۲۰۰) می‌باشند. همچنین در شکل ۳-۱-۴، پیک ظاهر شده در زاویه‌ی کم $2\theta = 2/3^\circ$ به صفحه‌ی براگ (۱۰۰) MCM-41 و دو سیگنال با شدت کمتر مشاهده شده در زوایای مابین $3/5^\circ$ و 6° ، به دلیل صفحات

^۱ Low angle XRD

^۲ Planes

(۱۱۰) و (۲۰۰) ترکیب مذکور ظاهر شده‌اند که وجود و سنتز موفقیت‌آمیز منظم و آرایه‌ای شش‌وجهی MCM-۴۱ را تایید می‌کنند [۲۸۴] و آشکارا نمایانگر ساختار مزومتخلخل منظم ترکیب مورد نظر می‌باشد و می‌توان به استناد مدارک و مستندات تایید شده در مراجع علمی، آن را به شبکه‌بندی منظم شبه شش‌وجهی دوبعدی^۱ MCM-۴۱ تهیه شده، نسبت داد [۱۷۳].

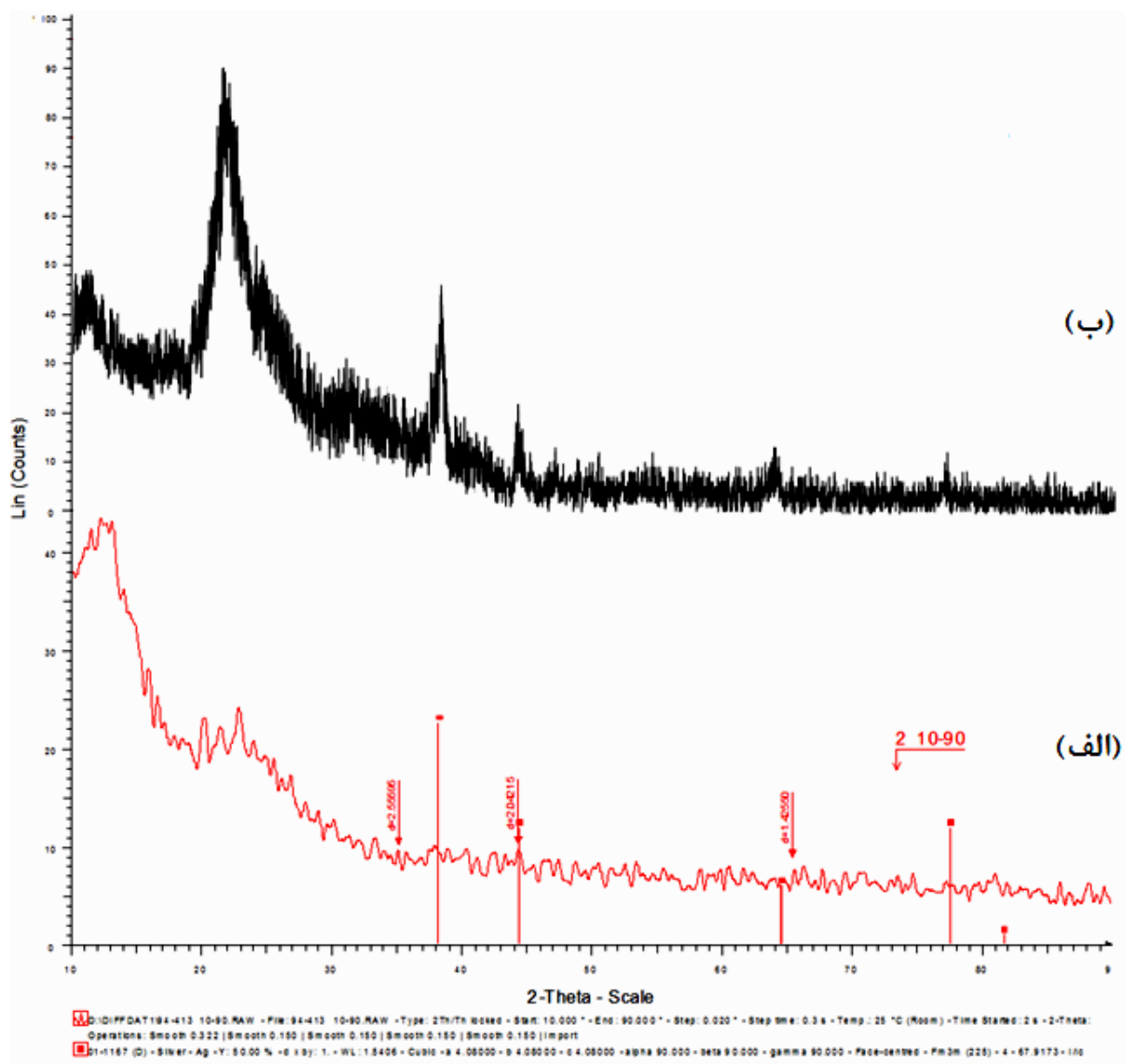
الگوی پراش (تفرق) پرتو ایکس با زاویه‌ی زیاد^۲ (WAXRS) در زوایای $2\theta = 90-10^\circ$ درجه مربوط به ترکیب نانوکامپوزیتی مزومتخلخل AgNPs@MCM-۴۱ نشان داده شده در شکل ۳-۱-۵ (الف)، قله‌های تفرقی شاخص مربوط به نقره را آشکار نساخته است؛ که این امر دلالت بر سایز بسیار پایین نانوذرات نقره و مهمتر از آن میزان پایین‌تر از حد تشخیص نقره‌ی بارگذاری شده در آرایه‌های ترکیب نانوکامپوزیتی مزومتخلخل دارد، که به دلیل میزان کم، با تکنیک XRD قابل تشخیص نیست. با این‌حال، با افزایش میزان بارگذاری نقره تا ۱۰ درصد وزنی (۱۰ wt%)، بازتابش‌ها ظاهر شده در زوایای $2\theta = 38/2^\circ$ ، $2\theta = 44/4^\circ$ ، $2\theta = 64/2^\circ$ و $2\theta = 77/5^\circ$ درجه (شکل ۳-۱-۵-ب) مربوط به تفرق صفحات براگ به ترتیب (۱۱۱)، (۲۰۰)، (۲۲۰) و (۳۱۱) شبکه و ساختار کریستالی مکعبی مرکز وجوه پر^۳ (fcc) نقره‌ی فلزی در ساختار نانوکامپوزیت مزومتخلخل AgNPs@MCM-۴۱ می‌باشند (شماره‌ی فایل JCPDS^۴ ۰۱-۱۱۶۷ [۲۸۵-۲۸۷] و کاملاً وجود نانوذرات ریز نقره را در ساختار کامپوزیتی، تایید می‌نماید. همچنین، شدت ضعیف و پهن‌شدگی همراه با نویز در الگوی پراش مذکور، گواه دیگری بر اندازه‌ی بسیار پایین نانوذرات نقره‌ی بارگذاری شده است. علاوه بر موارد مذکور، الگوهای XRD ثبت‌شده تایید می‌کنند که هیچ قله‌ی مشخصی ناشی از شکل‌گیری فاز مخلوط، در اثر برهمکنش‌های احتمالی بین نقره‌ی فلزی و تکیه‌گاه سیلیکایی مشاهده نمی‌شود.

^۱ Quasi-two dimensional hexagonal lattice

^۲ Wide-angle XRD pattern

^۳ Face-centered cubic (fcc) structure

^۴ Joint Committee on Powder Diffraction Standards (JCPDS)

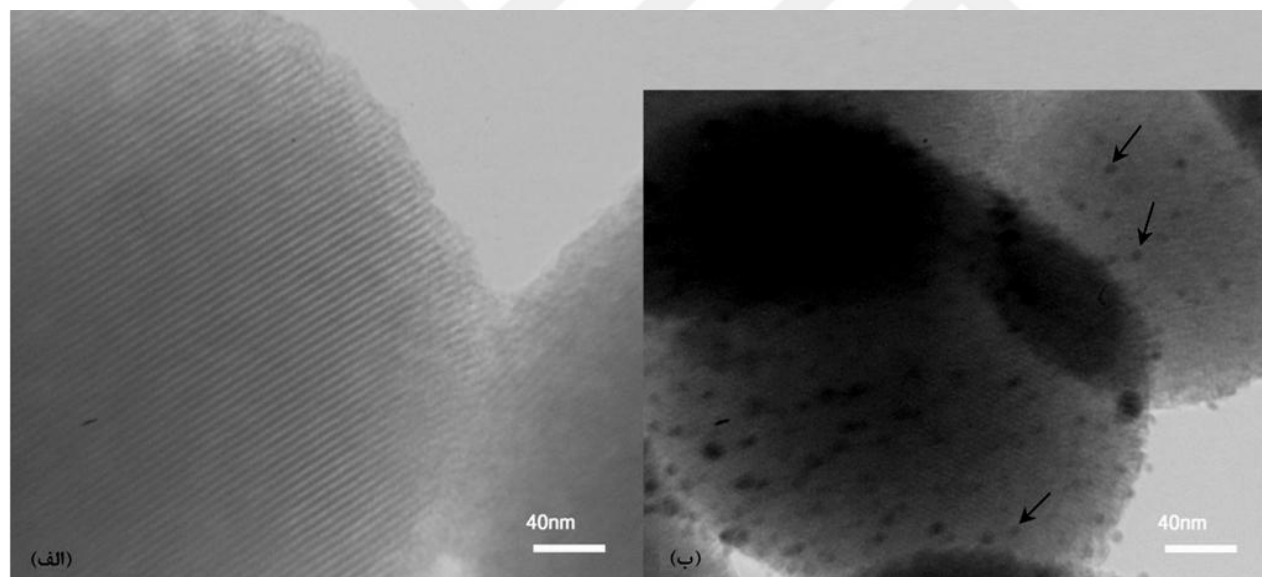


شکل ۳-۱-۵- الگوی WAXRD برای نانوجاذب مزومخلخل ۴۱- AgNPs@MCM تهیه شده (الف): با بارگذاری ۱۴۹/۰ درصدی نانوذرات نقره و (ب): با بارگذاری ۱۰ درصد از نانوذرات نقره در داخل شبکه‌ی سیلیکایی.

آنالیز میکروسکوپ الکترونی عبوری با قدرت تمایز بالا^۱ (HRTEM) به منظور تایید وجود نانوذرات نقره و نیز مطالعه‌ی ساختار آرایه‌ای کانال‌های ترکیب مزومخلخل سیلیکایی خالص سنتز شده قبل و بعد از فرآیند تعبیه‌ی نانوساختارهای نقره انجام شده است و تصاویر میکروسکوپی مربوطه در شکل‌های ۳-۱-۶- (الف) و (ب) ارائه شده است. همانطوری که در تصویر ۳-۱-۶- (الف) مشهود است، طرح دوبعدی از آرایش شش‌وجهی منظم کانال‌های موازی و همشکل (یکنواخت) MCM-41 آشکارا دیده می‌شود. درضمن، آنچنان که از تصویر ۳-۱-۶- (ب) برمی‌آید، ساختار شش‌وجهی منظم ترکیب

¹ High-resolution transmission electron microscopy (HRTEM)

سیلیکایی مزومتخلخل خالص پس از فرآیند بارگذاری نقره و شکل‌گیری نانوکامپوزیت $\text{AgNPs}@MCM-41$ ، به صورت دست نخورده باقی مانده و تغییر چندانی نکرده است. این امر تعبیه‌ی موفقیت‌آمیز و سنتز درمحل نانوذرات نقره را درون کانالهای ساختار مزومتخلخل $MCM-41$ تایید نموده و نشان می‌دهد که سنتز نانوذرات نقره در درون کانالهای آن تاثیر قابل‌توجهی بر یکنواختی آرایه‌ها و کانالهای منظم ساختار مزوپروس نداشته است. همچنین نانوذرات نقره به صورت کاملاً واضح در کانالها و شبکه‌های سیلیکایی پراکنده شده‌اند که موید این حقیقت می‌باشد که روش پیشنهادی برای تهیه‌ی نانوکامپوزیت مورد نظر، اثر قابل‌توجهی بر روی ساختار همگون و منظم مواد سیلیکایی متخلخل نداشته و سیستم مزوپروسی آن را مختل نمی‌نماید. بررسی دقیق‌تر تصاویر میکروسکوپ الکترونی ثبت شده، حاکی از ریز بودن نانوذرات نقره‌ی سنتز شده می‌باشد که در توافق مطلوب و منطقی با نتایج حاصل از آنالیزهای پراش اشعه‌ی ایکس است. علاوه بر این، تعبیه و قرارگرفتن نانوساختارهای نقره در درون شبکه‌ی سیلیکایی، از نظم بالایی برخوردار نیست و امکان سنتز و قرارگرفتن تعدادی از نانوذرات نقره در خارج کانالها و یا قرارگرفتن آنها در ابتدای حفرات کانالهای سیلیکایی را نمی‌توان نادیده انگاشت.



شکل ۳-۱-۶- ریزنگار و تصاویر HRTEM مربوط به (الف): ساپورت مزومتخلخل $MCM-41$ خالص و (ب): نانوجاذب (نانوکامپوزیت) $\text{AgNPs}@MCM-41$ حاوی ۰/۱۴۹ درصد نانوذرات نقره؛ توضیحاً اینکه، نانوذرات نقره‌ی پراکنده شده به میزبانی کانالهای ساختار مزومتخلخل توسط پیکانها مشخص شده‌اند.

۳-۱-۲- مطالعات اولیه، توسعه و بهینه‌سازی روش CE-UV

هدف از بخش اول این تحقیق، ارائه و توسعه‌ی یک روش تجزیه‌ای حساس و مقرون به صرفه، مبتنی بر تکنیک الکتروفورز موئن برای اندازه‌گیری همزمان پیش‌داروی شیمی‌درمانی کپسیتابین و متابولیت اصلی آن (۵-FU) در مقادیر غلظتی پایین نمونه‌های پلاسمای انسان پایه‌گذاری شده بود. بدین منظور، برخی از فرآیندهای تجزیه‌ای مشتمل بر حالات الکتروفورتیکی مختلف و تلفیق آنها با تکنیک‌های پیش‌تغلیظ داخل‌ستونی (آنلاین) مورد بررسی و آزمایش قرار گرفتند. همچنین، یک رویکرد نسبتاً جدید از استخراج فاز جامد- مایع بر پایه‌ی فیبرهای توخالی (HF-SLPME) که فازهای استخراجی تمیز و در عین حال درصد‌های بازیابی مطلوبی را برای هر دو آنالیت فراهم کند، به منظور آماده‌سازی و پیش‌تغلیظ خارج‌ستونی (آفلاین) مورد بهره‌برداری قرار گرفته است. در مرحله‌ی اول، برای دستیابی به شرایط جداسازی بهینه‌ی ترکیبات دارویی هدف، به ویژه جداسازی و تفکیک در خط زمینه^۱، فاکتورها و پارامترهای مرتبط با شرایط جداسازی نظیر نوع و غلظت الکترولیت زمینه (BGE)، اثرات pH بافر، دمای جداسازی، ولتاژ اعمالی، نوع و مقدار اصلاح‌گر آلی^۲ بافر (به عنوان افزودنی الکترولیت زمینه) توسط روش یکی در یک زمان^۳ مورد ارزیابی و بهینه‌سازی قرار گرفتند.

از این‌رو، به منظور انتخاب و تایید بهترین ترکیب بافری برای جداسازی الکتروفورتیکی آنالیت‌های هدف، سیستم‌های بافری متعددی از قبیل بافر بورات، استات، فسفات- تری‌اتانول‌آمین (phosphate-TEA) و فسفات- تریس (phosphate-Tris) در محدوده‌های غلظتی وسیعی از ۲۰ تا ۱۵۰ میلی‌مولار و گستره‌های pH ۲/۲ تا ۹/۲ مورد مطالعه و آزمایش قرار گرفتند و رفتار الکتروفورتیکی هر دو ترکیب دارویی هدف در شرایط یاد شده ارزیابی شد. نتایج آزمایشات متعدد نشان داد که بهترین شرایط جداسازی همزمان CAP و ۵-FU توسط استفاده از مخلوط دو بافر سدیم دی‌هیدروژن فسفات NaH_2PO_4 با غلظت 0.06 mol/L و دی‌سدیم هیدروژن فسفات Na_2HPO_4 با غلظت مشابه حاوی ۱۰٪ متانول به عنوان اصلاح‌گر آلی الکترولیت که pH آن توسط افزودن مقادیر مشخصی از محلول آبی تریس با غلظت ۰/۵ مولار در مقدار برابر ۷/۰ تنظیم شده بود، بدست آمد. لذا در این تحقیق و در کلیه‌ی قسمتهای بعدی، الکترولیت زمینه‌ی بهینه شده، تحت عنوان بافر فسفات- تریس نامیده شده است که مراحل بهینه‌سازی آن در ادامه تشریح شده است.

کاملاً اثبات شده است که جریان الکترواسموتیک (EOF)، گرمایش ژولی^۴ و جذب سطحی^۵ آنالیت‌ها بر روی دیواره‌ی داخلی ستون لوله‌ای موئن، پدیده‌هایی هستند که توسط غلظت بافر و الکترولیت زمینه

^۱ Baseline

^۲ Organic modifier

^۳ One-factor-at-a-time approach

^۴ Joule heating

^۵ Adsorption of analyte on the inner surface of capillary column

تحت تاثیر قرار می گیرند [۲۸۸]. لذا در این مطالعه، تاثیر غلظت‌های مختلفی از الکترولیت زمینه در محدوده ۲۰ تا ۱۰۰ میلی مولار مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج بدست آمده نشان می‌دادند که با افزایش غلظت الکترولیت از ۲۰ میلی مولار تا ۶۰ میلی مولار و به تبع آن افزایش قدرت یونی^۱ سیستم بافری، یک بهبود چشمگیر در قدرت تمایز پیک‌ها مشاهده گردید. این بهبود در قدرت تفکیک جداسازی پیک‌های آنالیت‌های هدف را احتمالاً می‌توان به کاهش جریان الکترواسموتیک و متعاقب آن کاهش جذب سطحی آنالیت‌ها در سطح داخلی دیواره‌ی ستون مؤثرین نسبت داد [۱۹۸]. در ادامه‌ی مراحل بهینه‌سازی غلظت الکترولیت زمینه، با افزایش غلظت الکترولیت تا ۷۵ میلی مولار، کاهش قدرت تمایز پیک‌ها و ناهم‌هنگی و بدشکلی پیک‌های مربوطه مشاهده گردید. لذا در نهایت، از بررسی غلظت‌های بالاتر به دلیل تخریب شرایط جداسازی اجتناب شده است و بافر فسفات-تریس با غلظت ۶۰ میلی مولار به عنوان بهترین ترکیب غلظتی الکترولیت زمینه انتخاب گردید.

جداسازی الکتروفورتیکی به دلیل تاثیر pH بر روی جریان الکترواسموتیک و همچنین نقش آن در فرآیند یونیزه‌شدن آنالیت‌های تحت بررسی، وابستگی معنی‌دار و قابل توجهی را به pH الکترولیت زمینه دارد [۳۰]. از همین رو، pH به عنوان یکی از مهمترین و حیاتی‌ترین پارامترهای انتخابی، تاثیر و نقش بسزایی را اندازه‌گیری ترکیبات اسیدی و بازی ایفا می‌کند و دارای اهمیت مضاعفی در فرآیندهای الکتروفورتیکی آنها می‌باشد. از آنجایی که این مسئله اثبات شده است که آنالیت‌های بازی در محدوده‌های وسیعی از شرایط pH علی‌الخصوص در pHهای اسیدی، دارای بار مثبت هستند؛ لذا به صورت الکترواستاتیکی تمایل بالایی را برای اتصال به دیواره‌ی باردار منفی لوله‌ی مؤثرین دارند. بعلاوه، در pHهای پایین‌تر، یونیزاسیون سطح دیواره کمتر بوده و در نتیجه سرعت جریان الکترواسموتیک پایین می‌باشد. در ادامه، تاثیر pH الکترولیت زمینه بر روی کارایی جداسازی نمونه‌های پلاسمای آغشته شده با آنالیت‌های هدف^۲ در گستره‌ی مقادیر ۶ تا ۸ مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج حاصل نشان می‌داد که بالاترین تفکیک در جداسازی همزمان پیک‌های آنالیت‌های مربوطه در pH برابر ۷ مشاهده می‌شود. تحت این شرایط، جداسازی هر دو آنالیت با توجه به تعداد بشقابک‌های فرضی^۳ حاصل که در کلیه‌ی مراحل بالاتر از ۳۵۰۰۰۰ بود، کارایی مطلوبی را نشان می‌داد. همچنین مشاهده گردید که در pH کمتر از ۶/۵، قدرت تفکیک کاهش می‌یابد. این در حالی بود که در pHهای بالاتر از ۷ زمانهای مهاجرت ترکیبات تحت آنالیز طولانی‌تر می‌شد؛ در حالی که با کاهش جزئی در قدرت تفکیک همراه بود. بنابراین و با توجه به اطلاعات و داده‌های حاصل از مراحل مذکور، $pH=7/0$ به عنوان مقدار بهینه برای آزمایشات بعدی انتخاب شد.

¹ Corresponding buffer ionic strength enhancement

² Spiked plasma samples

³ Theoretical plates

همچنین زمانهای مهاجرت^۱ و قدرت تفکیک جداسازی پارامترهایی هستند که توسط شدت میدان الکتریکی اعمال شده و دمای سیستم تحت تاثیر قرار می گیرد. بدین صورتکه، ولتاژ بالاتر منجر به افزایش EOF، بهبود کارایی جداسازی و در عین حال کاهش چشمگیر زمانهای آنالیز می گردد. این درحالی است، که شدت جریانهای بالای حاصل از میدانهای الکتریکی قویتر (ولتاژهای بالا)، می تواند به عنوان یک عامل محدودکننده در فرآیند جداسازی مطرح شود؛ که این محدودیت به توانایی سیستم در تعدیل و تحمل گرمایش ژولی حاصل، در حین فرآیند جداسازی بستگی دارد. لذا در مراحل بعدی، تاثیرات مربوط به ولتاژ و دمای جداسازی با اجرای شرایط آنالیز در ولتاژهای افزایشی (۳۰kV، ۱۵، ۱۸، ۲۰، ۲۲، ۲۵، ۲۷) و دماهای مختلف در گستره ۱۵ تا ۳۰ درجهی سانتی گراد مورد بررسی قرار گرفته است. شایان ذکر است که افزایش دمای جداسازی به دلیل کاهش در گرانروی الکترولیت زمینه، سبب کاهش جزئی در زمانهای مهاجرت آنالیتها و کوتاهتر شدن زمان کلی آنالیز می گردد. بنابراین و اساساً بایستی توازن کافی و منطقی مابین ولتاژ اعمالی و دمای ستون، حفظ و اعمال گردد. لذا با انجام آزمایشات متعدد و بر مبنای نتایج حاصل از جداسازی آنالیتها، شرایط بهینهی شدت میدان الکتریکی اعمالی و دمای ستون به ترتیب در ولتاژ ۱۸ کیلوولت (که شدت جریانهای ۱۴۰ تا ۱۶۰ میکروآمپری را در سیستم برقرار می کرد) و ۲۵ درجهی سانتی گراد که جداسازی آنالیتهای هدف را با قدرت تفکیک مطلوب و مدت زمان آنالیز کوتاهتری فراهم می ساخت، تنظیم و تثبیت شد. ولتاژهای بالاتر از ۱۸ kV سبب افزایش شدت جریان، ناپایداری و ایجاد نویز در پیکهای جداسازی می گردید. همچنین ولتاژهای بالاتر از ۲۲kV سبب ناپایداری شدید خط زمینه، ایجاد نویز شدید و جداسازی ضعیف آنالیتها و در برخی از موارد، توقف شرایط آنالیزی توسط دستگاه، به دلیل ایجاد جریانهای فراتر از آستانهی تحمل دستگاه و یا افزایش حرارت سریع و لحظه ای^۲ می گردید. در دماهای بالاتر از ۲۵ درجهی سانتی گراد، قدرت تفکیک به طرز چشمگیری کاهش می یافت که احتمالاً مرتبط با تغییرات گرانروی در الکترولیت زمینه می باشد. همچنین در دماهای پایین تر از دمای بهینهی انتخاب شده، مدت زمان آنالیز طولانی تر می شد، لذا دمای ستون ۲۵ درجهی سانتی گراد به عنوان شرایط بهینهی دمایی جداسازی انتخاب شد.

اصلاحگرهای آلی به دلیل نقش بی بدیل در ایجاد تغییرات در قطبیت نمونه ها برای اهداف جداسازی- های الکتروفورتیکی به ویژه در اندازه گیری های همزمان ترکیبات دارویی دارای اهمیت می باشند. افزودن برخی از حلالهای آلی با تغییر پتانسیل در دیواره ی لوله ی موئین، تغییر در ثابت دی الکتریک بافر و همچنین تغییر در گرانروی سیستم، معمولاً منجر به کاهش جریان الکترواسموتیک می شوند. در عین حال، افزودنی های آلی سبب کاهش آب پوشی آنالیتها شده و در نهایت موجب افزایش تراکم (stacking) آنالیت های هدف می گردند [۲۸۹-۲۹۱]. لذا در آخرین مرحله از بهینه سازی شرایط الکتروفورتیکی و

¹ Migration times

² Rapid heating boost

توسعه‌ی روش، اثر افزایش یک اصلاحگر آلی به الکترولیت زمینه، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل مویید این بود که بهترین و مطلوب‌ترین جداسازی با بیشترین تفکیک آنالیت‌ها در خط زمینه، توسط اضافه کردن حلال متانول به عنوان اصلاحگر آلی الکترولیت زمینه حاصل شده است. از همین‌رو، نسبت‌های مختلفی از حلال متانول (v/v ۲۰-۰) به الکترولیت زمینه انتخابی اضافه شد (در حالی که سایر پارامترها در شرایط بهینه بودند). نتایج بدست آمده نشان می‌داد که با افزایش غلظت متانول در الکترولیت زمینه از صفر تا ۱۰ درصد حجمی - حجمی، فاکتور تفکیک^۱ از ۰/۸۹ در شرایط بدون افزایش متانول (اصلاحگر آلی)، به ۱/۴ افزایش یافت. در عین حال، گزینش‌پذیری جداسازی با اضافه کردن مقادیر افزون‌تری از متانول به بافر اجرایی^۲ (تا ۱۵٪ حجمی - حجمی) افزایش قابل ملاحظه‌ای را نشان می‌داد؛ در حالی که با این میزان متانول، علی‌رغم بهبود شرایط جداسازی آنالیت‌ها، زمانهای مهاجرت گونه‌ها بسیار طولانی می‌گردید؛ که احتمالاً به دلیل تغییر بیش از حد در تحرک آنالیت‌ها و تغییرات غیرقابل اغماض در گرانیوی الکترولیت زمینه می‌باشد [۲۹۲]. لذا در نهایت ترکیب بهینه‌ی الکترولیت زمینه بر اساس داده‌های حاصل از آزمایشات توسعه‌ی روش به صورت: ۶۰ میلی‌مولار بافر فسفات - تریس (pH=۷) حاوی ۱۰٪ متانول به عنوان اصلاحگر آلی، برای مراحل و آزمایشات بعدی انتخاب گردید.

۳-۱-۳- بهینه‌سازی شرایط و پارامترهای ریزاستخراج AgNPs@MCM41-HF-SLPME برای اندازه‌گیری همزمان کپسیتابین و متابولیت اصلی آن (FU-۵)

در فرآیندهای استخراجی و آماده‌سازی خارج ستونی نمونه، پارامترهای مختلفی که کارایی استخراج^۳ را تحت تاثیر قرار می‌دهند، بایستی مورد مطالعه‌ی دقیق، ارزیابی و بهینه‌سازی قرار گیرند. از همین‌رو، در روش ریزاستخراجی فاز جامد- مایع مبتنی بر فیبرتوخالی ارائه شده برای استخراج همزمان دو آنالیت هدف کپسیتابین و متابولیت اصلی آن (FU-۵)، شرایط و پارامترهای موثر بر روی کارایی استخراج از جمله: نوع حلال استخراج کننده، مقدار و غلظت نانوکامپوزیت مورد استفاده به عنوان ترکیب نانوجاذب، pH محلول نمونه، اثر قدرت یونی محلول و افزایش نمک، سرعت همزدن و تحریک مکانیکی^۴ محلول (سرعت چرخش محلول نمونه)، زمان استخراج و شرایط واجدبی^۵ آنالیت‌ها پس از اتمام فرآیند استخراج، مورد مطالعه و ارزیابی قرار گرفته و مقادیر بهینه‌ی بدست آمده، گزارش شده‌اند. لذا به منظور انتخاب و ارائه‌ی شرایط آزمایشی بهینه، جزئیات مربوط به آزمایشات انجام شده و پارامترهای تاثیرگذار بر روی کارایی روش، در قسمتهای بعدی مورد بحث قرار می‌گیرند. لازم به توضیح است که در تمامی مراحل بهینه‌سازی روش ریزاستخراج پیشنهادی، غلظتهای آغشته شده‌ی هر دو آنالیت هدف (غلظتهای اضافه شده به نمونه‌های پلاسما) ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر انتخاب شده و کلیه‌ی آزمایشات در نمونه-

¹ Resolution

² Run buffer

³ Extraction performance

⁴ Agitation rate

⁵ Desorption conditions

های پلاسمای انسان (نمونه‌های کنترل کیفی (QC))، انجام شده‌اند. همچنین تمامی آزمایشات سه بار^۱ تکرار شده و مقادیر میانگین حاصل از نتایج تکرارهای متعدد به همراه انحرافات استاندارد مربوطه، در محاسبات مربوطه لحاظ گردیده و گزارش شده است.

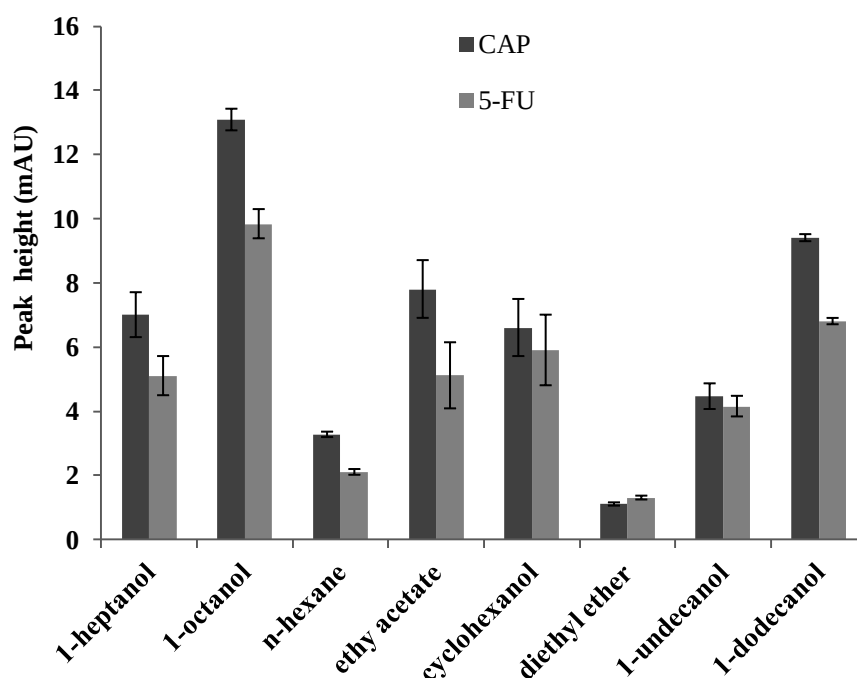
۳-۱-۳-۱- انتخاب حلال استخراج کننده

اولین پارامتر بهینه شده، انتخاب نوع حلال استخراج کننده بود. در فرآیندهای استخراج فاز مایع بر پایه‌ی فیبرهای توخالی (HF-LPME) و همچنین استخراجهای فاز جامد- مایع متکی بر فیبرهای توخالی (HF-SLPME)، نوع حلال استخراجی نقش کلیدی را در رسیدن به کارایی‌های مطلوب استخراج برای آنالیت‌های هدف، ایفا می‌کند. بنابراین در مرحله‌ی حساس انتخاب حلال استخراج کننده در روشهای مذکور، فاکتورهای متعددی بایستی مد نظر قرار گیرند. در درجه‌ی اول، همانطوری که قبلاً نیز اشاره شد، حلال آلی باید دارای سازگاری کافی و مطلوب با ساختار غشایی پلیمری فیبر توخالی باشد، تا ضمن پرکردن خلل و فرج فیبرهای مذکور [۲۹۳]، شرایط اشباع‌سازی کامل و تثبیت بدون نقص در منافذ دیواره‌ی فیبرها، جهت تامین حداکثری میزان انتقال آنالیت‌های مورد مطالعه به درون حلال آلی را فراهم نماید [۲۷۵]. علاوه بر این، حلال آلی مورد استفاده بایستی غیرقابل امتزاج^۲ در آب، محلولهای آبی و پیکره‌ی نمونه‌ی مورد نظر باشد تا از انحلال و از دست رفتن آن به درون فاز آبی در حین فرآیند استخراج ممانعت بعمل آید. در عین حال، حلال آلی انتخابی به ویژه در روش HF-SLPME، بایستی قابلیت پراکنده‌سازی^۳ نانوجاذب مورد استفاده را به شکل مطلوبی دارا باشد، تا از تجمع و لختگی جاذبهای جامد در فاز آلی جلوگیری کند. در نهایت، حلال آلی مورد استفاده باید توانایی تمایل بالا برای آنالیت هدف را فراهم کرده و قادر باشد حلالیت مطلوبی را برای آنالیت مورد نظر ایجاد نماید. همچنین حلال آلی انتخابی بایستی دارای پایداری کافی و فراریت بسیار پایین باشد تا میزان از دست رفتن و تبخیر حلال در طول مدت زمان استخراج به حداقل برسد. بر همین اساس، و با توجه به محدودیتهای موجود برای تکنیک الکتروفورز موئین، ستونهای مربوطه و لزوم پراکنده شدن یکنواخت نانوجاذب تهیه شده، حلالهای مختلفی نظیر ۱- هپتانول، سیکلو هگزانول، ۱- دودکانول، ۱- آندکانول، ۱- اکتانول، دی- اتیل اتر، n- هگزان و اتیل استات در این مطالعه مورد ارزیابی قرار گرفتند. همانطوری که در شکل (نمودار) ۳-۱-۷ مشاهده می‌شود، در نهایت حلال ۱- اکتانول به دلیل فراهم کردن بهترین سیگنال تجزیه‌ای و بالاترین کارایی استخراج برای هر دو آنالیت، به عنوان حلال استخراج کننده‌ی بهینه برای آزمایشات بعدی انتخاب گردید.

¹ Triplicate

² Immiscible

³ Dispersion capability



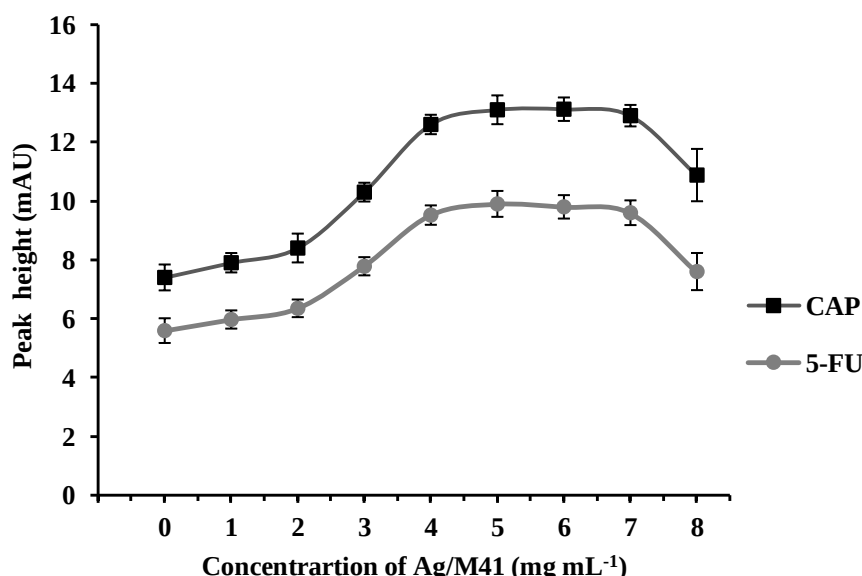
شکل ۳-۱-۷ اثر نوع حلال‌های استخراج‌کننده به عنوان فاز پذیرنده بر روی کارایی استخراج همزمان آنالیت‌های هدف (نشان داده شده بر حسب ارتفاع پیکها یا به عبارتی شدت سیگنال تجزیه‌ای و پاسخ ردیاب)؛ (شرایط استخراج: حجم نمونه‌ی آبی: ۵ میلی‌لیتر، دمای استخراج: ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، حجم حلال استخراج‌کننده: ۸ میکرولیتر، غلظت هر آنالیت: ۵۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر در پلاسما، طول فیبر: ۱/۲ cm، اثر نمک: بدون افزایش الکترولیت خارجی، سرعت همزدن: ۵۰۰ دور در دقیقه، مدت استخراج: ۲۰ دقیقه، زمان واجدبی: ۱۰ دقیقه، حلال واجدبی: مخلوط ۵۰٪ استونیتریل - آب، pH محلول نمونه برابر ۱۱ که توسط محلول ۱ مولار سدیم هیدروکسید تنظیم شده است.

۳-۱-۲-۳-۲- تأثیر غلظت و مقدار نانوجاذب

تأثیرات غلظت نانوجاذب (اثر افزایش نانوکامپوزیت $Ag/M\phi 1$ به درون حلال پذیرنده) بر قابلیت استخراج آنالیت‌ها، در محدوده‌ی ۰ تا ۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از نانوجاذب در حلال انتخابی، مورد بررسی قرار گرفت. همان‌طوری که در شکل ۳-۱-۸ مشاهده می‌شود، هنگامی که غلظت $Ag/M\phi 1$ از صفر میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (5 mg/mL) در حلال ۱- اکتانول افزایش داده شد، شدت سیگنال تجزیه‌ای هر دو آنالیت و به دنبال آن کارایی استخراج افزایش قابل‌توجهی را نشان داد و در غلظت‌های بالاتر به حالت پایدار^۱ رسیده و بدون تغییر باقی ماند. لازم به توضیح است که در غلظت‌های بیشتر از ۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نانوجاذب در حلال آلی پذیرنده، شدت پیکهای آنالیت‌ها و قابلیت استخراج، کاهش محسوسی داشت که این امر را احتمالاً می‌توان به قابلیت پراکندگی و دیسپرس شدگی ضعیف نانوجاذب در حلال پذیرنده در مقادیر غلظتی ذکر شده، نسبت داد. از این رو، غلظت

¹ Steady state

۵ میلی گرم بر میلی لیتر $Ag/M41$ در حلال ۱- اکتانول به عنوان مقدار بهینه‌ی جاذب نانوکامپوزیتی برای آزمایشات بعدی انتخاب شد.



شکل ۳-۱-۸- تاثیر غلظت نانوکامپوزیت مزومتخلخل پخش شده در حلال ۱- اکتانول (فاز پذیرنده) بر کارایی استخراج همزمان آنالیت‌های هدف؛ (شرایط استخراج: حجم نمونه‌ی آبی: ۵ میلی لیتر، دمای استخراج: ۲۵ درجه‌ی سانتی گراد، حلال استخراج کننده: ۱- اکتانول، حجم حلال استخراج کننده: ۸ میکرولیتر، غلظت هر آنالیت: ۵۰۰ نانوگرم بر میلی لیتر در پلاسما، طول فیبر: ۱/۲ cm، اثر نمک: بدون افزایش الکترولیت خارجی، سرعت همزدن: ۵۰۰ دور در دقیقه، زمان واجذبی: ۱۰ دقیقه، حلال واجذبی: مخلوط ۵۰٪ استونیتریل-آب، pH محلول نمونه برابر ۱۱ که توسط محلول ۱ مولار سدیم هیدروکسید تنظیم شده است.

۳-۳-۱-۳- تاثیر سرعت همزدن محلول

با توجه به تئوری انتقال جرم، سرعت همزدن محلول نمونه و تحریک مکانیکی آن، نقش غالبی را در کارایی فرآیند استخراج دارد [۵۶، ۱۶۴]. افزایش سرعت چرخش فیبر استخراجی در محلول نمونه، می-تواند فرآیند انتقال جرم^۱ را از فاز دهنده به فاز پذیرنده سرعت بخشیده و در نهایت سینتیک استخراج^۲ را از طریق کاهش ضخامت لایه‌ی (فیلم) انتشار^۳ تسریع کرده و زمان لازم برای رسیدن به تعادل ترمودینامیکی^۴ را کاهش دهد [۲۹۴، ۲۹۵]. لذا این پارامتر در فرآیندهای استخراجی فاز مایع مبتنی بر فیبرهای توخالی، تاثیر بسزایی در قابلیت و کارایی استخراج خواهد داشت؛ که بایستی بدقت مورد بررسی قرارگیرد. از همین رو در این مطالعه، به منظور بررسی نقش سرعت چرخش بر روی استخراج آنالیت‌های

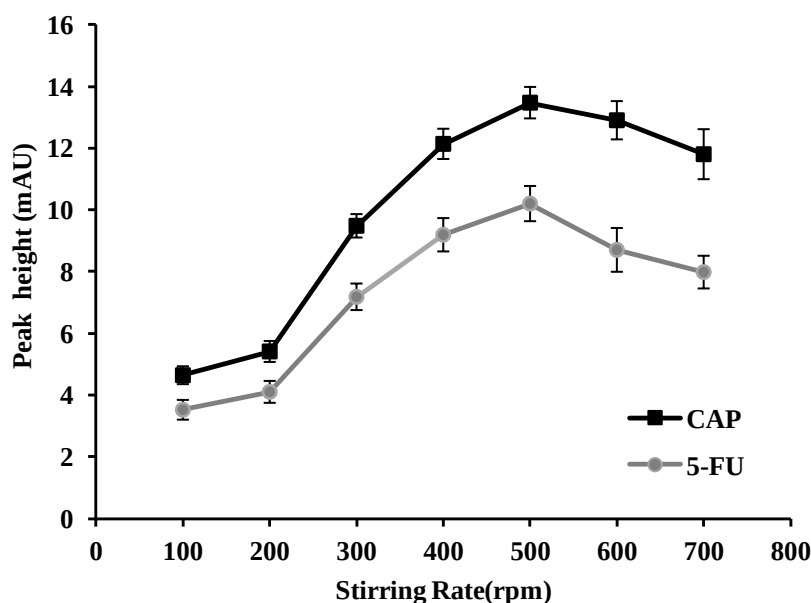
¹ Mass transfer

² Extraction kinetics

³ Thickness of the diffusion film

⁴ Thermodynamic equilibrium

هدف، پاسخ تجزیه‌ای دستگاه به صورت تابعی از سرعت‌های چرخش مختلف از ۱۰۰ تا ۸۰۰ دور در دقیقه (تحت شرایط آزمایشی بهینه‌شده قبلی)، ثبت گردید. نتایج حاصل از آزمایشات تایید کردند که تحریک مکانیکی فیبر تهیه شده در داخل نمونه، تا حد زیادی استخراج داروهای مذکور را بهبود می‌بخشد. شکل ۳-۱-۹ نشان می‌دهد که قابلیت استخراج هر دو آنالیت هدف، هنگامی که سرعت چرخش از ۱۰۰ دور در دقیقه به ۵۰۰ دور در دقیقه افزایش داده می‌شود، بهبود مطلوبی را تجربه می‌کند. ضمناً سرعت‌های بالاتر از ۵۰۰ دور در دقیقه سبب ایجاد حبابهای هوا^۱ بر روی سطح و دیواره‌ی جانبی غشایی فیبر توخالی می‌شد که به احتمال زیاد بدلیل تشدید تلاطم^۲ در محلول نمونه و همچنین تقلا و استرس^۳ مکانیکی بیش از حد^۴ تحمیل شده به فیبر مذکور در سرعت‌های چرخش بالاتر ایجاد می‌گردد (به دلیل حجم پایین نمونه و ویال حاوی محلول نمونه). لذا محدودیت‌های ذکرشده، به دلیل اشغال سایتهای تماسی^۴ سطح خارجی فیبر استخراجی، سبب جلوگیری از انتقال مطلوب آنالیتها به فاز پذیرنده شده که این امر به خودی خود تاثیرات منفی را بر خروجی و بازده روش ریزاستخراج پیشنهادی و تکرارپذیری آن به همراه خواهد داشت. بنابراین و بر اساس نتایج بدست آمده، سرعت چرخش ۵۰۰ rpm^۵ به عنوان مقدار بهینه، در کلیه‌ی آزمایشات و مراحل بعدی اعمال گردید.



شکل ۳-۱-۹- تاثیر سرعت همزدن محلول نمونه بر کارایی استخراج همزمان آنالیت‌های هدف، (شرایط استخراج: حجم نمونه‌ی آبی: ۵ میلی‌لیتر، حلال آلی فاز پذیرنده: ۱- اکتانول، غلظت نانوجاذب مزومتخلخل در فاز پذیرنده: ۵ mg/mL، غلظت هر آنالیت: ۵۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر در پلاسما و بقیه‌ی شرایط مشابه شکل ۳-۱-۸).

¹ Massive air bubbles

² Turbulence

³ Mechanical stress

⁴ Occupation of the contactsites

⁵ Revolutions per minute

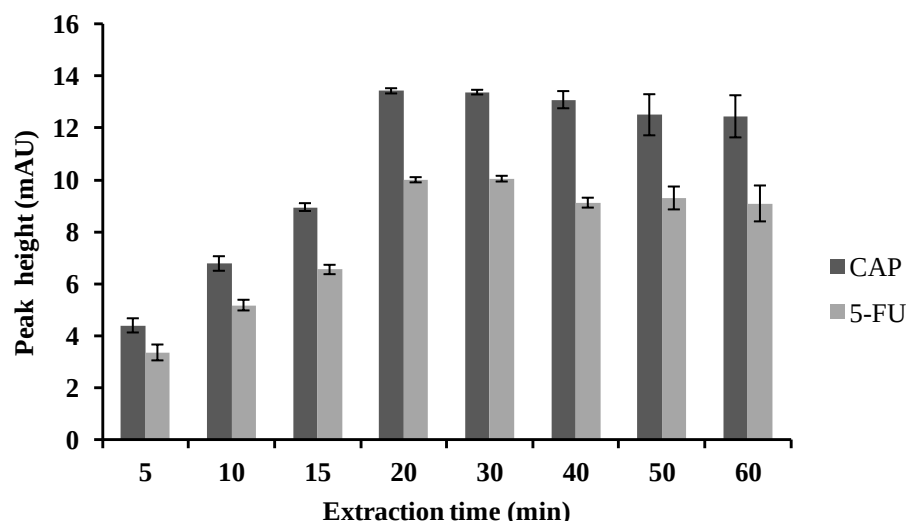
۳-۱-۳-۴- تأثیر زمان استخراج

عمدتاً در اکثر روشهای ریزاستخراج، کارایی استخراج به فرآیند انتقال جرم آنالیت از پیکرهی نمونه به فاز یا فازهای استخراج‌کننده بستگی دارد [۲۶۹]. ذکر این نکته ضروری است که، همانند سایر روشهای ریزاستخراجی، استخراجهای مبتنی بر فاز مایع نیز روشهای کاملی نیستند؛ بلکه فرآیندهایی تعادلی می‌باشند که در آنها، آنالیتها بین پیکرهی نمونه و فاز استخراج‌کننده توزیع می‌گردد. انتقال جرم، یک فرآیند تعادلی وابسته به زمان است که تنها در اثر تماس فاز پذیرنده با نمونه و برای مدت زمان خاصی حاصل می‌شود. از اینرو، زمان استخراج در روش HF-SLPME، یک فاکتور بسیار مهم است؛ چرا که در حالت کلی، توزیع آنالیتها را بین نمونه و ساختار غشایی فیبر (در درجهی اول بین محلول نمونه و نانوجاذب تثبیت شده در سطح دیوارهی غشا و متعاقب آن، بین فاز آلی و نانوجاذب در داخل کانال فیبر توخالی) تحت تاثیر قرار می‌دهد. از سویی دیگر، انتقال جرم یک فرآیند وابسته به زمان است، لذا کارایی استخراج در روشهای HF-SLPME، با بالابردن زمان استخراج در گسترهی سینیتیکی افزایش می‌یابد، درحالی که در شرایط تعادلی (پس از رسیدن به تعادل ترمودینامیکی)، این پارامتر مستقل از زمان خواهد شد [۲۹۶]. کاملاً ثابت شده است که سرعت انتشار و نفوذ آنالیتها از یک پوشش متخلخل و با ضخامت کم در مقایسه با یک پوشش ضخیم و غیرمتخلخل، بالاتر خواهد بود [۱۶۲]. لذا در این مطالعه، با هدف تعیین پروفایل زمانی استخراج آنالیتهای هدف، تاثیر زمان استخراج بر روی کارایی آن در زمانهای مختلف از ۵ دقیقه تا ۶۰ دقیقه مورد بررسی قرارگرفت؛ در حالی که سایر پارامترها ثابت بوده و در مقدار بهینه شدهی قبلی حفظ شده بودند. نتایج بدست آمده که در شکل ۳-۱-۱۰ قابل مشاهده است، نشان می‌دهد که با افزایش مدت زمان فرآیند استخراج تا ۲۰ دقیقه، شدت پاسخ و سیگنال مربوط به هر دو آنالیت افزایش یافته و پس از آن تغییر قابل توجهی مشاهده نگردید. بنابراین، نتایج حاصل حاکی از این است که تعادل استخراج در مدت زمان یاد شده (بیست دقیقه) حاصل می‌شود. به همین دلیل، برای آزمایشات بعدی، زمان استخراجی بیست دقیقه به عنوان مقدار بهینه انتخاب گردید.

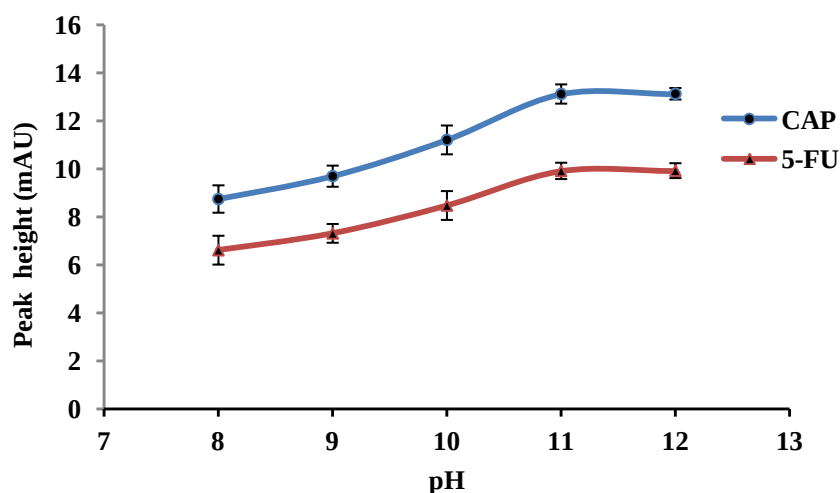
۳-۱-۳-۵- تأثیر pH فاز دهنده (ماتریکسی نمونه)

در بسیاری از روشهای ریزاستخراج، pH پیکرهی نمونه یکی از مهمترین پارامترهایی است که می‌تواند اثرات چشمگیر و قابل توجهی را بر کارایی روش استخراجی داشته باشد [۲۹۷]. برای ترکیبات بازی ضعیف مانند آنالیت‌های مورد مطالعه، کپسیتابین ($pK_a=8/8$) و ۵-فلوروآوراسیل ($pK_a=8/01$)، pH فاز دهنده بایستی در گسترهی مناسبی از حالت بازی باشد تا متضمن این باشد که آنالیتها به طور کامل به صورت غیریونی وجود داشته باشند؛ حالیت آنها در فاز دهنده کاهش، و تمایل آنها برای انتقال به حلال آلی (فاز پذیرنده) افزایش یابد. در این بخش از مطالعه، به منظور بررسی تاثیر pH فاز دهنده بر کارایی استخراج دو ترکیب دارویی مورد مطالعه، محلولهای نمونه با pHهای مختلف (۸ تا ۱۲)، تنظیم شده توسط محلول آبی سدیم هیدروکسید) مورد بررسی و آزمایش قرارگرفتند. استخراجها با سرعت هم‌زدن

۵۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۲۰ دقیقه انجام شدند. نتایج حاصل (ارائه شده برحسب شدت سیگنال دو آنالیت) نشان دادند که افزایش pH ($\text{pH} \geq 11$) باعث افزایش مطلوبتر میزان استخراج برای هر دو ترکیب دارویی مورد مطالعه گردید. همانطوری که در شکل ۳-۱۱-۳ نشان داده شده است، برای استخراج آنالیتها مناسب بوده و بنابراین این مقدار pH در ادامه‌ی آزمایشات توسط محلول سدیم-هیدروکسید کنترل گردید.



شکل ۳-۱۰-۱ اثر زمان بر روی کارایی استخراج، (شرایط استخراج: حجم نمونه‌ی آبی: ۵ میلی‌لیتر، غلظت هر آنالیت: ۵۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر در پلاسما، سرعت همزدن محلول نمونه: ۵۰۰ rpm، حلال آلی فاز پذیرنده: ۱-اکتانول، غلظت نانوجاذب مزومتخلخل در فاز پذیرنده: ۵ mg/mL و بقیه‌ی شرایط مشابه شکل ۳-۱۰-۸).



شکل ۳-۱۱-۱ اثر pH فاز دهنده (محلول نمونه) بر کارایی استخراج همزمان کپسیتابین و ۵-فلوروآوراسیل، (شرایط استخراج: حجم نمونه‌ی آبی: ۵ میلی‌لیتر، غلظت هر آنالیت: ۵۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر در پلاسما، سرعت همزدن محلول نمونه: ۵۰۰ rpm و بقیه‌ی شرایط مشابه شکل ۳-۱۰-۸)، pH محلول نمونه در تمامی تستها توسط محلول آبی ۱ مولار سدیم هیدروکسید تنظیم شده است.

۳-۱-۳-۶- تأثیر قدرت یونی محلول (اثر افزایش نمک)

عموماً در اغلب روشهای استخراجی خارج‌ستونی، اثر افزودن نمک به محلول نمونه، به منظور کاهش حلالیت مولکولهای آنالیت در فازدهنده و افزایش توزیع آنها به درون حلال آلی/ فازپذیرنده که منجر به بهبود بازده‌های استخراجی می‌شود، مورد بررسی قرار می‌گیرد. این پدیده در اغلب اوقات به دلیل تأثیر ماهیت برهمکنشهای الکترواستاتیک^۱ و همچنین خصوصیات آگریزی بین آنالیت یا آنالیت‌های هدف و جاذبها/ استخراج‌کننده‌ها، روی می‌دهد [۲۹۸]. اما آنچه که در این مقوله بایستی مد نظر قرارگیرد این است که اولاً تأثیر افزودن نمک بر روی کارایی استخراج بستگی به ماهیت آنالیت‌های هدف دارد؛ و در درجه‌ی دوم، گاهاً افزودن نمک در کنار مزایای بارزی که در بهبود کارایی استخراج دارد، می‌تواند از طریق افزایش گرانی و دانسیته‌ی فاز آبی (فاز دهنده، محلول نمونه) محدودیت‌هایی (اثرات منفی) را نیز برای فرآیندهای استخراجی به همراه داشته باشد [۲۹۹]. این تأثیرات منفی به احتمال زیاد به صورت کاهش در سرعت انتشار آنالیت‌ها خودنمایی می‌کنند که معمولاً در اثر تمایل یونهای نمک به محدودکردن حرکت آنالیت‌ها از توده‌ی محلول به فاز پذیرنده، قابل تأمل می‌باشند. در این مطالعه، اثر افزایش نمک بر کارایی استخراج همزمان کپسیتابین و متابولیت اصلی آن، با افزایش مقادیر مختلفی از سدیم کلرید (۰-۲۰ w/v) به داخل نمونه‌های پلاسمای آغشته به داروهای هدف، مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج حاصله نشان دادند که نه‌تنها تأثیر مثبت و قابل‌توجهی در بهبود کارایی استخراج مشاهده نگردید، بلکه در غلظت‌های بالاتر نمک، کاهش محسوسی نیز در میزان استخراج حاصل گردید که به-احتمال زیاد می‌تواند به دلیل برهمکنشهای الکترواستاتیک بین مولکول‌های دارو و یون‌های نمک در محلول و کاهش ضرایب انتقال جرم محصول افزایشی دارو- یون باشد. لذا کلیه‌ی مراحل و آزمایشات بعدی، بدون اضافه‌کردن الکترولیت خارجی به محلول نمونه، دنبال شده است.

۳-۱-۳-۷- بررسی شرایط واجذبی

پس از اتمام فرآیند استخراج، خارج‌کردن فیبرها از محلول نمونه و قبل از انجام آنالیزهای الکتروفورتیکی، آنالیت‌های هدف از فیبرهای توخالی تقویت‌شده با نانوجاذب مزومتخلخل AgNPs@MCM-۴۱ (به عنوان ابزار استخراج فاز جامد- مایع)، با اعمال تحریک فراصوت^۲ تحت شرایط زمانی مناسب و با استفاده از ۱۰۰ میکرولیتر حلال واجذبی (حداقل حجم لازم برای غوطه-ورسازی فیبرهای الاستیک پلیمری مورد استفاده در فرآیند استخراج) واجذب شدند (استخراج برگشتی^۳). قابل توجه است که هر دو پارامتر انتخاب حلال و زمان واجذبی، تأثیرات و نقش کلیدی را بر روی شدت سیگنال (ارتفاع پیکها)، تقارن شکل پیک‌های آنالیت‌های استخراج شده و جداسازی آنها در

^۱ Electrostatic interactions

^۲ Ultrasonic agitation

^۳ Back- or Re-extracted

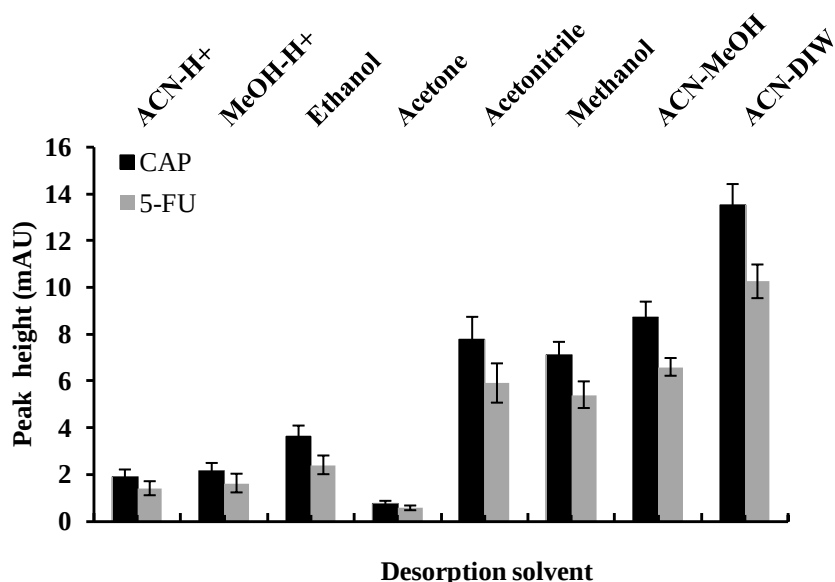
خط زمینه دارند و بایستی با احتیاط مورد بررسی قرار گرفته و بهینه شوند. در وهله‌ی نخست، با توجه به لزوم سازگاری با تکنیک، دستگاه و ستون‌های الکتروفورز موئین، تاثیرات انواع مختلفی از سیستم‌ها و حلالهای واجدبی مشتمل بر استونیتریل (ACN)، متانول (MeOH)، مخلوط استونیتریل - متانول (ACN-MeOH)، استونیتریل‌اسیدی ($ACN-H^+$)، متانول‌اسیدی ($MeOH-H^+$)، اتانول (EtOH)، استون و همچنین مخلوط‌های دوتایی^۱ (دوگانه) با درصدهای حجمی - حجمی مختلف (۲۵:۷۵، ۵۰:۵۰ و ۷۵:۲۵) از استونیتریل - آب دیونیزه (ACN-Water) مورد مطالعه قرار گرفتند و نتایج مربوطه در شکل ۱-۳-۱۲ ارائه شده است. لازم به تاکید است که در بررسی‌های بعمل آمده مربوط به حلالها و سیستمهای واجدبی، این اصل که غشای پلیمری فیبرتوخالی و نانوجاذب مورد استفاده در حلالهای مورد بررسی، غیرقابل انحلال یا تخریب ساختار هستند، مد نظر قرار داده شده است [۲۶۹]. با توجه به نتایج حاصله و با در نظر گرفتن شرایط ملزومه‌ی پیش‌تغلیظ توده‌ای داخل‌ستونی (FASI) مورد استفاده برای بهبود بیشتر حساسیت در این مطالعه، مخلوط ۷/۷ v/v ۵۰:۵۰ آب یون‌زدا شده - استونیتریل (ACN-DIW)، بهترین پاسخ تجزیه‌ای را فراهم کرده و شکلهای مناسب و متقارن پیک و همچنین بیشترین ارتفاع و سطح زیر پیک را نسبت به سایر سیستم‌های واجدبی تست شده، نشان داد. لذا در کلیه‌ی مراحل آزمایشی، مخلوط یک به یک (۱:۱) استونیتریل + آب دیونیزه، به دلیل قابلیت مطلوب این سیستم واجدبی در رهایش^۲، واجدب و استخراج برگشتی مولکولهای آنالیت‌های هدف از فیبر بکارگرفته شده به عنوان ابزار استخراجی، مورد استفاده قرار گرفته است.

در وهله‌ی دوم، تاثیر مدت زمان واجدبی، توسط روش تحریک فراصوت (التراسونیک) در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، از طریق تغییر در پریودهای زمانی مختلف واجدبی^۳ با روش فراصوت از ۱ تا ۱۵ دقیقه، مورد ارزیابی قرار گرفته است (شکل ۱-۳-۱۳). بررسی نتایج بدست آمده مشخص می‌نماید که شدت و ارتفاع پیک آنالیت‌ها، با افزایش زمانهای واجدبی تا ۱۰ دقیقه به تدریج افزایش می‌یابد و پس از مدت زمان مذکور، در حالت ثابت و بدون تغییر محسوس باقی می‌ماند. لذا با تکیه بر نتایج مربوط به تعادلات واجدبی، اعمال مدت زمان ۱۰ دقیقه‌ای تحریک فراصوت در سیستم حلالی استونیتریل - آب (۱:۱)، برای کلیه‌ی مراحل و آزمایشات متعاقب، ترجیح داده شده است.

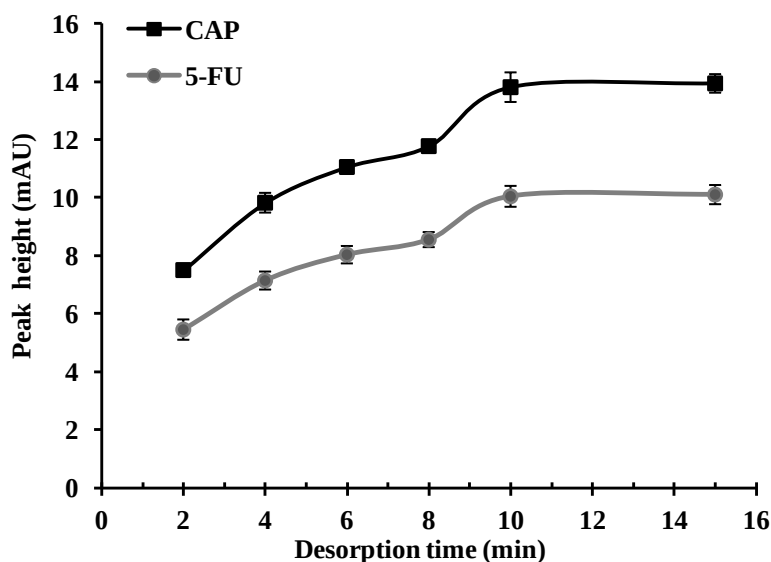
¹ Binary mixtures

² Releasing

³ Sonication periods



شکل ۳-۱-۱۲- بهینه سازی شرایط واجذبی: انتخاب حلال واجذبی، (شرایط استخراج: حجم نمونه ی آبی: ۵ میلی لیتر، دمای استخراج: ۲۵ درجه ی سانتی گراد، غلظت هر آنالیت: ۰/۵ میکروگرم بر میلی لیتر در پلاسما، طول فیبر: ۱/۲ cm، اثر نمک: بدون افزایش الکترولیت خارجی، سرعت همزدن: ۵۰۰ دور در دقیقه، حلال آلی فاز پذیرنده: ۱- اکتانول، غلظت نانوجاذب مزومتخلخل در فاز پذیرنده: ۵ mg/mL، زمان واجذبی: ۱۰ دقیقه.



شکل ۳-۱-۱۳- بهینه سازی زمان واجذبی با تحریک فراصوت، (شرایط استخراج: حجم نمونه ی آبی: ۵ میلی لیتر، دمای استخراج: ۲۵ درجه ی سانتی گراد، غلظت هر آنالیت: ۰/۵ میکروگرم بر میلی لیتر در پلاسما، حلال واجذبی: مخلوط ۵۰٪ استونیتریل- آب، pH محلول نمونه برابر ۱۱ که توسط محلول ۱ مولار سدیم هیدروکسید تنظیم شده است و بقیه ی شرایط مشابه شکل ۳-۱-۱۱).

۳-۱-۴- بهینه‌سازی شرایط روش پیش‌تغلیظ داخل‌ستونی (FASI)

همانطوری که در قسمتهای قبلی نیز اشاره شده است، روش FASI یک تکنیک پیش‌تغلیظ آنلاین (درون‌ستونی) نمونه در روشهای مبتنی بر الکتروفورز موئین می‌باشد که اساس این رویکرد، بر مبنای تفاوت در رسانایی‌های بین قاچ نمونه و الکترولیت زمینه خلاصه شده است [۲۷]. در حالت کلی، هنگامی که غلظت آنالیت‌های دارویی در پیکره و محلول نمونه کم بوده و محدودیتهای ردیابی با آشکارسازهای معمولی مطرح باشد و در عین حال، آنالیزهای قابل اعتماد کمی مورد نیاز باشد، نمونه طوری به لوله‌ی موئین تزریق می‌شود که غلظت آنالیت یا آنالیت‌های هدف، در داخل ستون افزایش یابد؛ که این روش تزریق توده‌ای (stacking) نامیده می‌شود. بدین صورتکه، نمونه عمدتاً در داخل محلولی که نیروی یونی آن کمتر از الکترولیت زمینه باشد، حل یا آماده‌سازی می‌گردد. پایین بودن غلظت نمونه که سبب پایین بودن نیروی یونی آن نیز می‌شود، موجب بالارفتن مقاومت (R) آن نسبت به محلول بافر می‌گردد. لذا تا زمانی که جریان الکتریکی عبوری از لوله‌ی موئین ثابت باشد، با در نظر گرفتن قانون اهم^۱ می‌توان دریافت که شدت میدان الکتریکی (E) در قاچ نمونه بیشتر از محلول بافر خواهد بود. از آنجاییکه سرعت تحرک مواد بطور مستقیم، تابع شدت میدان الکتریکی می‌باشد، بنابراین یونهای درون قاچ نمونه با سرعت بالاتری مهاجرت می‌کنند. هنگامی که مواد حل‌شده به مرز بین قاچ نمونه و محلول بافر می‌رسند، شدت میدان اعمال شده به آنها کاهش یافته و در نتیجه سرعت حرکت آنها کند می‌شود که متعاقب آن، یونها در مرز بین قاچ نمونه و بافر متراکم شده و غلظتشان افزایش می‌یابد؛ که این فرآیند منجر به بهبود حساسیت آشکارسازی می‌گردد [۳۰۰]. هنگام کاربرد روش تغلیظ توده‌ای تقویت‌شده با میدان الکتریکی (FASI)، تزریق نمونه به داخل ستون به صورت الکتروکینتیکی انجام می‌گیرد و به همین سبب، فرآیند متمرکز شدن و تراکم آنالیتها، در شروع و ابتدای تزریق روی می‌دهد. بنابراین در این روش، هر دو فرآیند مهاجرت الکتروکینتیکی یونهای باردار نمونه و جریان الکترواسموتیک محلول نمونه، در بارگذاری نمونه به داخل ستون مشارکت می‌کنند.

در این مطالعه، قبلاً و با هدف دستیابی به حد تشخیص‌های قابل قبول برای آنالیت‌های هدف، امکان‌سنجی کاربرد تکنیک پیش‌تغلیظ FASI، توسط واجذب کردن آنالیت‌های استخراج‌شده با روش (HF-SLPME) به داخل سیستم حلالی استونیتریل- آب (با نسبت ۱:۱)، که پیش‌تر مورد مطالعه و بهینه‌سازی قرار گرفته شده بود، بررسی شده است (بررسی از نظر ماتریکس نمونه). لیکن در مطالعه‌ی فوق، تهیه و یا واجذب نمونه‌های خروجی استخراج خارج‌ستونی در محیط الکترولیت زمینه^۲ (BGE) یا محلولهای ده بار رقیق شده از بافر اجرایی^۳ (که عمدتاً یکی از ملزومات اصلی روش FASI تلقی می‌شود)،

¹ Ohm's Law

² BGE media (for conventional injection)

³ Diluted run buffer

مقدور نبود؛ چراکه نمونه‌های مستخرج از روش آماده‌سازی خارج‌ستونی (آفلاین) پیشنهادی در این پژوهش، می‌بایستی در حلال واجد بی بهینه شده در مراحل قبل آماده می‌شدند (شکل ۳-۱-۱۲). بنابراین و برای حصول اطمینان مجدد، ناچاراً ترکیب ماتریکس نمونه^۱ دوباره توسط حلال استونیتریل خالص و حلالهای آلی دیگری نظیر متانول و مخلوطهای دوگانه‌ی آنها با درصدهای حجمی - حجمی مختلف در محدوده‌های (۰-۱۰۰ v/v) تطبیق داده شده و بررسی گردید.

لازم به توضیح است که بمنظور اجرای مطلوب و مناسب تکنیک FASI، پارامترهای مختلفی بایستی مد نظر قرار گرفته و بهینه شوند. بنابراین در این بخش از مطالعه، تاثیرات این عوامل مهم مشتمل بر، ترکیب ماتریکس نمونه، زمان تزریق نمونه، ولتاژ تزریق نمونه و حضور یا عدم حضور یک پلاگ (قاچ) با مقاومت بالا از آب خالص^۲ (زمان تزریق قاچ باریکی از آب^۳، قبل از وارد کردن و تزریق نمونه‌ی اصلی به داخل لوله‌ی موئین، مورد بررسی قرار گرفته است. لذا در وهله‌ی نخست، به منظور بررسی مجدد اثر ماتریکس نمونه بر روی عملکرد روش FASI، حلالهایی از قبیل استونیتریل خالص، مخلوطهای دوگانه‌ی استونیتریل - آب با درصدهای حجمی - حجمی مختلف (۲۵:۷۵، ۵۰:۵۰ و ۷۵:۲۵) از استونیتریل - آب دیونیزه (ACN-Water) و مخلوطهای دوگانه از سایر سیستمهای حلالی مانند متانول - آب با درصدهای حجمی - حجمی مختلف (۳۰:۷۰ v/v و ۷۰:۳۰ v/v)، به عنوان ماتریکس نمونه تست شدند؛ درحالیکه مخلوطی از داروهای هدف با غلظت ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر (۱ μg/ml) از هر کدام، تهیه شده و تزریق می‌شد. بررسی نتایج نشان می‌داد هنگامی که آنالیت‌های مورد مطالعه پس از اتمام فرآیند استخراج آفلاین در مخلوطهای دوگانه از متانول - آب تحت شرایط واجد بی قرار می‌گرفتند، پیکهای واضح و خوش‌فرمی (تیز) مشاهده نمی‌شد و آنالیت‌ها قابل تشخیص و جداسازی با درجه‌ی تفکیک مناسب نبودند. در حالیکه، آنالیت‌های دارویی مورد مطالعه، بالاترین سیگنال و ارتفاع پیک، بهترین تکرارپذیری و تفکیک مناسب را در شرایط واجد بی در مخلوط ۵۰:۵۰ v/v آب دیونیزه - استونیتریل (ACN-DIW) نشان دادند. لذا در پی نتایج حاصله، مخلوط یک به یک (۱:۱) استونیتریل + آب دیونیزه، مجدداً به عنوان مناسب‌ترین ترکیب نمونه برای تزریق و افزایش بهبود حساسیت با روش FASI، تایید شد.

عموماً در روشهای تزریق توده‌ای (به عنوان یک راهبرد بهبود حساسیت داخل‌ستونی در روشهای CE)، پیش‌تزریق^۴ یک قاچ (پلاگ) از آب خالص، قبل از وارد کردن نمونه به ستون موئین، می‌تواند شرایط ترپ (دام اندازی) ماندی را فراهم کند که در اثر آن، آنالیت‌ها قبل از جداسازی در الکترولیت زمینه^۵، تجمع می‌شوند و در نتیجه، کارایی و عملکرد روش FASI، بهبود بیشتری می‌یابد [۱۸۶، ۳۰۱].

^۱ Sample composition matrix

^۲ Presence/absence of a high-resistivity plug

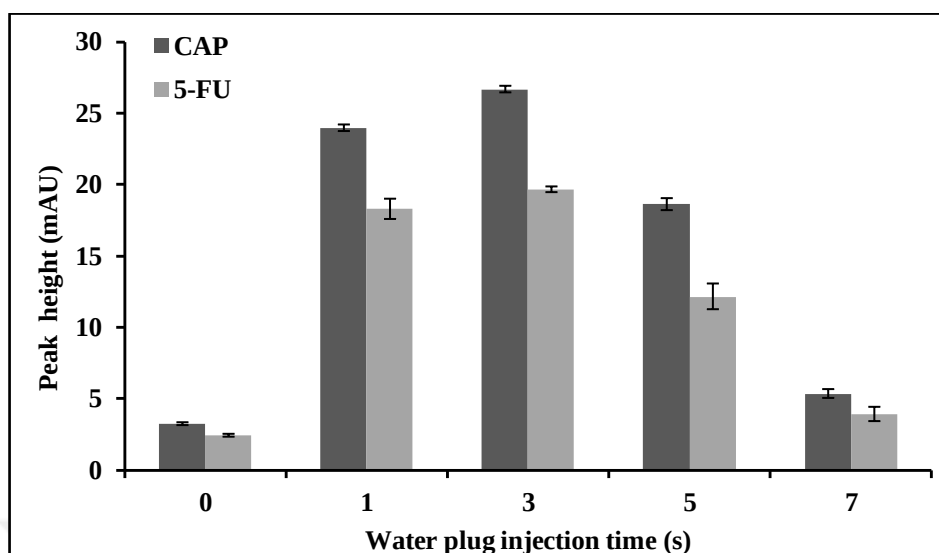
^۳ Water plug injection time

^۴ Pre-injection water plug prior to sample injection

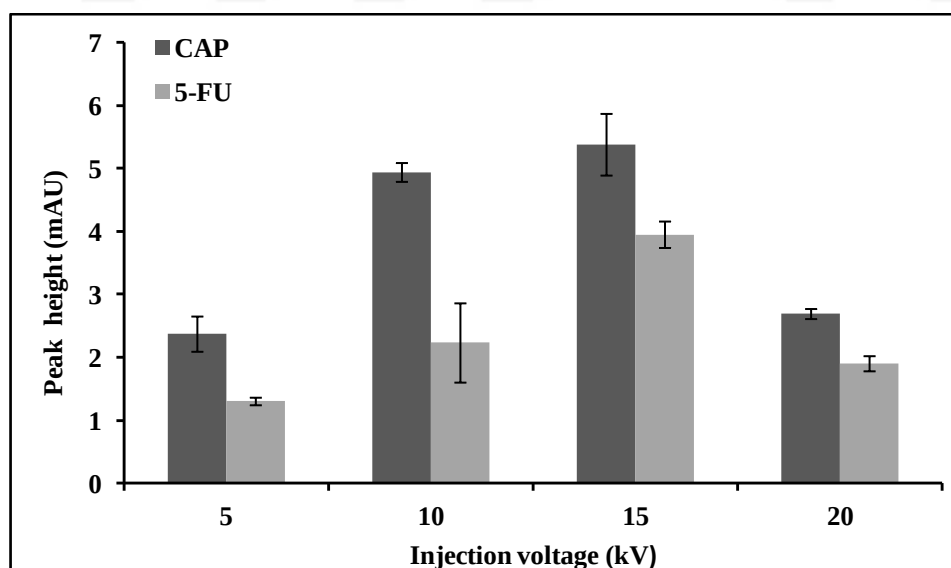
^۵ Prior to being separated in the BGE

[۳۰۲]. لذا در مرحله‌ی بعدی، تاثیر تزریق هیدرودینامیک (فشاری) یک قاچ باریک از آب خالص قبل از تزریق الکتروکننتیکی نمونه به داخل ستون مورد مطالعه قرار گرفت. این بدین معنی است که قبل از تزریق آنالیتها، یک پلاک پیش‌تزریقی از آب با فشار ۵۰ میلی‌بار و برای مدت زمانهای مختلفی از صفر تا ۷ ثانیه، به داخل لوله‌ی موئین بارگذاری شد. نتایج بدست آمده که در شکل ۳-۱-۱۴ نشان داده شده است، تایید می‌نمایند که سطح زیر پیک و ارتفاع پیکها با افزایش زمان پیش‌تزریق آب از صفر به ۳ ثانیه افزایش می‌یابد. تزریقهای فشاری قاچ آب، متجاوز از مدت زمان ۳ ثانیه سبب کاهش و اخلاص در قدرت تفکیک جداسازی آنالیتها و همچنین کاهش در ارتفاع پیکهای مربوط به هر دو آنالیت می‌شود. از این رو، پیش‌تزریق آب خالص به مدت ۳ ثانیه و با فشار ۵۰ میلی‌بار، در مراحل بعدی و قبل از تزریق الکتروکننتیکی نمونه‌ها، اعمال شده است. از طرفی دیگر، تزریق الکتروکننتیکی به دلیل قابلیت آن در پیش‌تغلیظ بهتر آنالیتها [۳۰۳]، برای وارد کردن نمونه‌ها به ابتدای ستون، مورد استفاده قرار گرفته است. لذا تاثیرات پارامترهای دخیل در این نوع تزریق بایستی بهینه شوند. از همین رو، در مرحله‌ی نهایی از بهینه‌سازی شرایط پیش‌تغلیظ آنالین، تاثیرات مربوط به زمانها و ولتاژهای مختلف دخیل در تزریق الکتروکننتیک نمونه‌ها، با اعمال این پارامترها به صورت متغیر و به ترتیب از ۵ تا ۳۰ ثانیه (برای زمان تزریق) و ۵ تا ۲۰ کیلوولت (برای ولتاژ تزریق)، مورد بررسی قرار گرفته است. همانگونه که در نتایج منعکس شده در شکل‌های ۳-۱-۱۵ و ۳-۱-۱۶ به‌وضوح مشاهده می‌شود، با تغییر ولتاژ تزریق الکتروکننتیک تا ۱۵ کیلوولت و افزایش زمان تزریق از ۵ ثانیه به ۲۵ ثانیه، ارتفاع پیکهای مربوط به هر دو دارو افزایش قابل‌ملاحظه‌ای را نشان می‌دهد. لازم به تاکید است که افزایش بیشتر در ولتاژ و زمان تزریق الکتروکننتیکی نمونه‌ها به داخل لوله‌ی موئین، به‌ترتیب منجر به پهن‌شدگی و همپوشانی پیکها (پیک‌های جداسازی نشده)^۱ گردید. لذا با در نظر گرفتن قدرت تفکیک و ارتفاع پیکها و بر مبنای داده‌های بدست آمده از آزمایشات متعدد انجام شده، زمان ۲۵ ثانیه و ولتاژ ۲۵ کیلوولت به ترتیب به عنوان شرایط بهینه‌ی تزریق الکتروکننتیکی نمونه‌ها (آنالیت‌های استخراج شده توسط روش پیش‌تغلیظ خارج-ستونی) انتخاب شدند.

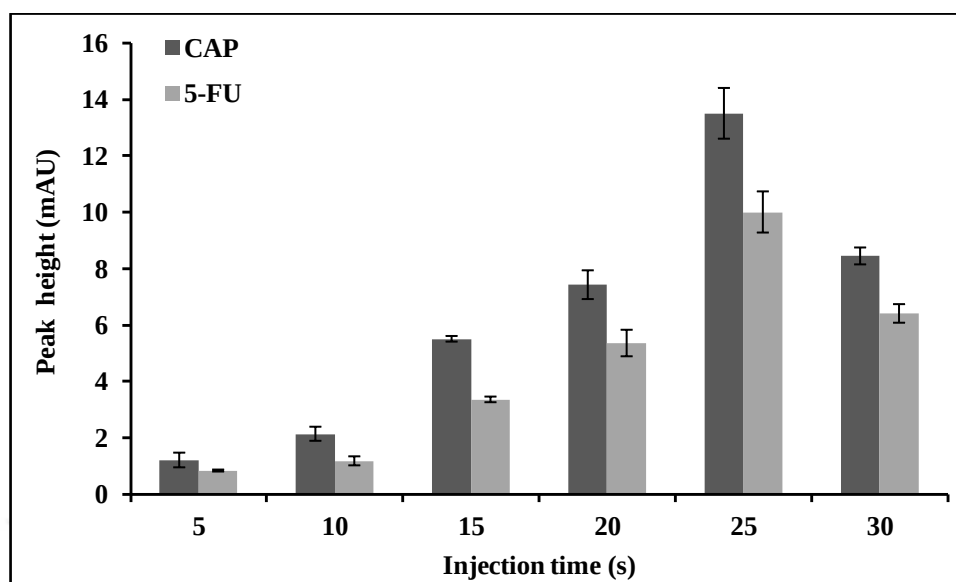
¹ Unresolved peaks



شکل ۳-۱۴- بهینه سازی شرایط و پارامترهای تزریق برای پیش تغلیظ توده ای تقویت شده با میدان الکتریکی (FAEI) برای بهبود حساسیت: "تأثیر زمان پیش تزریق هیدرودینامیک قاج آب خالص قبل از وارد کردن نمونه"، (نشان داده شده بر حسب ارتفاع پیکها یا به عبارتی شدت سیگنال تجزیه ای و پاسخ ردیاب)؛ (شرایط جداسازی: ستون موئین با قطر داخلی ۵۰ میکرومتر (طول کل ۶۰ cm و طول موثر ۴۸/۵ cm)، الکترولیت زمینه: ۶۰mM بافر فسفات-تریس با pH=۷ محتوی ۱۰٪v/v متانول به عنوان اصلاحگر آلی، طول موج آشکارسازی ۲۴۵nm، دمای ستون در حین جداسازی ۲۵±۰/۲ درجه ی سانتی گراد، ولتاژ اعمالی برای جداسازی ۱۸kV، محلول نمونه: مخلوط استخراجی دو داروی کپسیتابین و ۵- فلورو اوراسیل: (غلظت هر آنالیت ۱μg/ml) تزریق شده به ستون با ولتاژ ۱۵ کیلوولت و به مدت ۲۵ ثانیه.



شکل ۳-۱۵- بهینه سازی شرایط و پارامترهای تزریق برای پیش تغلیظ توده ای تقویت شده با میدان الکتریکی (FAEI) برای بهبود حساسیت: "تأثیر ولتاژ تزریق نمونه"، (محلول نمونه: مخلوط استخراجی دو داروی کپسیتابین و ۵- فلورو اوراسیل بعد از استخراج آفلاین: (غلظت هر آنالیت ۲۰۰ ng/mL در محلول ۵۰٪ استونیتریل- آب) تزریق شده به ستون به مدت ۲۵ ثانیه، پس از پیش تزریق هیدرودینامیک یک پلاگ باریک از آب خالص با فشار ۵۰ mbar به مدت ۳ ثانیه، سایر شرایط جداسازی: مشابه شکل ۳-۱۴.



شکل ۳-۱-۱۶- بهینه‌سازی شرایط و پارامترهای تزریق برای پیش‌تغلیظ توده‌ای تقویت‌شده با میدان الکتریکی (FAEI) برای بهبود حساسیت: "تأثیر زمان تزریق نمونه"، (محلول نمونه: مخلوط استخراجی دو داروی کپسیتابین و ۵-فلورواوراسیل بعد از استخراج خارج‌ستونی: (غلظت هر آنالیت ۵۰۰ ng/mL در محلول ۵۰٪ استونیتریل - آب) تزریق شده به ستون با ولتاژ ۱۵ کیلوولت، پس از پیش‌تزریق هیدرودینامیک یک قاچ باریک از آب خالص با فشار ۵۰ mbar به مدت ۳ ثانیه، سایر شرایط جداسازی: مشابه شکل ۳-۱-۱۴.

۳-۱-۵- معبرسازی تجزیه‌ای

روشهای زیست‌تجزیه‌ای^۱ (bio-analytical methods)، عمدتاً برای اندازه‌گیری کمی، آنالیز و تعیین ترکیبات دارویی و متابولیت‌های آنها در پیکره‌های زیستی و بیولوژیکی، مورد استفاده و کاربرد قرار می‌گیرند. لذا پس از توسعه‌ی یک روش زیست‌تجزیه‌ای با خصوصیات مورد نظر و بهینه‌سازی تمامی شرایط تأثیرگذار در آن، روش پیشنهادی بایستی برای حصول اطمینان از اینکه آیا در حین آنالیز نمونه‌های مورد مطالعه، می‌توان به نتایج و داده‌های دقیق، صحیح و تکرارپذیر دست یافت، معبرسازی شود [۳۰۴، ۳۰۵]. در اصل، معبرسازی روشهای تجزیه‌ای، فرآیندی است که ثابت می‌کند یک روش تجزیه‌ای پیشنهادی، حداقل استانداردهای توصیه شده^۲ توسط دستورالعمل‌های بین‌المللی (به عنوان مثال دستورالعمل FDA یا ICH^۳) و یا استانداردهایی فراتر از حداقل مقادیر تعیین‌شده توسط دستورالعملهای مذکور برای پارامترهای تجزیه‌ای مهمی چون خطی بودن^۴، حد تشخیص (LOD)، حد اندازه‌گیری (LOQ)، حد پایین اندازه‌گیری (LLOQ)، حد بالای اندازه‌گیری (ULOQ)، صحت، دقت (تکرارپذیری

^۱ Bio-analytical methods

^۲ Minimum recommended standards

^۳ International Conference on Harmonization

^۴ Linearity

درون روز و بین روز)، درصد بازیابی، انتخابگری (گزینش پذیری)، پایداری و استحکام (سختی) را به صورت موفقیت آمیز برای هر آنالیت و ترکیب مورد مطالعه، کسب خواهد کرد. لذا در این بخش، تکنیک ارائه شده و بهینه سازی شده برای اندازه گیری همزمان داروی کپسیتابین و متابولیت اصلی آن، با توجه به گزاره های FDA و دستورالعمل این سازمان برای آنالیزهای زیست تجزیه ای، معتبرسازی شده است که نتایج حاصل به تفکیک و تفصیل و به انضمام توضیحات مربوطه در قسمتهای بعدی ارائه می گردد.

۳-۱-۵-۱- منحنی کالیبراسیون، خطی بودن و حساسیت

منحنی های کالیبراسیون (استاندارد) با آغشته کردن (spiking) نمونه های پلاسمای عاری از دارو با غلظت های مشخص و مختلفی از هر دو آنالیت (در محدوده $25-2500 \text{ ng/mL}$) و پس از انجام فرآیند ریزاستخراج بهینه شده ی خارج ستونی (مشروح در قسمتهای قبلی) و تزریق تحت شرایط بهینه، ترسیم شدند. شدت سیگنال و ارتفاع پیک ها متناسب با غلظت اسمی^۱ (مشخص شده) آنالیتها در فاز دهنده (محلول نمونه) بودند. خطوط رگرسیون برای تعیین غلظت آنالیتها در نمونه ها مورد استفاده قرار گرفت. در ضمن، برای بررسی خطی بودن روش و محاسبه ی ضرایب همبستگی^۲ (R)، توان دوم ضریب همبستگی (R^2)، عرض از مبدا^۳ (y-intercept)، شیب خط رگرسیون^۴ و مقادیر انحراف استاندارد^۵ آنها (تمامی آزمایشات در هر غلظت، ۳ بار تکرار متوالی شده اند)، از میانگین داده های مربوط به سه منحنی کالیبراسیون مختلف (ترسیم شده در سه روز غیرمتوالی^۶) استفاده شده است. حساسیت روش در اثر تعیین حد تشخیص، حد اندازه گیری و حد بالا و پایین اندازه گیری ارزیابی شده است.

حد تشخیص (LOD) و حد اندازه گیری (LOQ) به صورت پایین ترین (حداقل) غلظتی از آنالیتها که پیک های با نسبت سیگنال به نویز (S/N) به ترتیب برابر سه و ده تولید می کنند، تعیین می گردند. عبارتهای حد اندازه گیری پایین (LLOQ) و حد اندازه گیری بالا (ULOQ) به ترتیب، معادل پایین ترین و بالاترین نقاط (مقادیر) در منحنی کالیبراسیون خطی در نظر گرفته می شوند؛ در حالی که درصد انحراف استاندارد و $CV\%$ برای سه بار تکرار آنها، باید کمتر از ۱۵٪ برای ULOQ و ۲۰٪ برای LLOQ باشد. لازم به توضیح است که نسبت سیگنال (علامت) به نویز با استفاده از سنجش ارتفاع پیک ها نسبت به نویزهای خط زمینه (Baseline) برآورد شده و تخمین زده می شود و در نتیجه مقادیر ارتفاع و شدت کلیه ی پیک ها با در نظر گرفتن ارتفاع پیک آنالیت یا آنالیتها در پایین ترین حد اندازه گیری (LLOQ)، به غلظت تبدیل شده و در گزارشات لحاظ می شوند. ضمناً طبق دستورالعمل FDA، در ارزیابی خطی بودن

¹ Nominal concentration

² Correlation coefficient

³ Intercept

⁴ Slope of the regression line

⁵ Standard errors

⁶ Nonconsecutive Days

⁷ Coefficient of variation

روش، درصدهای بازیابی غلظتهای محاسبه شدهی آنالیتها از غلظتهای اسمی (غلظت مشخص شده) صرفاً در محدودهی ۸۵-۱۱۵٪ مورد قبول و تایید می‌باشد [۲۲۸]. همچنین، در بخشی از دستورالعمل معتبرسازی روشهای زیست‌تجزیه‌ای، تاکید شده است که اولین نقطه‌ی غلظتی استاندارد منحنی کالیبراسیون که قابل تعیین با یک عدم قطعیت مناسب باشد معمولاً به عنوان حد اندازه‌گیری پایین در نظر گرفته خواهد شد [۳۰۶]. بر همین اساس، محدوده‌ی غلظتی بین LLOQ و ULOQ به عنوان محدوده‌ی معتبر (گستره‌ی خطی) برای اندازه‌گیری تعریف می‌شود. همانطوری که قبلاً اشاره شده است، خطی‌بودن روش در محدوده‌ی غلظتی ۲۵-۲۵۰۰ ng/mL مورد ارزیابی قرار گرفته است. با عنایت به اینکه، محدوده‌ی مورد نظر به اندازه‌ی کافی برای مطالعات بالینی گستره بود، غلظتهای بالاتر تست نشده است. نتایج حاصل از معتبرسازی ویژگی‌های کمی روش برای هر دو آنالیت، اطلاعات و داده‌های مربوط به میانگین معادلات رگرسیون (میانگین معادلات مربوط به منحنیهای کالیبراسیون ترسیم شده در سه روز غیرمتوالی)، ضرایب همبستگی آنها و سایر پارامترهای مربوط به حساسیت روش از جمله حد تشخیص، حد اندازه‌گیری و غیره در جدول ۳-۱-۲ ارائه شده است. همانطوری که ملاحظه می‌شود، روش ارائه شده در محدوده‌ی غلظتی ۲۵ تا ۱۰۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر با ضرایب همبستگی در حدود ۰/۹۹۹ برای هر دو آنالیت خطی بود ($n=3$). پایین‌ترین غلظت قابل اندازه‌گیری (حد اندازه‌گیری) با روش معتبرسازی شده برای هر یک از آنالیتها به ترتیب ۱۷ نانوگرم بر میلی‌لیتر برای کپسیتابین و ۲۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر برای ۵-FU به دست آمد. حد تشخیص در مورد هر دو آنالیت با استفاده از شیب خطوط کالیبراسیون (a) و انحراف معیار جمله‌ی مستقل خطی رگرسیون (S_b) و با توجه به رابطه‌ی آورده شده در زیر جدول محاسبه و گزارش شده است.

جدول ۳-۱-۲- داده‌های آزمون معتبرسازی روش پیشنهادی برای اندازه‌گیری کمی CAP و ۵-FU در نمونه پلاسمای انسان (خصوصیات کمی روش).

ترکیب	شیب	انحراف استاندارد شیب ($n=3$)	عرض از مبدا	انحراف استاندارد عرض از مبدا ($n=3$)	مقدار R^2 ^a	محدوده‌ی خطی (ng mL ⁻¹)	حد تشخیص (LOD) ^b	حد اندازه‌گیری (LOQ) ^c	حد پایین اندازه‌گیری (LLOQ) ^c
CAP	۰/۰۲۶	۰/۰۰۱	۰/۹۱۴	۰/۰۲۵	۰/۹۹۹	۲۵-۱۰۰۰	۶/۴	۱۷	۲۵
۵-FU	۰/۰۲	۰/۰۰۱	۰/۰۳۵	۰/۰۲۲	۰/۹۹۹	۲۵-۱۰۰۰	۹/۳	۲۵	۲۵

^a توان دوم ضریب همبستگی

^b $LOD = 3 \times (S_b/a)$ ، S_b خطای استاندارد عرض از مبدا و a شیب منحنی کالیبراسیون می‌باشند.

^c تمامی غلظت‌ها بر اساس ng mL⁻¹ گزارش شده‌اند.

۳-۱-۵-۲- تکرارپذیری (دقت)، صحت و درصد بازیابی

دقت یک روش تجزیه‌ای به صورت درصد ضریب تغییر (CV%) و همچنین به صورت میانگین درصد انحراف استاندارد نسبی (RSD%) درون‌روز (Intra-day) و بین‌روزهای مختلف (Inter-day) گزارش می‌-

شود. درحالی که صحت یک روش زیست تجزیه‌ای، معمولاً به صورت تفاوت (اختلاف) بین غلظت اندازه-گیری شده (غلظت مشاهده شده)^۱ یا بدست آمده توسط روش (و غلظت واقعی)^۲ (اسمی) تعریف می‌گردد [۳۰۷]. در این مطالعه، دقت و صحت روش با انجام آزمایشات تکرارپذیری درون‌روز (n=۵) و بین‌روز (n=۵)، از طریق آنالیز نمونه‌های QC (اندازه‌گیری و آنالیز نمونه‌های پلاسمای آغشته شده به داروهای هدف) تحت شرایط بهینه و در سه سطح غلظتی (پایین، متوسط و زیاد)^۳ برای هر دو آنالیت مورد ارزیابی قرار گرفته و به ترتیب برحسب درصد انحرافات استاندارد نسبی (RSD%) برای مطالعات مربوط به تکرارپذیری (دقت) و مقادیر بدست‌آمده در درصد خطاهای نسبی^۴ (RE%) برای مطالعات مربوط به صحت، تخمین زده و گزارش شده‌اند. شایان ذکر است که به موجب دستورالعمل FDA در آنالیزهای زیست تجزیه‌ای، مقادیر درصد انحراف استاندارد نسبی (RSD%) کمتر از ۲۰٪ برای LLOQ و کمتر از ۱۵٪ برای سایر سطوح غلظتی تست شده (میانگین و بالا)، قابل قبول و معتبر می‌باشد [۲۸۱، ۳۰۸]. صحت روش پیشنهادی با محاسبه‌ی درصد خطاهای نسبی و با استفاده از رابطه‌ی زیر، مورد ارزیابی قرار گرفته است:

$$RE (\%) = 100 \times \frac{\text{Found value} - \text{Nominal value}}{\text{Nominal value}} \quad \text{معادله‌ی (۱-۳)}$$

نتایج خلاصه شده در جدول ۳-۱-۳ نشان می‌دهند که درصد انحرافات استاندارد نسبی بدست آمده برای تکرارپذیری درون‌روز و بین‌روز (ارائه شده بر حسب RSD%) مربوط به غلظت‌های مختلف ارزیابی شده به ترتیب در سه سطح پایین، متوسط و بالا (۲۵،۵۰۰ و ۱۰۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر) مابین مقادیر ۱/۳ و ۱۳/۳ درصد متغیر می‌باشد؛ درحالی که مقادیر خطاهای نسبی (RE%) در محدوده‌ی ۸- تا ۷/۵+ درصد محاسبه شده است. لذا با توجه به نتایج حاصل و با عنایت به گزاره‌های FDA، می‌توان دریافت که مقادیر محاسبه شده در گستره‌های قابل قبول و معتبری از منظر دستورالعمل‌های بین المللی بوده و بنابراین روش پیشنهادی از دقت و صحت کافی برخوردار است. همچنین، به منظور بررسی صحت روش پیش‌تغلیظ و پاکسازی خارج‌ستونی پیشنهادی، محاسبات مربوط به درصدهای بازیابی انجام شده است. لذا به منظور ارزیابی بازیابی روش، نمونه‌های پلاسمای انسانی با سه سطح غلظتی مختلف از داروی کپسیتابین و متابولیت اصلی آن ۵-FU آغشته شدند و این نمونه‌های QC، به ترتیب مطابق روشهای استخراج خارج‌ستونی، پیش‌تغلیظ داخل‌ستونی و متعاقب آن تحت شرایط الکتروفورتیکی بهینه شده (مشروح در قسمتهای قبلی، AgNPs@MCM41-HF-SLPME-FASI-CE-UV) آنالیز شدند.

¹ Observed (measured) concentration

² Actual (nominal) concentration

³ Low, medium and high

⁴ Relative error

لازم به توضیح است که، بازیابی یک روش آماده‌سازی نمونه، به صورت درصد نسبتِ مقادیر اندازه‌گیری شده از آنالیت یا آنالیت‌ها در پیکره‌ی مورد نظر، به مقدار واقعی و نظری^۱ متصور در آن پیکره، تعریف می‌شود. همچنین بازیابی نسبی^۲ (RR%) روش، به صورت درصد نسبت غلظت‌های اندازه‌گیری شده بر غلظت‌های اسمی (آغشته‌شده) آنالیت تعریف می‌گردد. در مطالعه‌ی حاضر، این پارامتر برای هر دو آنالیت مورد نظر پس از انجام مراحل بهینه‌ی آماده‌سازی نمونه و اجرای آنالیز، با استفاده از رابطه‌ی زیر محاسبه شده است (جدول ۳-۱-۴).

$$\text{RR (\%)} = 100 \times \frac{\text{Measured value}}{\text{Nominal value}} \quad \text{معادله‌ی (۳-۲)}$$

همان‌طوری که در نتایج مندرج در جدول ۳-۱-۴ ملاحظه می‌شود، مقادیر درصد‌های بازیابی نسبی محاسبه شده (RR%)، در محدوده‌ی ۹۲ تا ۱۱۲٪ می‌باشند؛ که نمایانگر شایستگی و مناسب بودن روش پیش‌تغلیظ خارج‌ستونی پیشنهادی برای آنالیز و اندازه‌گیری ترکیبات دارویی هدف این مطالعه، در نمونه‌های بیولوژیکی (پلاسما) است.

جدول ۳-۱-۳- دقت و صحت روش برای اندازه‌گیری داروهای تحت مطالعه در نمونه‌های پلاسمای انسان.

آنالیت	غلظت آغشته‌شده (اسمی) (ng mL ⁻¹)	دقت درون روز RSD%; n = ۵ ^a	صحت (RE %)	دقت بین روز RSD%; n = ۵ ^b	صحت ^c (RE %)
کپسیتابین	۲۵	۱۲/۷	۴/۴	۱۱	-۸
	۵۰۰	۲/۳	-۰/۸۴	۱۳/۳	-۳/۶
	۱۰۰۰	۴/۸	۱/۳	۹/۴	-۶/۴
۵-FU	۲۵	۸/۷	۷/۵	۱۳	-۴
	۵۰۰	۱/۳	۰	۲/۷	-۷/۴
	۱۰۰۰	۵/۱	۳/۶	۵/۱	-۰/۳

^a تعداد تکرار

^b تعداد روزها

^c RE% = ۱۰۰ × ((مقدار بدست‌آمده) - مقدار اسمی) / مقدار اسمی

¹ Theoretical amount

² Relative recoveries (RR%)

جدول ۳-۴- درصدهای بازیابی نسبی بدست آمده با روش پیشنهادی (HF-SLPME-FASI-CE-UV) در نمونه های پلاسمای آغشته شده با غلظتهای ۲۵، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ نانوگرم بر میلی لیتر از هر دو آنالیت.

آنالیت	غلظت آغشته شده (اسمی) (ng mL ⁻¹ ; n=۵)	غلظت اندازه گیری شده (ng mL ⁻¹) ± SD ^a (n =۵)	درصد بازیابی نسبی (RR %) ± SD
کپسیتابین	۲۵	۲۳±۵	۹۲±۸
	۵۰۰	۴۹۸±۴۵	۱۰۰±۹
	۱۰۰۰	۹۵۶±۳۹	۹۶±۴
۵-FU	۲۵	۲۸± (<۰/۵)	۱۱۲± (<۰/۵)
	۵۰۰	۵۱۰±۲	۱۰۲±۱
	۱۰۰۰	۱۰۸۷±۱۰	۱۰۹±۶

^a انحراف استاندارد برای ۵ بار اندازه گیری

۳-۵-۱-۳- اختصاصی بودن و انتخابگری روش (Selectivity & Specificity)

یک روش زیست تجزیه ای کارآمد و مفید، بایستی توانایی تمایز، تفکیک و تشخیص دقیق آنالیت های مورد نظر از سایر عوامل مزاحم و تداخلات برونزا^۱ (عوامل مزاحم بیرونی مانند محصولات ناشی از تخریب آنالیتها) و همچنین ترکیبات جانبی درونی^۲ (موجود در پیکره ی نمونه که ممکن است تحت شرایط اجرایی روش، از ماتریکسهای بیولوژیکی مشتق شوند)، را به نحو مطلوبی میسر سازد [۲۷۰، ۳۰۹].

لذا در مطالعه ی حاضر، انتخابگری این روش توسعه یافته، به منظور بررسی وجود یا عدم وجود عوامل تداخل کننده ی بالقوه و یا احتمالی، توسط آنالیز نمونه های پلاسمای آغشته شده با برخی از داروها و ترکیبات کمک درمانی^۳ و همچنین برخی دیگر از داروهای انجام شده است (در غلظتهای ۵۰۰ نانوگرم بر میلی لیتر از هر ترکیب دارویی)؛ که گاهاً همراه با داروی کپسیتابین و به منظور اهداف درمانی دیگری غیر از مشکلات مربوط به سرطانهای دستگاه گوارشی و یا بعضاً با هدف کاهش عوارض جانبی شیمی-درمانی با داروی مذکور، به بیماران مبتلا به سرطانهای دستگاه گوارشی که مصرف کننده ی داروی کپسیتابین هستند، تجویز می گردد. داروهای تست شده ی مذکور برای مطالعات انتخابگری روش عبارتند از: آسپیرین^۴ (استیل سالیسیلیک اسید^۵)، پروپرانولول، وراپامیل، امپرازول^۶، متوکلوپرامید^۷، رانیتیدین^۸،

¹ Exogenous interferences

² Endogenous compounds

³ Co-administered drugs

⁴ Aspirin

⁵ Acetylsalicylic acid

⁶ Omeprazol

⁷ Metoclopramid

⁸ Ranitidine

استامینوفن^۱، اُگرازپام^۲، فلوکستین و دیکلوفناک^۳. پاسخ تجزیه‌ای آنالیت‌های مورد نظر این مطالعه (کپسیتابین و ۵-FU) در غلظت مربوط به حد پایین اندازه‌گیری (LLOQ) با پاسخ تجزیه‌ای (سیگنال) نمونه‌های پلاسمای آغشته شده با سایر داروهای مذکور در غلظت ۵۰۰ ng/mL مقایسه شده‌اند؛ و در زمانهای مهاجرت آنالیت‌های هدف، هیچ پیک تداخلی و مزاحم و یا همپوشانی پیک‌های مربوط به داروهای فوق با پیک‌های مربوط به کپسیتابین و ۵-FU مشاهده نگردید.

همچنین اختصاصی بودن روش (specificity)، با استفاده از نمونه‌های پلاسمای عاری از دارو (شاهد) مربوط به ۶ نفر از افراد سالم (داوطلبین سالم خون‌دهنده در سازمان انتقال خون) و در عین حال مخلوط پلاسمایی هر ۶ نفر، پس از انجام مراحل آماده‌سازی، استخراج و آنالیز، و مطابق پروتکل‌های مشروح در قسمت‌های قبل، مورد تحقیق و بررسی قرار گرفته است؛ که بررسی نتایج، موید عدم مزاحمت یا تداخل عوامل درونی احتمالی و یا اجزای^۴ مربوط به نمونه‌های پلاسمای شاهد (عاری از آنالیت) با پیک‌های مربوط به آنالیت‌های هدف بود (هیچ پیک شاخصی در نمونه‌های پلاسمای شاهد، مشاهده نگردید). شکل ۱-۳-۱۷ به ترتیب، نتایج جداسازی‌های الکتروفورتیکی مربوط به مخلوط نمونه‌های پلاسمای شاهد (عاری از آنالیت‌ها) پس از انجام استخراج در شرایط بهینه (شکل ۱-۳-۱۷-الف)، یک نمونه‌ی پلاسمای آغشته شده با داروهای مورد نظر در غلظت ۲۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر از هر دارو (شکل ۱-۳-۱۷-ب) و یک نمونه‌ی پلاسمای جداسازی شده از خون یک فرد بیمار (بیمار با کُد A) پس از مصرف خوراکی داروی کپسیتابین (محصول شرکت داروسازی Roche سوئیس، با دوز ۱۰۰۰ mg/m²) را تحت شرایط بهینه‌ی روش نشان می‌دهد.

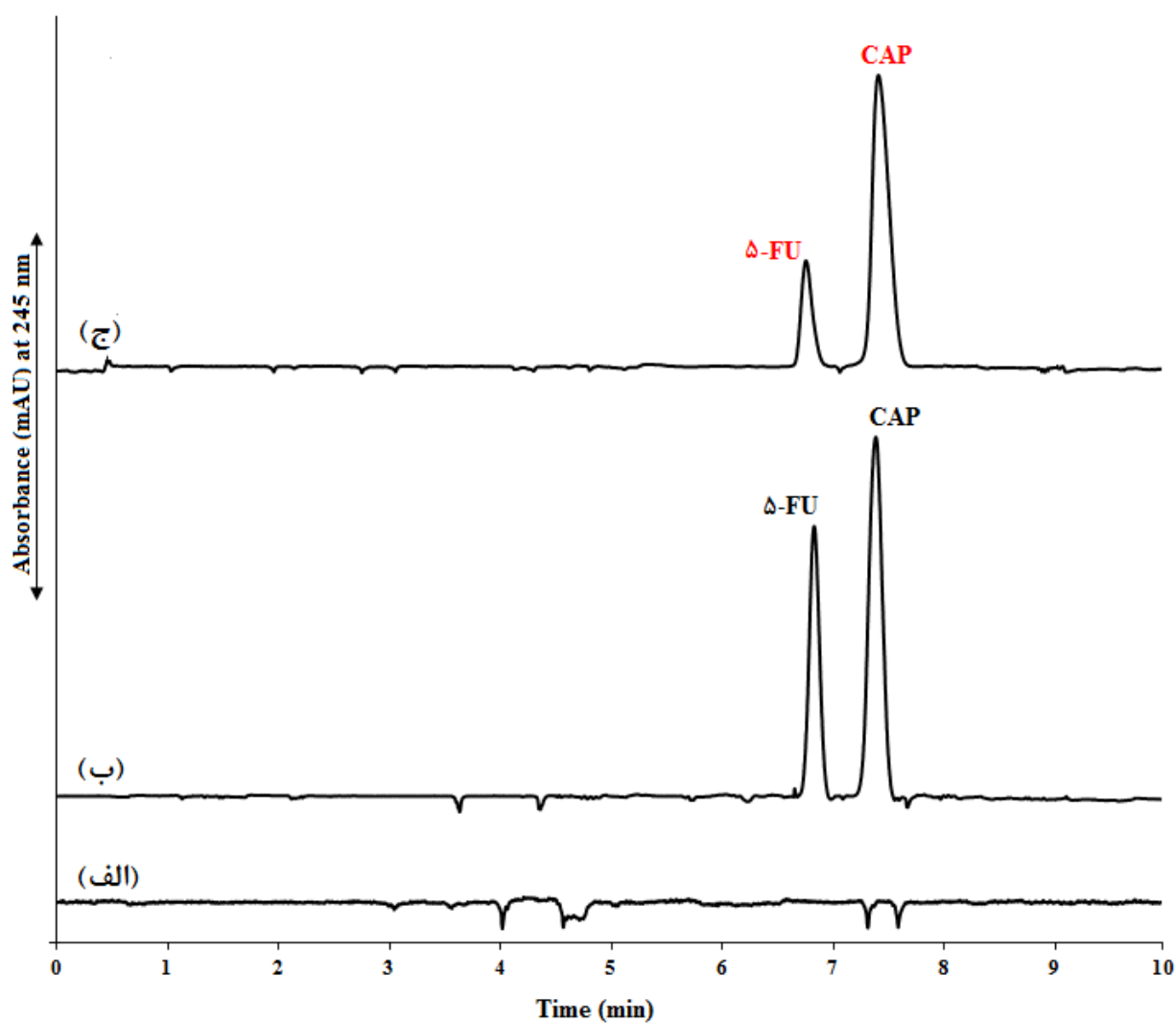
همانطوری که ملاحظه می‌شود، زمانهای مهاجرت تقریبی ۵-FU و CAP به ترتیب ۶/۶ و ۷/۴ دقیقه تخمین زده می‌شود. همچنین، در طول موج ۲۴۵ nm، نمونه‌ی پلاسمای عاری از دارو، هیچ پیک قابل-توجهی مربوط به عوامل مزاحم و متداخل احتمالی را در زمانهای مهاجرت مربوط به آنالیت‌های هدف نشان نمی‌دهند. نتایج حاصل از جداسازی به همراه الکتروفروگرام‌های ثبت شده، حاکی از این هستند که روش آماده‌سازی و پیش‌تیمار بهینه شده‌ی پیشنهادی در این مطالعه، توانایی و قابلیت حذف و زدودن بسیاری از اجزای غیرهدف پیکره‌ی بیولوژیکی را دارا می‌باشد. در عین حال، نتایج حاصل تایید می‌نمایند که اختصاصی بودن و انتخابگری روش ارائه شده برای اندازه‌گیری و آنالیز داروی‌های تحت مطالعه در ماتریکس پلاسمای، در سطح قابل قبولی از نظر دستورالعمل‌های مربوط به آنالیزهای زیست-تجزیه‌ای ترکیبات دارویی، می‌باشند.

¹ Acetaminophen

² Oxazepam

³ Diclofenac

⁴ Components



شکل ۳-۱-۱۷- الکتروفروگرام‌های نوعی^۱ حاصل از آنالیز FASI-CE: (الف) پلاسمای انسانی شاهد (عاری از دارو)؛ (ب) پلاسمای انسانی آغشته شده با غلظت ۲۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر از کپسیتابین (CAP) و Δ-FU؛ (ج) نمونه پلاسمای به دست آمده ۱۸۰ دقیقه پس از مصرف خوراکی کپسول کپسیتابین (با برند زلودا) با دوز ۱۰۰۰ میلی‌گرمی توسط یکی از بیماران (با کد A که فقط تحت درمان با داروی کپسیتابین قرار داشت). شرایط الکتروفورتیکی و استخراجی در بخشهای ۲-۳-۱ و ۲-۶-۱-۱ به تفصیل ارائه شده است.

^۱ Typical electropherograms

۳-۱-۵-۴- مطالعات پایداری داروهای هدف

پایداری آنالیت‌های دارویی در حین نمونه‌برداری، پردازش، تیمار و نگهداری (ذخیره‌ی نمونه‌های بیولوژیکی) در مطالعات مربوط به شیمی‌بالینی، به منظور تفسیر صحیح و دقیق نتایج غلظتی داروها در نمونه‌های کلینیکال، موضوعی اساسی و بسیار حائز اهمیت است [۳۱۰]. از آنجایی که معمولاً آنالیزهای تجزیه‌ای بلافاصله و مستقیماً پس از جمع‌آوری نمونه‌های بیولوژیکی انجام نمی‌گیرد؛ بلکه این فرآیند مستلزم نمونه‌گیری، پردازش، تیمار، ذخیره و نگهداری نمونه‌های مذکور می‌باشد؛ از اینرو پایداری آنالیت‌های دارویی تحت مطالعه، بایستی در شرایط ذخیره‌سازی و نگهداری (انجماد) آنها حفظ و بررسی گردد؛ تا اطمینان حاصل گردد که نتایج غلظتی حاصل از آنالیز، تا حد زیاد و قابل قبولی منعکس کننده‌ی مقادیر غلظتی واقعی آنالیت‌ها بلافاصله بعد از نمونه‌گیری در ماتریکس‌های بیولوژیکی‌شان می‌باشد. به همین دلیل، ارزیابی پایداری آنالیت‌ها مطابق با دستورالعمل‌های مورد تایید FDA، همواره بخش مهمی از مطالعات معتبرسازی روش‌های زیست تجزیه‌ای را شامل می‌شود [۳۱۱]. لذا در این مطالعه، به منظور بررسی پایداری داروهای تحت مطالعه در پیکره‌ی پلاسما، آنالیزهای مربوط به پایداری آنها در دو حالت (ورژن) پایداری کوتاه مدت^۱ و پایداری انجماد-ذوب^۲، مورد ارزیابی و بررسی قرار گرفته است. لازم به توضیح است که در روش مطالعه‌ی پایداری کوتاه مدت، آنالیزهای مربوطه در مورد نمونه‌های پلاسمای انسانی و در سه سطح غلظتی (پایین، متوسط و بالا)، پس از آغشته‌سازی با داروهای هدف در غلظت‌های یاد شده، انجماد آنها به مدت ۲۴ ساعت و سپس خارج کردن از حالت انجماد در شرایط نرمال (با قرار دادن به مدت ۱۲ ساعت در دمای اتاق: دمای 25 ± 2 درجه‌ی سانتی‌گراد)، انجام شده است. همچنین به منظور ارزیابی و سنجش پایداری ترکیبات مورد مطالعه در شرایط مربوط به مطالعات پایداری انجماد-ذوب، مجموعه‌ای (یک ست) از نمونه‌های محتوی سه سطح غلظتی از داروهای هدف در پلاسمای انسانی تهیه شده و منجمد شده‌اند. بعد از انجماد کامل به مدت ۱۲ ساعت، نمونه‌ها در دمای یخ‌زدایی شده و پس از ذوب شدن کامل، مجدداً بدون هیچ‌گونه فرآیند آنالیزی و دستکاری جانبی به مدت ۲۴ ساعت تحت شرایط انجماد قرار گرفته‌اند. این فرآیند به صورت چرخه‌ای، دوبار دیگر نیز تکرار شده است؛ و در مجموع سه چرخه‌ی انجماد-ذوب^۳ (سه بار منجمد کردن و مجدداً ذوب کردن در شرایط دمایی ۲۰- تا ۲۵+ درجه‌ی سانتی‌گراد) بر روی نمونه‌های مذکور انجام شده است. نهایتاً نمونه‌های پلاسما پس از سومین بار یخ‌زدایی در دمای اتاق، مطابق روش بهینه شده آنالیز شده و مقادیر داروهای هدف در آنها اندازه‌گیری شده است. نتایج حاصل با نتایج بدست آمده از قبل (بدون انجام فرآیندهای انجماد-ذوب) مقایسه شده‌اند. داده‌های بدست آمده از بررسی مطالعات پایداری، در جدول ۳-۱-۵ منعکس شده‌اند. همانطوری که ملاحظه می‌شود و با توجه به مستندات توصیه شده‌ی FDA، ناپایداری قابل توجهی در

¹ Short-term temperature stability

² Freeze-thaw stability

³ Three freeze-thaw cycles

مورد نمونه‌های تحت مطالعه در شرایط مختلف نگهداری مشاهده نمی‌شود؛ که نشان دهنده‌ی پایداری مطلوب شرایط آنالیز و معتبر بودن روش تجزیه‌ای ارائه شده از منظر بازخورد بررسی‌های پایداری می‌باشد.

جدول ۳-۱-۵- ارزیابی پایداری روش پیشنهادی برای استخراج و اندازه‌گیری همزمان CAP و ۵-FU در نمونه‌های کنترل کیفی (QC) پلاسمای انسان.

پایداری دمای اتاق				پایداری در شرایط انجماد-ذوب			
آنالیت	غلظت آغشته شده (اسمی) (ng mL ⁻¹ ; n = ۳)	میانگین غلظت اندازه‌گیری شده (ng mL ⁻¹) ± SD	صحت (RE %)	SD ± درصدبازایی	میانگین غلظت اندازه‌گیری شده (ng mL ⁻¹) ± SD	صحت (RE %)	SD ± درصدبازایی
CAP	۲۵	۲۷ ± (<۱)	۸/۰	۱۰۸ ± ۶	۲۹ ± ۲	۱۶/۰	۱۱۶ ± ۳
	۵۰۰	۵۰۶ ± ۵	۱/۲	۱۰۱ ± ۳	۴۹۷ ± ۱۰	-۰/۶	۹۹ ± ۶
	۱۰۰۰	۹۸۱ ± ۳۹	-۱/۹	۹۸ ± ۲	۱۰۲۶ ± ۱۶	۲/۶	۱۰۳ ± ۱
۵-FU	۲۵	۲۶ ± ۲	۴/۰	۱۰۴ ± ۱	۲۵ ± (<۱)	۰	۱۰۰ ± ۴
	۵۰۰	۵۲۳ ± ۱۸	۴/۶	۱۰۵ ± ۱	۵۳۰ ± ۲۱	۶/۰	۱۰۶ ± ۵
	۱۰۰۰	۱۰۱۸ ± ۲۶	۱/۸	۱۰۲ ± ۴	۹۸۴ ± ۳۳	-۱/۶	۹۸ ± ۷

۳-۱-۵-۵- مطالعات سختی و استحکام روش (Robustness)

تغییرات جزئی در پارامترهای تاثیرگذار و مهم یک فرآیند تجزیه‌ای، می‌تواند نتایج آن آنالیز را تحت تاثیر قرار دهد و بنابراین می‌بایستی لزوماً از طریق تست و بررسی استحکام و سختی (Robustness)، در اثنای معتبرسازی روش، مورد بررسی و ارزیابی قرار گیرد. در حالت کلی، استحکام یک روش تجزیه‌ای در قالب سنجش ظرفیت و قابلیت تغییرناپذیری آن روش در برابر تغییرات اعمالی جزئی؛ اما تعمدی در شرایط و پارامترهای تاثیرگذار روش مذکور، تعریف می‌شود [۳۱۲]. بر همین اساس در این مطالعه، اثرات مربوط به برخی از تغییرات تعمدی زیر در پارامترهای مربوط به شرایط جداسازی و استخراج روش، مورد بررسی قرار گرفته و تعیین شده‌اند: تغییرات جزئی در pH محلول نمونه (فاز دهنده، ۵/۰ ± واحد pH)؛ تغییرات در غلظت الکترولیت زمینه (۲ ± میلی مولار)؛ تغییرات ملایم در pH الکترولیت زمینه (۱/۰ ± واحد pH)؛ تغییرات در ولتاژ جداسازی به صورت (۱۸/۵ و ۱۷/۵ kV)؛ تغییرات تعمدی در دمای ستون و جداسازی به صورت (۲۵/۵ و ۲۴/۵ °C) و در نهایت تغییرات در حجم حلال استخراج‌کننده و همچنین غلظت نانوکامپوزیت جامد (به صورت پخش شده در فاز پذیرنده)، به ترتیب: هر کدام به اندازه‌ی نیم میکرولیتر و ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر.

تحت شرایط تغییر یافته‌ی مذکور، نمونه های پلاسما (QC) با دو داروی CAP/۵-FU در غلظتهای ۵۰۰ نانوگرم بر میلی لیتر (غلظت حد متوسط اندازه گیری) از هر دارو آغشته شده و تحت شرایط بهینه سازی شده‌ی روش توسعه یافته در این مطالعه (HF-SLPME-FASI-CE-UV)، در معرض آنالیز قرار گرفتند. نتایج بدست آمده که در جدول ۳-۱-۶ خلاصه شده است، نشان می دهند که درصد های بازیابی نسبی در محدوده‌ی مابین ۸۷ تا ۱۰۵٪ متغیر می باشند و در عین حال این نتایج، تایید می نمایند که تغییرات ناچیز اعمال شده در شرایط آزمایشی روش، تاثیرات قابل توجهی بر روی داده های آنالیز و کارایی استخراج خارج ستونی پیشنهادی نداشته، و بنابراین مؤید برخورداری روش پیشنهادی از استحکام کافی و منطقی و در نتیجه معتبر بودن آن می باشد.

جدول ۳-۱-۶- نتایج ارزیابی استحکام (سختی روش) برای هر دو آنالیت هدف در شش سطح^a مختلف از تغییرات تعدی اعمالی در شرایط جداسازی و استخراج روش (تغییرات اعمالی هر سطح، در ذیل جدول قابل مشاهده است).

آنالیت	سطح تغییر ^a	غلظت آغشته شده (اسمی) (ng mL ⁻¹ ; n = ۳)	میانگین غلظت اندازه گیری شده (ng mL ⁻¹) ± SD	صحت (RE %)	SD ± درصد بازیابی
CAP	۱	۵۰۰	۵۰۹±۱۰	۱/۸	۱۰۲±۱
	۲	۵۰۰	۵۱۰±۱	۲/۰	۱۰۲±(<۰/۵)
	۳	۵۰۰	۵۲۷±۹	۵/۴	۱۰۵±۲
	۴	۵۰۰	۴۸۸±۷	-۲/۴	۹۸±۶
	۵	۵۰۰	۵۱۲±۳۳	۲/۴	۱۰۲±۴
	۶	۵۰۰	۵۰۸±۱۲	۱/۶	۱۰۲±۵
۵-FU	۱	۵۰۰	۵۰۶±۲۳	۱/۲	۱۰۱±۳
	۲	۵۰۰	۴۹۷±۴	-۰/۶	۹۹±۶
	۳	۵۰۰	۵۱۸±۵۹	۳/۶	۱۰۴±۱
	۴	۵۰۰	۴۳۶±۳۱	-۱۲/۸	۸۷±۲
	۵	۵۰۰	۴۸۹±۲۲	-۲/۲	۹۸±۱
	۶	۵۰۰	۴۶۵±۱۴	-۷/۰	۹۳±۷

^a سطح ۱: pH=۶/۹ بافر، غلظت بافر برابر ۵۸mM و pH=۱۰/۵ فازدهنده؛ سطح ۲: (pH=۷ بافر، غلظت بافر برابر ۶۰mM و pH=۱۱ فازدهنده)
سطح ۳: (pH=۷/۱ بافر، غلظت بافر برابر ۶۲mM و pH=۱۱/۵ فازدهنده)؛ سطح ۴: (ولتاژ اعمالی: ۱۷/۵kV، دما: ۲۴/۵°C، حجم: ۱- اکتانول: ۷/۵μL و غلظت Ag@MCM-41 درحلال آلی برابر ۴/۵ mg mL⁻¹)؛ سطح ۵: (ولتاژ اعمالی: ۱۸kV، دما: ۲۵°C، حجم: ۱- اکتانول: ۸μL و غلظت Ag@MCM-41 درحلال آلی برابر ۵ mg mL⁻¹)؛ سطح ۶: (ولتاژ اعمالی: ۱۸/۵kV، دما: ۲۵/۵°C، حجم: ۱- اکتانول: ۸/۵μL و غلظت Ag@MCM-41 درحلال آلی برابر ۵/۵ mg mL⁻¹).

۳-۱-۶- کاربرد روش ارائه شده و معتبرسازی شده در نمونه‌های حقیقی و بالینی

با هدف آشکارساختن قابلیت کاربرد فرآیندهای استخراج، پیش‌تغلیظ و روش FASI-CE توسعه داده شده در این مطالعه، برای آنالیز و اندازه‌گیری همزمان داروی کپسیتابین همراه با متابولیت اصلی آن (FU-۵) در نمونه‌های حقیقی، روش معتبرسازی شده‌ی حاضر (کل پروسه‌ی تجزیه‌ای مشروح)، برای آنالیز نمونه‌های کلینیکی کسب شده از ده بیمار مبتلا به سرطانهای دستگاه گوارشی (تعدادی از بیماران مبتلا به سرطان روده‌ی بزرگ و بخشی دیگر مبتلا به سرطان معده و رکتوم بودند و در محدوده‌ی سنی ۲۹ تا ۷۵ سال قرار داشتند)، که تحت شیمی‌درمانی با داروی کپسیتابین قرار داشتند، مورد استفاده قرار گرفته است. همانطوری که قبلاً تأکید شده است، کلیه‌ی مراحل این بخش از مطالعه مطابق با اصول عهدنامه‌ی هلسینکی انجام شده و تمامی بیماران داوطلب شرکت‌کننده، رضایت‌نامه‌ی مورد تأیید کمیته‌ی اخلاقی مرکز تحقیقات گوارش و کبد ایران را امضاء نموده‌اند. به عنوان مثال، بیمار داوطلب شماره‌ی ۱^۱ مشخص شده با کد A، فردی ۵۶ ساله با جنسیت مذکر بود که داروی کپسیتابین را با دوز ۱۰۰۰ میلی-گرم همراه با مقدار کافی آب و غذا دریافت نموده بود و بیمار داوطلب شماره‌ی ۲^۲ مشخص شده با کد B، بانوی ۲۹ ساله‌ای بود که با توجه به تیپ درمانی تجویزی از سوی پزشک معالج، دوز ۸۲۵ میلی‌گرمی از داروی زلودا را به صورت خوراکی مصرف نموده بود. نمونه‌های خون بیماران مذکور در فواصل زمانی ۲ ساعت تا ۱۸۰ دقیقه پس از مصرف دوزهای مشخص شده از قرص یا کپسول زلودا (Xeloda®) محصول شرکت داروسازی Roche (بازل، سوئیس) یا قرص اُسلودا® (Osloda®) محصول شرکت داروسازی اُسوه^۲ (تهران، ایران)، جمع‌آوری شده است.

مطابق با مستندات منتشر شده در مراجع علمی، زمانهای نمونه‌گیری اعلام شده پس از مصرف خوراکی، حساسیت کافی را برای بررسی رفتار کپسیتابین و FU-۵، در نمونه‌های پلاسمای بیماران، فراهم می‌نمایند [۳۱۳]. نمونه‌های خون بیماران شرکت‌کننده در این مطالعه، بلافاصله پس از جمع‌آوری و جداسازی کسر پلاسمایی، تا زمان آنالیز در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد منجمد و نگهداری شده‌اند. نمونه‌های ذخیره شده بر اساس پروتکل‌های مشروح، پس از انجام مراحل پاکسازی و استخراج خارج-ستونی با روش توسعه داده‌ی شده‌ی (AgNPs@MCM-۴۱-HF-SLPME) و متعاقب آن پیش‌تغلیظ داخل‌ستونی و آنالیز با تکنیک الکتروفورز موئین (FASI-CE)، که کلیه‌ی مراحل بهینه‌سازی آنها در قسمتهای قبلی به تفصیل ارائه شده است، آنالیز شده و مورد بررسی قرار گرفته‌اند. مقادیر غلظتی مربوطه به آنالیت‌های دارویی تحت مطالعه در نمونه‌های حقیقی بیماران، با توجه به منحنی کالیبراسیون در مرحله‌ی معتبرسازی روش، محاسبه و گزارش شده است. الکتروفروگرامهای نوعی به ترتیب مربوط به نمونه‌ی پلاسمای آغشته شده با غلظت ۲۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر از هر دو دارو و نمونه‌ی پلاسمای بیمار

^۱ Basel

^۲ Osvah

با کد A که داروی کپسیتابین را در دوز ۱۰۰۰ میلی گرمی مصرف کرده بود، قبلاً در شکل‌های ۱-۳-۱۷- (ب) و ۱-۳-۱۷- (ج) ارائه شده است. همانطوری که مشاهده می‌شود، هیچ پیکی مربوط به عوامل مزاحم در حین آنالیز این ترکیبات مهم شیمی درمانی در نمونه‌های بیولوژیکی مشاهده نشده است؛ که حاکی از شایستگی و مناسب بودن روش پیشنهادی برای کاربرد در مطالعات کلینیکی می‌باشد.

در مورد بیمار با کد A (بیمار شماره ۱)، سطح غلظتی پلاسمایی داروی کپسیتابین و متابولیت اصلی آن به ترتیب ۲۴۷ و ۶۱ نانوگرم بر میلی لیتر مشخص شده است. شایان ذکر است که در برخی از بیماران شرکت کننده، غلظت‌های ۵-FU صرفاً در زمانهای ۱ تا ۲ ساعت پس از مصرف خوراکی کپسیتابین قابل اندازه گیری می‌باشد که با روش آنالیز شده‌ی حاضر، سطح غلظتی ۵-FU در نمونه‌های پلاسمای آنها نزدیک به غلظت مربوط به حد پایین اندازه گیری (LLOQ) روش بود. به عنوان مثال، مقدار سطح غلظتی ۵- فلورواوراسیل در نمونه‌ی پلاسمای بیمار با کد F (۴۹ ساله با جنسیت مذکر) مقدار ۲۶/۸ نانوگرم بر میلی لیتر تخمین زده شد؛ که نزدیک به حد پایین اندازه گیری بود. در زمانهای نمونه گیری طولانی تر، مقدار و سطح غلظتی ۵-FU در برخی از بیماران داوطلب شرکت کننده، کمتر از حد تشخیص و حد پایین اندازه گیری روش حاضر بود. نتایج بدست آمده از آنالیز نمونه‌های حقیقی (پلاسمای بیماران)، در توافقی کامل با نتایج حاصل از روش پیشنهادی HPLC-MS/MS گزارش شده توسط وینچتین^۱ و همکارانش [۲۲۷]، برای اندازه گیری همزمان آنالیت‌های دارویی فوق می‌باشد. نتایج بدست آمده از سایر بیماران شرکت کننده در این مطالعه، تنوع و گوناگونی بین بیمار^۲ گسترده‌ای را در سطوح غلظتی داروها نشان می‌داد، که احتمالاً می‌توان این تغییرات را به فعالیتهای متفاوت آنزیمی درگیر در فرآیند متابولیسم^۳ داروی کپسیتابین در بین بیماران مختلف نسبت داد [۳۱۳] و یا بر اساس اختلافات موجود در اتصال به پروتئینهای بدن توجیه نمود؛ که دلایل آن به تفصیل در بخش مقدمه، مورد بحث قرار گرفته است. بحث دقیق تر و با جزئیات بیشتر در مورد تنوع غلظتی مشاهده شده در بیماران مختلف، نیاز به مطالعات گسترده تر بر روی تعداد بیشتری از نمونه‌های مربوط به بیماران مختلف و انجام مطالعات و تحقیقات کارآزمایی بالینی دارد؛ که در حال حاضر خارج از محدوده‌ی اهداف تعیین شده‌ی این مطالعه می‌باشد.

¹ Vainchtein

² Inter-patient variability

³ Different enzymatic activities involved in the metabolism process

۳-۱-۷- مقایسه‌ی روش پیشنهادی با سایر روشهای اندازه‌گیری و آنالیز ترکیبات تحت مطالعه

در جدول ۳-۱-۷، برخی از روشهای تجزیه‌ای که در مراجع معتبر علمی، برای اندازه‌گیری منفرد، و همچنین تعیین همزمان داروی کپسیتابین، متابولیت‌های واسطه و متابولیت اصلی آن گزارش شده است؛ به همراه گستره‌ی خطی (LDR)، حد اندازه‌گیری (LOQ) و تکنیک‌های گزارش شده‌ی پیش-تغلیظ و آماده‌سازی نمونه برای روشهای مذکور در پیکره‌های مختلف، نظیر فرمولاسیون دارویی، نمونه‌های محیطی و به ویژه ماتریکس‌های بیولوژیکی، لیست شده است. همانطوری که ملاحظه می‌شود و پیش‌تر نیز اشاره شده است، اغلب روشهای استخراج، پیش‌تغلیظ، پاکسازی و آماده‌سازی نمونه‌ی سنتی، مانند استخراج مایع-مایع (LLE) و استخراج فاز جامد (SPE) و یا تلفیقی از روشهای مذکور در توسعه‌ی روشهای تجزیه‌ای منتشرشده‌ی مذکور، بکارگرفته شده است [۲۳۰] و کاربرد تکنیکهای ایمن‌تر و مقرون بصرفه‌تر ریزاستخراج و پاکسازی اولیه‌ی نمونه (clean-up)، برای آنالیز همزمان ترکیب دارویی ضد سرطان کپسیتابین و متابولیت‌های مختلف آن، تاکنون مورد مطالعه قرار نگرفته است.

نگاهی جامع به جدول مقایسه‌ای مذکور و سایر مراجع علمی، مشخص می‌سازد که تاکنون به جز یک مورد که در سال ۲۰۰۳، از تکنیک الکتروفورز موئین برای بررسی نفوذ داروی کپسیتابین و متابولیت‌های آن در بافت تومورهای بدخیم پستان، استفاده شده بود [۲۲۹]، گزارشی دیگری مبنی بر استفاده از تکنیک الکتروفورز موئین برای آنالیز و تعیین همزمان یا منفرد این دارو به همراه متابولیت یا متابولیت‌های مربوطه در پیکره‌های بیولوژیکی (مشمول بر پلاسمای انسانی و سایر پیکره‌های زیستی)، فرمولاسیون دارویی و حتی سایر ماتریکس‌های محیطی، به انتشار نرسیده است.

شایان ذکر است که در مواردی که از سایر تکنیکهای کروماتوگرافی مانند HPLC، به صورت تلفیق-شده با آشکارسازهای UV و DAD برای اندازه‌گیری آنالیت‌های تحت مطالعه بهره گرفته شده است، حد تشخیص و حد اندازه‌گیری‌های حاصل از روشهای مذکور، به صورت قابل‌ملاحظه‌ای بالاتر از روش پیشنهادی در این مطالعه می‌باشد و مشهود است که حساسیت حاصل از روش پیشنهادی تلفیق AgNPs@MCM41-HF-SLPME-FASI-CE-UV، در مقایسه با سایر روشهای کروماتوگرافی تلفیق-شده با آشکارساز فرابنفش، بسیار مطلوب‌تر و در حد قابل قبولی می‌باشد. همچنین مقادیر LOQ پایین-تر و گستره‌های خطی (LDR) وسیع‌تر حاصل از کاربرد سایر روشهای قدرتمندتر و پیچیده‌تر لیست شده در جدول ۳-۱-۷ مانند LC-MS-MS و کروماتوگرافی گازی تلفیق شده با طیف سنجی جرمی (GC-MS)، برای اندازه‌گیری و تشخیص آنالیت‌های هدف این مطالعه، مدیون سیستم‌های قدرتمند تجزیه‌ای و آشکارسازهای فوق العاده حساس تلفیق شده با روشهای یاد شده می‌باشد که در مقایسه با تکنیک الکتروفورز موئین از تکنولوژی پیشرفته‌تری برخوردار بوده و دستگاههایی بسیار پرهزینه و نسبتاً پیچیده‌ای می‌باشند که علی‌رغم کارایی تجزیه‌ای بی‌نظیرشان، در اغلب آزمایشگاه‌های تحقیقاتی به-راحتی در دسترس نمی‌باشند.

جدول ۳-۱-۷- مروری بر برخی از روش‌های تجزیه‌ای گزارش شده در مراجع علمی برای تعیین، تشخیص و اندازه‌گیری کمی داروی کپسیتابین (CAP) و متابولیت‌های مربوطه، در پیکره‌ها و نمونه‌های مختلف؛ مقایسه با روش HF-SLPME- FASI-CE-UV ارائه شده در این تحقیق.

ترکیب / ترکیبات	ماتریکس	روش آماده‌سازی نمونه ^a	روش تجزیه‌ای	محدوده خطی فقط برای CAP (ng mL ⁻¹)	حد اندازه‌گیری فقط برای CAP (ng mL ⁻¹)	مرجع
CAP, ۵-DFUR, ۵-DFCR و ۵-FU	پلاسمای انسان	استخراج فاز جامد	LC-MS-MS	۱-۵۰۰	۰/۰۲	[۳۱۴]
CAP و تمامی متابولیت‌های آن	پلاسمای انسان	استخراج مایع-مایع	APCI- LC-MS/MS	۱۵۰-۳۰۰۰	۱۵۰	[۳۱۵]
CAP, ۵-DFUR, ۵-DFCR و ۵-FU	پلاسمای و سرم موش و صفرای خرگوش ^۱	ترسیب پروتئین	HPLC-DAD	۱۰۰۰-۵۰۰۰۰	۵۰۰	[۳۷۰]
CAP, α-fluoro-β-alanine و ۵-FU	پلاسمای انسان	ترسیب پروتئین به همراه مشتق‌سازی با پنتا فلورو-بنزیل برآمید ^۲	GC-MS	۵-۲۰۰	۵	[۳۱۶]
CAP و شش متابولیت آن	پلاسمای انسان	ترسیب پروتئین	HPLC-MS/MS	۵۰-۶۰۰۰	۵۰	[۳۲۸]
CAP	فرمولاسیون دارویی	بدون استخراج نمونه	Differential pulse polarography(DPP)	۲-۱۰۰	۱/۳۶	[۳۱۷]
CAP, DFCR, DFUR و FU	بافت تومور بدخیم	بدون تیمار	CE-UV	۶۴۰-۱۵۴۰۰	۱۰۰	[۳۲۹]
CAP	نمونه‌ی خالص و فرم دارویی (قرص)	-	HPLC-UV	۷۰۰-۱۲۰۰۰	۲۴۷	[۳۱۸]
CAP	پلاسمای انسان	استخراج فاز جامد	HPLC-UV	گزارش نشده	۱۵۶	[۳۱۹]
CAP, ۵-DFUR, ۵-DFCR و ۵-FU و ۵-FUH ₂	پلاسمای انسان	استخراج مایع-مایع	LC-MS	۲۵-۱۰۰۰۰	۲۵	[۳۲۰]
CAP و سه متابولیت نوکلئوزیدی آن ^۳	پلاسمای انسان	استخراج فاز جامد استخراج مایع-مایع ترسیب پروتئین	LC-MS/MS	۱۰-۵۰۰۰	۱۰	[۳۱۳]
CAP	نمونه‌های خون انسان	استخراج مایع-مایع به همراه روش لکه‌ی خون خشک شده ^۴	LC-ESI-MS/MS	۱۰-۱۰۰۰۰	۱۰	[۳۲۱]
CAP و ۵-FU	پلاسمای انسان	ترسیب پروتئین	LC-MS/MS	۵-۱۰۰۰	۵	[۳۲۵]
CAP و ۵-FU	پلاسمای انسان	HF-SLPME	FASI-CE-UV	۲۵-۱۰۰۰	۱۷	کار حاضر

^a استخراج فاز جامد (SPE)، استخراج مایع-مایع (LLE)، ترسیب پروتئین (PP)، لکه‌ی خون خشک شده (DBS)، ریزاستخراج فاز جامد-مایع مبتنی بر فیبر توخالی (HF-SLPME)، بدون استخراج (Without any sample extraction).

¹ Mouse plasma, Mouse serum and Rabbit bile

² Penta fluorobenzyl bromide

³ Nucleoside metabolites

⁴ Dried blood spot

۳-۲- تکنیک الکتروفورز موئن با آشکارساز فرابنفش تلفیق شده با روش تغلیظ توده‌ای درون‌ستونی تقویت‌شده با میدان الکتریکی (FASI) و استخراج الکتروغشایی بر پایه فیبرهای توخالی تقویت‌شده با نانوکامپوزیت $[OMIm]Br-MWCNT/ZnO$ ، به‌منظور اندازه‌گیری داروی شیمی‌درمانی ایماتینیب مسیلات در نمونه‌های پلاسما

۳-۲-۱- مشخصه‌یابی جاذب نانوکامپوزیتی $MWCNT@ZnO$ پوشش‌داده شده با مایع یونی $[OMIm]Br$

تکنیک سُل-ژل در مقایسه با سایر روش‌های تهیه‌ی سیستم‌های نانوکامپوزیتی کارآمد و روش‌های پوشش‌دهی فیبرهای مورد استفاده در فرآیندهای استخراجی، دارای مزایای بارزی از قبیل فراهم ساختن اتصال و چسبندگی^۱ موثر و قوی بین پوشش نانوساختاری و فیبر، تولید ساختارهای متخلخل با قابلیت ایجاد سطح ویژه‌ی بالا و نیز تهیه‌ی سیستم‌های کامپوزیتی همگن با قابلیت پوشش‌دهی مطلوب را داراست؛ که مزایای فوق، سبب افزایش در انتخابگری جاذب‌های تهیه شده با روش مذکور در برخی از کاربردهای تجزیه‌ای می‌گردد [۱۶۳]. از طرفی، مایعات یونی به دلیل داشتن خواص متمایز و منحصر-بفرد فیزیکی و شیمیایی، نظیر فرارایت و سمیت پایین، گرانروی متعادل و تغییرپذیر، ظرفیت حل‌کنندگی عالی^۲، شفافیت طیفی بالا^۳، قطبیت قابل‌تنظیم، پایداری حرارتی مطلوب و در عین حال قابلیت استخراج بسیاری از ترکیبات آلی و معدنی [۳۲۲]، تاثیرات بسیار قابل‌توجهی را بر روی ساختار تخلخلی مواد بر پایه‌ی سل-ژل و ترکیبات تهیه شده با این روش دارد؛ که این مایعات را واجد شرایط و شایسته-ی ترجیحات اخیر پژوهشگران شاخه‌ی شیمی تجزیه، به ویژه برای کاربرد در علوم و تکنیک‌های جداسازی ساخته است. قابل توجه است که مایعات یونی بر پایه‌ی ایمیدازولیوم، ترکیبات هتروسیکل^۴ نیتروژن‌دار با رادیکال غنی از الکترون^۵ هستند [۱۳۰] که از طریق تشکیل پیوندهای $\pi-\pi$ ، پیوند هیدروژنی و برهمکنش‌های آبرگریز، می‌توانند تعاملات و فعل و انفعالات خوبی را با بسیاری از آنالیت‌های آلی و معدنی داشته باشند. علاوه بر این، خصوصیات ساختاری کم‌نظیر نانولوله‌های کربنی (MWCNTs) مانند سطح موثر زیاد، برهمکنش‌های آبرگریزی و الکترواستاتیکی با آنالیت‌های مختلف به همراه دارا بودن ساختار منحصربفرد لوله‌ای^۶، این نانوترکیبات کربنی را به انتخابهای جذابی برای استفاده در فرآیندهای استخراجی و در نقش جاذب‌های موثر و کارا، تبدیل کرده است؛ که کاربرد آنها در فرآیندهای استخراجی

¹ Adhesion

² Dissolving capacity

³ Large spectral transparency

⁴ Heterocyclic

⁵ Electron-rich radical

⁶ Tubular

به دلیل نسبت سطح به حجم بسیار بالایشان، معمولاً سبب افزایش ظرفیت و بهبود کارایی روشهای استخراجی می‌گردد [۳۲۳، ۳۲۴]. لذا در این مطالعه، از یک نانوکامپوزیت هیبریدی نانولوله‌های-کربنی/نانوذرات اکسیدروی (MWCNT/ZnO nano-hybrid composite) پوشیده شده با یک مایع یونی (۱- اکتیل-۳- متیل ایمیدازولیوم بروماید، [OMIm]Br)، که با روش سل- ژل تهیه شده است، برای اصلاح ترکیب غشای مایع تثبیت شده (SLM) استفاده شده و نانوکامپوزیت هیبریدی مذکور به صورت پراکنده شده در حلال SLM انتخابی، در خلل و فرج فیبر توخالی پلی‌پروپیلنی، تثبیت شده است. بدین‌منظور و همان‌طوری که قبلاً اشاره شد، پیش از انجام واکنشهای سل- ژلی، ابتدا کامپوزیت MWCNTs/ZnO تهیه شده (بخش ۲-۶-۲) و از نظر سطح، مورفولوژی و ترکیب ساختار توسط تکنیکهای SEM و TEM، مورد بررسی قرار گرفته و مشخصه‌یابی گردیده است. نتایج تصویربرداری‌های میکروسکوپیهای الکترونی SEM و TEM به ترتیب در شکل‌های ۱-۲-۳- (الف) و ۱-۲-۳- (ب) آورده شده است. تصاویر مربوطه نشان می‌دهند که نانوذرات اکسیدروی به صورت موفقیت‌آمیز، در روی سطح نانولوله‌های کربنی مستقر شده و سبب پوشیده شدن MWCNTs با لایه‌ای از این نانوساختارهای اکسید فلزی شده‌اند. با توجه به اینکه یکی از راهبردهای افزایش برهمکنشهای بین آنالیت‌های مختلف و نانولوله-های کربنی و همچنین موثرترین عامل در تخلیص و مهمتر از آن پراکنده‌سازی آسان این نانوساختارها در محیطهای سل- ژلی، فرآیند عامل‌دار کردن و اصلاح سطح آنها می‌باشد؛ لذا در مطالعه‌ی حاضر، این فرآیند قبل از استفاده از نانولوله‌های کربنی برای تهیه‌ی کامپوزیت فوق‌الذکر، از طریق انجام واکنش اکسیداسیون اسیدی و اتصال گروه‌های عاملی هیدروکسیل و کربوکسیلیکی بر سطح و دیواره‌های جانبی نانولوله‌های کربنی چند دیواره‌ی خام، انجام شده (بخش ۲-۶-۲) و قرارگیری موفقیت‌آمیز گروه‌های عاملی مورد نظر بر روی سطح نانولوله‌های مذکور، با استفاده از روش آنالیز FT-IR، مورد بررسی قرار گرفته است. شکل‌های ۲-۲-۳- (الف و ب) به‌ترتیب، طیفهای عبوری آنالیز FT-IR مربوط به نانولوله-های کربنی خام (اصلاح نشده) و عامل‌دار شده با فرآیند اکسیداسیون اسیدی را نشان می‌دهند. همان‌طوری که در شکل ۲-۲-۳- الف، مشهود است، هم‌آراستگی^۱ بالا و تقارن ساختاری موجود در MWCNTs خام، منجر به تولید سیگنال‌های مادون قرمز بسیار ضعیف^۲ می‌گردد که این امر به خودی خود، به دلیل اختلاف جزئی بار بین اتم‌های کربن بوده که در نهایت با ایجاد یک دوقطبی الکتریکی القایی^۳ بسیار ضعیف و کوچک، سبب ظاهر شدن ساختار طیفی ساده و مسکوت^۴ می‌گردد [۱۱۳]. در شکل ۲-۲-۳- ب، پیک ظاهر شده در عدد موجی حوالی 1622 cm^{-1} به احتمال بسیار زیاد مربوط به ارتعاشات پیوند C=C می‌باشد که به وضوح بیانگر عامل‌دار شدن اسیدی نانولوله‌های کربنی (انجام فرآیند

¹ High symmetry

² Very weak infrared signals

³ Small induced electric dipole

⁴ Silent spectrum

اکسیداسیون اسیدی) می‌باشد. همچنین، نوار عبوری و پیک ظاهر شده در عدد موجی 3448 cm^{-1} را می‌توان به عنوان پیک مشخصه‌ی مربوط به ارتعاشات کششی گروه‌های عاملی OH کربوکسیلیکی^۱ بر روی سطح نانولوله‌های کربنی نسبت داد (COOH-MWCNTs). از طرفی، نوار مشاهده شده و پیک ظاهر شده در عدد موجی حوالی 1495 cm^{-1} مربوط به ارتعاشات کششی ناشی از پیوند C-O بوده و نشان دهنده‌ی قرار گرفتن و اتصال گروه‌های عاملی کربوکسیلیک بر روی سطح نانولوله‌های کربنی، در اثر اکسیداسیون موفقیت‌آمیز سطح آنها می‌باشد [۱۱۳].

متعاقب انجام مراحل مشخصه‌یابی نانولوله‌های کربنی عامل‌دار شده (اکسید شده)، و استفاده از آنها در تهیه‌ی کامپوزیت MWCNT/ZnO؛ محصول بدست آمده از مرحله‌ی مذکور پس از انجام فرآیند پوشش‌دهی با مایع یونی [OMIm]Br، همان‌طوری که قبلاً نیز به تفصیل مورد بحث قرار گرفته است، برای سنتز نانوجاذب هیبریدی بر پایه‌ی تکنیک سل-ژل با استفاده از روش کاتالیز بازی، مورد استفاده قرار گرفته است. سپس، نانوجاذب تهیه شده به منظور استفاده در اصلاح ترکیب غشای مایع تثبیت شده (پراکنده‌سازی در حلال انتخابی SLM و تقویت فیبرهای توخالی) در فرآیند استخراج الکتروغشایی، مورد استفاده قرار گرفته است. لازم به توضیح است که برای مشخصه‌یابی سل-ژل نانوهیبریدی تهیه شده، از تکنیک‌های میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) و طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل‌فوری (FT-IR) استفاده شده است. شکل ۳-۲-۳، طیف عبوری آنالیز FT-IR مربوط به نانوجاذب هیبریدی تهیه شده با روش سل-ژل را نشان می‌دهد. نوار و پیک با بسامد پایین^۲ ظاهر شده در عدد موجی حوالی 444 cm^{-1} نشان‌دهنده‌ی خمش خارج صفحه‌ای^۳ (خارج از صفحه) پیوند Si-O-Si می‌باشد و همچنین پیک‌های مشاهده شده در موقعیتهای ۷۹۶ و 1067 cm^{-1} احتمالاً به ترتیب، مربوط به ارتعاشات کششی متقارن و نامتقارن^۴ Si-O-Si می‌باشد. بعلاوه، نوارهای عبوری ضعیف مشاهده شده در ۹۷۶ و 1210 cm^{-1} (که با پیکانه‌های متفاوت و اعداد قرمز رنگ مشخص شده‌اند) را می‌توان به ترتیب به ارتعاشات پیوندهای Si-OH و Si-O-C نسبت داد. همچنین پیک ظاهر شده در نزدیک 576 cm^{-1} را می‌توان گواه آشکار دیگری، برای حضور لایه‌ی سیلیکاتی (silica layer) بر روی سطح نانوجاذب کامپوزیتی تهیه شده، در نظر گرفت [۲۷۵]. از طرفی، دو نوار جذبی ظاهر شده در حوالی اعداد موجی ۲۹۳۸ و 2836 cm^{-1} ، به ترتیب به دلیل ارتعاشات کششی باند C-H مربوط به ساختار آروماتیک^۵ و آلیفاتیک^۶ مایع یونی می‌باشند [۱۶۳]. همچنین حضور مایع یونی [OMIm]Br، در ساختار سل-ژلی نانوجاذب تهیه شده، بوسیله‌ی ظاهر شدن نوارهای شاخص مربوط به ارتعاشات کششی پیوند C=N در اعداد موجی

^۱ OH band from carboxylic groups

^۲ Low frequency peak

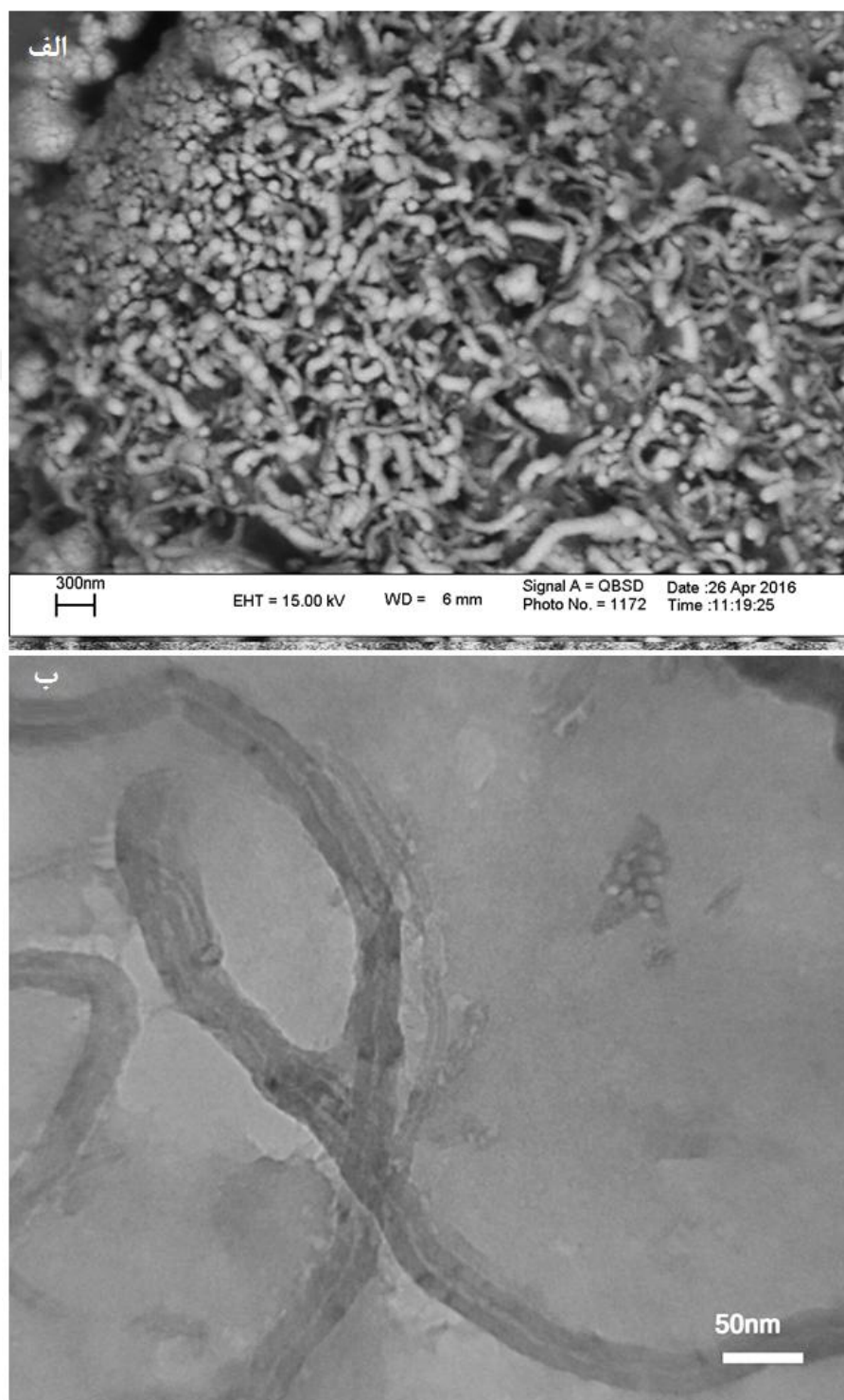
^۳ Out-of-plane bending mode

^۴ Asymmetric

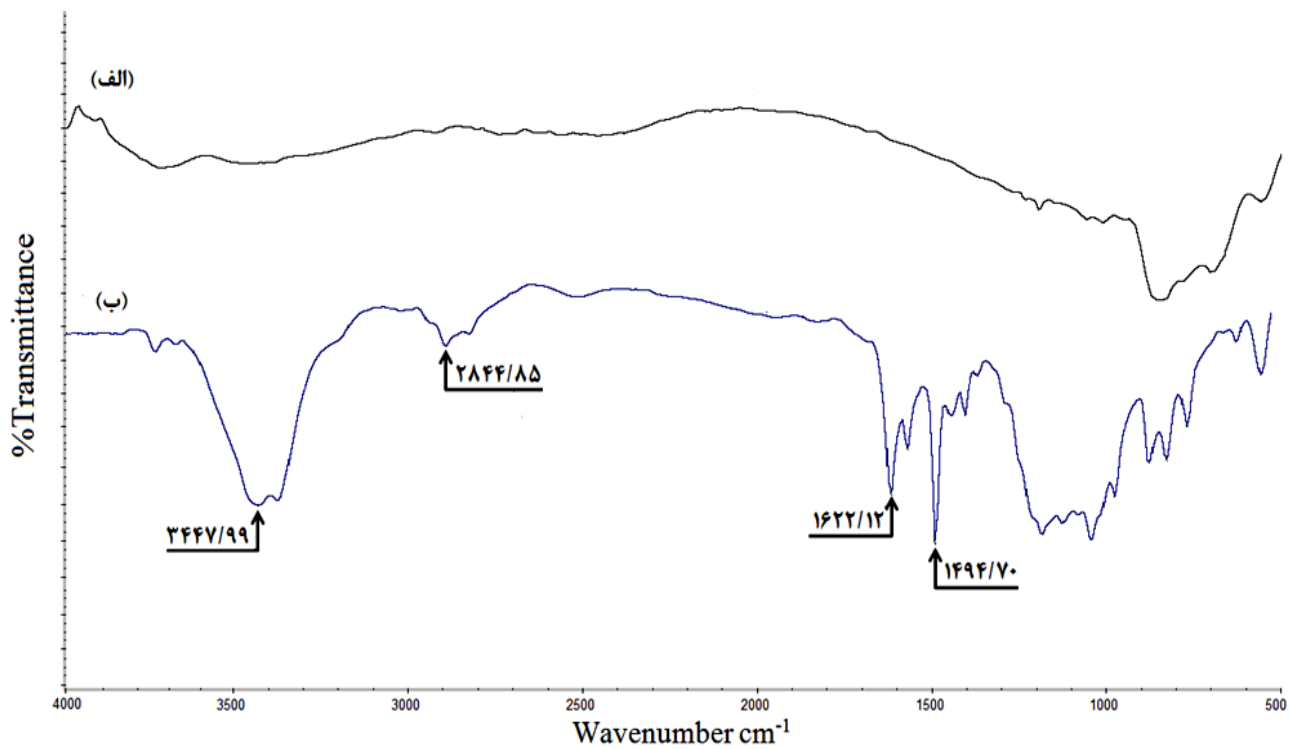
^۵ Aromatic

^۶ Aliphatic

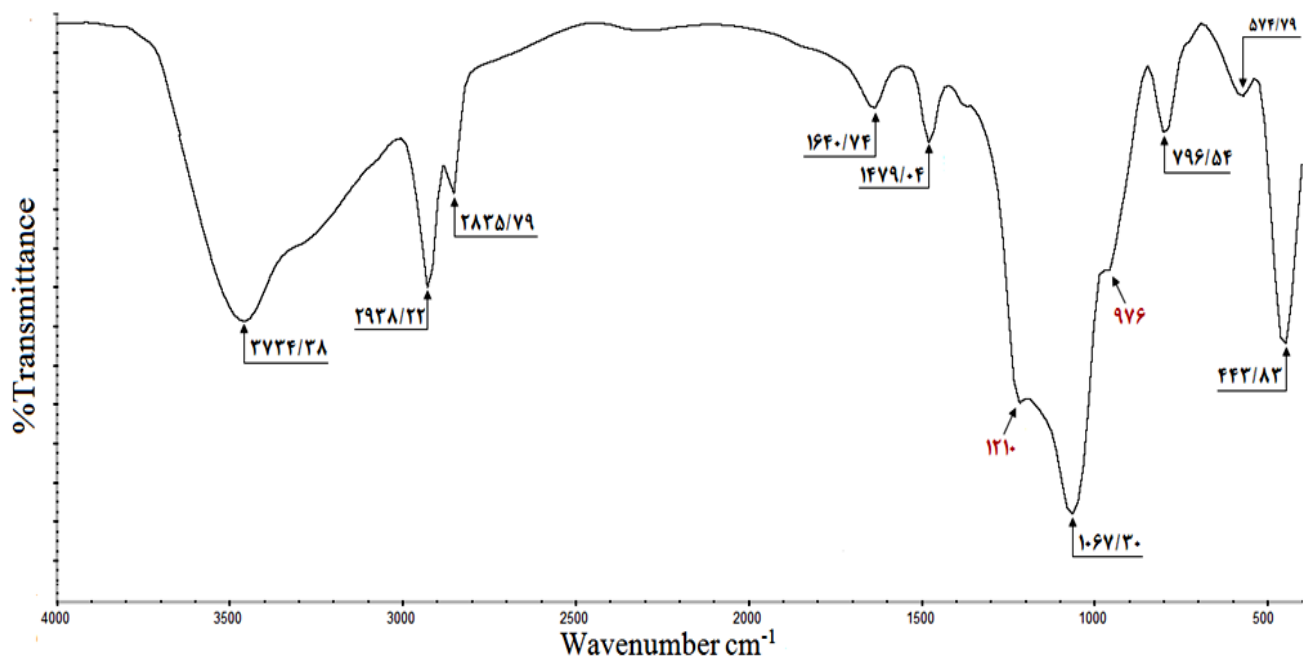
حوالی 1480 و 1640 cm^{-1} تایید شده است که نشان دهنده‌ی تثبیت و پوشش‌دهی موفقیت‌آمیز مایع یونی مورد استفاده، در سطح جاذب نانوکامپوزیتی تهیه شده با روش سل-ژل می‌باشد.



شکل ۳-۲-۱- تصاویر میکروسکوپ الکترونی از کامپوزیت MWCNT/ZnO تهیه شده؛ (الف): تصویر نوعی SEM (مقیاس: ۳۰۰ نانومتر) و ریزنگار HR-TEM (مقیاس: ۵۰ نانومتر).

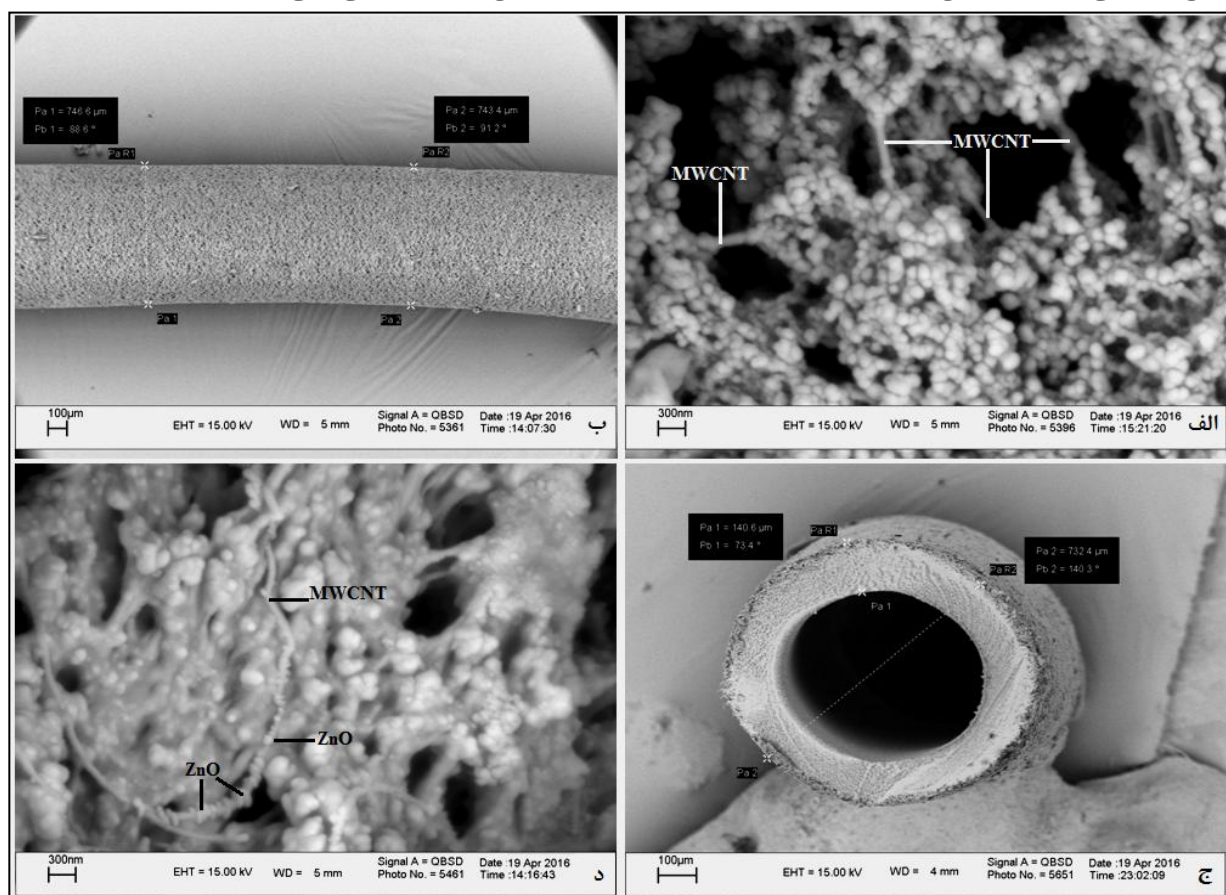


شکل ۳-۲-۲- طیفهای FT-IR مربوط به (الف): نانولوله‌های کربنی چند دیواره‌ای خام (اصلاح نشده)؛ (ب) نانولوله‌های کربنی تخلیص شده و عامل دار شده با فرآیند اکسیداسیون اسیدی.



شکل ۳-۲-۳- طیف FT-IR مربوط به نانوجاذب هیبریدی تهیه شده با روش سل - ژل.

تصویر ریزنگار میکروسکوپ الکترونی پوششی (SEM)، ثبت شده برای مشخصه‌یابی سطح نانوجاذب هیبریدی تهیه شده با روش سل-ژل در شکل ۳-۲-۴ (الف) ارائه شده است. همچنین، مشخصه‌یابی فیبر توخالی اصلاح شده و تقویت شده با نانوجاذب مذکور که در روش استخراج الکتروغشایی (EME) توسعه داده شده در مطالعه‌ی حاضر مورد استفاده قرار گرفته است، با ثبت تصاویر میکروسکوپ الکترونی از زوایای مختلف، انجام شده و نتایج حاصل در شکل ۳-۲-۴ (ب-د) نشان داده شده است؛ که شامل تصاویر ثبت شده‌ی به ترتیب مربوط به دیواره‌ی جانبی (شکل ۳-۲-۴ ب)، سطح مقطع و بُرش عرضی (شکل ۳-۲-۴ ج) و مورفولوژی سطح فیبر مذکور (شکل ۳-۲-۴ د)، می‌باشند. الگوهای SEM، تایید می‌نمایند که قطر خارجی فیبر توخالی اصلاح شده با نانوجاذب سل-ژلی در حدود ۷۳۰ میکرومتر بوده و به وضوح موید حضور مواد نانوجاذب در سطح خارجی و خلل و فرج دیواره‌ی فیبر مورد استفاده در استخراج الکتروغشایی، می‌باشند.



شکل ۳-۲-۴- تصاویر ریزنگار میکروسکوپی الکترونی پوششی (SEM) از (الف): $[OMIm]Br-MWCNTs@ZnO$ نانوجاذب کامپوزیتی تهیه شده با روش سل-ژل (مقیاس: ۳۰۰ نانومتر)؛ و تصاویر SEM یک فیبر توخالی پلی پروپیلنی تقویت شده با نانوجاذب مذکور از زوایای دید مختلف (ب): دیواره‌ی خارجی (مقیاس: ۱۰۰ میکرومتر)؛ (ج): بُرش عرضی (مقیاس: ۱۰۰ میکرومتر)؛ (د): مورفولوژی سطح و تصویر بافت از فیبر توخالی در یک بزرگنمایی دیگر^۱، پس از تثبیت نانوجاذب پخش شده در حلال NOPE بر روی سطح فیبر (مقیاس: ۳۰۰ نانومتر).

¹ Different magnification

۳-۲-۲- توسعه‌ی روش و بهینه‌سازی شرایط الکتروفورتیکی

هدف بخش دوم این تحقیق، بر مبنای توسعه‌ی یک روش کاربردی استخراج الکتروغشایی به صورت تلفیق شده با روش تجزیه‌ای FASI-CE، با هدف آنالیز و اندازه‌گیری سطوح غلظتی پایین داروی مهم شیمی‌درمانی ایماتینیب مسیلات (IMM) در نمونه‌های پلاسمای انسان، پایه‌گذاری شده بود. بدین منظور و برای دستیابی به بالاترین راندمان تجزیه‌ای به همراه شرایط بهینه‌ی یک جداسازی کارآمد، برخی از فرآیندهای تجزیه‌ای مشتمل بر آزمایشات مختلف الکتروفورتیکی مورد بررسی و آزمایش قرار گرفته است. از همین‌رو، مطالعات مربوط به توسعه و بهینه‌سازی روش بر اساس بررسی تاثیرات پارامترهای مختلفی نظیر ترکیب الکترولیت زمینه، غلظت و pH آن، ولتاژ اعمالی و در نهایت دمای جداسازی بر روی شرایط آنالیز و اندازه‌گیری داروی تحت مطالعه، هدف‌گذاری شده بود. لذا، پاسخ‌های بهینه مطابق با کیفیت (بازده)^۱ و شدت پیک‌های حاصل و مقادیر انحراف استاندارد نسبی (RSD%) مربوط به زمان مهاجرت آنالیت مورد نظر، بر اساس مقادیر میانگین حاصل از سه بار یا تعداد بیشتری از تکرار آزمایشات، مورد ارزیابی قرار گرفته است.

با توجه به ساختار و ترکیب شیمیایی آنالیت هدف این مطالعه (ایماتینیب در حالت طبیعی خود، یک ترکیب بازی است و از همین‌رو در شرایط اسیدی به خوبی قابل حل شدن و پروتونه شدن^۲ می‌باشد)؛ بافرها و الکترولیت‌های زمینه‌ی اسیدی می‌توانند برای افزایش و به حداکثر رساندن یونیزاسیون آن، مورد استفاده قرار گیرند [۲۶۴، ۳۲۵]. لذا در این مطالعه، چهار مورد از الکترولیت‌های زمینه‌ی اسیدی مشتمل بر بافر استات، فسفریک اسید- تری‌اتانول‌آمین (phosphoric acid-TEA)، بافر فسفات- تریس و سدیم دی‌هیدروژن فسفات (NaH_2PO_4)، در pHهای نسبتاً پایین مورد بررسی قرار گرفتند. کاملاً مشخص است که pHهای پایین الکترولیت زمینه، سبب ایجاد جریان‌های الکترواسموتیک پایین می‌گردد و در نتیجه آنالیت مورد مطالعه در چنین شرایطی، تحت جریان کاهش یافته‌ی EOF و بواسطه‌ی تحرک الکتروفورتیکی خود، مهاجرت می‌کند [۱۸۶]. بنابراین و با توجه به تاثیرات قابل‌ملاحظه‌ی pH الکترولیت زمینه بر روی جریان EOF، انتخاب یک pH مناسب برای بهینه‌سازی شرایط جداسازی در روشهای مبتنی بر الکتروفورز موئین، بسیار حیاتی و حائز اهمیت است. لذا در ابتدا، مطالعات توسعه‌ی روش با تست کردن pHهای مختلف جداسازی در محدوده‌ی ۱/۵ تا ۳/۷ از بافرهای ذکر شده، کلید خورده است. نتایج آزمایشات متعدد توسعه‌ی روش نشان می‌داد که ایده‌آل‌ترین شرایط جداسازی، هنگام استفاده از بافر آبی سدیم دی‌هیدروژن فسفات (با $\text{pH}=2$) به عنوان الکترولیت زمینه، حاصل شده است.

^۱ Peak efficiency

^۲ Well-dissolved and protonated

پیش‌تر نیز عنوان گردید که جریان الکترواسموتیک، گرمایش ژولی و جذب سطحی آنالیتها بر روی دیواره‌ی داخلی ستون موئین، پدیده‌هایی هستند که توسط غلظت بافر اجرایی جداسازی، تحت تاثیر قرار می‌گیرند [۲۸۸]. لذا در مرحله‌ی بعدی، تاثیر غلظتهای مختلفی از بافر جداسازی بر روی زمان مهاجرت ترکیب دارویی تحت مطالعه، در محدوده‌ی ۵۰ تا ۱۲۰ میلی‌مولار از بافر سدیم دی‌هیدروژن فسفات (که pH آن با افزایش مقدار مناسبی از هیدروکلریک اسید، در مقدار برابر ۲ تنظیم شده بود)، مورد ارزیابی قرار گرفته است. نتایج بدست آمده نشان می‌دادند که با افزایش غلظت الکترولیت از ۵۰ میلی‌مولار تا ۱۰۰ میلی‌مولار و به تبع آن افزایش قدرت یونی سیستم، کاهش قابل توجهی در زمان مهاجرت گونه‌ی هدف به همراه بهبود چشمگیری در شدت پیک‌ها مشاهده گردید.

این افزایش در شدت سیگنال و ارتفاع پیک آنالیت را به احتمال زیاد می‌توان به کاهش جریان الکترواسموتیک و متعاقب آن کاهش جذب آنالیت در سطح داخلی دیواره‌ی لوله‌ی موئین، در اثر افزایش نیروی یونی بافر نسبت داد [۱۹۸]. با افزایش بیشتر غلظت بافر جداسازی تا ۱۲۰ میلی‌مولار، شدت جریان عبوری از سیستم نسبت به غلظت الکترولیت زمینه شدیداً افزایش یافته و منجر به قطع شدن ناگهانی جریان (جریان به صفر رسید) و متوقف شدن خودکار آنالیز، به دلیل ایجاد جریانهای فراتر از آستانه‌ی تحمل دستگاه، افزایش حرارت لحظه‌ای و گرمایش ژولی گردید.

شایان ذکر است که هنگام بررسی تاثیرات مربوط به غلظتهای پایین‌تر از ۵۰ میلی‌مولار از الکترولیت زمینه‌ی انتخابی بر روی کارایی روش و زمان مهاجرت ایماتینیب، جداسازی الکتروفورتیکی مطلوب آنالیت مذکور محقق نگردید و منجر به ظاهر شدن پیک‌های بسیار پهن و بدشکل شد. همچنین در برخی از مواردی که غلظتهای کمتر از ۲۰ میلی‌مولار از بافر سدیم دی‌هیدروژن فسفات، مورد بررسی قرار می‌گرفت، هیچ پیکی مربوط به آنالیت مشاهده نگردید. لازم به توضیح است که تاثیر تکنیک پیش‌تغلیظ آنالیز (FASI) مورد استفاده و اعمالی در این مطالعه، به طور ویژه‌ای به حضور متانول به عنوان حلال رقیق‌ساز فازپذیرنده^۱ پس از اتمام فرآیند استخراج الکتروغشایی بستگی دارد؛ که افزودن متانول به فاز-پذیرنده پس از اتمام استخراج الکتروغشایی، به منظور آماده‌سازی شرایط ماتریکس نمونه‌ی مورد نیاز در آنالیز FASI-CE، صورت می‌پذیرد. در عدم حضور متانول، الکترولیت زمینه‌ی انتخابی، تغلیظ توده‌ای (stacking) ناموفقی را برای ترکیب دارویی هدف سبب می‌شود که این امر به دلیل اختلاف ناچیز مابین رسانایی الکتریکی بافر اجرایی و قاچ نمونه می‌باشد. همچنین ثابت شده است که با افزایش مولاریته‌ی بافر اجرایی، شدت تراکم توده‌ای^۲ نمونه افزایش و بهبود می‌یابد که افزایش تعداد بشقابک‌های فرضی حاصل را به همراه داشته و در نهایت منجر به افزایش ارتفاع پیک مربوط به آنالیت می‌گردد [۳۰۰]. لذا،

^۱ Sample (acceptor phase) dilution solvent

^۲ Stacking force

با توجه به موارد یاد شده و نتایج حاصل از آزمایشات متعدد و به منظور حفظ شکل، تقارن، تیزی، شدت و ارتفاع مطلوب پیک آنالیت، دستیابی به زمانهای آنالیز رضایت بخش، تثبیت جریانهای معقول در سیستم و همچنین به حداقل رساندن انحرافات^۱، ناپایداری و نویز خط زمینه؛ در نهایت برای ایجاد شرایط سازشی^۲ مابین پارامترهای درگیر در بهبود کارایی جداسازی و توسعه بهینه‌ی روش، غلظت^۳ ۱۰۰ میلی‌مولار از بافر سدیم دی‌هیدروژن فسفات با pH=۲ برای آزمایشات و مراحل بعدی مورد تایید قرار گرفت.

تأثیرات مربوط به تغییر در ولتاژ و دمای جداسازی، تحت شرایط انتخابی مذکور در بالا و توسط انجام آزمایشات الکتروفورتیکی در ولتاژهای بالارونده (۲۵ و ۱۵، ۱۸، ۲۰، ۲۲ kV) و دماهای مختلف ستون در گستره‌ی ۱۵ تا ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، مورد ارزیابی قرار گرفته است. زمان مهاجرت یک آنالیت، توسط شدت میدان الکتریکی اعمالی و دمای جداسازی تحت تأثیر قرار می‌گیرد. بدین‌صورتکه، ولتاژهای بالاتر، سبب افزایش کارایی جداسازی و کوتاه‌تر شدن زمان اجرای آنالیز می‌گردند؛ این در حالی است که شدت جریانهای حاصل از ولتاژهای بالاتر، می‌تواند به عنوان یک عامل محدودکننده در فرآیند جداسازی ظاهر گردد که منجر به ناپایداری شدید خط زمینه و تکرارپذیری بسیار ضعیف جداسازی خواهد شد [۳۲۶]. لذا، پس از اعمال ولتاژهای مختلف با استفاده از غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار NaH_2PO_4 (pH=۲) در نقش الکترولیت زمینه، پایدارترین حالت خط زمینه و حداقل نویز^۳، در ولتاژ اعمالی ۲۰ kV حاصل گردید. در ولتاژ بالاتر، جداسازی با اختلال شدید مواجه می‌شد و جریان الکتریکی بسیار ناپایداری حاصل می‌گشت که سبب تخریب شکل پیک مربوط به آنالیت و کاهش ارتفاع آن می‌گردید. علاوه بر موارد یاد شده، گرانیوی الکترولیت زمینه و به تبع آن زمان آنالیز با افزایش بیشتر دمای سیستم، کاهش می‌یابد که در بررسی‌های صورت گرفته در مطالعه‌ی حاضر، افزایش بیش از حد دمای ستون در برخی از موارد به دلیل ایجاد گرمایش ژولی، منجر به جداسازی‌های ناموفق می‌شد. با این حال، کاهش دمای ستون به حدود ۱۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، بهترین شرایط سازشی بین شدت سیگنال تجزیه‌ای و زمان آنالیز به همراه سطح قابل‌قبولی از ناپایداری در خط زمینه را فراهم می‌نمود. لذا با عنایت به نتایج کسب شده، ولتاژ ۲۰ kV و دمای ۱۵°C، در نهایت به عنوان شرایط بهینه‌ی جداسازی الکتروفورتیکی انتخاب شدند.

۳-۲-۳- بهینه‌سازی شرایط پیش‌تغلیظ آنالین داخل ستونی FASI

به منظور دستیابی به حساسیت بالاتر، جداسازی مطلوب‌تر، کاهش حد تشخیص روش و زمانهای آنالیز کوتاه‌تر برای آنالیت تحت مطالعه، روش تراکم توده‌ای تقویت شده با میدان الکتریکی (FASI) به-عنوان یک استراتژی پیش‌تغلیظ آنالین نمونه، مورد بررسی و امکان‌سنجی قرار گرفته است؛ که این

¹ Aberrations

² Compromise

³ Stable baseline and minimum noise

راهبرد به دلیل حساسیت نسبتاً پایین دستگاه الکتروفورز موئین با ردیاب فرابنفش (CE-UV) و به دلیل کوتاه بودن طول مسیر نور^۱ در پنجره‌ی تشخیصی^۲ این روش، انتخاب شده است. لذا، به منظور امکان-سنجی تلفیق و در عین حال حصول حداکثر کارایی روش پیش‌تغلیظ انتخاب شده در حالت جفت شده با تکنیک استخراج الکتروغشایی خارج ستونی توسعه داده شده در مطالعه‌ی حاضر، تاثیرات پارامترهای مختلفی از قبیل ترکیب ماتریکس نمونه^۳، حضور و یا عدم حضور قاج آب قبل از تزریق و وارد کردن نمونه‌ی اصلی به داخل ستون (تاثیرات مربوط به مدت زمان تزریق پلاگ آب) و در نهایت شرایط مربوط به تزریق الکتروکنتیکی نمونه (ولتاژ و زمان تزریق الکتروکنتیک) بر عملکرد مناسب روش FASI، حین آنالیز با الکتروفورز موئین به تفصیل مورد بررسی قرار گرفته است.

به طور معمول تکنیک FASI، از طریق آماده کردن نمونه در محیط‌هایی با رسانایی الکتریکی کمتر از الکتروولیت زمینه (به عنوان مهمترین پارامتر در اجرای موفقیت آمیز FASI) انجام می‌شود؛ که این امر اغلب بوسیله‌ی رقیق‌سازی نمونه‌ی حاصل از استخراج خارج ستونی با بافر اجرایی و یا مخلوط کردن و در برخی از موارد، بازحل کردن (reconstituting) نمونه‌ی استخراج شده با استفاده از یک حلال خالص با رسانایی پایین، میسر می‌شود. جالب توجه است که یکی از چالش‌های عمده در تلفیق روش استخراج الکتروغشایی با تکنیک پیش‌تغلیظ توده‌ای آنالیز تقویت شده با میدان الکتریکی (FASI)، علی‌الخصوص در هنگام مطالعات آنالیت‌های بازی، شرایط اسیدی فاز پذیرنده می‌باشد که بایستی به دقت مد نظر قرار گیرد. لذا به منظور کاربرد روش FASI در موارد مربوط به ترکیب و پیکره‌ی نمونه‌های استخراج شده با روش الکتروغشایی، ماهیت اسیدی فاز پذیرنده ممکن است سبب افزایش رسانایی منطقه‌ی نمونه^۴ (sample zone) شود؛ که این امر به دلیل این واقعیت که رسانایی بافر جداسازی بایستی بیشتر از رسانایی قاج نمونه باشد [۱، ۱۸۶]، به عنوان یک چالش منفی برای اجرای روش FASI، تلقی می‌گردد. بنابراین، افزودن یک حلال آلی با رسانایی پایین (به عنوان اصلاحگر رقیق‌ساز نمونه) به احتمال زیاد می‌تواند امکان تلفیق روش FASI را با تکنیک استخراج الکتروغشایی فراهم کرده و حساسیت روش مذکور را آشکارا بهبود بخشد. با عنایت به موارد مذکور و همان‌طوری که قبلاً نیز مورد بحث قرار گرفته است، ایماتینیب مسیلات (IMM) یک داروی بازی است و شرایط اسیدی منجر به پروتونه شدن آن می‌گردد؛ لذا با بهره‌گیری و کاربرد تزریق الکتروکنتیک، آنالیت هدف پروتونه شده تمایل و استعداد بالایی را برای وارد شدن به ستون موئین نشان خواهد داد. ولی در مقابل، آنچه که حائز اهمیت است؛ این مهم می‌باشد که حضور یک حلال آلی به عنوان رقیق‌ساز نمونه‌های استخراج شده با روش الکتروغشایی، ممکن است سبب مهار یا ممانعت از یونیزاسیون آنالیت هدف در شرایط مذکور گشته و پیش‌تغلیظ

¹ short optical path length

² Detection window

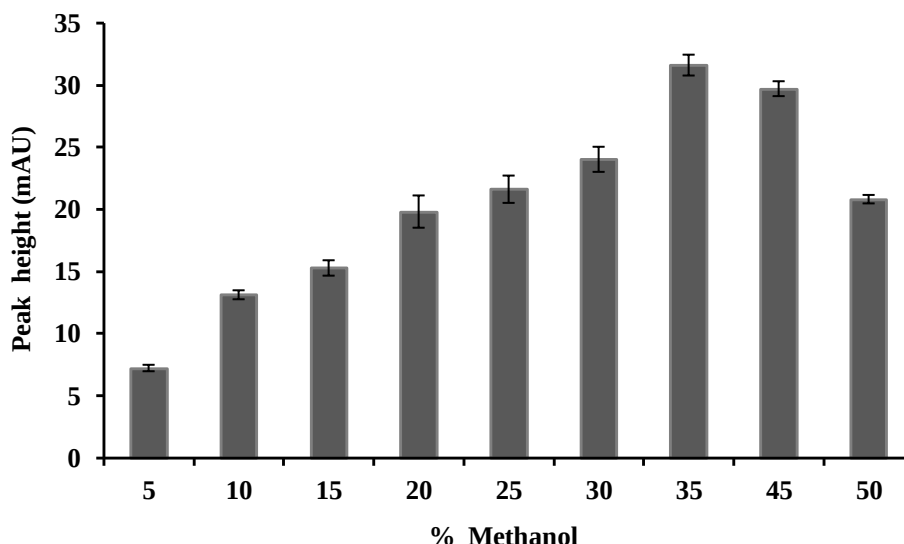
³ Composition of sample matrix

⁴ Sample zone

آنالین و تراکم نمونه‌ی ناموفقی را سبب شود [۳۲۵]. از اینرو، برای تضمین تزریق موفقیت‌آمیز و تغلیظ کارآمد نمونه‌ها، حفظ اسیدیته‌ی (شرایط اسیدی) نمونه‌های استخراج‌شده با روش الکتروغشایی (فاز پذیرنده) در حین رقیق‌سازی آنها، ضروری و دارای اهمیت بالایی است. بنابراین نوع و غلظت حلال آلی رقیق‌کننده‌ی نمونه‌های حاصل از استخراج الکتروغشایی بایستی بهینه گردد.

در مطالعه‌ی حاضر، اختلاط نمونه‌های استخراج‌شده به روش الکتروغشایی با الکترولیت زمینه (در شرایط حداقل ده بار رقیق‌شده) و همچنین اختلاط با آب خالص، نتایج رضایت‌بخشی را حاصل نکرد (آنالیت آشکارسازی نشد). لذا، تاثیر حضور (از طریق افزودن) حلالهای آلی مختلفی مانند متانول، استون و استونیتریل به عنوان حلال خالص رقیق‌ساز در نمونه‌های استخراج‌شده به روش الکتروغشایی، مورد ارزیابی قرار گرفت.

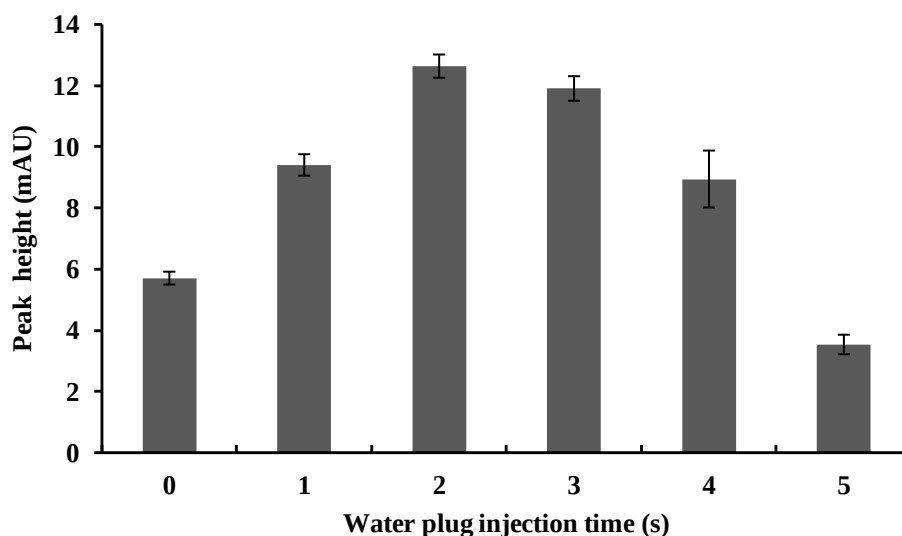
هنگام استفاده از هر سه حلال خالص اشاره شده‌ی بالا در درصدهای حجمی پایین (۰.۳٪)، تفاوت چشمگیری مشاهده نشد؛ ولی به دلیل انحلال‌پذیری پایین آنالیت دارویی هدف در حلالهای استونیتریل و استون، مشکل ترسیب آنالیت و به موازات آن، افزایش شدید نویز در خط‌زمینه در هنگام افزودن جداگانه‌ی درصدهای حجمی بالاتری از این دو حلال، مشاهده گردید. بنابراین و به عنوان یک استراتژی جایگزین برای رفع احتمالی مشکل فوق، قبل از انجام فرآیند رقیق‌سازی نمونه‌های استخراج‌شده، دو حلال استونیتریل و استون به صورت جداگانه با آب خالص (با خلوص کروماتوگرافی) مخلوط شدند و مخلوط‌های دوگانه‌ی حلالهای مذکور با آب خالص با درصدهای حجمی - حجمی مختلف، به عنوان اصلاحگر رقیق‌ساز، مورد بررسی و آزمایش قرار گرفتند. با این حال، بالاترین ارتفاع و سطح زیر پیک، هنگام استفاده از متانول خالص به عنوان حلال رقیق‌کننده مشاهده گردید. بر همین اساس، نسبت‌های مختلفی از متانول ($[v/v] 5-50\%$) به نمونه‌های استخراج‌شده با روش EME اضافه شد؛ و نمونه‌های فوق تحت شرایط اعمال ولتاژ تزریق ۱۰kV (به مدت ۱۰ ثانیه و سایر پارامترها در شرایط بهینه)، به ستون موئین تزریق شدند. قوی‌ترین سیگنال الکتروفورتیکی و بیشترین ارتفاع پیک همراه با پایداری رضایت‌بخش خط‌زمینه، با افزایش تدریجی غلظت متانول در نمونه‌های استخراج‌شده از ۵ به ۳۵٪ حجمی - حجمی، حاصل شد (شکل ۳-۲-۵). شایان ذکر است که هیچ‌گونه بهبود فراتری در شدت و ارتفاع پیک آنالیت، در نتیجه‌ی افزایش غلظتهای بیشتری از متانول (بیشتر از ۳۵٪)، مشاهده نگردید؛ ولی با این حال، زمان مهاجرت آنالیت در اثر افزودن غلظتهای بالاتری از متانول طولانی‌تر شد و افزایش پهنای پیک به همراه کاهش در ارتفاع و شدت سیگنال، مشاهده گردید. بنابراین و بر اساس نتایج حاصل، غلظت ۳۵٪ حجمی - حجمی متانول نسبت به فاز پذیرنده‌ی استخراج الکتروغشایی، به عنوان مناسب‌ترین انتخاب و بهترین شرایط حلال رقیق‌کننده‌ی نمونه‌ها، در آزمایشات بعدی مورد استفاده قرار گرفت.



شکل ۳-۲-۵- بهینه‌سازی شرایط و پارامترهای تزریق الکتروکنتیک برای پیش‌تغلیظ توده‌ای تقویت‌شده با میدان الکتریکی (FASI): "تأثیر ترکیب ماتریکس نمونه با افزایش غلظت حجمی - حجمی حلال رقیق‌ساز (متانول)"، (نشان- داده شده برحسب ارتفاع پیک آنالیت یا به عبارتی شدت سیگنال تجزیه‌ای و پاسخ ردیاب)؛ (شرایط جداسازی: ستون موئین با قطر داخلی ۵۰ میکرومتر (طول کل ۶۵ cm و طول موثر تا ردیاب ۵۳/۵ cm)، الکترولیت زمینه: ۱۰۰ میلی‌مولار NaH_2PO_4 (pH=۲)، طول موج آشکارسازی ۲۴۱nm، دمای ستون در حین جداسازی $1 \pm 15^\circ\text{C}$ درجه‌ی سانتی‌گراد، ولتاژ اعمالی برای جداسازی ۲۰kV، محلول نمونه: داروی ایماتینیب مسیلات در پلاسمای انسانی (با غلظت $10 \mu\text{g/ml}$) تزریق شده به ستون با ولتاژ ۱۰ کیلوولت و به مدت ۱۰ ثانیه.

در مراحل بعد، تاثیرات مربوط به سایر پارامترهای ذکر شده بر روی کارایی اجرای روش تراکم توده-ای نمونه (stacking)، مورد مطالعه قرار گرفته است. پیش‌تر نیز عنوان شد که عموماً در روشهای تزریق توده‌ای، پیش‌تزریق و وارد کردن یک قاچ آب، قبل از وارد کردن نمونه به ستون موئین می‌تواند شرایط تله (تَرپ) مانندی را فراهم کند که در اثر آن، آنالیتها قبل از جداسازی در الکترولیت زمینه، تجمع و متراکم می‌شوند و در نتیجه، کارایی و عملکرد روش FASI به دلیل امکان اعمال شدت مناسب‌تر میدان الکتریکی، بهبود بیشتری می‌یابد [۳۰۲]. لذا، تاثیر زمان تزریق هیدرودینامیک (فشاری) یک پلاگ باریک آب، قبل از وارد کردن الکتروکنتیکی نمونه (در شرایط ولتاژ تزریق ۱۰kV و به مدت ۱۰ s) به داخل ستون، مورد بررسی قرار گرفته است. بدین‌صورتکه، قبل از تزریق نمونه‌ی اصلی خروجی استخراج الکتروغشایی و رقیق‌سازی مناسب با حلال انتخابی (متانول)، یک پلاگ پیش‌تزریقی از آب با فشار ۵۰ میلی‌بار و برای مدت زمانهای مختلفی از صفر تا ۵ ثانیه، به داخل لوله‌ی موئین بارگذاری شد. نتایج بدست آمده که در شکل ۳-۲-۶ ارائه شده است، نشان می‌دهد که حساسیت و شدت سیگنال (ارتفاع پیک آنالیت) به موازات افزایش زمان پیش‌تزریق آب، از صفر (بدون پیش‌تزریق قاچ آب) به ۲ ثانیه، به-تدریج افزایش می‌یابد. همانطوری که ملاحظه می‌شود، افزایش زمان تزریق فشاری قاچ (پلاگ) آب به بیش از زمان ۲ ثانیه، سبب کاهش ارتفاع پیک مربوط به آنالیت می‌شود. از اینرو، پیش‌تزریق آب خالص

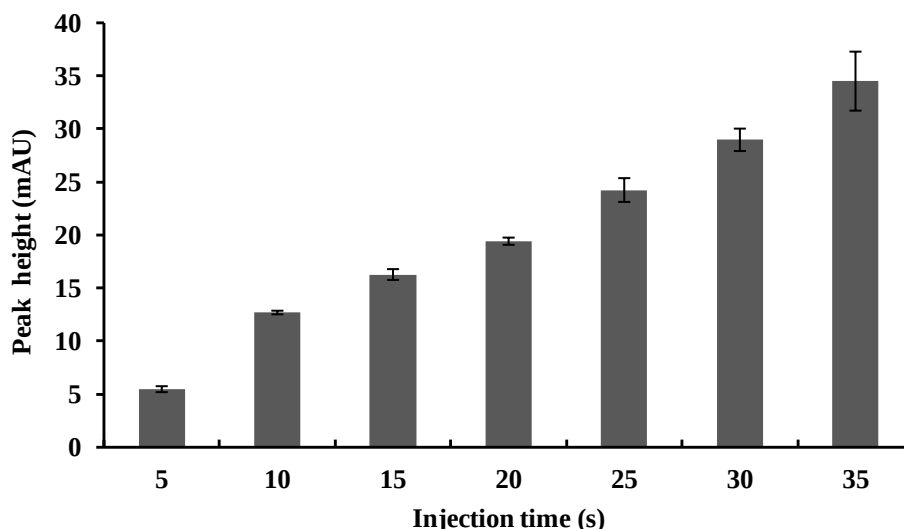
به مدت ۲ ثانیه و با فشار ثابت ۵۰ میلی بار، در کلیه آزمایشات بعدی و قبل از تزریق الکتروکنتیکی نمونه‌ها، انجام شده است.



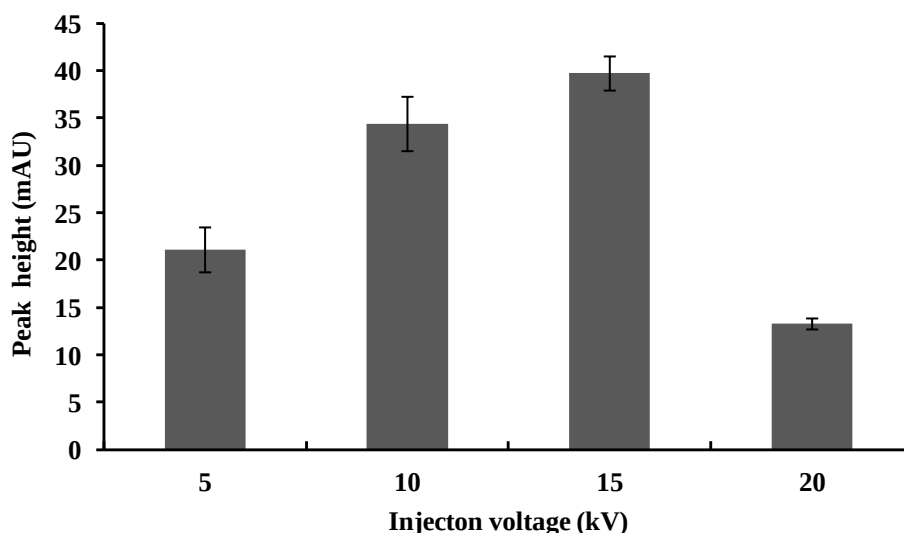
شکل ۳-۲-۶- بهینه‌سازی شرایط و پارامترهای تزریق الکتروکنتیک برای پیش‌تغلیظ توده‌ای تقویت‌شده با میدان الکتریکی (FASI): "تأثیر زمان پیش‌تزریق هیدرودینامیک قاج آب خالص قبل از وارد کردن نمونه"، (محلول نمونه: داروی ایماتینیب مسیلات در پلاسما انسانی (با غلظت ۱ $\mu\text{g/ml}$) تزریق شده به ستون با ولتاژ ۱۰ کیلوولت و به مدت ۱۰ ثانیه؛ سایر شرایط جداسازی و الکتروفورسیکی: مشابه شکل ۳-۲-۵).

همانطوری که به کرات تأکید شده است، تزریق الکتروکنتیک به دلیل قابلیت بالاتر آن در پیش-تغلیظ [۱۸۶] آنالیت‌های مورد مطالعه، برای وارد کردن نمونه‌ها به ستون موئین مورد استفاده قرار گرفته است. لذا تأثیرات زمان و ولتاژ تزریق، با اعمال این پارامترها به صورت متغیر از ۵ تا ۳۵ ثانیه (برای زمان تزریق) و از ۵ تا ۲۰ کیلوولت (برای ولتاژ تزریق) مورد بررسی قرار گرفتند. همانطور که به ترتیب در شکل‌های ۳-۲-۷ و ۳-۲-۸ نشان داده شده است، با اعمال تغییرات زمان تزریق الکتروکنتیک از ۵ تا ۳۵ ثانیه و تغییر ولتاژ اعمالی تا ۱۵ کیلوولت، ارتفاع پیک آنالیت مورد مطالعه، متناظراً افزایش یافته است. لذا در نهایت، بر اساس داده‌های حاصل از آزمایشات توسعه‌ی روش، شرایط مورد نیاز برای آنالیز FASI-CE، به صورت زیر بهینه و اعمال گردید: غلظت ۱۰۰ میلی مولار بافر سدیم دی‌هیدروژن فسفات (pH=۲) به عنوان ترکیب بهینه‌ی الکتروولت زمینه مورد استفاده قرار گرفت؛ در حالیکه تزریق نمونه‌ها به صورت الکتروکنتیکی و با اعمال ولتاژ ۱۵ kV به مدت ۳۵ ثانیه و پس از پیش‌تزریق اولیه‌ی یک قاج آب به مدت ۲ ثانیه و با فشار ۵۰ mbar به ستون موئین، صورت می‌گرفت. دمای جداسازی در تمام مراحل آزمایشات الکتروفورسیکی در 15 ± 0.1 درجه‌ی سانتی‌گراد ثابت نگه داشته می‌شد و ولتاژ اعمالی برای جداسازی ۲۰ kV انتخاب شده بود. همچنین، افزایش ۳۵٪ حجمی - حجمی متانول خالص نسبت به فاز پذیرنده‌ی استخراج الکتروغشایی، پس از اتمام فرآیند استخراج آفلاین و به عنوان مناسب‌ترین ترکیب

رقیق‌ساز نمونه‌های استخراج شده، به منظور آماده‌سازی آنها جهت آنالیز با تکنیک FASI-CE، انجام می‌گردید.



شکل ۳-۲-۷- بهینه‌سازی شرایط و پارامترهای تزریق الکتروکنتیک برای پیش‌تغلیظ توده‌ای تقویت‌شده با میدان-الکتریکی (FASI): "تأثیر زمان تزریق الکتروکنتیک نمونه"، (محلول نمونه: $1 \mu\text{g/ml}$ از داروی ایماتینیب مسیلات در نمونه‌های کنترل کیفی (QC) پلاسمای انسانی پس از انجام فرآیند استخراج الکتروغشایی مطابق روش بهینه شدهی IL-MWCNTs/ZnO-EME، تزریق شده به ستون با ولتاژ 10 kV پس از پیش‌تزریق هیدرودینامیک یک پلاگ باریک از آب خالص با فشار 50 mbar به مدت 2 ثانیه، سایر شرایط جداسازی و الکتروفوریزیکی: مشابه شکل ۳-۲-۵.



شکل ۳-۲-۸- بهینه‌سازی شرایط و پارامترهای تزریق الکتروکنتیک برای پیش‌تغلیظ توده‌ای تقویت‌شده با میدان-الکتریکی (FASI): "تأثیر ولتاژ تزریق نمونه"، (محلول نمونه: $1 \mu\text{g/ml}$ از داروی ایماتینیب مسیلات در نمونه‌های کنترل کیفی (QC) پلاسمای انسانی پس از انجام فرآیند استخراج الکتروغشایی مطابق روش بهینه شدهی IL-MWCNTs/ZnO-EME، تزریق شده به ستون به مدت 35 ثانیه پس از پیش‌تزریق هیدرودینامیک یک پلاگ باریک از آب خالص با فشار 50 mbar به مدت 2 ثانیه، سایر شرایط جداسازی و الکتروفوریزیکی: مشابه شکل ۳-۲-۵.

۳-۲-۴- بهینه‌سازی شرایط و پارامترهای استخراج الکتروغشایی

به منظور دستیابی به بیشینه کارایی استخراج EME و انتخاب شرایط آزمایشی بهینه، پارامترهای موثر بر روی عملکرد فرآیند استخراج الکتروغشایی توسعه داده شده، مورد ارزیابی و مطالعه قرار گرفته و بهینه‌سازی شده‌اند. جزئیات مربوط به مطالعات و آزمایشات انجام شده و پارامترهای بهینه شده از جمله: ترکیب غشای مایع تثبیت شده^۱ (نوع حلال مورد استفاده برای SLM و نوع و مقدار نانوجاذب پراکنده شده در حلال SLM انتخابی)، ولتاژ اعمالی برای استخراج، زمان استخراج، مقادیر pH فازهای دهنده و پذیرنده، سرعت همزدن و تحریک مکانیکی محلول نمونه (سرعت چرخش محلول نمونه) و اثر قدرت یونی محلول نمونه، در قسمت‌های بعدی مورد بحث قرار می‌گیرند. لازم به توضیح است که در تمامی مراحل بهینه‌سازی روش استخراج الکتروغشایی پیشنهادی، غلظت آغشته شده‌ی آنالیت هدف (غلظت اضافه شده به نمونه‌های پلاسما) ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بوده و کلیه‌ی آزمایشات در نمونه‌های پلاسمای انسان (نمونه‌های کنترل کیفی (QC))، انجام شده‌اند. همچنین تمامی آزمایشات سه بار تکرار شده و مقادیر میانگین حاصل از نتایج تکرارهای متعدد به همراه انحرافات استاندارد مربوطه، در محاسبات مربوطه لحاظ گردیده و گزارش شده‌اند.

۳-۲-۴-۱- انتخاب حلال آلی مورد استفاده به عنوان غشای مایع تثبیت شده (SLM)

عوامل متعددی باید در انتخاب یک حلال آلی ایده‌آل در نظر گرفته شود. در درجه‌ی اول، حلال مورد نظر باید رسانایی الکتریکی کافی داشته باشد تا امکان برقراری یک میدان الکتریکی پایدار و پیوسته^۲، بین فاز دهنده (DP) و فاز پذیرنده (AP) فراهم گردد. ثانیاً حلال آلی باید بخوبی با ساختار پلیمری غشای فیبر توخالی سازگار باشد تا ضمن پر کردن خلل و فرج فیبرهای مذکور، شرایط اشباع‌سازی کامل و تثبیت بدون نقص در منافذ دیواره‌ی فیبرها را فراهم نماید. در وهله‌ی سوم، حلال انتخاب شده باید خواص شیمیایی مناسبی داشته باشد تا مهاجرت الکتریکی ماده هدف یونی و انتقال آن از محلول نمونه به فاز پذیرنده را در سرتاسر غشای مورد استفاده، تسهیل کند. همچنین، حلال مورد ترجیح، باید ظرفیت و قابلیت پراکنده‌سازی و پخش‌کنندگی نانوجاذب مورد استفاده را به شکل مطلوبی دارا باشد. در عین حال، حلال آلی مذکور بایستی غیرقابل امتزاج با ماتریکس نمونه بوده (به منظور جلوگیری از هدررفت نمونه و نشست SLM به درون محلول آبی) و گرانش پایینی را به منظور فراهم نمودن ضرایب انتشار بالا و تسهیل انتقال جرم سریع آنالیت‌ها، داشته باشد [۳۲۷، ۳۲۸، ۳۲۹]. علاوه بر این، حلال مورد نظر ترجیحاً باید دارای پایداری کافی (فشار بخار پایین) باشد، تا در حین فرآیندهای استخراج الکتروغشایی و در مدت زمان اعمال ولتاژ، از اتلاف آن تحت تاثیر افزایش گرمای ژولی ناشی از میدان الکتریکی اعمالی، ممانعت بعمل آید [۳۲۸]. ذکر این نکته حائز اهمیت است که در نظر گرفتن و

^۱ Supported liquid membrane composition

^۲ Continuous

ملاحظات مربوط به شرایط و مشخصات فیزیکی و شیمیایی آنالیت هدف و تطبیق آن با حلالهای آلی مورد آزمایش، قبل از بررسی تمام موارد فوق ضروری خواهد بود.

آن گونه که از مطالعات علمی انجام گرفته و گزارشات منتشر شده در مراجع علمی معتبر به منظور استخراج و آنالیز آنالیت های دارویی بازی با استفاده از روش استخراج الکتروغشایی بر می آید، حلال های نیتروآروماتیکی^۱ (نیترو حلقوی)، خصوصیات عنوان شده در بالا را به شکل قابل توجهی دارا می باشند و بصورت موفقیت آمیزی در گستره های متنوعی از ولتاژهای اعمالی، به عنوان SLM های کارآمد، مورد استفاده قرار گرفته اند [۵۲]. بر همین اساس، برخی از حلال های مذکور که به صورت تجاری در دسترس بوده و متداولاً مورد استفاده قرار می گیرند، نظیر نیتروبنزن، ۱- اتیل-۲- نیتروبنزن، ایزوپروپیل نیتروبنزن و ۲- نیترو فیل اکتیل اتر (NPOE) در مطالعه ی حاضر مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نهایی بررسی های دقیق انجام شده نشان می دهد که در بین حلال های تست شده، NPOE مناسب ترین حلال برای دستیابی به بیشترین راندمان استخراج الکتروغشایی و بالاترین پاسخ تجزیه ای الکتروفورتیکی می باشد. بنابراین در مطالعه ی حاضر، NPOE به عنوان حلال SLM انتخاب شده و مورد استفاده قرار گرفته است.

۳-۲-۴-۲- تأثیر غلظت نانوکامپوزیت (نوع و مقدار نانوجاذب)

در روش استخراج الکتروغشایی توسعه داده شده، انتخابِ نانو جاذب مناسب برای دستیابی به پیش- تغلیظ رضایت بخش و استخراج موثر داروی ایماتینیب، از اهمیت بالایی برخوردار بود. عمدتاً در فرآیند EME، نانومواد به عنوان استخراج کننده های فاز جامد با مساحت سطح بالا در مقیاس نانو^۲ عمل می کنند. این مواد سایت های جذبی را فراهم می کنند که آنالیت ها می توانند از محلول نمونه، بر روی سطح آنها جذب سطحی شده و سپس به درون فاز پذیرنده، واجذب شوند. در مطالعه ی حاضر، تأثیرات مربوط به نوع و مقدار ماده ی نانوجاذب پخش شده در حلال SLM بر روی کارایی استخراج، با رویکرد بهینه سازی یکی در یک زمان ارزیابی شده است.

در مرحله ی اول، برای بررسی تأثیر حضور یا عدم حضور یک ماده ی نانوجاذب جامد در غشای مایع تثبیت شده (SLM)، بر روی عملکرد فرآیند استخراج الکتروغشایی، ۰/۲٪ وزنی- حجمی (۲mg/mL)، از هر کدام از نانومواد مورد استفاده در تهیه ی نانوکامپوزیت هیبریدی سنتزی در این مطالعه؛ مشتمل بر به ترتیب: نانولوله های کربنی چند دیواره ی خام (اصلاح نشده)، نانولوله های کربنی عامل دار شده به روش اکسیداسیون اسیدی (acid-functionalized MWCNTs)، کامپوزیت MWCNTs/ZnO و در نهایت نانوجاذب هیبریدی (IL-MWCNTs@ZnO) تهیه شده و پوشش داده شده با مایع یونی، به صورت جداگانه و تحت شرایط امواج فراصوت (التراسونیک) در NPOE (حلال SLM) پراکنده شده و سپس

¹ Nitro-aromatic solvents

² Nano-scale solid phase extractants

استخراج الکتروغشایی در شرایط یکسان و بهینه به صورت جداگانه با استفاده از فیبرهای توخالی تقویت شده با هر یک از مخلوطهای فوق الذکر (به عنوان یک مطالعه مقایسه‌ای) انجام شده است (برای آگاهی از نحوه تهیه فیبرهای مذکور با هر یک از نانومواد مورد اشاره و مراحل اجرای استخراج الکتروغشایی، به بخش ۲-۶-۲ مراجعه شود).

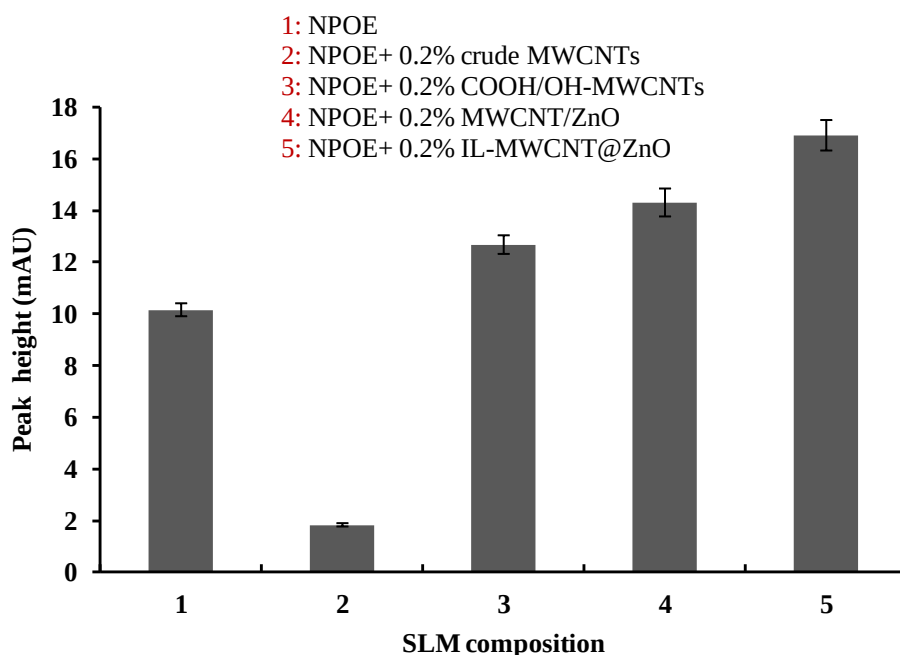
نتایج بدست آمده (شکل ۳-۲-۹) نشان می‌دهد که نانوکامپوزیت هیبریدی پوشش داده شده با مایع یونی ۱- اکتیل ۳- متیل ایمیدازولیوم بروماید ($[\text{OMIm}]\text{Br-MWCNTs@ZnO}$)، عملکرد و کارایی استخراجی بهتری را در مقایسه با روش EME-NPOE (استخراج الکتروغشایی ساده بدون استفاده از هر گونه نانومواد پراکنده شده در حلال SLM) و همچنین سایر موارد و آزمایشات تست شده ارائه می‌کند (استخراجهای الکتروغشایی جداگانه با استفاده از هر یک از نانومواد مذکور در بالا). این امر به احتمال زیاد شاید بخاطر این واقعیت باشد که نانوکامپوزیت هیبریدی IL-MWCNTs@ZnO ، به دلیل حضور گروه‌های نیتروژن دار^۱ می‌تواند به عنوان یک حامل مناسب‌تری عمل کند و همچنین نسبت به سایر نانوساختارهای تست شده، پراکندگی و قابلیت پخش‌شدگی بالاتری را در غشای مایع تثبیت شده، رقم بزند. همچنین قابل توجه است که، مایع یونی مورد استفاده یک ترکیب هتروسیکل واجد نیتروژن با رادیکال غنی از الکترون [۱۳۰] می‌باشد که احتمالاً می‌تواند از طریق برهمکنش $\pi-\pi$ ، تشکیل پیوند هیدروژنی و یا برهمکنش‌های آب‌گریزی با آنالیت مورد نظر، فعل و انفعال و تعامل داشته باشد. لذا بر اساس نتایج حاصل، ترکیب هیبریدی IL-MWCNTs@ZnO ، به عنوان نانوجاذب جامد مناسب برای مطالعات و مراحل بعدی، انتخاب و مورد استفاده قرار گرفته است. همان‌طوری که در شکل ۳-۲-۹ ملاحظه می‌شود، حضور نانولوله‌های کربنی تیمار نشده (بدون انجام فرآیند تخلیص و عامل‌دار کردن اسیدی) در حلال انتخابی SLM، سبب کاهش کارایی استخراج شده است؛ که دلایل متعددی را می‌توان برای این پدیده عنوان کرد: (۱) نانولوله‌های کربنی اصلاح نشده، بسیار بهتر و بیشتر از نانولوله‌های کربنی عامل‌دار شده، منافذ و تخلخلات فیبر غشایی توخالی را پُر و اشغال می‌نمایند؛ که این امر به دلیل لیپوفیلیته^۲ بالای نانولوله‌های کربنی خام در مقایسه با نانولوله‌های عامل‌دار شده می‌باشد که خود منجر به تمایل بسیار بالاتر نانومواد کربنی اصلاح نشده به غشایی پلی‌پروپیلنی آب‌گریز می‌گردد؛ (۲) تمایل بالاتر نانولوله‌های کربنی خام به ساختار غشایی فیبر توخالی، سبب مسدود شدن نسبتاً کامل منافذ فیبر مذکور و در نتیجه کاهش و کور شدن چشمگیر سایت‌های جذبی شده و عبور آنالیت هدف از فاز پذیرنده به فاز گیرنده از طریق ساختار متخلخل غشاء را با اخلاص مواجه می‌کند [۳۲۹]، (۳) موارد یاد شده در قسمت های (۱) و (۲)، سبب کاهش شدید مقاومت^۳ غشای مایع تثبیت شده بر سطح فیبر

^۱ Presence of N groups as well as higher dispersibility of this nano-material

^۲ Lipophilicity

^۳ Resistance of SLM

توخالی شده که سبب کاهش چشمگیر اثر میدان الکتریکی اعمالی و احتمال روی دادن پدیده‌ی الکترولیز می‌گردد؛ که در نهایت کارایی استخراج بسیار پایینی را به دنبال خواهد داشت.

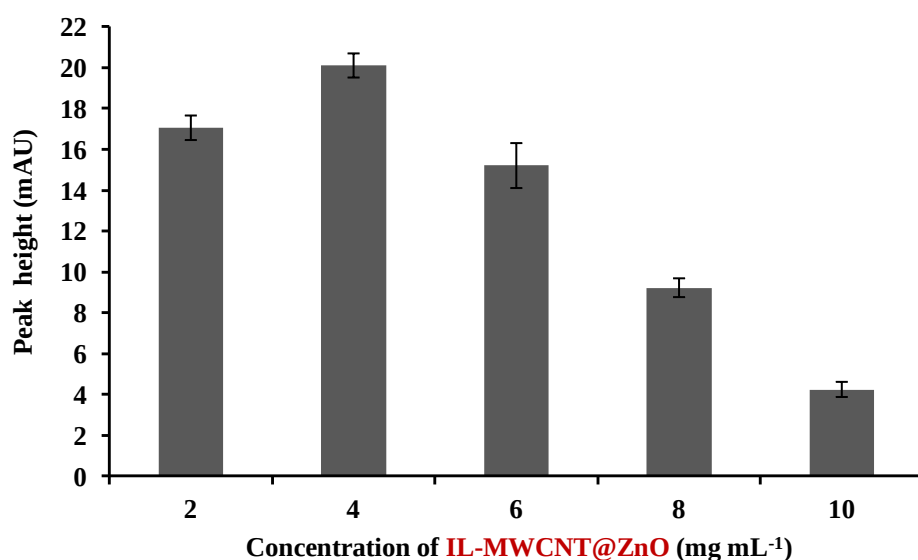


شکل ۳-۲-۹- بهینه‌سازی پارامترهای استخراج الکتروغشایی پیشنهادی: تاثیر افزودن مواد نانوجاذب به ترکیب غشای مایع تثبیت شده (SLM)، بر روی کارایی استخراج داروی ایماتینیب مسببات (نشان داده شده برحسب ارتفاع پیکها یا به عبارتی شدت سیگنال تجزیه‌ای و پاسخ ردیاب)؛ (شرایط استخراج: غلظت آغشته شده‌ی آنالیت هدف در نمونه‌های پلاسمای انسانی: ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر؛ حجم نمونه: ۴ میلی‌لیتر؛ فاز پذیرنده: ۳۰ میکرولیتر از محلول آبی هیدروکلریک اسید با غلظت (۱۵/۵ mM)؛ ولتاژ اعمالی: ۱۰۵ V؛ pH فازدهنده (محلول نمونه) برابر ۲؛ pH فاز-پذیرنده برابر ۸/۱؛ زمان استخراج: ۱۵ دقیقه؛ سرعت همزدن: ۸۰۰ دور در دقیقه؛ دمای استخراج: در دمای اتاق؛ طول فیبر: ۶ cm؛ بدون افزایش نمک؛ بدون افزایش نمک؛ شرایط جداسازی الکتروفورتیکی: ستون موئین از جنس سیلیکای گداخته با قطر داخلی ۵۰ میکرومتر (طول کل ۶۵ cm و طول موثر تا ردیاب ۵۳/۵ cm)، الکترولیت زمینه: ۱۰۰ میلی‌مولار NaH_2PO_4 (pH=۲)، طول موج آشکارسازی ۲۴۱nm، دمای ستون در حین جداسازی ۱۵±۰/۱ درجه‌ی سانتی‌گراد، ولتاژ اعمالی برای جداسازی ۲۰ kV. نوارهای خطا (error bars) نمایانگر انحراف استاندارد حاصل از سه بار تکرار هر آزمایش می‌باشند.

در مرحله‌ی بعدی بهینه‌سازی پارامترهای موثر بر کارایی استخراج الکتروغشایی، تاثیر غلظت نانو-جاذب هیبریدی ([OMIm]Br-MWCNTs@ZnO) انتخابی در حلال NPOE، بر روی قابلیت و کارایی استخراج، در محدوده‌ی غلظتی ۱۰-۲۰ mg/mL مورد بررسی قرار گرفته است. شکل ۳-۲-۱۰ نشان می‌دهد که شدت سیگنال و ارتفاع پیک آنالیت با افزایش غلظت IL-MWCNTs@ZnO تا ۴ mg/mL، بهبود پیدا کرده است. همانطوری که در شکل نیز مشهود است؛ ارتفاع پیک آنالیت و به تبع آن درصد بازیابی و کارایی استخراج، در غلظت‌های بالاتر کاهش یافته است؛ که به احتمال زیاد به دلیل انباشتگی^۱

^۱ Accumulation

تدریجی نانوکامپوزیت جامد در منافذ و حفرات فیبر غشایی پلی پروپیلنی می باشد که ممکن است به نوبه ی خود اصلی ترین عامل کاهش کارایی استخراج از طریق انسداد ساختار متخلخل غشاء باشد. علاوه بر این، مقادیر اضافی از IL-MWCNTs@ZnO، به مرور زمان منجر به تجمع و لختگی آن در مخلوط پخش شده می گردد [۱۵۴] که به عنوان یک عامل محدودکننده برای تثبیت موفقیت آمیز نانوجاذب در داخل منافذ فیبر توخالی، ظاهر می شود. شایان ذکر است که رفتار مشابهی در مطالعات اخیر منتشر شده در مراجع علمی معتبر، گزارش شده است [۸۴، ۱۵۴]. بنابراین، غلظت ۴ میلی گرم بر میلی لیتر از نانوجاذب هیبریدی (OMIm)Br-MWCNTs@ZnO در حلال ۲- نیتروفنیل اکتیل اتر، به عنوان بهترین ترکیب غشای مایع تثبیت شده^۱ (SLM) برای استخراج آنالیت دارویی ایماتینیب مسیلات با بهره گیری از تکنیک EME، مورد تایید قرار گرفت. در ضمن در مطالعه ی حاضر، مقادیر مختلفی از مایع-یونی انتخابی به عنوان عامل پوشش دهنده ی نانوکامپوزیت MWCNTs@ZnO، در گستره ی ۵-۲۰٪ (وزنی-وزنی) مورد استفاده قرار گرفته است (بخش ۲-۶-۳). بر مبنای نتایج حاصل، بالاترین شدت سیگنال، بیشترین ارتفاع پیک و بالاترین میزان غنی سازی، در مقدار ۱۵٪ w/w از مایع یونی به عنوان عامل پوششی، مشاهده گردید.



شکل ۳-۲-۱۰- تاثیر غلظت نانوکامپوزیت IL-MWCNTs@ZnO در حلال آلی، (به عنوان نانوجاذب جامد) بر روی کارایی استخراج الکتروغشایی داروی ایماتینیب مسیلات، (شرایط استخراج: غلظت آغشته شده ی آنالیت هدف در نمونه های پلاسمای انسانی: ۰/۵ میکروگرم بر میلی لیتر؛ حجم نمونه: ۴ میلی لیتر؛ حلال آلی: NPOE؛ ولتاژ اعمالی: ۱۰۵ V؛ فاز دهنده (pH=۲)؛ pH فاز پذیرنده برابر ۱/۸؛ زمان استخراج: ۱۵ دقیقه؛ سرعت همزدن: ۸۰۰ دور در دقیقه و بقیه ی شرایط استخراج و جداسازی مشابه شرایط مذکور در شکل ۳-۲-۹ می باشد.

¹ The best SLM composition

۳-۲-۴-۳- تأثیرات مربوط به ولتاژ و زمان استخراج الکتروغشایی

شرایط میدان الکتریکی اعمالی، به عنوان نیروی پیشران برای مهاجرت الکتریکی مولکول‌های هدف از سرتاسر غشای مایع تثبیت شده به درون فاز پذیرنده، پارامتر موثر و کلیدی دیگری در تکنیک استخراج الکتروغشایی می‌باشد که به دلیل تأثیر بسیار بالای ولتاژ اعمالی بر روی شار^۱ آنالیت‌ها، بایستی بدقت مورد ارزیابی قرارگیرد [۳۳۰]. لازم به تأکید است که در روشهای مبتنی بر استخراج الکتروغشایی، ولتاژ و زمان، دو پارامتر مهمی هستند که دارای تأثیرات موازی بر روی کارایی استخراج می‌باشند [۳۳۱]. جالب توجه است که مزایای تئوریک^۲ و اجرایی روش EME و همچنین کارایی استخراجی این تکنیک در نمونه‌های بیولوژیکی بویژه در محیط پلاسما، در مقایسه با روش مشابه ریزاستخراج فاز مایع مبتنی بر فیبر توخالی (HF-LPME) و نیز سایر روشهای آماده‌سازی، پیش‌تغلیظ و پاکسازی نمونه، بسیار برجسته و قابل توجه است. برتری این روش، عمدتاً به دلیل این واقعیت است که در نمونه‌های بیولوژیکی، اتصال بسیار بالای ترکیبات دارویی به پروتئین‌ها، می‌تواند دسترسی پذیری^۳ آنالیت‌های آزاد در محلولهای نمونه را کاهش داده و منجر به سینتیکهای کندتر فرایند استخراج و ایجاد محدودیتهای بالقوه در بازیابی آنالیت‌های هدف شود [۳۳۲]. در حالیکه در روش استخراج الکتروغشایی، اتصال دارو به پروتئین با اعمال یک پتانسیل الکتریکی به طور چشمگیری کاهش می‌یابد و داروی مورد آنالیز، بدون نیاز به مراحل و استراتژی‌های جانبی برای شکستن پیوند پروتئین-دارو (مانند روش ترسیب پروتئین)، براحتی آزاد می‌شود.

بنابراین در این مرحله از بهینه سازی کارایی استخراج، در ابتدا شرایط آزمایش به مدت ۱۵ دقیقه بدون اعمال پتانسیل الکتریکی (مشابه روش HF-LPME) مورد بررسی قرارگرفت. نتایج حاصل نشان می‌داد که در عدم حضور ولتاژ، استخراج آنالیت تقریباً صفر^۴ درصد بود (هیچ گونه سیگنالی مشاهده نشد)؛ که این نتیجه، تایید می‌نماید که پدیده‌ی انتشار^۵ آنالیت (همانند آنچه در روش ریزاستخراج فاز مایع مبتنی بر فیبر توخالی رخ می‌دهد)، هیچ سهم و نقشی در بهبود کارایی روش استخراج الکتروغشایی پیشنهادی ندارد.

در مرحله‌ی بعدی و به منظور تعیین مناسب‌ترین ولتاژ استخراج، یک سری از آزمایشات با اعمال ولتاژهای مختلف در گستره‌ی ۳۰ تا ۱۲۰ ولت انجام شد. استخراج و انتقال آنالیت به فاز پذیرنده (مشخص شده توسط مقایسه‌ی شدت سیگنال و ارتفاع پیکها) با افزایش و تثبیت ولتاژ اعمالی در ۱۰۵ ولت، بهبود یافت (شکل ۲-۱۱). با توجه به مستندات منتشر شده‌ی مربوط به گزارشات اخیر در

¹ Flux

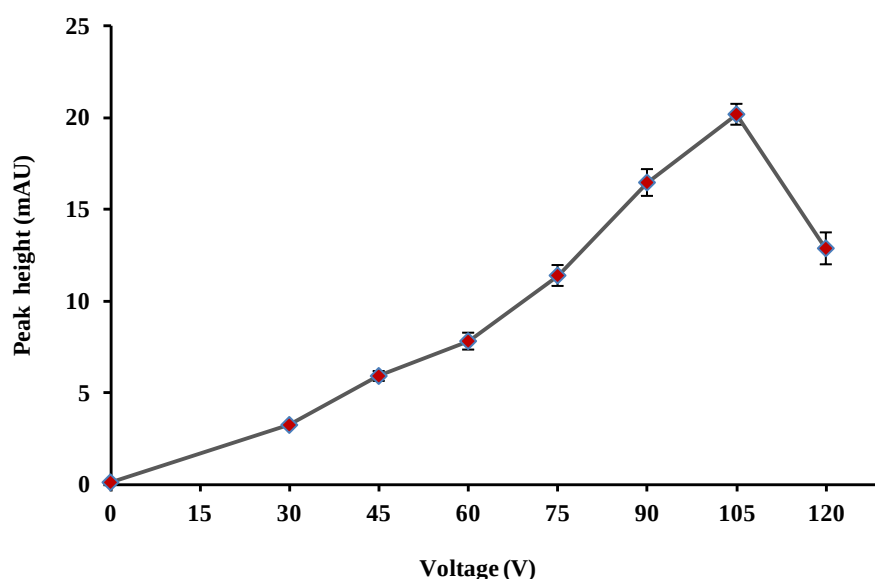
² Theoretical

³ Availability

⁴ Almost null

⁵ Diffusion of analyte

مراجع علمی [۵۷]، این بهبود در راندمان استخراج اینگونه توجیه می‌گردد که، ولتاژهای نسبتاً بالایی برای دستیابی به حداکثر کارایی استخراج یک آنالیت بازی در هنگام استفاده از ۲- نیتروفنیل اکتیل اتر به عنوان حلال غشای مایع تثبیت شده (SLM)، مورد نیاز و انتظار می‌باشد؛ چرا که رسانایی پایین و ثابت الکتریکی^۱ پایین‌تر این حلال در مقایسه با سایر حلالهای نیتروآروماتیک، امکان اعمال ولتاژهای بالاتری را بدون رخ دادن فرآیند الکترولیز و اتلاف غشای مایع تثبیت شده فراهم می‌نماید؛ که طبق تئوری استخراج الکتروغشایی، اعمال ولتاژهای بالاتر کارایی استخراج بالاتری را نیز به همراه خواهند داشت. از طرفی دیگر، وارد کردن و تثبیت یک ماده‌ی نانوجاذب جامد در منافذ فیبر توخالی، به احتمال بسیار زیاد سبب کاهش حجم منافذ^۲ فیبر می‌گردد؛ که این امر به نوبه‌ی خود سبب بالابردن پایداری غشای مایع تثبیت شده در روی فیبر توخالی تحت شرایط اعمال ولتاژهای بالاتر، در حین فرآیند استخراج می‌گردد.



شکل ۳-۲-۱۱- تاثیر ولتاژ اعمالی بر روی کارایی استخراج الکتروغشایی داروی ایماتینیب مسیلات، (شرایط استخراج: غلظت آغشته شده‌ی آنالیت هدف در نمونه‌های پلاسمای انسانی: ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر؛ حجم نمونه: ۴ میلی‌لیتر؛ ترکیب SLM: ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از نانوجاذب هیبریدی IL-MWCNTs@ZnO در حلال NPOE؛ زمان استخراج: ۱۵ دقیقه؛ سرعت همزدن: ۸۰۰ دور در دقیقه و بقیه‌ی شرایط استخراج و جداسازی مشابه شرایط مذکور در شکل‌های ۳-۲-۹ و ۳-۲-۱۰ می‌باشد.

¹ Electrical constant

² Pore volume

همانطوری که در شکل ۳-۲-۱۱ (صفحه‌ی قبل) مشاهده می‌شود، یک کاهش نسبتاً چشمگیر در شدت سیگنال و ارتفاع پیک استخراجی آنالیت در اثر افزایش بیشتر ولتاژ، رخ می‌دهد. ضمن اینکه با اعمال ولتاژ بالاتر از ۱۰۵ ولت ناپایداری شدیدی در جریان الکتریکی مشاهده شد، تشکیل حبابهای گاز در سطح الکتروود آند و اطراف فیبر محتوی فاز پذیرنده، به دلیل پدیده‌ی الکترولیز اتفاق افتاد. این امر سبب ناپایداری سیستم استخراجی و کاهش کارایی استخراج آنالیت و به تبع آن کاهش بازیابی گردید؛ که به صورت کاهش ارتفاع پیک در شکل مذکور نمایان است (در ولتاژ ۱۲۰ ولت). کاهش کارایی استخراج در ولتاژ اعمالی بالاتر، به دلیل تغییر در شرایط pH هر دو فاز پذیرنده و دهنده (به ویژه تغییر (شیفت)^۱ pH در فاز پذیرنده به دلیل پدیده‌ی الکترولیز) می‌گردد که ممکن است باعث استخراج برگشتی^۲ آنالیت راه‌یافته به فاز پذیرنده، به غشای مایع (SLM) و به دنبال آن برگشت به محلول نمونه (فاز دهنده) شود [۳۳۳].

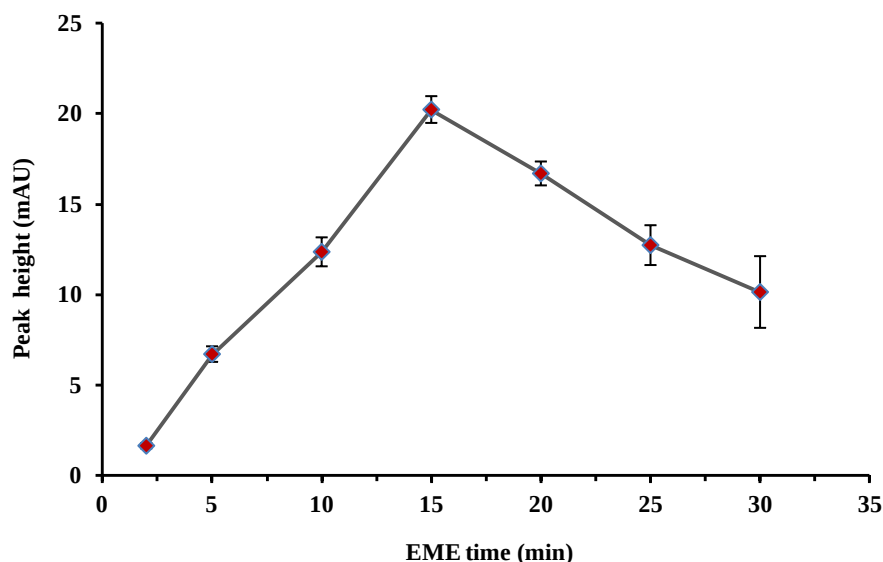
در ادامه‌ی مراحل بهینه‌سازی پارامترهای استخراج الکتروغشایی و به‌منظور بررسی تاثیر زمان استخراج بر کارایی روش و همچنین با عنایت به اینکه انتقال جرم در EME، یک فرآیند وابسته به زمان است، یک سری از آزمایشات در شرایط بهینه شده‌ی قبلی (ولتاژ ۱۰۵V با ترکیب SLM انتخابی) به عنوان تابعی از زمان (زمانهای استخراج مختلف در بازه‌ی ۲ تا ۳۰ دقیقه) انجام شده است. همانگونه که شکل ۳-۲-۱۲ آشکار می‌سازد، میزان آنالیت استخراج شده در مدت زمان ۱۵ دقیقه (با توجه به ارتفاع پیک آنالیت)، به بیشترین مقدار خود رسیده است. این در حالی است که، یک کاهش محسوس در ارتفاع پیک و شدت پاسخ دستگاه، در زمان‌های استخراج طولانی‌تر از ۱۵ دقیقه مشاهده می‌شود. این کاهش محسوس، ممکن است به دلیل استخراج برگشتی آنالیت به داخل SLM و یا مقاومت در برابر انتقال جرم^۳ و تشکیل یک لایه‌ی دوگانه از یونها در فصل مشترک^۴ هر دو طرف SLM، صورت پذیرد [۸۴، ۳۳۴]. چنین پدیده‌ای پیش از این نیز برای سیستم‌های استخراج الکتروغشایی گزارش شده است [۳۳۵]؛ که وقوع آن، این دیدگاه را تقویت می‌نماید که زمان لازم برای رسیدن به تعادل در روش استخراج الکتروغشایی برای آنالیت‌های مختلف، متفاوت است [۵۶، ۳۳۰]. لذا بر اساس نتایج مشاهده شده در شکل ۳-۲-۱۲ و دستیابی به یک کارایی استخراجی موثر و پایدار در این شرایط، ۱۰۵ ولت و ۱۵ دقیقه، به ترتیب به عنوان نیروی پیشران (ولتاژ) و زمان استخراج بهینه برای آزمایشات بعدی، تنظیم شدند.

¹ Shift

² Back-extraction

³ Mass transfer resistance

⁴ Built-up of a boundary layer of ions at the interfaces of both sides of the SLM



شکل ۳-۲-۱۲- تاثیر زمان استخراج بر روی کارایی استخراج الکتروغشایی داروی ایماتینیب مسیلات، (شرایط استخراج: غلظت آغشته شده آنالیت هدف در نمونه‌های پلاسمای انسانی: ۰/۵ میکروگرم بر میلی لیتر؛ حجم نمونه: ۴ میلی لیتر؛ ترکیب SLM: ۴ میلی گرم بر میلی لیتر از نانوجاذب هیبریدی IL-MWCNTs@Zn در حلال NPOE؛ ولتاژ اعمالی: ۱۰۵ ولت؛ سرعت همزدن: ۸۰۰ دور در دقیقه و بقیه‌ی شرایط استخراج و جداسازی مشابه شرایط مذکور در شکل‌های ۳-۲-۹ و ۳-۲-۱۰ می باشد.

۳-۲-۴- انتخاب ترکیب شیمیایی فازهای دهنده و پذیرنده و مقادیر pH آن‌ها

یکی از پیش شرط‌های اساسی در اغلب استخراج‌هایی که در حضور یک میدان الکتریکی انجام می‌گیرند، این است که آنالیت‌ها یا بایستی در فرم یونی خود باشند و یا باید یونیزه شوند تا امکان انجام فرآیند استخراج در حضور میدان الکتریکی، فراهم شود. در روش استخراج الکتروغشایی، یونیزاسیون آنالیت می‌تواند با ایجاد تغییرات و دستکاری^۱ در مقادیر pH فازهای دهنده و پذیرنده صورت پذیرد [۵۸]. همانطوری که قبلاً نیز ذکر شده است، داروی ایماتینیب مسیلات، یک ترکیب بازی (pKa=۱/۵۲-۸/۰۷) است؛ و از همین رو، این ترکیب در pHهای برابر ۶ و پایین‌تر از آن به صورت جزئی باردار بوده، در حالیکه در pHهای بالاتر از ۸ در حالت خنثی می‌باشد [۲۳۹، ۳۳۶]. به طور معمول برای آنالیت‌های بازی، استخراج الکتروغشایی بایستی با اعمال یک میدان الکتریکی و از یک نمونه‌ی (فاز دهنده) اسیدی به یک فاز پذیرنده‌ی اسیدی انجام شود [۳۳۷]. بر همین اساس در مطالعه‌ی حاضر، در درجه‌ی اول به دلیل ماهیت بازی آنالیت تحت مطالعه [۳۲۵]؛ در وهله‌ی دوم با هدف دستیابی به بیشینه مهاجرت الکتروکنتیکی یونهای آنالیت هدف؛ و در نهایت به سبب ضرورت سازگاری مطلوب فازهای پذیرنده و دهنده (به ویژه فاز پذیرنده) با الکترولیت زمینه‌ی اسیدی انتخاب شده برای آنالیز

¹ Manipulation

داروی ایماتینیب در مراحل بهینه‌سازی الکتروفورتیکی روش، انتخاب محلول‌های اسیدی برای فازهای پذیرنده و دهنده امری منطقی، معقول و از دیدگاه علمی قابل قبول به نظر می‌رسد. به ویژه اینکه، مقدار pH فاز پذیرنده بایستی به اندازه‌ی کافی پایین باشد تا (۱): آنالیت هدف را در حالت پروتونه حفظ کرده و از دپروتونه شدن^۱ جزئی آن در حین استخراج ممانعت بعمل آورد؛ (۲): مهاجرت آنالیت پروتونه‌شده به سمت الکتروُد منفی (کاتد) را تحت شرایط اعمالی میدان الکتریکی، فراهم کند؛ (۳): واجذب آنالیت را از ترکیب انتخابی SLM (حلال آلی/نانوجاذب هیبریدی) به درون فاز پذیرنده تسهیل نماید و (۴): از استخراج برگشتی آنالیت به فاز آلی غشای مایع تثبیت شده (حلال SLM) جلوگیری کند. لازم به توضیح است که، مورد آخر از اهمیت بالاتری برخوردار است چرا که؛ استخراج برگشتی آنالیت به فاز آلی، به احتمال بسیار زیاد به این دلیل می‌باشد که در نتیجه‌ی فرآیند الکترولیز، تغییرات افزایشی pH فاز پذیرنده در حین فرآیند استخراج الکتروغشایی، مورد انتظار است که این امر عمدتاً در هنگام کاربرد حجمهای پایین‌تری از فاز پذیرنده تشدید می‌گردد؛ لذا در موارد مربوط به آنالیز آنالیت‌های بازی، حفظ شرایط بهینه‌ی اسیدی در فاز پذیرنده، بسیار ضروری می‌نماید [۳۳۸]. از طرفی دیگر و با توجه به مبانی نظری استخراج الکتروغشایی، به خوبی مشخص است که نسبت غلظت یونی کل فاز دهنده به فاز پذیرنده^۲ که تحت عنوان تعادل یونی^۳ $[\chi]$ شناخته می‌شود، شار آنالیت را در سرتاسر غشاء تحت تاثیر قرار می‌دهد که این شار عبوری ممکن است در اثر افزایش نسبت فوق (تعادل یونی)، کاهش یابد [۳۳۱]. لذا عمدتاً در فرآیندهای استخراج الکتروغشایی ترکیبات بازی، با هدف کاهش پارامتر تعادل یونی در فاز پذیرنده و افزایش شار آنالیت، غلظت اسیدی فاز پذیرنده بیشتر از غلظت فاز دهنده انتخاب می‌گردد. با این حال در مطالعه‌ی حاضر، افزایش غلظت اسیدی فاز پذیرنده (افزایش غلظت HCl و تبع آن کاهش pH) با محدودیت بالایی مواجه بود که چالش اصلی این مطالعه در تلفیق روش استخراج الکتروغشایی با تکنیک FASI بود. چرا که به منظور افزایش حساسیت و بهبود عملکرد روش تغلیظ توده‌ای آنالین تقویت شده با میدان الکتریکی (FASI)، رسانایی قاچ نمونه بایستی کمتر از رسانایی الکترولیت زمینه باشد تا شرایط تراکم و پیش‌تغلیظ توده‌ای داخل ستونی نمونه فراهم گردد (برای آگاهی بیشتر از مکانیسم روش FASI به بخش ۱-۷-۲ مراجعه شود). لذا، افزایش بیشتر غلظت HCl در فاز پذیرنده از این جهت که سبب اختلاف ناچیز بین رسانایی الکتریکی نمونه‌های استخراج شده با الکترولیت زمینه می‌گردید، ناممکن به نظر می‌رسید. لذا در ابتدا، به منظور بررسی تکمیلی و همچنین با هدف ارزیابی تاثیر مقدار pH محلول پذیرنده بر روی کارایی استخراج الکتروغشایی، pH محلول نمونه (فاز دهنده) در مقدار ۲/۰ ثابت نگه داشته شد، در حالیکه pH فاز پذیرنده در بازه‌ی ۳-۱/۳ تغییر داده شد (توسط تغییر غلظت HCl در فاز پذیرنده) و تحت شرایط فوق، استخراجهای الکتروغشایی به مدت ۱۵ دقیقه انجام

¹ Deprotonation

² The ratio of the total ionic concentration of the donor phase to that of the acceptor phase

³ Ion balance

شده و محلولهای استخراجی پس از انجام رقیق سازی لازم با متانول که در بخش ۳-۲-۳ به تفصیل مورد بحث قرار گرفته است، تحت آنالیز با تکنیک FASI-CE قرار گرفتند. در این شرایط، بیشترین کارایی استخراج (بالاترین ارتفاع پیک آنالیت)، هنگام تنظیم pH محلول پذیرنده در مقدار ۱/۸ (با استفاده از محلول ۱۵/۵ mM هیدروکلریک اسید)، حاصل شد. در مرحله ی بعدی، تاثیر مقادیر مختلف pH در فاز دهنده (محلول نمونه) مورد بررسی قرار گرفت؛ در حالیکه pH فاز پذیرنده در مقدار ۱/۸ ثابت نگه داشته شده بود. نتایج حاصل نشان می داد که بیشترین ارتفاع پیک آنالیت و بالاترین شدت سیگنال تجزیه ای در $pH=2/0$ از محلول نمونه (تنظیم شده با استفاده از محلول ۱۰ mM هیدروکلریک اسید) در شرایط ثابت نگهداشتن pH محلول پذیرنده در مقدار ۱/۸، مشاهده گردید.

شایان ذکر است که با افزایش بیشتر pH فاز پذیرنده، مهاجرت الکتروکینتیکی آنالیت هدف و ارتفاع پیک مربوطه کاهش چشمگیری یافت؛ که این پدیده به احتمال زیاد ناشی از دیپروتونه شدن جزئی آنالیت بازی ایماتینیب در pH های بالاتر می باشد. همانطوری که انتظار می رفت، قابلیت استخراج داروی هدف، با ثابت نگه داشتن pH فاز پذیرنده در کمترین مقدار ممکن ($pH=1/8$) با توجه به محدودیت تلفیق با تکنیک FASI، افزایش معقولی یافته است. احتمالاً کاهش نسبی پارامتر تعادل یونی، به عنوان قاطع ترین دلیل بهبود کارایی استخراج الکتروغشایی تحت این شرایط، تلقی می شود. لازم به تاکید است که در این مطالعه، امکان ارزیابی بازیابی استخراج در غلظت های بالاتری از محلول آبی هیدروکلریک اسید ($pH=1$ ، 100 mM) به عنوان فاز پذیرنده وجود نداشت چرا که قدرت یونی و رسانایی بالای این محلول در نقش فاز پذیرنده، منجر به رفتار الکتروفورتیکی بسیار ضعیف نمونه های استخراج شده با روش الکتروغشایی تحت آنالیز با روش FASI-CE می گردید (سبب تغلیظ توده ای ناموفق می شد) که دلایل آن به تفصیل در بخش ۳-۲-۳، مورد بحث و بررسی قرار گرفته است. لذا با توجه به نتایج حاصل و توضیحات تکمیلی ارائه شده، pH های مربوط به فازهای دهنده و پذیرنده به ترتیب در مقادیر ۲/۰ و ۱/۸ برای مطالعات آتی تثبیت شدند.

۳-۲-۴-۵- تاثیر افزایش نمک

در حالت کلی در فرآیند استخراج الکتروغشایی، تاثیر پارامتر تعادل یونی (χ) در سرتاسر غشای مایع تثبیت شده، هنوز هم به اندازه ی کافی واضح و مشخص نیست [۳۲۷]. این بدین معنی است که طبق مستندات و مطالعات گسترده ی منتشر شده در مراجع علمی، تاثیر نمک به عنوان یک الکترولیت خارجی در فاز دهنده (محلول نمونه) بر روی کارایی استخراج الکتروغشایی، فرآیندی کاملاً وابسته به آنالیت مورد مطالعه می باشد [۳۲۷]. به ویژه از دیدگاه عملی، هنگامی که انتظار می رود نمونه های مورد مطالعه به صورت قابل ملاحظه ای از نظر محتوای یونی متفاوت باشند، شایسته است که تاثیر این پارامتر بر روی کارایی استخراج در اثنای توسعه ی روش، بدقت تحت بررسی قرار گیرد. ولی در مقابل و بر مبنای برخی دیگر از مقالات مروری منتشر شده در مراجع علمی [۷۱، ۵۵]، حضور مقادیر بالایی از مواد یونی

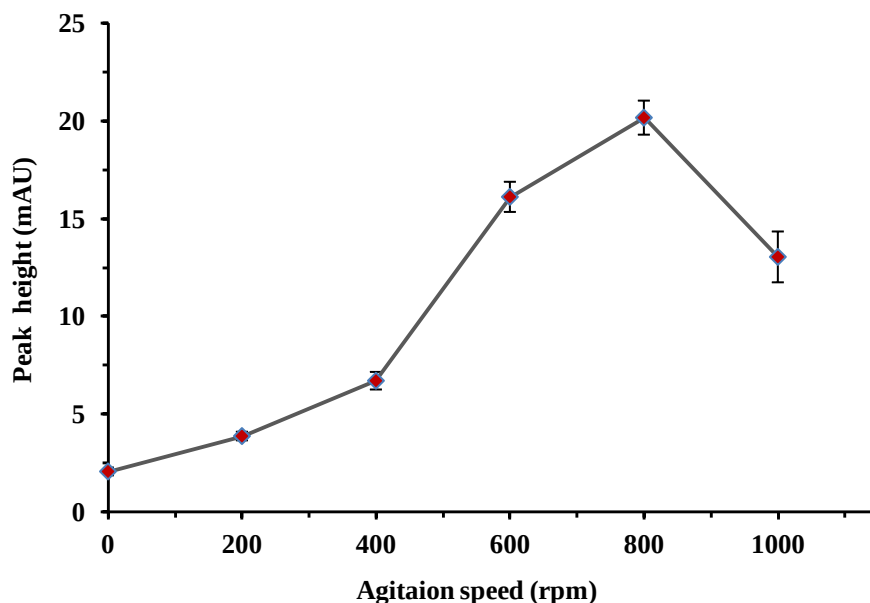
(به عنوان مثال حضور یک نمک یا الکترولیت در محلول دهنده) اغلب سبب افزایش قدرت یونی فاز-دهنده و متعاقب آن منجر به یک افزایش قابل ملاحظه در مقدار پارامتر تعادل یونی می‌گردد و در نتیجه، شار آنالیت را به صورت کلی در سرتاسر غشاء کاهش می‌دهد. بنا به دلایل ذکر شده، در مطالعه‌ی پیش رو و به عنوان مرحله‌ی بعدی بهینه‌سازی کارایی استخراج، این پارامتر در فاز دهنده و توسط افزودن نمک سدیم کلرید (در محدوده‌ی غلظتی ۱۵٪-۰ w/v) به درون محلول نمونه، مورد ارزیابی و مطالعه قرار گرفته است. نتایج آزمایشی حاصل نشان می‌داد که افزودن نمک به محلول نمونه، حتی در مقادیر اندک، به صورت محسوسی سبب کاهش کارایی استخراج می‌گردد. لذا بر مبنای نتایج مشاهده شده و به استناد مطالب فوق‌الذکر، عدم استفاده از یک الکترولیت خارجی در محلول نمونه، برای مطالعات بعدی ترجیح داده شد.

۳-۲-۴-۶- تأثیر سرعت هم‌زدن محلول نمونه

مطابق با اصول اجرایی و نظری روش استخراج الکتروغشایی، به‌خصوص در مواردی که حجم محلول نمونه (فاز دهنده) بالا باشد [۳۳۰]، با هدف اختلاط مناسب محلول دهنده، انتقال سریع جرم بواسطه‌ی کاهش ضخامت لایه‌ی دوگانه در اطراف SLM [۵۶] و در نهایت، کاهش زمان لازم برای رسیدن به تعادل ترمودینامیکی [۵۴]، کل سیستم استخراجی در ویال نمونه بایستی به صورت تحریک مکانیکی، متلاطم شود (یا به عبارتی محلول نمونه باید بهم‌زده شود) [۱۵۴]. بر همین اساس، سرعت هم‌زدن محلول نمونه نیز بایستی در روش استخراج الکتروغشایی بهینه‌سازی شود. بنابراین در آخرین مرحله از فرآیندهای بهینه‌سازی سیستم استخراج الکتروغشایی پیشنهادی، تأثیر سرعت هم‌زدن محلول نمونه (۱۰۰۰-۰ rpm) بر روی کارایی استخراج، با ثابت نگهداشتن سایر عوامل در مقادیر بهینه، بررسی شده است. ارتباط بین ارتفاع پیک آنالیت و سرعت هم‌زدن فاز دهنده، در شکل ۳-۲-۱۳ به تصویر کشیده شده است. همانطور که مشهود است، شدت سیگنال و ارتفاع پیک ترکیب هدف استخراج شده، متناظر با افزایش سرعت هم‌زدن محلول نمونه تا ۸۰۰ دور در دقیقه، افزایش پیدا کرده است. این افزایش در کارایی استخراج به احتمال زیاد به دلیل اثر همرفت^۱ و همچنین به واسطه‌ی افزایش تماس^۲ بین یون-های آنالیت و غشای محتوی فاز پذیرنده می‌باشد. همچنین ملاحظه می‌شود که در سرعت‌های بالاتر، کاهش قابل توجهی در کارایی استخراج روی می‌دهد (کاهش در ارتفاع پیک آنالیت)؛ که به احتمال زیاد به دلیل نشت تدریجی حلال آلی از SLM در سرعت‌های بالا و همچنین تشکیل حباب‌های گاز در محلول نمونه و متعاقب آن ناپایداری جریان در سیستم می‌باشد [۵۸].

^۱ Convection effect

^۲ Contact



شکل ۳-۲-۱۳- تاثیر سرعت هم‌زدن و تحریک مکانیکی بر روی کارایی استخراج الکتروغشایی داروی ایماتینیب مسیلات، (شرایط استخراج: غلظت آغشته شده‌ی آنالیت هدف در نمونه‌های پلاسمای انسانی: ۵/۰ میکروگرم بر میلی-لیتر؛ حجم نمونه: ۴ میلی‌لیتر؛ ترکیب SLM: ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از نانوجاذب هیبریدی IL-MWCNTs@ZnO در حلال NPOE؛ ولتاژ اعمالی: ۱۰۵ ولت؛ زمان استخراج: ۱۵ دقیقه و بقیه‌ی شرایط استخراج و جداسازی مشابه شرایط مذکور در شکل‌های ۳-۲-۹ و ۳-۲-۱۰ می‌باشد.

۳-۲-۵- معبرسازی زیست‌تجزیه‌ای روش پیشنهادی

همانطوری که قبلاً اشاره شده است، مطالعات معبرسازی روش پیشنهادی، طبق پروتکل و دستورالعمل تایید شده‌ی سازمان غذا و داروی ایالت متحده آمریکا (FDA) انجام شده است [۲۸۱]. پارامترهای مشتمل بر محدوده‌ی خطی منحنی عیارسنجی، حد تشخیص (LOD)، حد اندازه‌گیری (LOQ)، حد پایین اندازه‌گیری (LLOQ)، حد بالای اندازه‌گیری (ULOQ)، انتخابگری، دقت و تکرارپذیری‌های درون‌روز و بین‌روز، صحت، درصد بازیابی نسبی استخراج، پایداری آنالیت (پایداری دمای اتاق و پایداری در شرایط انجماد-ذوب) و استحکام^۱ روش، تحت شرایط بهینه‌ی آزمایشی از جمله مولفه‌هایی بودند که مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفتند.

داده‌های حاصل از میانگین سه منحنی کالیبراسیون با ماتریکس همسان^۲ (منحنی کالیبراسیون در نمونه‌های با پیکره‌ی همسان با نمونه‌های حقیقی و در محیط پلاسمای انسانی مورد بررسی قرار گرفته است)، که در سه روز مختلف غیرمتوالی ترسیم شده بودند، برای محاسبه‌ی پارامترهای خطی بودن (ضریب همبستگی، عرض از مبدا، شیب خط رگرسیون و سایر پارامترهای مربوطه) و همچنین مقادیر

^۱ Robustness

^۲ Matrix-matched calibration curves

انحراف استاندارد پارامترهای مذکور، مورد استفاده قرار گرفته است. برای آگاهی بیشتر در مورد شیوهی مطالعات معتبرسازی و کسب اطلاعات جامع تر راجع به روش و نحوه ی بررسی و محاسبه ی پارامترهای مختلف معتبرسازی روش، به بخشهای ۱-۵-۱-۳ تا ۵-۵-۱-۳ مراجعه شود.

۳-۲-۵-۱- منحنی کالیبراسیون، محدوده ی خطی دینامیکی و حساسیت

منحنی های کالیبراسیون (استاندارد)، با آغشته کردن (spiking) جداگانه ی نمونه های پلاسمای عاری از دارو با هفت غلظت مشخص و مختلف از آنالیت هدف و پس از انجام فرآیند استخراج الکتروغشایی و تزریق تحت شرایط بهینه، ترسیم شدند. شدت سیگنال و ارتفاع پیک ها متناسب با غلظت اسمی (مشخص شده) آنالیتها در فاز دهنده (محلول نمونه) بودند. به عبارت دیگر، منحنی های کالیبراسیون با ترسیم ارتفاع پیک های آنالیت بر حسب غلظت مشخص شده از هفت نمونه ی استاندارد پلازما و تحت شرایط بهینه ی روش حاصل شده اند؛ که در رنج غلظتی $25-1500 \text{ ng mL}^{-1}$ و با ضریب همبستگی ($R^2=0.998$) خطی بودند. خط رگرسیون برای تعیین غلظت آنالیتها در نمونه ها مورد استفاده قرار گرفته است. در ضمن، برای بررسی خطی بودن روش و محاسبه ی ضرایب همبستگی (R)، توان دوم ضریب همبستگی (R^2)، عرض از مبدا (y-intercept)، شیب خط رگرسیون و مقادیر انحراف استاندارد آنها (تمامی آزمایشات در هر غلظت، ۳ بار تکرار متوالی شده اند)، از میانگین داده های مربوط به سه منحنی کالیبراسیون مختلف (ترسیم شده در سه روز غیرمتوالی) استفاده شده است. حساسیت روش به واسطه ی تعیین حد تشخیص، حد اندازه گیری و حدود بالا و پایین اندازه گیری ارزیابی شده است.

جزئیات و داده های مربوط به منحنی کالیبراسیون به همراه پارامترهای حساسیت روش پیشنهادی و همچنین فاکتور غنی سازی (EF) و درصد بازده استخراج (ER%)، در جدول ۱-۲-۳ ارائه شده اند. با توجه به مستندات گزارش شده در مراجع علمی [۲۳۹، ۳۳۹]، محدوده ی خطی بدست آمده، به اندازه ی کافی وسیع بود که گستره ی غلظتی درمانی داروی ایما تینیب (therapeutic range) در مطالعات بالینی را پوشش دهد.

جدول ۳-۲-۱- نتایج و خصوصیات کمی معتبرسازی روش پیشنهادی EME-FASI-CE-UV برای آنالیز آنالیت هدف در نمونه‌های پلاسما.

پارامترهای تجزیه‌ای	مقادیر ^۱
محدوده‌ی خطی دینامیکی (ng mL ⁻¹)	۲۰-۱۵۰۰
شیب	۰/۰۴
انحراف استاندارد شیب (n=۳)	۰/۰۰۳
عرض از مبدا	۱/۲۶۴
انحراف استاندارد عرض از مبدا (n=۳)	۰/۲
توان دوم ضریب همبستگی (R ^۲)	۰/۹۹۸
تعداد نقاط داده‌ها	۷
حد تشخیص ^a (ng mL ⁻¹)	۶/۲۴
حد اندازه‌گیری ^b (ng mL ⁻¹)	۲۰
حد پایین اندازه‌گیری ^c (ng mL ⁻¹)	۲۰
حد بالای اندازه‌گیری ^d (ng mL ⁻¹)	۱۵۰۰
SD ± فاکتور غنی‌سازی ^e	۷۸±۲/۲
SD ± درصد بازده استخراج ^f	۷۹±۲/۲

^a Limit of detection (LOD)؛ $LOD=3 \times (S_b/a)$ ؛ S_b خطای استاندارد عرض از مبدا و a شیب منحنی کالیبراسیون.

^b Limit of quantification (LOQ)

^c Lower limit of quantification (LLOQ)

^d Upper limit of quantification (ULOQ)

^e Enrichment factor (EF)

^f Extraction recovery (ER%)

۳-۲-۵- دقت (تکرارپذیری)، صحت و درصد بازیابی (Recovery)

در این مطالعه دقت و صحت روش با انجام آزمایشات تکرارپذیری درون‌روز (n=۵) و بین‌روز (n=۵)، از طریق آنالیز نمونه‌های QC (اندازه‌گیری و آنالیز نمونه‌های پلاسمای آغشته شده به داروی هدف) تحت شرایط بهینه و در سه سطح غلظتی پایین، متوسط و بالا (۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر) مورد ارزیابی قرار گرفته و به ترتیب برحسب درصد انحراف استاندارد نسبی (RSD%) برای مطالعات مربوط به تکرارپذیری (دقت) و درصد خطای نسبی (RE%) برای مطالعات مربوط به صحت، تخمین زده و گزارش شده است (جدول ۳-۲-۲). توضیحاً اینکه، کلیه محاسبات بر مبنای پنج بار تکرار اندازه‌گیری‌ها، گزارش شده‌اند. شایان ذکر است که به موجب دستورالعمل FDA در آنالیزهای زیست‌تجزیه‌ای، مقادیر درصد انحراف استاندارد نسبی (RSD%) کمتر از ۲۰٪ برای LLOQ (حد پایین اندازه‌گیری) و کمتر از ۱۵٪ برای سایر سطوح غلظتی تست شده (میانگین و بالا)، قابل قبول و معتبر می‌باشد [۲۸۱، ۳۰۸]. همچنین، صحت روش پیشنهادی با محاسبه درصد خطاهای نسبی و با استفاده از رابطه‌ی ۳-۱ (به-

^۱ Values

صفحه‌ی ۱۴۱ رجوع شود)، محاسبه و گزارش شده است. همان‌طوریکه در جدول ۲-۲-۳ ملاحظه می‌شود، نتایج حاصل بصورت RSD% (درصد انحراف استاندارد نسبی میانگین) و RE% (خطای نسبی، درصد انحراف بین غلظت واقعی و غلظت اندازه‌گیری شده) نشان داده شده‌اند.

بررسی نتایج حاصل، مبرهن می‌کند که مقادیر میانگین درصد انحرافات استاندارد نسبی بدست آمده برای سنجش‌های دقت درون‌روز و بین‌روز (تاکیداً: میانگین مقادیر گزارش شده‌ی RSD%) مربوط به غلظت‌های مختلف ارزیابی شده در سه سطح غلظتی پایین، متوسط و بالا (۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر)، به ترتیب برابر ۶/۸۳ و ۷/۷۱ درصد محاسبه شده‌اند؛ درحالی که مقادیر درصد خطاهای نسبی (RE%) در محدوده‌ی ۶/۸۰ تا ۳/۸۶٪ بدست آمده است (که محدوده‌ی قابل‌قبول و معتبری برای صحت روش می‌باشد). شایان ذکر است که، بالاترین میزان درصد انحراف استاندارد نسبی (RSD%)، برای نمونه‌ی با غلظت ۵۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر مشاهده گردید؛ که در محدوده‌ی قابل‌قبولی بود (با توجه به دستورالعمل FDA). لذا با توجه به نتایج حاصل و با عنایت به گزاره‌های FDA، می‌توان دریافت که مقادیر محاسبه شده در گستره‌های قابل‌قبول و معتبری از منظر دستورالعمل‌های بین‌المللی بوده و بنابراین روش پیشنهادی از دقت و صحت کافی برخوردار است.

عموماً در مطالعات زیست‌تجزیه‌ای، دومین معیار برای ارزیابی صحت روش بر مبنای محاسبات بازیابی نسبی (RR%) آنالیت از نمونه‌های آغشته شده می‌باشد [۳۴۰]. بازیابی نسبی (RR%) روش، به صورت درصد نسبت غلظت‌های اندازه‌گیری شده بر غلظت‌های اسمی (آغشته‌شده‌ی) آنالیت تعریف می‌گردد. لذا در این مطالعه، محاسبات درصد بازیابی نیز به منظور بررسی و اثبات صحت روش پیش‌تغلیظ و پاکسازی نمونه‌ها، با استفاده از رابطه‌ی (۲-۳، صفحه‌ی ۱۴۲) انجام شده است. بدین‌صورتکه، نمونه‌های پلاسمای انسانی با سه سطح غلظتی مختلف از داروی ایماتینیب مسیلات آغشته شدند و این نمونه‌های QC، در معرض روش توسعه داده شده‌ی استخراج الکتروغشایی و به دنبال آن آنالیز با تکنیک FASI-CE، تحت شرایط بهینه شده قرار گرفتند. نتایج حاصل در جدول ۳-۲-۳ ارائه شده است. مقادیر درصد‌های بازیابی نسبی محاسبه شده (RR%)، در محدوده‌ی ۹۸ تا ۱۰۶٪ می‌باشند؛ که نمایانگر شایستگی و صلاحیت روش آماده‌سازی نمونه‌ی پیشنهادی، برای آنالیز ترکیب دارویی مورد نظر در نمونه‌های پلاسما می‌باشد.

جدول ۳-۲-۲- دقت و صحت روش برای اندازه‌گیری داروی مورد مطالعه در نمونه‌های پلاسمای کنترل کیفی (QC).

ایماتینیب مسیلات			غلظت آغشته شده (اسمی) (ng mL^{-1})
۱۰۰۰	۵۰۰	۵۰	
درون روز ($n=5^a$)			
۱۰۲۹/۳۰	۵۰۸/۰۰	۵۱/۷۸	غلظت اندازه‌گیری شده (ng mL^{-1})
۵/۵۳	۴/۲۷	۱۰/۶۸	دقت (RSD%)
۲/۹۳	۱/۶۰	۳/۵۶	صحت (RE%)
بین روز ($n=5^b$)			
۱۰۱۴/۷۶	۴۹۳/۸۸	۴۶/۶۰	غلظت اندازه‌گیری شده (ng mL^{-1})
۲/۱۳	۷/۵۵	۱۳/۴۶	دقت (RSD%)
۱/۴۷	-۱/۲۲	-۶/۸۰	صحت (RE%)

^a تعداد تکرارها

^b تعداد روزها

^c مقدار معین / (مقدار معین - مقدار بدست آمده) $\times 100 = \text{RE \%}$

جدول ۳-۲-۳- بازیابی‌های نسبی برای استخراج و آنالیز داروی ایماتینیب مسیلات در نمونه‌های پلاسمای آغشته به دارو در سه سطح غلظتی ۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ (با روش پیشنهادی IL-MWCNTs@ZnO-HF-EME-FASI-CE-UV).

ایماتینیب مسیلات			غلظت آغشته شده (ng mL^{-1} ؛ $n=5$)
۱۰۰۰	۵۰۰	۵۰	
۱۰۲۲±۵۷	۵۲۹±۲۴	۴۹±۶	غلظت اندازه‌گیری شده (ng mL^{-1}) $\pm \text{SD}^a$
۱۰۲±۸	۱۰۶±۵	۹۸±۱۳	درصد بازیابی نسبی، $\pm \text{SD}$ (RR%)

^a انحراف استاندارد برای ۵ بار اندازه‌گیری.

۳-۵-۲-۳- اختصاصی بودن (Specificity) و انتخابگری (Selectivity) روش

در مطالعه‌ی حاضر، احتمال حضور هرگونه عامل مزاحم و متداخل (بالقوه و بالفعل) درون‌زا^۱ با پیک آنالیت هدف، توسط تزریق نمونه‌های مختلفی از پلاسمای عاری از دارو (نمونه‌های پلاسمای شاهد مربوط به ۶ نفر از افراد سالم و در عین حال مخلوط پلاسمایی هر ۶ فرد)، پس از انجام مراحل آماده‌سازی و استخراج الکتروغشایی تحت شرایط بهینه‌ی روش و مطابق پروتکل‌های توضیح داده شده در قسمت‌های قبل، مورد مطالعه قرار گرفته است. شکل ۳-۲-۱۴ که نمایانگر الکتروفرودگرام‌های نوعی به ترتیب مربوط به نمونه‌ی پلاسمای شاهد و عاری از آنالیت (شکل ۳-۲-۱۴-الف) و یک نمونه‌ی پلاسمای آغشته شده با ترکیب دارویی ایماتینیب مسیلات در غلظت ۵۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد،

¹ Any potential/probable endogenous interferences

موید عدم مزاحمت یا تداخل عوامل درونی احتمالی و یا اجزای مربوط به نمونه‌های پلاسمای شاهد با پیک مربوط به آنالیت است. این بدین معنی است که تحت شرایط بهینه شده‌ی روش، هیچ پیک مزاحمی از ماتریکس پلاسما، مشاهده نگردید؛ که نشان دهنده‌ی این حقیقت است که روش پیشنهادی اختصاصی می‌باشد و تکنیک آماده‌سازی و پیش‌تیمار بهینه شده در این مطالعه، توانایی و قابلیت حذف و زدودن بسیاری از اجزای غیرهدف پیکره‌ی بیولوژیکی را دارا می‌باشد.

انتخابگری، به صورت توانایی و قابلیت یک روش در شناسایی و تمییز یک ترکیب در حضور سایر ترکیبات (مانند ناخالصی‌ها و عوامل مزاحم برون‌زا) تعریف می‌گردد [۳۴۱]. لذا در این مطالعه و به منظور بررسی انتخابگری روش، نمونه‌های پلاسما با یکی از ترکیبات دارویی کمک‌درمانی و همچنین برخی دیگر از داروهای آغشته شده‌اند (در غلظت‌های ۵۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر از هر ترکیب دارویی)؛ که گاه‌ها همراه با داروی ایماتینیب مسیلات و به منظور اهداف درمانی غیرمرتبط با سرطان بافت همبند دستگاه گوارشی (GIST) و عمدتاً با هدف کاهش عوارض جانبی شیمی‌درمانی با داروی مذکور، به بیماران مبتلا که مصرف‌کننده‌ی داروی ایماتینیب هستند، تجویز می‌گردد. داروهای تست شده‌ی مذکور برای مطالعات انتخابگری روش عبارتند از: تنوفویر^۱، آسپیرین (استیل‌سالیسیلیک اسید)، امپرازول، متوکلوپرامید، رانیتیدین، استامینوفن، آگزازپام، فلوکستین، کارودیلول و دیکلوفناک.

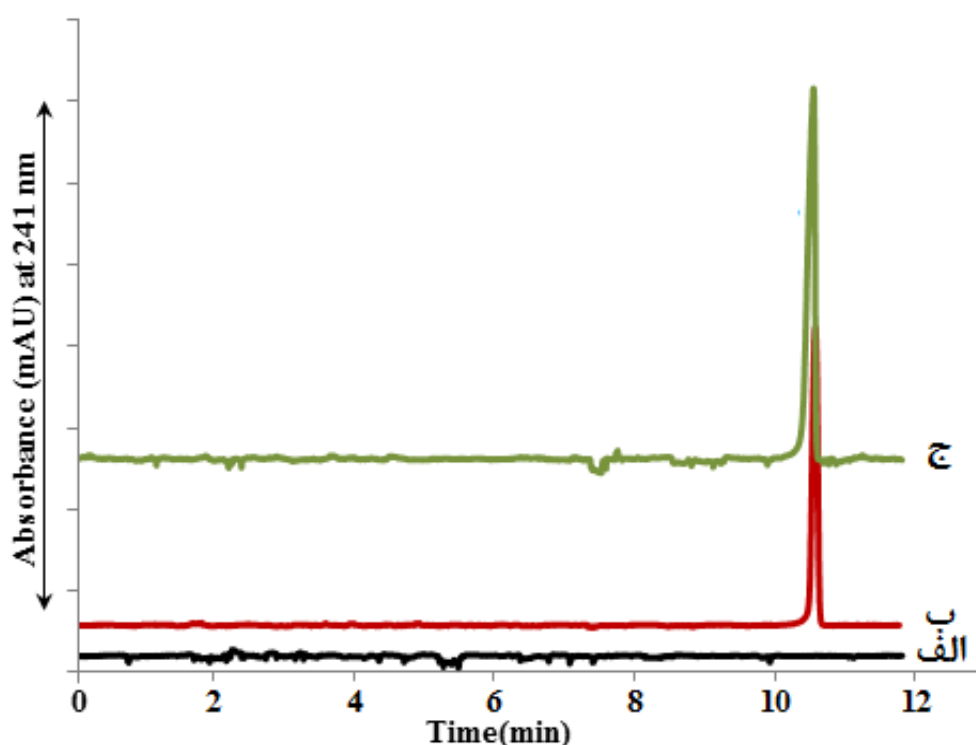
نمونه‌های مذکور سپس با استفاده از روش بهینه شده‌ی EME، استخراج شدند و تحت شرایط یکسان و در غلظت‌های $0.5 \mu\text{g/mL}$ از هر ترکیب دارویی، مطابق روش توسعه داده شده با تکنیک الکتروفورز موئن، آنالیز شدند. لازم به توضیح است که تزریق کلیه‌ی نمونه‌های مذکور به دستگاه CE، در شرایط بهینه انجام گرفته است. پاسخ تجزیه‌ای آنالیت ضد سرطان مورد نظر این مطالعه (IMM) در غلظت مربوط به حد پایین اندازه‌گیری (LLOQ) با پاسخ تجزیه‌ای (سیگنال) نمونه‌های پلاسمای آغشته شده با کلیه‌ی داروهای مذکور (در غلظت 500 ng/mL) مقایسه شده است. قابل توجه است که از میان داروهای تست شده، برخی از آنها مانند استامینوفن و دیکلوفناک داروهای اسیدی هستند و تحت شرایط بهینه شده‌ی استخراج الکتروغشایی در مطالعه‌ی حاضر، به دلیل عدم دارا بودن بار مثبت^۲ و عدم امکان پروتونه شدن در فازهای پذیرنده و دهنده‌ی انتخابی (شرایط اسیدی)، با استفاده از این روش قابل آنالیز نمی‌باشند. از طرفی دیگر، برای برخی دیگر از داروهای تست شده در مرحله‌ی بررسی و معتبرسازی انتخابگری روش، مانند تنوفویر (که ترکیبی بسیار آبدوست^۳ می‌باشد؛ $\text{Log P} = -1/6$) و همچنین برای داروهای اسیدی یاد شده، ترکیب حلال بهینه شده برای غشای مایع تثبیت شده (NPOE)، بسیار نامناسب و غیرکارآمد است؛ چراکه بر مبنای مستندات گزارش شده در حجم وسیعی از مقالات منتشر شده در مراجع علمی [۳۴۲]، حلال NPOE معمولاً برای ترکیبات با قطبیت بالا و ترکیبات آبدوست و

^۱ Tenofovir

^۲ Positive charge

^۳ Hydrophilic

همچنین برای ترکیبات دارویی اسیدی، کارایی بسیار ضعیفی دارد. این امر به این دلیل است که آنالیت‌های اسیدی تمایل بسیار پایینی را به حلال مذکور دارند و در عین حال با استفاده از این حلال به عنوان غشای مایع تثبیت شده در استخراج الکتروغشایی، آنالیت‌های آبدوست نیز انتقال و مهاجرت فوق-العاده پایینی را از نمونه‌های آبی به حلال آلی SLM، نشان می‌دهند [۶۸]. لذا بر مبنای نتایج حاصل، هیچ پیک مزاحم و یا همپوشانی پیک‌های سایر داروها با پیک ایماتینیب (مربوط به مزاحمت و تداخلات داروهای تست شده)، در زمان مهاجرت آنالیت هدف (۱۰/۶ دقیقه) و طول موج بهینه‌ی آنالیز (۲۴۱ nm)، مشاهده نگردید. این امر نشان می‌دهد که هیچ گونه‌ی دیگری بجز آنالیت تحت مطالعه، در نتایج کسب شده مشارکت نداشته و بنابراین تایید کننده‌ی انتخاب‌گری بالای روش پیشنهادی می‌باشد.



شکل ۳-۲-۱۴- الکتروفرودگرام‌های نوعی حاصل از تکنیک پیشنهادی در شرایط بهینه: (الف) پلاسمای انسانی شاهد (عاری از دارو)؛ (ب) پلاسمای انسانی آغشته شده با ۵۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر داروی هدف (IMM)؛ (ج) نمونه پلاسمای به دست آمده پس از مصرف خوراکی داروی ایماتینیب مسیلات (با برند Gleevec®) با دوز ۲۰۰ میلی‌گرمی توسط بیمار شماره‌ی یک (با کد K که فقط تحت درمان با داروی ایماتینیب مسیلات قرار داشت). شرایط آزمایشی مشتمل بر (شرایط استخراج و شرایط جداسازی الکتروفورتیکی) در بخش‌های ۲-۳-۲ و ۲-۳-۵ به تفصیل ارائه شده است و مشابه شکل ۳-۲-۹ می‌باشد.

۳-۲-۴-۵- پایداری و استحکام روش (Stability & Robustness)

از آنجایی که معمولاً آنالیزهای تجزیه‌ای بلافاصله و مستقیماً پس از جمع‌آوری نمونه‌های بیولوژیکی انجام نمی‌گیرد؛ بلکه این فرآیند مستلزم نمونه‌گیری، پردازش، تیمار، ذخیره و نگهداری نمونه‌های مذکور می‌باشد؛ از این رو پایداری آنالیت دارویی مورد مطالعه، بایستی تحت شرایط ذخیره‌سازی و نگهداری مربوطه، مورد بررسی قرار گیرد.

در مطالعه‌ی حاضر، به منظور ارزیابی پایداری آنالیت مورد نظر در پیکره‌ی پلاسما در فواصل زمانی ایجاد شده از نمونه‌گیری تا آنالیز، دو شیوه و روش مختلف مشتمل بر (الف): مطالعات پایداری کوتاه مدت (نمونه‌های پلاسمای آغشته شده در سه سطح غلظتی پایین، متوسط و بالا تهیه شده و قبل از آنالیز به مدت ۱۲ ساعت در دمای محیط قرار داده شدند) و (ب): مطالعات پایداری انجماد-ذوب (مجموعه‌ای از نمونه‌های آغشته شده با سه سطح غلظتی مختلف از داروی هدف در پلاسمای انسانی تهیه شده و به مدت ۲۴ منجمد شده‌اند و پس از سه بار تکرار چرخه‌ی انجماد-ذوب، آنالیز شده‌اند). چرخه‌های انجماد-ذوب (سه بار منجمد کردن و مجدداً ذوب کردن در شرایط دمایی ۲۰- تا ۲۵+ درجه-ی سانتی‌گراد) به این ترتیب انجام و سه بار تکرار شده‌اند؛ (۱): نمونه‌های پلاسمای آغشته شده به داروی هدف در سه سطح غلظتی تهیه شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد منجمد شدند؛ (۲): نمونه‌های منجمد شده تا ذوب شدن کامل، در دمای محیط به حال خود رها شدند؛ (۳): نمونه‌های ذوب شده (یخ‌زدایی شده) بدون انجام هیچ فرآیندی مجدداً به مدت ۲۴ ساعت منجمد شدند. این فرآیند دوبار دیگر تکرار شده و در نهایت نمونه‌های پلاسما پس از سومین بار یخ‌زدایی در دمای محیط، مطابق روش بهینه شده آنالیز شده و مقادیر غلظتی داروی هدف در آنها، اندازه‌گیری شده است.

نتایج حاصل در جدول ۳-۲-۴ آورده شده است. همانطوری که مشهود است، مقادیر درصد خطاهای نسبی (RE%) محاسبه شده برای تستهای پایداری، در بازه‌ی بین ۷- تا ۶٪ متغیر بوده و دقت‌های میانگین کمتر از ۱۵٪ محاسبه شده است ($RSD\% < 15$)؛ که نشان می‌دهد داروی مذکور در شرایط نگهداری و ذخیره‌سازی مختلف (نگهداری به مدت ۱۲ ساعت در دمای اتاق و همچنین نگهداری در شرایط فرایندهای انجماد-ذوب متوالی از دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد تا دمای محیط)، دارای پایداری قابل اعتماد^۱ و رضایت بخشی در ماتریکس مورد مطالعه (پلاسمای انسانی) می‌باشد.

¹ Reliable

جدول ۳-۲-۴- نتایج و داده‌های حاصل از مطالعات پایداری برای استخراج و اندازه‌گیری ایماتینیب میسیلات در نمونه‌های کنترل کیفی پلاسما (QC) با استفاده از روش پیشنهادی.

ایماتینیب میسیلات			
غلظت آغشته شده (اسمی) (ng mL^{-1} ; $n=3$)	میانگین غلظت اندازه‌گیری شده (ng mL^{-1}) $\pm \text{SD}^a$	صحت (RE %)	درصد بازیابی $\pm \text{SD}$
پایداری در دمای اتاق			
۵۰	۴۹ $\pm$ ۴	-۲	۹۸ $\pm$ ۶
۵۰۰	۵۱۶ $\pm$ ۲۰	۳	۱۰۳ $\pm$ ۵
۱۰۰۰	۱۰۳۷ $\pm$ ۴۱	۴	۱۰۴ $\pm$ ۴
پایداری در شرایط انجماد-ذوب			
۵۰	۵۳ $\pm$ ۳	۶	۱۰۶ $\pm$ ۱۰
۵۰۰	۴۸۶ $\pm$ ۱۳	-۳	۹۷ $\pm$ ۳
۱۰۰۰	۹۲۸ $\pm$ ۳۶	-۷	۹۳ $\pm$ ۴

^a انحراف استاندارد برای $n=3$

در این مطالعه همچنین، تست استحکام روش پیشنهادی (Robustness)، با اعمال تغییرات جزئی ولی بصورت عمدی و طراحی شده در برخی از پارامترهای شرایط جداسازی روش، به شرح زیر انجام شده است: تغییرات جزئی در غلظت الکترولیت زمینه (± 2 میلی مولار)؛ تغییرات در pH الکترولیت زمینه (± 0.1 واحد pH)؛ تغییرات در ولتاژ جداسازی (± 0.5 کیلوولت) و تغییرات عمدی در دمای ستون موئین ($\pm 1^\circ\text{C}$). تحت شرایط تغییر یافته مذکور، نمونه‌های پلاسما (QC) با داروی ایماتینیب در غلظتهای ۵۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر (غلظت حد متوسط اندازه‌گیری) آغشته شده و تحت شرایط بهینه‌سازی شده‌ی روش توسعه یافته در این مطالعه (EME-FASI-CE-UV)، در معرض آنالیز قرار گرفتند. نتایج بدست آمده که در جدول ۳-۲-۵ خلاصه شده است، نشان می‌دهند که درصدهای بازیابی نسبی (RR%) در محدوده‌ی مابین ۹۳ تا ۱۰۴٪ متغیر می‌باشند و در عین حال این نتایج، تایید می‌نمایند که تغییرات ناچیز اعمال شده در شرایط آزمایشی روش، تاثیرات قابل‌ملاحظه‌ای بر روی نتایج آنالیز نداشته؛ و بنابراین مؤید استحکام و سختی روش پیشنهادی، در جریان مطالعات معتبرسازی می‌باشد.

جدول ۳-۲-۵- ارزیابی سختی و استحکام روش پیشنهادی برای استخراج و آنالیز ایماتینیب مسیلات در نمونه‌های پلاسمای آغشته شده؛ در سه سطح مختلف از تغییرات اعمال شده در شرایط جداسازی.

دارو	سطح	غلظت آغشته شده (اسمی) (ng mL ⁻¹ ؛ n=۳)	غلظت اندازه‌گیری شده (ng mL ⁻¹) ±SD (n=۳)	صحت (RE %)	درصد بازیابی ± SD
ایماتینیب- مسیلات	۱	۵۰۰	۴۹۴±۱۰	-۱	۹۹±۲
	۲	۵۰۰	۵۱۹±۱۳	۴	۱۰۴±۲
	۳	۵۰۰	۴۷۶±۱۶	-۷	۹۳±۳
سطح ۱: pH بافر: ۱/۹، غلظت بافر: ۹۸mM، ولتاژ اعمالی: ۱۹/۵kV، دمای جداسازی ۱۴°C.					
سطح ۲: pH بافر: ۲، غلظت بافر: ۱۰۰mM، ولتاژ اعمالی: ۲۰kV، دمای جداسازی ۱۵°C.					
سطح ۳: pH بافر: ۲/۱، غلظت بافر: ۱۰۲mM، ولتاژ اعمالی: ۲۰/۵kV، دمای جداسازی ۱۶°C.					

۳-۲-۶- کاربرد روش در نمونه‌های حقیقی و بالینی بیماران مبتلا به سرطان GIST

همانگونه که پیش از نیز این اشاره شده است، پژوهش حاضر اولین گزارش درباره تلفیق روش استخراج الکتروغشایی با تکنیک FASI-CE برای اندازه‌گیری و آنالیز کمی داروی ایماتینیب مسیلات در پیکره‌ی پلاسمای انسانی می‌باشد. لذا به منظور اثبات قابلیت و انطباق این روش جدید پیشنهادی، نمونه‌های پلاسما (بالینی) از چهار بیمار مبتلا به سرطان بافت همبند دستگاه گوارشی (GIST) که تحت درمان خوراکی با داروی ایماتینیب مسیلات با برند گلوپیک® بودند و رضایت نام‌هی مورد تایید کمیته‌ی اخلاق مرکز تحقیقات گوارش و کبد ایران را امضاء نموده بودند، جمع‌آوری شده و پس از انجام مراحل لازم تحت شرایط بهینه شده‌ی روش، آنالیز شدند. جزئیات مربوط به اطلاعات بیماران و نحوه‌ی نمونه‌گیری به همراه سطح غلظتی اندازه‌گیری شده‌ی داروی ایماتینیب مسیلات در نمونه‌های پلاسمای مربوط به هریک از بیماران داوطلب، در جدول ۳-۲-۶ ارائه شده است. مقادیر کمی و غلظتی داروی موجود در پلاسمای بیماران بر اساس منحنی کالیبراسیون حاصل از مرحله‌ی معتبرسازی روش، محاسبه شده است.

الکتروفرورگرامهای نوعی به ترتیب مربوط به نمونه‌ی پلاسمای آغشته شده با غلظت ۵۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر از آنالیت دارویی و نمونه‌ی پلاسمای بیمار شماره ۱ با کد K، که داروی ایماتینیب مسیلات را در دوز ۲۰۰ میلی‌گرم در یک روز مصرف کرده بود، در شکل‌های ۳-۲-۱۴ (ب) و ۳-۲-۱۴ (ج) ارائه شده است. همانطوری که مشاهده می‌شود، هیچ پیکی مربوط به عوامل مزاحم در حین آنالیز داروی مذکور در نمونه‌های پلاسما مشاهده نمی‌شود؛ که حاکی از شایستگی و قابل‌اعتماد بودن روش پیشنهادی برای کاربرد در مطالعات کلینیکی می‌باشد.

شایان ذکر است که با توجه به داده‌ها، اطلاعات و گزارشات متعدد ارائه شده و منتشر شده در مراجع علمی مختلف، مقادیر بدست آمده برای سطح غلظتی داروی ایماتینیب در نمونه‌های حقیقی مربوط به بیماران مختلف دریافت کننده داروی مذکور، در گستره‌ی غلظتی قابل انتظار و قابل قبولی بود [۲۵۱، ۲۶۴، ۳۴۵-۳۴۳]. به عنوان یک نتیجه‌ی کلی و به زعم نگارنده، این روش پیشنهادی برای اهداف سنجش سطح غلظتی درمانی و همچنین مطالعات پایش دارویی و فارماکوکینتیکی بر روی این عامل دارویی شیمی درمانی پراهمیت و پرمصرف، از حساسیت تجزیه‌ای کافی برخوردار بوده و می‌تواند به عنوانی جایگزین مناسبی برای روشهای پرهزینه و پیچیده‌تر، مورد استفاده قرار گرفته و ترجیح داده شود.

جدول ۳-۲-۶- نتایج و برخی از جزئیات نمونه‌های حقیقی (پلاسمای جدا شده از خون) مربوط به بیماران مبتلا به سرطان GIST، که برای تعیین سطح غلظتی داروی ایماتینیب مسیلات با استفاده از روش پیشنهادی، آنالیز شده‌اند.

شماره	جنسیت	سن (سال)	وزن (Kg)	دوز دارو (میلی گرم/روز)	ساعت مصرف	ساعت نمونه گیری	غلظت اندازه گیری شده $(ng mL^{-1}) \pm SD (n=3)$
۱	مرد	۵۶	۶۶	۲۰۰	۱۱ صبح	۱۴ عصر	569 ± 8
۲	مرد	۶۵	۶۰	۲۰۰	۱۳:۴۵ عصر	۱۷:۳۰ عصر	746 ± 5
۳	زن	۷۵	۹۶	۳۰۰	۱۰:۳۰ صبح	۱۳:۳۰ عصر	372 ± 6
۴	زن	۵۹	۵۳	۴۰۰	۱۸ عصر	۲۱ شب	1378 ± 23

^a سه بار تکرار آنالیز (n=۳).

۳-۲-۷- مقایسه‌ی روش پیشنهادی جدید با سایر روش‌های گزارش شده در مراجع علمی

به منظور ارزیابی مزایا و معایب روش پیشنهادی در این مطالعه برای اندازه‌گیری سطوح و مقادیر غلظتی داروی شیمی درمانی ایماتینیب مسیلات در مایعات فیزیولوژیکی بدن (پیکره‌ی زیستی)، مقایسه‌ای با سایر روشهای مبتنی بر تکنیک الکتروفورز موئن (CE) از جنبه‌ی خصوصیات مختلف روش، از قبیل: حد تشخیص، حد اندازه‌گیری، محدوده‌ی خطی، پارامترهای توسعه و معتبرسازی تجزیه‌ای و همچنین تکنیک پیش تیمار و آماده‌سازی نمونه، انجام شده است و اطلاعات لازم در جدول ۳-۲-۷، گردآوری شده است. همانطوری که مشهود است در اغلب روشهای گزارش شده‌ی قبلی، از رویکردهای آماده‌سازی نمونه‌ی سنتی و متداول، مانند استخراج مایع- مایع (LLE) و استخراج فاز جامد (SPE) برای اهداف پاکسازی، استخراج و پیش‌تغلیظ آفلاین آنالیت، استفاده شده است که روشهای مذکور مستلزم و دربرگیرنده‌ی مراحل اجرایی زمان‌بر و نسبتاً پرهزینه یا دشوار و همچنین مصرف حجمهای زیادی از حلالهای آلی پرخطر، قبل از فرآیند آنالیز می‌باشند. در مقابل، روش پیشنهادی موضوع این مطالعه (EME)، در مقایسه با تکنیک‌های یاد شده، به مقادیر ناچیزی از حلالهای آلی (مانند متانول و NPOE) نیاز دارد؛ که میزان مصرف آنها در این مطالعه چندین برابر کمتر از روشهای استخراج سنتی گزارش شده در جدول ۳-۲-۷ می‌باشد. همچنین در مواردی که از ردیاب‌های تجاری فرابنفش (UV) و

آرایه دیودی (DAD) استفاده شده است، حد تشخیص‌های بدست آمده به طور معنی‌دار و قابل‌توجهی بالاتر از حدتشخیص حاصل از این روش پیشنهادی می‌باشند. بایستی توجه داشت که حدتشخیص مطلوب‌تر و پایین‌تری که صرفاً در یک مقاله‌ی منتشر شده‌ی قبلی [۲۶۸] (اشاره شده در جدول ۳-۲-۷) و بدون کاربرد رویکرد پیش‌تغلیظ آنالین داخل‌ستونی گزارش شده است، مدیون استفاده از تکنیک CE-ESI-TOF-MS می‌باشد که از مزایای آشکارساز طیف‌سنجی جرمی تلفیق شده با آنالیزور زمان پرواز^۱ (TOF) بهره‌مند بوده و بطور قابل‌ملاحظه‌ای حساس‌تر از آشکارساز فرابنفش مورد استفاده در مطالعه‌ی حاضر می‌باشد (آشکارساز فرابنفش دارای حساسیت ذاتی پایینی است). در عین حال، تلفیق تکنیک الکتروفورز موئین با طیف‌سنجی جرمی (CE-MS) به اندازه‌ی روش CE-UV متداول و معمول نیست؛ لذا با در نظر داشتن این واقعیت و با عنایت به این که روش استخراج الکتروغشایی، در نمونه‌های بیولوژیکی نسبتاً ساده‌تر و کارآمدتر از سایر روشهای استخراجی عمل می‌کند، این امر به عنوان یکی از نقاط قوت و مزیت پژوهش حاضر، قابل تلقی است. همچنین یکی دیگر از مزایای این روش، عدم نیاز به تجهیزات و سیستمهای فیزیکی و دستگاهی جانبی، در تلفیق تکنیک پیش‌تغلیظ آنالین مورد استفاده در مطالعه‌ی حاضر (FASI)، با دستگاه الکتروفورز موئین می‌باشد.

جدول ۳-۲-۷- مقایسه‌ی روش پیشنهادی EME-FASI-CE-UV با سایر روش‌های مبتنی بر تکنیک الکتروفورز موئین که تاکنون برای تشخیص و اندازه‌گیری داروی ایماتینیب مسیلات در مایعات بیولوژیکی (نمونه‌های انسانی)، گزارش شده‌اند.

روش جداسازی	آشکارساز (ردیاب)	ماتریکس	آماده‌سازی نمونه	پارامترهای معتبرسازی شده	LOQ و LOD (ng mL ⁻¹)	Linear range (ng mL ⁻¹)	مرجع
NACE ^۲	DAD	ادرار	SPE	محدوده‌ی خطی، دقت، صحت و انتخابگری	۸۰ و ۲۴	۵۰۰-۶۰۰۰	[۲۳۶]
CE	DAD	پلاسما	LLE	محدوده‌ی خطی، دقت، بازیابی، انتخابگری و پایداری	ND و ۱۲۵	۱۲۵-۵۰۰۰	[۲۶۴]
CZE ^۴	DAD	ادرار	رقیق سازی ^۳	گزارش شده بدون معتبرسازی روش	۳۰۰ و ۱۰۰	۴۰۰-۳۰۰۰۰	[۳۳۶]
NACE	DAD	ادرار	SPE	معتبرسازی جزئی (بدون بررسی انتخابگری و استحکام روش)	۴۴۰ و ۱۳۰	۵۰۰-۱۰۰۰۰۰	[۳۴۶]
CE	ESI-TOF-MS ^۵	پلاسما	LLE-SPE	فقط دقت و صحت	۲۰ و ۵	۰-۱۵۰۰	[۲۶۸]
FASI-CE	UV	پلاسما	EME	معتبرسازی کامل کلیه پارامترها مطابق دستورالعمل FAD	۲۰ و ۶/۲	۲۰-۱۵۰۰	کار حاضر

CZE: Capillary zone electrophoresis; DAD: Diode array detector; NACE: Nonaqueous capillary electrophoresis; SPE: Solid phase extraction; LLE: Liquid-liquid extraction; ESI-TOF-MS: Electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry; EME: electro-membrane extraction; FASI: Field amplified sample injection; ND: No reported data.

¹ Time-of-flight mass spectrometry

² Nonaqueous capillary electrophoresis(NACE)

³ Dilution

⁴ Capillary zone electrophoresis (CZE)

⁵ Electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry

همچنین، برخی دیگر از تکنیکهای کروماتوگرافی گزارش شده در مراجع علمی برای اندازه‌گیری کمی داروی شیمی‌درمانی ایماتینیب مسیلات در ماتریکسهای بیولوژیکی، به همراه خصوصیات کمی روشهای مذکور، نظیر حد تشخیص، حد اندازه‌گیری، نوع پیکره‌ی نمونه، استراتژی مورد استفاده در آماده‌سازی نمونه و محدوده‌ی خطی، در جدول ۳-۲-۸ خلاصه شده‌اند. قابل توجه است که اکثر روشهای لیست شده در جدول مذکور، از تکنولوژی‌ها و رویکردهای تجزیه‌ای پیچیده، گاهاً قدرتمند و در عین حال پرهزینه‌ی دستگاهی/آشکارسازی، مانند LC-MS و LC-MS-MS که ذاتاً بسیار حساس‌تر از روش CE-UV هستند، برای اندازه‌گیری و تعیین داروی ایماتینیب مسیلات بهره برده‌اند. ذکر این نکته خالی از لطف نیست که در کنار پرهزینه بودن، زمان بر بودن آنالیز و مراحل قبل از آنالیز با استفاده از روشهای مذکور نسبت به روش پیشنهادی این مطالعه، می‌تواند به عنوان محدودیت و نقطه‌ی ضعف آنها برای آنالیزهای روتین و روزمره محسوب شود.

ولی آنچه که حائز اهمیت است و تحت عنوان نتیجه‌ی کلی مقایسات صورت گرفته قابل ذکر می‌باشد، این است که حساسیت بالاتر و مقادیر حدود تشخیص و اندازه‌گیری پایین‌تر و مطلوب‌تری از تکنیک‌های فوق انتظار می‌رود؛ که به عنوان مزایا و نقاط قوت آنها و در حقیقت بصورت ایراد اصلی روش پیشنهادی حاضر، مطرح می‌گردد. با این حال، نگاهی جامع‌تر به مطالعات منتشر شده‌ی لیست شده در جدول ۳-۲-۸ نشان می‌دهد که روشهای HPLC-DAD و HPLC-UV (لیست شده در جدول مذکور) که از آشکارساز مشابهی با ردیاب مورد استفاده در کار حاضر، استفاده کرده‌اند و با برخی از تکنیکهای آماده‌سازی یا استخراج زمان‌بر و نسبتاً خسته‌کننده^۱ مانند SPE، LLE و روش تعویض آنالین ستون^۲ تلفیق شده‌اند؛ حد تشخیص‌های بالاتر و یا در برخی از موارد، قابل‌مقایسه^۳ با حد تشخیص حاصل از این روش، ارائه نموده‌اند. اگرچه با استفاده از تکنیک LC/LC-MS-MS مقدار بسیار پایین حد اندازه‌گیری (۰/۰۳ ng/mL) قابل دستیابی بوده است [۲۶۵]، اما این دستگاه بسیار گرانبه‌ایست و هزینه‌بر بوده و در اکثر مراکز تحقیقاتی و دانشگاهی به سهولت قابل دسترسی نیست.

^۱ Tedious

^۲ On-line column switching

^۳ Comparable

جدول ۳-۲-۸- مرور و مقایسه‌ای بر برخی از روش‌های تجزیه‌ای (صرفاً روشهای کروماتوگرافی) گزارش شده در مراجع علمی برای تعیین، تشخیص و اندازه‌گیری کمی داروی ایماتینیب مسیلات (IMM) در پیکره‌ها و نمونه‌های زیستی.

روش تجزیه‌ای و آشکارسازی	ماتریکس (پیکره)	روش آماده‌سازی نمونه	Linear range (ng mL ⁻¹)	LOQ (ng mL ⁻¹)	LOD (ng mL ⁻¹)	مرجع
HPLC-UV	پلاسمای انسان	استخراج فاز جامد	۱۰۰-۵۰۰	۵۰	۱۰	[۳۴۷]
LC-MS-MS	پلاسمای انسان، گلبول‌های قرمز خون ^۱	ترسیب پروتئین	۱-۱۰۰۰	۲/۱	۰/۶۸	[۳۴۸]
HPLC-DAD	پلاسمای انسان	ترسیب پروتئین	۸۰-۴۰۰۰	۸۰	-	[۲۵۶]
HPLC-MS	پلاسمای انسان	ترسیب پروتئین	۷۸/۱-۱۰۰۰۰	۷۸/۱	۳۰	[۲۵۵]
LC-MS-MS	پلاسمای انسان	ترسیب پروتئین	۱-۱۰۰۰۰	۱	۰/۳	[۲۱]
LC-MS-MS	پلاسمای انسان	ترسیب پروتئین	۱-۱۰۰۰	۱	-	[۳۴۹]
LC-MS-MS	پلاسمای انسان	ترسیب پروتئین	۴-۱۰۰۰۰	۴	-	[۲۵۱]
LC-MS	پلاسمای انسان	استخراج فاز جامد	۸/۳۵-۸۳۵۰	۸/۳۵	-	[۳۵۰]
HPLC-UV	پلاسمای انسان	ترسیب پروتئین	۵۰-۲۵۰۰۰	۳۰	-	[۳۴۳]
LC-MS-MS	پلاسمای انسان	استخراج مایع-مایع	۱۰-۵۰۰۰	۱۰	-	[۳۵۱]
LC-MS-MS	پلاسمای انسان	ترسیب پروتئین	۱۰۰-۵۰۰۰	۴/۱	۱/۲۴	[۳۵۲]
HPLC-UV	پلاسمای انسان	ترسیب پروتئین به-همراه سوئیچینگ ^۲	۱۰-۲۰۰۰۰	-	۱۰	[۳۵۳]
LC-MS-MS	پلاسمای انسان	استخراج فاز جامد	۹/۵۸-۴۵۱۳/۲۹	۹/۵۸	-	[۳۵۴]
HPLC-UV	پلاسمای انسان	استخراج مایع-مایع	۱۰-۱۰۰۰۰	۱۰	-	[۲۵۷]
HPLC-UV	پلاسمای انسان	استخراج مایع-مایع	۶۲/۵-۶۰۰۰	۶۲/۵	-	[۲۶۶]
UPLC-MS-MS	پلاسمای آغشته شده ^۴ به دارو	الترافیلتراسیون ^۳	۱۰-۲۰۰۰	۱۰	-	[۲۴۱]
LC-MS	مغز استخوان انسان ^۵	استخراج فاز جامد	۱-۱۵۰۰	۵	۰/۳	[۲۶۷]
LC-MS-MS	پلاسمای انسان	استخراج مایع-مایع	۵-۵۰۰۰	۵	-	[۳۵۵]
LC/LC-MS/MS	خون انسان و محیط کشت ^۶	ترسیب پروتئین	۰/۰۳-۷۵	۰/۰۳	-	[۲۶۵]

¹ Red blood cells (RBCs)

² Switching technique

³ Ultra-filtration

⁴ Spiked plasma

⁵ Human bone marrow

⁶ Human whole blood and cell culture

فصل چهارم:

نتیجه‌گیری، چشم‌اندازها و پیشنهادات

۴-۱- نتیجه‌گیری

در حال حاضر، سرطان در حال تبدیل شدن به مرگبارترین بیماری در سرتاسر جهان است و به همین دلیل است که دانشمندان در حال پژوهشهای بیشتر و تکمیلی بر روی توسعه‌ی روشهای درمانی و نیز کشف و تایید داروها و سیستم‌های درمانی نوین هستند. در هنگام توسعه‌ی روشهای درمانی از طریق ترکیبات دارویی جدید، دو پارامتر زمان و مقرون‌بصر فگی، مهمترین عواملی هستند که بایستی مدنظر قرار گیرند. بی‌تردید، اولین رویکرد در بررسی تاثیرات دارویی ضد سرطان، صرف نظر از غربالگری علائم بالینی بیمار، مطالعات فارماکوکینتیک و فارماکودینامیک ترکیبات دارویی ضدسرطان و همچنین سنجش سطح غلظتی درمانی داروهای شیمی‌درمانی به ویژه در موارد مصرف خوراکی می‌باشد؛ که این امر به منظور دستیابی به بهترین کارایی درمان و به حداقل رسانیدن عوارض جانبی مرتبط با مصرف داروهای ضد سرطان ضروری است. در همین راستا، روشهای نمونه‌گیری، نمونه‌برداری و تکنیکهای تجزیه‌ای، رویکردهای مهمی هستند که خلوص و سطوح غلظتی داروهای تجویزی را در فرمولاسیون دارویی و بیماران مصرف‌کننده، غربالگری کرده و نقش اصلاحی موثری در مطالعات دارویی به ویژه در حوزه‌ی پژوهشهای آنکولوژی ایفا می‌نمایند. لذا امروزه، آنالیز داروهای ضد سرطان و سنجش TDM آنها یکی از کاربردی‌ترین مطالعات حوزه‌ی پژوهشهای زیست تجزیه‌ای را به خود اختصاص داده است؛ که در همین راستا ضرورت اندازه‌گیری سطوح غلظتی درمانی داروهای مذکور به دلیل گوناگونی پارامترهای فردی و فارماکوکینتیکی آنها در بیماران مختلف و همچنین با هدف افزایش کارایی و ارزیابی اطلاعات مفید راجع به تیپ‌های درمانی و دوزهای تجویزی، ضروری می‌نماید. از این رو، نیاز به روشهای صحیح و دقیق تجزیه‌ای برای جداسازی و اندازه‌گیری این ترکیبات دارویی و متابولیت‌های آنها در مایعات بیولوژیکی و شرایط فیزیولوژیکی، اجتناب‌ناپذیر است. از سویی دیگر، رویکردها و روشهای آماده‌سازی نمونه برای دستیابی به حداقل نویز و ناپایداری پیکرهای بیولوژیکی حین آنالیزهای دستگاهی و در عین حال افزایش حساسیت روشهای تجزیه‌ای، بیش از همه ضروری و حیاتی است.

معرفی روشهای جدیدتر و کم هزینه‌تر برای آنالیز داروهای شیمی‌درمانی دسته‌ی آنتی نئوپلاستیک خوراکی و در عین حال ردیابی و ارزیابی پیک غلظتی این نوع داروها در نمونه‌های خونی بیماران دریافت‌کننده‌ی این دسته از داروها با در نظر گرفتن عوارض جانبی آنها، از طریق غربالگری کیفیتی و نیز بررسی عدم تداخل با سایر داروهای تجویزی احتمالی در دوران ممنوعیت مصرف، افزایش آگاهی گروه‌های پزشکی در رابطه با مخاطرات و یا عدم مخاطرات دارویی در نتیجه‌ی مصرف تولیدات مختلف، بروز-رسانی عملیات گروه‌های پزشکی آنکولوژی جهت پیگیری کیفیت اثربخشی دارو به منظور آگاهی از وقوع یا عدم وقوع عوارض دارویی این دسته از داروهای کموتراپی که احتمال بروز عوارض جانبی در مصرف آنها بالاست است، می‌تواند نقش بسیار مهمی را در ارتقاء سلامت جامعه، اثر بخشی هر چه-بیشتر تیپ‌های درمانی و نیز کاهش عوارض جانبی داروها و در نهایت کاهش مخاطرات و نگرانی‌ها و

افزایش اعتمادسازی ناشی از مصرف دوزهای تجویزی را ایفا نماید. تاکنون روشهای بسیار متعدد تجزیه-ای و کروماتوگرافی برای اندازه‌گیری این دسته از داروها و متابولیت‌های آنها از پیکره‌های مختلف، در مراجع علمی معتبر گزارش شده است. در اکثر روشهای مذکور روشهای سنتی استخراج به منظور پیش-تغلیظ و آماده‌سازی نمونه‌ها از پلاسمای بیماران مورد استفاده قرار گرفته است. این در حالی است که اکثر روشهای یاد شده نسبتاً و گاهاً بسیار دشوار و پرهزینه بوده و مستلزم استفاده از دستگاه‌های پیچیده و صرف وقت و انرژی بالایی می‌باشد.

توانمندی‌های خاص دستگاه الکتروفورز موئین در آنالیز ترکیبات دارویی، این روش را به ابزاری رقیب، در حال گسترش و قدرتمند نسبت به سایر دستگاه‌های تجزیه‌ای مانند کروماتوگرافی مایع تبدیل کرده است. لذا با توجه به این که تکنیک الکتروفورز موئین در جداسازی با برگزیدگی و انتخابگری بالا و همچنین در آنالیزهای مستلزم وقت و هزینه‌ی پایین، بر سایر روشهای کروماتوگرافی ترجیح داده می‌شود، زمینه‌ی توسعه‌ی کاربردهای آن در آنالیز و اندازه‌گیری مواد دارویی به ویژه داروهای حساسی چون داروهای آنتی‌نفوپلاستیک شیمی‌درمانی فراهم است.

از طرفی با توجه به اینکه در پژوهشهای جدید، فناوری نانو نقش مهمی را در بسیاری از پیشرفتهای علمی حال حاضر و آینده به خود اختصاص داده و خواهد داد، یک جنبه‌ی کلیدی از این رویکرد علمی توسعه‌ی روشهای معتبر و ایمن از منظر زیست محیطی، برای استفاده‌ی کمکی از این تکنولوژی در فناوری‌های رو به رشد، به ویژه در بسط و گسترش علوم نوین جداسازی ترکیبات دارویی و پیش‌تغلیظ و استخراج انتخابی این ترکیبات به واسطه‌ی کاهش هزینه و مخاطرات متداول در روشهای پیش‌تیمار نمونه‌ی سنتی و همچنین افزایش بازده و کارایی روشهای آماده‌سازی نمونه از طریق بهره‌گیری از ویژگی‌های منحصر به فرد محصولات فناوری مذکور می‌باشد.

در رساله‌ی حاضر، قابلیت دو روش جدید استخراجی (طراحی جدید)، مشتمل بر: به ترتیب (۱): استخراج فاز جامد- مایع مبتنی بر فیبرهای توخالی (HF-SLPME) تقویت شده با سیستمهای نانوجاذب مزومتخلخل و (۲): استخراج الکتروغشایی (EME) مبتنی بر فیبرهای توخالی اصلاح ترکیب غشایی شده از طریق نوسازی غشای مایع تثبیت شده با ترکیبات نانوکامپوزیتی هیبریدی بر پایه‌ی تکنیک سل-ژل؛ هر دو به همراه تکنیک الکتروفورز موئین برای اندازه‌گیری برخی از داروهای شیمی-درمانی خوراکی (به ترتیب داروی کپسیتابین به همراه متابولیت اصلی آن (۵-FU) و همچنین داروی ایماتینیب مسیلات) مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند. روشهای توسعه داده شده مطابق با دستورالعمل و گزاره-های FDA معتبرسازی شده‌اند.

با توجه به یافته‌های حاصل از مطالعات صورت گرفته در این رساله، می‌توان نتیجه گرفت که روش الکتروفورز موئین (CE) یک ابزار مستعد و تطبیق‌پذیر و در عین حال قابل اعتماد برای آنالیز داروهای

ضد سرطان می‌باشد. روشهای پیش‌تغلیظ آنالیز، براحتی و بدون نیاز به دستکاری و نصب تجهیزات جانبی اضافی، قابلیت تلفیق با دستگاه الکتروفورز موئن را نشان می‌دهند. زمان آنالیز با روش الکتروفورز موئن، کوتاه‌تر و مصرف حلالهای آلی و الکترولیت‌های زمینه (BGEs) در حدود منطقی و صرفاً برای دقایق کوتاهی بوده است (در مقایسه با روش کروماتوگرافی مایع). همچنین، افزودن اصلاحگرهای آلی در مقادیر بسیار پایین برای افزایش کارایی و قدرت تفکیک جداسازی، قابل انجام می‌باشد.

روشهای نوین ریزاستخراج HF-SLPME و EME براحتی برای استخراج ترکیبات دارویی شیمی درمانی انتخابی از پیکره‌ی پیچیده‌ی بیولوژیکی (پلاسما) مورد استفاده قرار گرفته‌اند. همچنین برای اولین بار، امکان سنجی تلفیق همزمان روشهای آماده‌سازی نمونه‌ی طراحی شده در این مطالعه با یکی از مهمترین تکنیکهای تغلیظ و تراکم توده‌ای داخل ستونی (FASI) مورد بررسی قرار گرفته و به صورت موفقیت‌آمیزی برای افزایش حساسیت و کاهش حد تشخیص‌های روشهای ارائه شده، مورد بهره‌برداری قرار گرفته است. علی‌رغم پیچیدگی بالای پیکره‌های زیستی (پلاسما) مورد مطالعه در هر دو بخش این پژوهش، پاکسازی (clean-up) نسبتاً بی‌نقص روشهای استخراجی پیشنهادی، بوضوح در الکتروفروگرام‌های نمونه‌های آنالیزی مشهود می‌باشد؛ که نشان دهنده‌ی این حقیقت است که گونه یا ترکیب دیگری غیر از آنالیت‌های تحت بررسی، در فازهای پذیرنده‌ی مورد استفاده استخراج نشده‌اند. نتایج حاصل از معتبرسازی کامل هر دو روش پیشنهادی مطابق با دستورالعمل‌های بین‌المللی، موید معتبر و قابل اعتماد بودن روشهای مذکور برای کاربرد در مطالعات بالینی و زیست‌تجزیه‌ای می‌باشد.

استفاده از روشهای HF-SLPME-FASI-CE-UV و HF-EME-CE-FASI-UV برای آنالیز آنالیت‌های دارویی هدف این مطالعه، توانسته‌اند تامین‌گر و فراهم‌کننده‌ی تعیین و اندازه‌گیری کمی، سریع و با حساسیت مطلوب آنها باشند. روشهای نوین استخراجی معتبرسازی شده در این مطالعه، پاکسازی نمونه‌ی ایده‌آلی را فراهم نموده‌اند که به حذف عوامل مزاحم و مداخله از محیط پیچیده‌ی بیولوژیکی آنالیت‌های هدف، کمک شایانی نموده است که به زعم نگارنده و با تکیه بر یافته‌های حاصل، این توانایی قابلیت کاربرد برای آنالیزهای در حد آثار^۱ متابولیت‌ها و بیومارکرهای^۲ مختلف و همچنین بسیاری دیگر از ترکیبات دارویی، با استفاده از روش CE و یا سایر روشهای تجزیه‌ای و جداسازی را دارا می‌باشند.

^۱ Trace

^۲ Biomarkers

۴-۲- چشم‌اندازهای^۱ تحقیق

بی‌تردید، روشهای مبتنی بر تکنیک الکتروفورز موئین، رویکردهای مهمی برای توسعه‌ی سیستم‌های دارویی به ویژه در مطالعات کنترل کیفی داروهای ضد سرطان می‌باشند. قدرمسلّم، کاربرد این تکنیک ارزشمند در کشف و توسعه‌ی دارو، مشتمل بر مطالعات کنترل کیفی در صنعت، آنالیز داروها در نمونه‌های بیولوژیکی و درک مکانیسم برهمکنشهای این ترکیبات دارویی در محیطهای داخل بدنی، جذاب و ارزشمند خواهد بود. اگرچه، آنچه که در مراجع علمی مشاهده می‌شود این حقیقت است که تکنیک الکتروفورز موئین هنوز به اندازه‌ی کافی برای مطالعات سنجش سطوح درمانی داروهای شیمی‌درمانی توسعه نیافته است. در عین حال، حساسیت و تکرارپذیری هنوز هم به عنوان دو عامل محدود کننده‌ی این تکنیک در مطالعات بالینی مطرح می‌باشد؛ که قطعاً و به منظور بهبود این نقایص، اصلاحات دستگاهی، ساختاری و آشکارسازی در تکنیک‌های فوق در حال بروزرسانی بوده و خواهد بود. علاوه بر این، پیشرفتهای کاربردی تکنیک الکتروفورز موئین در سطوح ژنومیکی^۲ و مطالعات برهمکنش‌های این دسته از داروها با پروتئین‌های سِرِم و پلاسما مورد انتظار می‌باشد.

موفقیت حاصل از جداسازی‌های همزمان و یا مُنفردانه‌ی ترکیبات دارویی ضدسرطان با روش الکتروفورز موئین، قابلیت بسط برای آنالیز مولکولهای کایرال و جداسازی‌های انانتیومری ترکیبات دارویی مذکور را دارا می‌باشد. روشهای نیمه خودکار شده‌ی پیش‌تغلیظ آنالین و داخل‌ستونی برای جداسازی-های انانتیومری داروهای ضدسرطان که تاکنون مورد بررسی قرار نگرفته‌اند، فرصت جذابی را برای توسعه‌ی روشهای غربالگری و معتبرسازی تکنیکهای با توان بالا و نوآورانه رقم خواهند زد، که می‌توانند جایگزین روشهای پرهزینه، وقت‌گیر و دشوارتری مانند کروماتوگرافی مایع باشند؛ که جداسازی‌های کایرال در آنها مستلزم صرف هزینه و استفاده از تجهیزات و ستونهای اختصاصی گران قیمت می‌باشد. همچنین، امکان جداسازی ترکیبات دارویی ضد سرطان در سیستم‌های الکتروفورتیکی ریزتراشهای^۳ مبتنی بر فناوری نانو به خوبی قابل انتظار بوده و دارای پتانسیل بالایی برای توسعه در آنالیزهای حساس زیست تجزیه‌ای می‌باشد. علاوه بر این، روشهای جدیدتر و کوچک‌سازی‌تر شده‌ی استخراجی مانند روشهای خودکارسازی شده الکترونیکی می‌توانند با ضرایب اطمینان بالاتری برای جداسازی‌های کارآمد و سریع و همچنین تغلیظ‌های با بازده بالای ترکیبات دارویی بسیار گسترده‌ی ضد سرطان از محیطهای زیستی و بافتی داخل‌بدنی و مایعات فیزیولوژیکی، مورد استفاده قرار گیرند. این انتظار می‌رود که بزودی و در پژوهشهای آتی که قطعاً در بازه‌های زمانی پیش‌رو در مراجع علمی نمایان خواهند شد، تلفیق روشهای جدیدتر استخراجی و ریزاستخراجی بر پایه‌ی سیستمهای تبادل گیرنده‌های سنتزی^۴ داروهای

¹ Perspectives

² Genomic level

³ Microchip-based nano-CE methods

⁴ Synthetic receptors

هدف و همچنین روشهای جدیدتر تغلیظ داخل‌ستونی و آنالین با استفاده از سیستمهای آشکارسازی قدرتمند، در تلفیق با روش الکتروفورز موئن گسترش یابد.

۴-۳- پیشنهادات برای مطالعات آتی

در پژوهش حاضر، روش CE-UV، برای اندازه‌گیری برخی از داروهای خوراکی شیمی‌درمانی در نمونه‌های پلاسمای انسانی و بیماران مصرف‌کننده آنها مورد استفاده قرار گرفته است. داده‌های حاصل از سطوح غلظتی این داروها می‌توانند در شاخه‌های فارماکولوژی^۱ و فارماکوتراپی^۲ مورد استفاده قرار-گیرند.

بر مبنای تطبیق‌پذیری و سادگی نسبی روشهای مبتنی بر الکتروفورز موئن پیشنهادی در این مطالعه برای اندازه‌گیری مقادیر غلظتی داروهای هدف شیمی‌درمانی در پیکره‌های بیولوژیکی، پیشنهاد می‌گردد که پروفایل فارماکولوژی و مطالعات فارماکوکینتیکی آنها در پژوهشهای آتی با جزئیات بیشتری مورد بحث قرارگیرد. همچنین با توجه به بروز و مشاهده‌ی عوارض جانبی شدید داروهای کپسیتابین و ایماتینیب در موارد مصرف تولیدات داخلی این داروها (محصولات شرکتهای داروسازی داخل)، مقایسه‌ی خلوص و سطح سرمی داروهای مذکور با نمونه‌های وارداتی در قالب پژوهشهای کارآزمایی بالینی و با انتخاب جامعه‌ی آماری گسترده‌تری از بیماران مصرف‌کننده‌ی نمونه‌های تجاری خارجی و داخلی این داروها، جذاب خواهد بود. مطالعات موازی و مرتبط برای کمک به یافتن و درک مکانیسم عمل و ترویج روشهای نوآورانه‌ی دیگر برای پیش‌تغلیظهای کارآمدتر این ترکیبات دارویی نیز خالی از لطف نخواهد بود.

داروهای مورد بررسی در این مطالعه بر اساس مطالعات کتابخانه‌ای صورت‌گرفته در مراجع علمی و بر مبنای احساس نیاز به ارائه‌ی روشهای جدید الکتروفورتیکی برای اندازه‌گیری سطوح غلظتی آنها در نمونه‌های زیستی انتخاب شده‌اند و روشهای پیشنهادی در این مطالعه، می‌توانند برای سایر ترکیبات دارویی ضد سرطان خوراکی هم‌رده، مورد استفاده قرارگیرند.

بی‌شک، روش استخراج الکتروغشایی هنوز در مراحل میانی توسعه‌ی تکنولوژیکی قرار دارد و تحقیقات وسیع‌تری برای تبدیل‌شدن این روش ارزشمند به یک تکنیک آماده‌سازی روتین، مورد نیاز است؛ چراکه مزیت و برتری اصلی این روش نسبت به روشهای استخراج سنتی، در فراهم‌سازی تغلیظ-های کارآمدتر، استخراج‌های تمیز و با سرعت بالاتر و همچنین مصرف حداقلی از حلالهای شیمیایی مضر و عدم نیاز به استراتژی‌های پاکسازی جانبی مانند ترسیب پروتئین می‌باشد؛ که تمامی مزایای یاد شده منطبق بر اصول شیمی‌سبز در نظر گرفته می‌شوند. ولی در حال حاضر، تقنین افکار عمومی پژوهشگران

¹ Pharmacology

² Pharmacotherapy

حوزه‌ی بیومدیکال و آنالیز دارو به جایگزینی روشهای سنتی با روش استخراج الکتروغشایی، دشوار به نظر می‌رسد، چراکه روشهای سنتی برای اکثر ترکیبات دارویی که در حال حاضر مورد استفاده قرار می‌گیرند، توسعه داده شده، گاهی خودکارسازی شده و به صورت کامل معتبرسازی شده‌اند. لذا با در نظر گرفتن رویکردهای نوین، اصلاحات بیشتر و کاراتر در ترکیب غشای مایع تثبیت شده در روش استخراج الکتروغشایی، پیشنهادی سازنده تلقی می‌گردد. به ویژه برای دُرشت مولکولهای^۱ مهمی مانند پپتیدها، پروتئینها و سایر ماکرومولکولهای زیستی، روش استخراج الکتروغشایی می‌تواند جایگزینی قابل اعتماد، جالب و جذاب باشد.

در توسعه‌ی روش استخراج الکتروغشایی، انتخابهای منطقی‌تر برای SLM بر اساس سیستم‌های حلالی کم خطرتر و در دسترس‌تر و یا استفاده از مایعات یونی آبگریز در نقش حلالهای سبز و به عنوان جایگزین حلالهای آلی برای تثبیت در ساختار غشایی، بررسی‌های نوآورانه در امکان اعمال ولتاژهای کمتر با هدف صرفه جویی در مصرف انرژی و هزینه به منظور استخراجهای کارآمدتر و همچنین تلفیق روش استخراج الکتروغشایی با دیگر اصول و تکنیکهای جداسازی برای آنالیز و اندازه‌گیری آنالیت‌های جدید، پیشنهاد دیگری است که می‌تواند مد نظر پژوهشگران مقاطع تحصیلات تکمیلی قرار گیرد.

به عنوان آخرین دیدگاه آینده‌نگر، امکان‌سنجی تلفیق روشهای مناسب‌تر و کاراتر پیش‌تغلیظ آنالین داخل‌ستونی در تکنیک الکتروفورز موئین (مانند sweeping)، با روشهای نوین استخراجی برای آنالیز ترکیبات مهم دارویی و غیردارویی با استفاده از دستگاه CE، پیشنهاد می‌گردد.

¹ Macromolecules

فهرست منابع و مآخذ

منابع و مآخذ:

1. Hamidi S, Soltani S, Jouyban A (2015) A dispersive liquid–liquid microextraction and chiral separation of carvedilol in human plasma using capillary electrophoresis. *Bioanalysis* 7:1107–1117. doi: 10.4155/bio.15.51
2. Ali I, Haque A, Wani WA, Saleem K, Al Za'abi M (2013) Analyses of anticancer drugs by capillary electrophoresis: a review. *Biomed Chromatogr* 27:1296–311. doi: 10.1002/bmc.2953
3. Nussbaumer S, Bonnabry P, Veuthey J-L, Fleury-Souverain S (2011) Analysis of anticancer drugs: A review. *Talanta* 85:2265–2289.
4. Moore MJ, Erlichman C (1987) Therapeutic drug monitoring in oncology. *Clin Pharmacokinet* 13:205–227.
5. Paci A, Veal G, Bardin C, Levêque D, Widmer N, Beijnen J, Astier A, Chatelut E (2014) Review of therapeutic drug monitoring of anticancer drugs part 1–cytotoxics. *Eur J Cancer* 50:2010–2019.
6. Sawyers C (2004) Targeted cancer therapy. *Nature* 432:294–297.
7. Widmer N, Bardin C, Chatelut E, Paci A, Beijnen J, Levêque D, Veal G, Astier A (2014) Review of therapeutic drug monitoring of anticancer drugs part two–targeted therapies. *Eur J Cancer* 50:2020–2036.
8. Alnaim L (2007) Therapeutic drug monitoring of cancer chemotherapy. *J Oncol Pharm Pract* 13:207–221.
9. Gao B, Yeap S, Clements A, Balakrishnar B, Wong M, Gurney H (2012) Evidence for therapeutic drug monitoring of targeted anticancer therapies. *J Clin Oncol* 30:4017–4025.
10. Guetens G, De Boeck G, Highley MS, Wood M, Maes RAA, Eggermont AAM, Hanauske A, De Bruijn EA, Tjaden UR (2002) Hyphenated techniques in anticancer drug monitoring: II. Liquid chromatography–mass spectrometry and capillary electrophoresis–mass spectrometry. *J Chromatogr A* 976:239–247.
11. Jordan VC (2008) Tamoxifen: catalyst for the change to targeted therapy. *Eur J Cancer* 44:30–38.
12. Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P (2000) Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J* 351:95–105.
13. Cohen P (2002) Protein kinases—the major drug targets of the twenty-first century? *Nat Rev Drug Discov* 1:309–315.
14. Zhang J, Yang PL, Gray NS (2009) Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat Rev Cancer* 9:28–39.

15. Giamas G, Man YL, Hirner H, Bischof J, Kramer K, Khan K, Ahmed SSL, Stebbing J, Knippschild U (2010) Kinases as targets in the treatment of solid tumors. *Cell Signal* 22:984–1002.
16. Therapies. NCIT cancer <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/targeted-therapies/targeted-therapies-fact-sheet>.
17. Schilsky RL (2010) Personalized medicine in oncology: the future is now. *Nat Rev Drug Discov* 9:363–366.
18. Knight ZA, Lin H, Shokat KM (2010) Targeting the cancer kinome through polypharmacology. *Nat Rev Cancer* 10:130–137.
19. Decosterd L, Dahmane E, Neeman M, Buclin T, Csajka C, Haouala A, Widmer N (2012) Therapeutic drug monitoring of targeted anticancer therapy. Tyrosine kinase inhibitors and selective estrogen receptor modulators: a clinical pharmacology laboratory perspective. In: *LC-MS Drug Bioanal*. Springer, pp 197–250
20. Bouchet S, Chauzit E, Ducint D, Castaing N, Canal-Raffin M, Moore N, Titier K, Molimard M (2011) Simultaneous determination of nine tyrosine kinase inhibitors by 96-well solid-phase extraction and ultra performance LC/MS-MS. *Clin Chim Acta* 412:1060–1067.
21. Haouala A, Zanolari B, Rochat B, Montemurro M, Zaman K, Duchosal MA, Ris HB, Leyvraz S, Widmer N, Decosterd LA (2009) Therapeutic drug monitoring of the new targeted anticancer agents imatinib, nilotinib, dasatinib, sunitinib, sorafenib and lapatinib by LC tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 877:1982–1996.
22. Aranda EO, Esteve-Romero J, Rambla-Alegre M, Peris-Vicente J, Bose D (2011) Development of a methodology to quantify tamoxifen and endoxifen in breast cancer patients by micellar liquid chromatography and validation according to the ICH guidelines. *Talanta* 84:314–318.
23. Pursche S, Ottmann OG, Ehninger G, Schleyer E (2007) High-performance liquid chromatography method with ultraviolet detection for the quantification of the BCR-ABL inhibitor nilotinib (AMN107) in plasma, urine, culture medium and cell preparations. *J Chromatogr B* 852:208–216.
24. Pieri M, Miraglia N, Polichetti G, Tarantino G, Acampora A, Capone D (2011) Analytical and pharmacological aspects of therapeutic drug monitoring of mTOR inhibitors. *Curr Drug Metab* 12:253–267.
25. Rauf S, Gooding JJ, Akhtar K, Ghauri MA, Rahman M, Anwar MA, Khalid AM (2005) Electrochemical approach of anticancer drugs–DNA interaction. *J Pharm Biomed Anal* 37:205–217.
26. Corona G, Elia C, Casetta B, Frustaci S, Toffoli G (2011) High-throughput plasma docetaxel quantification by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Clin Chim acta* 412:358–364.

27. Kartsova LA, Bessonova EA (2009) Preconcentration techniques in capillary electrophoresis. *J Anal Chem* 64:326–337. doi: 10.1134/S1061934809040029
28. Geiger M, Hogerton AL, Bowser MT (2011) Capillary electrophoresis. *Anal Chem* 84:577–596.
29. Tiselius A (1937) A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures. *Trans Faraday Soc* 33:524–531.
30. Camilleri P (1997) Capillary electrophoresis: theory and practice. CRC press
31. Jorgenson JW, Lukacs KD (1981) Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries. *Anal Chem* 53:1298–1302.
32. Terabe S, Otsuka K, Ichikawa K, Tsuchiya A, Ando T (1984) Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries. *Anal Chem* 56:111–113.
33. Baker DR (1995) Capillary Electrophoresis John Wiley & Sons. New York
34. Landers JP (1996) Handbook of capillary electrophoresis. CRC press
35. Hempel G (2000) Strategies to improve the sensitivity in capillary electrophoresis for the analysis of drugs in biological fluids. *Electrophoresis* 21:691–698.
36. Bao J, Krylova SM, Wilson DJ, Reinstein O, Johnson PE, Krylov SN (2011) Kinetic Capillary Electrophoresis with Mass-Spectrometry Detection (KCE-MS) Facilitates Label-Free Solution-Based Kinetic Analysis of Protein–Small Molecule Binding. *ChemBioChem* 12:2551–2554.
37. Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR (2007) Principles of instrumental analysis. Thomson Brooks/Cole
38. Yin X-B, Wang E (2005) Capillary electrophoresis coupling with electrochemiluminescence detection: a review. *Anal Chim Acta* 533:113–120.
39. Richter EM, Fracassi da Silva JA, Gutz IGR, do Lago CL, Angnes L (2004) Disposable twin gold electrodes for amperometric detection in capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 25:2965–2969.
40. Morita I, Sawada J (1993) Capillary electrophoresis with on-line sample pretreatment for the analysis of biological samples with direct injection. *J Chromatogr A* 641:375–381.
41. Namera A, Saito T (2013) Recent advances in unique sample preparation techniques for bioanalysis. *Bioanalysis* 5:915–932.
42. Ashri NY, Abdel-Rehim M (2011) Sample treatment based on extraction techniques in biological matrices. *Bioanalysis* 3:2003–2018.

43. Arthur CL, Pawliszyn J (1990) Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Anal Chem* 62:2145–2148. doi: 10.1021/ac00218a019
44. Kataoka H, Saito K (2011) Recent advances in SPME techniques in biomedical analysis. *J Pharm Biomed Anal* 54:926–950.
45. Liu H, Dasgupta PK (1996) Analytical chemistry in a drop. Solvent extraction in a microdrop. *Anal Chem* 68:1817–1821.
46. Liu S, Dasgupta PK (1995) Liquid droplet. A renewable gas sampling interface. *Anal Chem* 67:2042–2049.
47. Cardoso AA, Dasgupta PK (1995) Analytical chemistry in a liquid film/droplet. *Anal Chem* 67:2562–2566.
48. Jeannot MA, Cantwell FF (1996) Solvent microextraction into a single drop. *Anal Chem* 68:2236–2240.
49. Ma M, Cantwell FF (1999) Solvent microextraction with simultaneous back-extraction for sample cleanup and preconcentration: preconcentration into a single microdrop. *Anal Chem* 71:388–393.
50. Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE (1999) Liquid– liquid– liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis. *Anal Chem* 71:2650–2656.
51. Rasmussen KE, Pedersen-Bjergaard S (2004) Developments in hollow fibre-based, liquid-phase microextraction. *TrAC Trends Anal Chem* 23:1–10.
52. Gjelstad A, Rasmussen KE, Pedersen-Bjergaard S (2006) Electrokinetic migration across artificial liquid membranes: tuning the membrane chemistry to different types of drug substances. *J Chromatogr A* 1124:29–34.
53. Mamat NA, See HH (2015) Development and evaluation of electromembrane extraction across a hollow polymer inclusion membrane. *J Chromatogr A* 1406:34–39.
54. Gjelstad A, Andersen TM, Rasmussen KE, Pedersen-Bjergaard S (2007) Microextraction across supported liquid membranes forced by pH gradients and electrical fields. *J Chromatogr A* 1157:38–45.
55. Gjelstad A, Rasmussen KE, Pedersen-Bjergaard S (2007) Simulation of flux during electro-membrane extraction based on the Nernst–Planck equation. *J Chromatogr A* 1174:104–111.
56. Balchen M, Gjelstad A, Rasmussen KE, Pedersen-Bjergaard S (2007) Electrokinetic migration of acidic drugs across a supported liquid membrane. *J Chromatogr A* 1152:220–5. doi: 10.1016/j.chroma.2006.10.096

57. Tabani H, Fakhari AR, Shahsavani A (2013) Simultaneous determination of acidic and basic drugs using dual hollow fibre electromembrane extraction combined with CE. *Electrophoresis* 34:269–276. doi: 10.1002/elps.201200330
58. Xu L, Hauser PC, Lee HK (2008) Electro membrane isolation of nerve agent degradation products across a supported liquid membrane followed by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. *J Chromatogr A* 1214:17–22.
59. Seip KF, Faizi M, Vergel C, Gjølstad A, Pedersen-Bjergaard S (2014) Stability and efficiency of supported liquid membranes in electromembrane extraction—a link to solvent properties. *Anal Bioanal Chem* 406:2151–2161.
60. Gjølstad A, Pedersen-Bjergaard S (2014) Electromembrane extraction—Three-phase electrophoresis for future preparative applications. *Electrophoresis* 35:2421–2428.
61. Marothu VK, Gorrepati M, Vusa R (2013) Electromembrane extraction—a novel extraction technique for pharmaceutical, chemical, clinical and environmental analysis. *J Chromatogr Sci* bmt041.
62. Gjølstad A, Pedersen-Bjergaard S (2013) Recent developments in electromembrane extraction. *Anal Methods* 5:4549–4557.
63. Balchen M, Halvorsen TG, Reubsaet L, Pedersen-Bjergaard S (2009) Rapid isolation of angiotensin peptides from plasma by electromembrane extraction. *J Chromatogr A* 1216:6900–6905.
64. Ramos-Payán M, Villar-Navarro M, Fernández-Torres R, Callejón-Mochón M, Bello-López MÁ (2013) Electromembrane extraction (EME)—an easy, novel and rapid extraction procedure for the HPLC determination of fluoroquinolones in wastewater samples. *Anal Bioanal Chem* 405:2575–2584.
65. Gjølstad A, Rasmussen KE, Pedersen-Bjergaard S (2009) Electromembrane extraction of basic drugs from untreated human plasma and whole blood under physiological pH conditions. *Anal Bioanal Chem* 393:921–928.
66. Basheer C, Tan SH, Lee HK (2008) Extraction of lead ions by electromembrane isolation. *J Chromatogr A* 1213:14–18.
67. Eibak LEE, Gjølstad A, Rasmussen KE, Pedersen-Bjergaard S (2010) Kinetic electro membrane extraction under stagnant conditions—fast isolation of drugs from untreated human plasma. *J Chromatogr a* 1217:5050–5056.
68. Huang C, Seip KF, Gjølstad A, Pedersen-Bjergaard S (2015) Electromembrane extraction for pharmaceutical and biomedical analysis—quo vadis. *J Pharm Biomed Anal* 113:97–107.
69. Liu Y, Zhang X, Guo L, Zhang Y, Li Z, Wang Z, Huang M, Yang C, Ye J, Chu Q (2014) Electromembrane extraction of salivary polyamines followed by capillary zone electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. *Talanta* 128:386–392.

70. Kjelsen IJØ, Gjølstad A, Rasmussen KE, Pedersen-Bjergaard S (2008) Low-voltage electromembrane extraction of basic drugs from biological samples. *J Chromatogr A* 1180:1–9.
71. Gjølstad A, Pedersen-Bjergaard S (2011) Electromembrane extraction: a new technique for accelerating bioanalytical sample preparation. *Bioanalysis* 3:787–797.
72. Seip KF, Gjølstad A, Pedersen-Bjergaard S (2015) The potential of electromembrane extraction for bioanalytical applications. *Bioanalysis* 7:463–480.
73. Lødøen CP, Eng Eibak LE, Rasmussen KE, Pedersen-Bjergaard S, Andersen T, Gjølstad A (2013) Storage of oral fluid as dried spots on alginate and chitosan foam—a new concept for oral fluid collection. *Bioanalysis* 5:317–325.
74. Nojavan S, Fakhari AR (2010) Electro membrane extraction combined with capillary electrophoresis for the determination of amlodipine enantiomers in biological samples. *J Sep Sci* 33:3231–3238.
75. Rezazadeh M, Yamini Y, Seidi S, Esrafil A (2012) Pulsed electromembrane extraction: a new concept of electrically enhanced extraction. *J Chromatogr A* 1262:214–218.
76. Tabani H, Fakhari AR, Shahsavani A, Alibabau HG (2014) Electrically assisted liquid-phase microextraction combined with capillary electrophoresis for quantification of propranolol enantiomers in human body fluids. *Chirality* 26:260–267.
77. Seidi S, Yamini Y, Rezazadeh M (2013) Combination of electromembrane extraction with dispersive liquid–liquid microextraction followed by gas chromatographic analysis as a fast and sensitive technique for determination of tricyclic antidepressants. *J Chromatogr B* 913:138–146.
78. Fakhari AR, Tabani H, Behdad H, Nojavan S, Taghizadeh M (2013) Electrically-enhanced microextraction combined with maltodextrin-modified capillary electrophoresis for quantification of tolterodine enantiomers in biological samples. *Microchem J* 106:186–193.
79. Huang C, Eibak LEE, Gjølstad A, Shen X, Trones R, Jensen H, Pedersen-Bjergaard S (2014) Development of a flat membrane based device for electromembrane extraction: a new approach for exhaustive extraction of basic drugs from human plasma. *J Chromatogr a* 1326:7–12.
80. Ahmar H, Fakhari AR, Tabani H, Shahsavani A (2013) Optimization of electromembrane extraction combined with differential pulse voltammetry using modified screen-printed electrode for the determination of sufentanil. *Electrochim Acta* 96:117–123.

81. Fakhari AR, Koruni MH, Ahmar H, Shahsavani A, Movahed SK (2014) Electrochemical Determination of Dextromethorphan on Reduced Graphene Oxide Modified Screen-Printed Electrode after Electromembrane Extraction. *Electroanalysis* 26:521–529.
82. Seip KF, Stigsson J, Gjellstad A, Balchen M, Pedersen-Bjergaard S (2011) Electromembrane extraction of peptides—Fundamental studies on the supported liquid membrane. *J Sep Sci* 34:3410–3417.
83. Hasheminasab KS, Fakhari AR, Shahsavani A, Ahmar H (2013) A new method for the enhancement of electromembrane extraction efficiency using carbon nanotube reinforced hollow fiber for the determination of acidic drugs in spiked plasma, urine, breast milk and wastewater samples. *J Chromatogr A* 1285:1–6. doi: 10.1016/j.chroma.2013.01.115.
84. Hasheminasab KS, Fakhari AR (2013) Development and application of carbon nanotubes assisted electromembrane extraction (CNTs/EME) for the determination of buprenorphine as a model of basic drugs from urine samples. *Anal Chim Acta* 767:75–80.
85. Pabby AK, Sastre AM (2013) State-of-the-art review on hollow fibre contactor technology and membrane-based extraction processes. *J Memb Sci* 430:263–303.
86. Hasheminasab KS, Fakhari AR, Koruni MH (2014) Development of carbon-nanotube-assisted electromembrane extraction in the two-phase mode combined with GC for the determination of basic drugs. *J Sep Sci* 37:85–91.
87. Ramos-Payán M, Fernández-Torres R, Pérez-Bernal JL, Callejón-Mochón M, Bello-López MÁ (2014) A novel approach for electromembrane extraction based on the use of silver nanometallic-decorated hollow fibers. *Anal Chim Acta* 849:7–11. doi: 10.1016/j.aca.2014.08.020
88. Gallis KW, Araujo JT, Duff KJ, Moore JG, Landry CC (1999) The use of mesoporous silica in liquid chromatography. *Adv Mater* 11:1452–1455.
89. Nazario CED, Fumes BH, da Silva MR, Lanças FM (2017) New materials for sample preparation techniques in bioanalysis. *J. Chromatogr. B* 1043: 81-95.
90. Hench LL, West JK (1990) The sol-gel process. *Chem Rev* 90:33–72.
91. Kloskowski A, Pilarczyk M, Chrzanowski W, Namieśnik J (2010) Sol-Gel Technique—A Versatile Tool for Adsorbent Preparation. *Crit Rev Anal Chem* 40:172–186.
92. Mclean M, Malik A, Florida S (2012) Sol-gel materials in analytical microextraction. In: *Compr. Sampl. Sample Prep*. Elsevier, pp 311–329
93. Fumes BH, Silva MR, Andrade FN, Nazario CED, Lanças FM (2015) Recent advances and future trends in new materials for sample preparation. *TrAC Trends Anal Chem* 71:9–25.

94. Kickelbick G (2007) Hybrid materials: synthesis, characterization, and applications. John Wiley & Sons
95. Naddaf E, Ebrahimi M, Es' hagh Z, Bamoharram FF (2015) Application of carbon nanotubes modified with a Keggin polyoxometalate as a new sorbent for the hollow-fiber micro-solid-phase extraction of trace naproxen in hair samples with fluorescence spectrophotometry using factorial experimental design. *J Sep Sci* 38:2348–2356.
96. Bagheri H, Piri-Moghadam H, Rastegar S, Taheri N (2014) Electrospun titania sol-gel-based ceramic composite nanofibers for online micro-solid-phase extraction with high-performance liquid chromatography. *J Sep Sci* 37:1982–1988.
97. Zheng H, Gao X, Song L, Guo H, Yang S, Chang X (2011) Preconcentration of trace aluminum (III) ion using a nanometer-sized TiO₂-silica composite modified with 4-aminophenylarsonic acid, and its determination by ICP-OES. *Microchim Acta* 175:225–231.
98. Nazario CED, de Lima Gomes PCF, Lancas FM (2014) Analysis of fluoxetine and norfluoxetine in human plasma by HPLC-UV using a high purity C18 silica-based SPE sorbent. *Anal Methods* 6:4181–4187.
99. Liang H-Q, Wu Q-Y, Wan L-S, Huang X-J, Xu Z-K (2014) Thermally induced phase separation followed by in situ sol-gel process: A novel method for PVDF/SiO₂ hybrid membranes. *J Memb Sci* 465:56–67.
100. Kumar R, Malik AK, Kabir A, Furton KG (2014) Efficient analysis of selected estrogens using fabric phase sorptive extraction and high performance liquid chromatography-fluorescence detection. *J Chromatogr A* 1359:16–25.
101. Liu W, Yan Z, Huang X, Chen J, Lu M, Zhang L, Chen G (2015) Simultaneous determination of blockers and agonists by on-fiber derivatization in self-made solid-phase microextraction coating fiber. *Talanta* 132:915–921.
102. Mu L, Hu X, Wen J, Zhou Q (2013) Robust aptamer sol-gel solid phase microextraction of very polar adenosine from human plasma. *J Chromatogr A* 1279:7–12.
103. Mirnaghi FS, Monton MRN, Pawliszyn J (2012) Thin-film octadecyl-silica glass coating for automated 96-blade solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry for analysis of benzodiazepines. *J Chromatogr A* 1246:2–8.
104. Rahim MA, Ibrahim WAW, Ramli Z, Sanagi MM (2015) New functionalised sol-gel hybrid sorbent coating for stir bar sorptive extraction of selected non-steroidal anti inflammatory drugs in human urine samples. *Malaysian J Anal Sci* 19:481–492.
105. Spietelun A, Pilarczyk M, Kloskowski A, Namieśnik J (2010) Current trends in solid-phase microextraction (SPME) fibre coatings. *Chem Soc Rev* 39:4524–4537.

106. Kabir A, Furton KG, Malik A (2013) Innovations in sol-gel microextraction phases for solvent-free sample preparation in analytical chemistry. *TrAC Trends Anal Chem* 45:197–218.
107. Chong SL, Wang D, Hayes JD, Wilhite BW, Malik A (1997) Sol– gel coating technology for the preparation of solid-phase microextraction fibers of enhanced thermal stability. *Anal Chem* 69:3889–3898.
108. Sarafraz-Yazdi A, Ardaki MS, Amiri A (2013) Determination of monocyclic aromatic amines using headspace solid-phase microextraction based on sol–gel technique prior to GC. *J Sep Sci* 36:1629–1635.
109. Sarafraz-Yazdi A, Zendegi-Shiraz A, Es'haghi Z, Hassanzadeh-Khayyat M (2015) Synthesis and characterization of composite polymer, polyethylene glycol grafted flower-like cupric nano oxide for solid phase microextraction of ultra-trace levels of benzene, toluene, ethyl benzene and o-xylene in human hair and water samples. *J Chromatogr A* 1418:21–28.
110. Gilart N, Marcé RM, Borrull F, Fontanals N (2014) New coatings for stir-bar sorptive extraction of polar emerging organic contaminants. *TRAC Trends Anal Chem* 54:11–23.
111. Fan W, Mao X, He M, Chen B, Hu B (2013) Stir bar sorptive extraction combined with high performance liquid chromatography-ultraviolet/inductively coupled plasma mass spectrometry for analysis of thyroxine in urine samples. *J Chromatogr A* 1318:49–57.
112. Mao X, Hu B, He M, Chen B (2012) High polar organic–inorganic hybrid coating stir bar sorptive extraction combined with high performance liquid chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry for the speciation of seleno-amino acids and seleno-oligopeptides in biological samp. *J Chromatogr A* 1256:32–39.
113. Ebrahimi M, Es'haghi Z, Samadi F, Hosseini M-S (2011) Ionic liquid mediated sol–gel sorbents for hollow fiber solid-phase microextraction of pesticide residues in water and hair samples. *J Chromatogr A* 1218:8313–8321.
114. Hou X, Guo Y, Liang X, Wang X, Wang L, Wang L, Liu X (2016) Bis (trifluoromethanesulfonyl) imide-based ionic liquids grafted on graphene oxide-coated solid-phase microextraction fiber for extraction and enrichment of polycyclic aromatic hydrocarbons in potatoes and phthalate esters in food-wrap. *Talanta* 153:392–400.
115. Wang T-T, Chen Y-H, Ma J-F, Hu M-J, Li Y, Fang J-H, Gao H-Q (2014) A novel ionic liquid-modified organic-polymer monolith as the sorbent for in-tube solid-phase microextraction of acidic food additives. *Anal Bioanal Chem* 406:4955–4963.
116. Liu R, Liu J, Yin Y, Hu X, Jiang G (2009) Ionic liquids in sample preparation. *Anal Bioanal Chem* 393:871–883.
117. Berthod A, He L, Armstrong DW (2001) Ionic liquids as stationary phase solvents for methylated cyclodextrins in gas chromatography. *Chromatographia* 53:63–68.

118. Carda-Broch S, Berthod A, Armstrong DW (2003) Solvent properties of the 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ionic liquid. *Anal Bioanal Chem* 375:191–199.
119. Ocaña-González JA, Fernández-Torres R, Bello-López M^Á, Ramos-Payán M (2016) New developments in microextraction techniques in bioanalysis. A review. *Anal Chim Acta* 905:8–23.
120. Rao RN, Raju SS, Vali RM (2013) Ionic-liquid based dispersive liquid–liquid microextraction followed by high performance liquid chromatographic determination of anti-hypertensives in rat serum. *J Chromatogr B* 931:174–180.
121. Li Z, Chen F, Wang X, Wang C (2013) Ionic liquids dispersive liquid–liquid microextraction and high-performance liquid chromatographic determination of irbesartan and valsartan in human urine. *Biomed Chromatogr* 27:254–258.
122. Sun J-N, Shi Y-P, Chen J (2013) Simultaneous determination of plasticizer di (2-ethylhexyl) phthalate and its metabolite in human urine by temperature controlled ionic liquid dispersive liquid–liquid microextraction combined with high performance liquid chromatography. *Anal Methods* 5:1427–1434.
123. Abulhassani J, Manzoori JL, Amjadi M (2010) Hollow fiber based-liquid phase microextraction using ionic liquid solvent for preconcentration of lead and nickel from environmental and biological samples prior to determination by electrothermal atomic absorption spectrometry. *J Hazard Mater* 176:481–486.
124. Sun J-N, Chen J, Shi Y-P (2014) Ionic liquid-based electromembrane extraction and its comparison with traditional organic solvent based electromembrane extraction for the determination of strychnine and brucine in human urine. *J Chromatogr A* 1352:1–7.
125. Yan H, Gao M, Yang C, Qiu M (2014) Ionic liquid-modified magnetic polymeric microspheres as dispersive solid phase extraction adsorbent: a separation strategy applied to the screening of sulfamonomethoxine and sulfachloropyrazine from urine. *Anal Bioanal Chem* 406:2669–2677.
126. Ding X, Wang Y, Wang Y, Pan Q, Chen J, Huang Y, Xu K (2015) Preparation of magnetic chitosan and graphene oxide-functional guanidinium ionic liquid composite for the solid-phase extraction of protein. *Anal Chim Acta* 861:36–46.
127. Yuan Y, Liang S, Yan H, Ma Z, Liu Y (2015) Ionic liquid-molecularly imprinted polymers for pipette tip solid-phase extraction of (Z)-3-(chloromethylene)-6-fluorothiochroman-4-one in urine. *J Chromatogr A* 1408:49–55.
128. Yan H, Liu S, Gao M, Sun N (2013) Ionic liquids modified dummy molecularly imprinted microspheres as solid phase extraction materials for the determination of clenbuterol and clorprenaline in urine. *J Chromatogr A* 1294:10–16.
129. Klotz K, Angerer J (2016) Quantification of naphthoquinone mercapturic acids in urine as biomarkers of naphthalene exposure. *J Chromatogr B* 1012:89–96.

130. Fan W, Mao X, He M, Chen B, Hu B (2014) Development of novel sol–gel coatings by chemically bonded ionic liquids for stir bar sorptive extraction—application for the determination of NSAIDS in real samples. *Anal Bioanal Chem* 406:7261–7273.
131. Wanigasekara E, Perera S, Crank JA, Sidisky L, Shirey R, Berthod A, Armstrong DW (2010) Bonded ionic liquid polymeric material for solid-phase microextraction GC analysis. *Anal Bioanal Chem* 396:511–524.
132. Yu H, Ho TD, Anderson JL (2013) Ionic liquid and polymeric ionic liquid coatings in solid-phase microextraction. *TrAC Trends Anal Chem* 45:219–232.
133. He Y, Pohl J, Engel R, Rothman L, Thomas M (2009) Preparation of ionic liquid based solid-phase microextraction fiber and its application to forensic determination of methamphetamine and amphetamine in human urine. *J Chromatogr A* 1216:4824–4830.
134. Xu L, Qi X, Li X, Bai Y, Liu H (2016) Recent advances in applications of nanomaterials for sample preparation. *Talanta* 146:714–726.
135. Gallego M, Petit de Pena Y, Valcarcel M (1994) Fullerenes as sorbent materials for metal preconcentration. *Anal Chem* 66:4074–4078.
136. Lasarte-Aragón G, Lucena R, Cárdenas S, Valcárcel M (2013) Effervescence-assisted carbon nanotubes dispersion for the micro-solid-phase extraction of triazine herbicides from environmental waters. *Anal Bioanal Chem* 405:3269–3277.
137. Yang Y, Chen J, Shi Y-P (2015) Recent developments in modifying polypropylene hollow fibers for sample preparation. *TrAC Trends Anal Chem* 64:109–117. doi: 10.1016/j.trac.2014.08.016
138. Beiraghi A, Pourghazi K, Amoli-Diva M (2014) Au nanoparticle grafted thiol modified magnetic nanoparticle solid phase extraction coupled with high performance liquid chromatography for determination of steroid hormones in human plasma and urine. *Anal Methods* 6:1418–1426.
139. Loi V, Vertzoni M, Vryonidou A, Phenekos C (2006) Development and validation of a simple reversed-phase high-performance liquid chromatography method for the determination of testosterone in serum of males. *J Pharm Biomed Anal* 41:527–532.
140. Ceglarek U, Kortz L, Leichtle A, Fiedler GM, Kratzsch J, Thiery J (2009) Rapid quantification of steroid patterns in human serum by on-line solid phase extraction combined with liquid chromatography–triple quadrupole linear ion trap mass spectrometry. *Clin Chim Acta* 401:114–118.
141. Sun L, Yong W, Chu X, Lin J-M (2009) Simultaneous determination of 15 steroidal oral contraceptives in water using solid-phase disk extraction followed by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1216:5416–5423.

142. Lasarte-Aragonés G, Lucena R, Cárdenas S, Valcárcel M (2011) Nanoparticle-based microextraction techniques in bioanalysis. *Bioanalysis* 3:2533–2548.
143. Shrivastava K, Wu H-F (2008) Modified silver nanoparticle as a hydrophobic affinity probe for analysis of peptides and proteins in biological samples by using liquid–liquid microextraction coupled to AP-MALDI-ion trap and MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal Chem* 80:2583–2589.
144. Sudhir P, Shrivastava K, Zhou Z, Wu H (2008) Single drop microextraction using silver nanoparticles as electrostatic probes for peptide analysis in atmospheric pressure matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry and comparison with gold electrostatic probes and silver hydrophobic . *Rapid Commun Mass Spectrom* 22:3076–3086.
145. Pyrzynska K (2013) Use of nanomaterials in sample preparation. *TrAC Trends Anal Chem* 43:100–108.
146. Lu Z, Duan J, He L, Hu Y, Yin Y (2010) Mesoporous TiO₂ nanocrystal clusters for selective enrichment of phosphopeptides. *Anal Chem* 82:7249–7258.
147. Ma W-F, Zhang C, Zhang Y-T, Yu M, Guo J, Zhang Y, Lu H-J, Wang C-C (2014) Magnetic MSP@ ZrO₂ microspheres with yolk–shell structure: designed synthesis and application in highly selective enrichment of phosphopeptides. *Langmuir* 30:6602–6611.
148. Li L, Chen S, Xu L, Bai Y, Nie Z, Liu H, Qi L (2014) Template-free synthesis of uniform mesoporous SnO₂ nanospheres for efficient phosphopeptide enrichment. *J Mater Chem B* 2:1121–1124.
149. Zhang Y, Li L, Ma W, Zhang Y, Yu M, Guo J, Lu H, Wang C (2013) Two-in-one strategy for effective enrichment of phosphopeptides using magnetic mesoporous γ -Fe₂O₃ nanocrystal clusters. *ACS Appl Mater Interfaces* 5:614–621.
150. Herm ZR, Wiers BM, Mason JA, van Baten JM, Hudson MR, Zajdel P, Brown CM, Masciocchi N, Krishna R, Long JR (2013) Separation of hexane isomers in a metal-organic framework with triangular channels. *Science* (80-) 340:960–964.
151. Acosta M, Savio M, Talio MC, Ferramola ML, Gil RA, Martinez LD (2013) On-line solid phase extraction of Cd from protein fractions of serum using oxidized carbon nanotubes coupled to electrothermal atomization atomic absorption spectrometry. *Microchem J* 110:94–98.
152. Herrera-Herrera A V, Ravelo-Pérez LM, Hernández-Borges J, Afonso MM, Palenzuela JA, Rodríguez-Delgado MÁ (2011) Oxidized multi-walled carbon nanotubes for the dispersive solid-phase extraction of quinolone antibiotics from water samples using capillary electrophoresis and large volume sample stacking with polarity switching. *J Chromatogr A* 1218:5352–5361.

153. Ding J, Gao Q, Li X, Huang W, Shi Z, Feng Y (2011) Magnetic solid-phase extraction based on magnetic carbon nanotube for the determination of estrogens in milk. *J Sep Sci* 34:2498–2504.
154. Song X-Y, Chen J, Shi Y-P (2015) Electromembrane extraction based on carbon nanotubes reinforced hollow fiber for the determination of plant hormones. *New J Chem* 39:9191–9199.
155. Sun M, Tang R, Wu Q, Wang C, Wang Z (2014) Graphene Reinforced Hollow Fiber Liquid Phase Microextraction for the Enrichment of some Phenylurea Residues in Milk Sample. *Food Anal Methods* 7:1097–1102. doi: 10.1007/s12161-013-9719-0
156. Wu C, Liu Y, Wu Q, Wang C, Wang Z (2012) Combined Use of Liquid–Liquid Microextraction and Carbon Nanotube Reinforced Hollow Fiber Microporous Membrane Solid-Phase Microextraction for the Determination of Triazine Herbicides in Water and Milk Samples by High-Performance Liquid Chromatography. *Food Anal Methods* 5:540–550. doi: 10.1007/s12161-011-9280-7
157. Luo X, Zhang F, Ji S, Yang B, Liang X (2014) Graphene nanoplatelets as a highly efficient solid-phase extraction sorbent for determination of phthalate esters in aqueous solution. *Talanta* 120:71–75.
158. Li J, Wang Y-B, Wu L, Li K-Y, Feng W (2014) Fabrication of multi-walled carbon nanotubes/oxide reinforced hollow fibers by sol-gel technique for rapid determination of metronidazole in milk. *Anal Methods* 6:1404–1411.
159. Sarafraz-Yazdi A, Abedi MR, Es' hagh Z (2013) Pre-concentration and determination of β -blockers using carbon nanotube-assisted pseudo-stirbar hollow fiber solid-/liquid-phase microextraction and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Liq Chromatogr Relat Technol* 36:750–769.
160. Hinterwirth H, Stübiger G, Lindner W, Lämmerhofer M (2013) Gold nanoparticle-conjugated anti-oxidized low-density lipoprotein antibodies for targeted lipidomics of oxidative stress biomarkers. *Anal Chem* 85:8376–8384.
161. Kailasa SK, Wu H-F (2010) Surface modified silver selenide nanoparticles as extracting probes to improve peptide/protein detection via nanoparticles-based liquid phase microextraction coupled with MALDI mass spectrometry. *Talanta* 83:527–534.
162. Es'haghi Z, Esmaili-Shahri E (2014) Sol–gel-derived magnetic SiO₂/TiO₂ nanocomposite reinforced hollow fiber-solid phase microextraction for enrichment of non-steroidal anti-inflammatory drugs from human hair prior to high performance liquid chromatography. *J Chromatogr B* 973:142–151. doi: 10.1016/j.jchromb.2014.09.030

163. Es'haghi Z, Nezhadali A, Bahar S, Bohlooli S, Banaei A (2015) [PMIM]Br@TiO₂ nanocomposite reinforced hollow fiber solid/liquid phase microextraction: an effective extraction technique for measurement of benzodiazepines in hair, urine and wastewater samples combined with high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 980:55–64. doi: 10.1016/j.jchromb.2014.12.010
164. Wu Q, Zhao Y, Wang C, Sun M, Ma X, Wang Z (2015) Mesoporous carbon reinforced hollow fiber liquid-phase microextraction for the enrichment of phenylurea herbicides followed by their determination with high performance liquid chromatography. *Anal Methods* 7:901–908. doi: 10.1039/C4AY02423K
165. Yang S, Chen C, Yan Z, Cai Q, Yao S (2013) Evaluation of metal-organic framework 5 as a new SPE material for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental waters. *J Sep Sci* 36:1283–1290.
166. Vadia N, Rajput S (2011) Mesoporous material, MCM-41: a new drug carrier. *Asian J Pharm Clin Res* 4:44–53.
167. Vinu A, Hossain KZ, Ariga K (2005) Recent advances in functionalization of mesoporous silica. *J Nanosci Nanotechnol* 5:347–371.
168. Alahmadi S (2012) Modification of Mesoporous Silica MCM-41 and its Applications- A review. *Orient J Chem* 28:1.
169. Ariga K, Vinu A, Yamauchi Y, Ji Q, Hill JP (2011) Nanoarchitectonics for mesoporous materials. *Bull Chem Soc Jpn* 85:1–32.
170. Wang X, Bu X, Feng P (2005) Porous inorganic materials. *Encycl. Inorg. Bioinorg. Chem.*
171. Fadzli SA, Roslinda S, Shahidan R, Firuz Z (2014) Sol-Gel Synthesis of Novel Silica Hybrid Xerogels: Porous Studies. In: *Key Eng. Mater. Trans Tech Publ*, pp 1003–1008
172. Bhattacharyya S, Lelong G, Saboungi M-L (2006) Recent progress in the synthesis and selected applications of MCM-41: a short review. *J Exp Nanosci* 1:375–395.
173. Kresge CT, Leonowicz ME, Roth WJ, Vartuli JC, Beck JS (1992) Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism. *Nature* 359:710–712.
174. Tanev PT, Pinnavaia TJ (1996) Biomimetic templating of porous lamellar silicas by vesicular surfactant assemblies. *Science* (80-) 271:1267.
175. Antonelli DM, Ying JY (1996) Synthesis of a Stable Hexagonally Packed Mesoporous Niobium Oxide Molecular Sieve Through a Novel Ligand-Assisted Templating Mechanism. *Angew Chemie Int Ed English* 35:426–430.
176. Attard GS, Glyde JC, Göltner CG (1995) Liquid-crystalline phases as templates for the synthesis of mesoporous silica. *Nature* 378:366–368.

177. Mahoney L, Koodali RT (2014) Versatility of evaporation-induced self-assembly (EISA) method for preparation of mesoporous TiO₂ for energy and environmental applications. *Materials (Basel)* 7:2697–2746.
178. Li W, Liu J, Zhao D (2016) Mesoporous materials for energy conversion and storage devices. *Nat Rev Mater* 1:16023.
179. AlOthman ZA (2012) A review: fundamental aspects of silicate mesoporous materials. *Materials (Basel)* 5:2874–2902.
180. Song K, Guan J, Wang Z, Xu C, Kan Q (2009) Post-treatment of mesoporous material with high temperature for synthesis super-microporous materials with enhanced hydrothermal stability. *Appl Surf Sci* 255:5843–5846.
181. Zhao D, Huo Q, Feng J, Chmelka BF, Stucky GD (1998) Nonionic triblock and star diblock copolymer and oligomeric surfactant syntheses of highly ordered, hydrothermally stable, mesoporous silica structures. *J Am Chem Soc* 120:6024–6036.
182. Mikkers FEP, Everaerts FM, Verheggen TPEM (1979) High-performance zone electrophoresis. *J Chromatogr A* 169:11–20.
183. Bharadwaj R, Santiago JG (2005) Dynamics of field-amplified sample stacking. *J Fluid Mech* 543:57–92.
184. Beckers JL, Boček P (2000) Sample stacking in capillary zone electrophoresis: principles, advantages and limitations. *Electrophoresis* 21:2747–2767.
185. Taylor RB, Reid RG (1993) Analysis of basic antimalarial drugs by CZE and MEKC. Part 1—critical factors affecting separation. *J Pharm Biomed Anal* 11:1289–1294.
186. Hamidi S, Jouyban A (2015) Capillary electrophoresis with UV detection, on-line stacking and off-line dispersive liquid–liquid microextraction for determination of verapamil enantiomers in plasma. *Anal Methods* 7:5820–5829. doi: 10.1039/C5AY00916B
187. Quirino JP, Kim J-B, Terabe S (2002) Sweeping: concentration mechanism and applications to high-sensitivity analysis in capillary electrophoresis. *J Chromatogr A* 965:357–73. doi: 10.1016/S0021-9673(01)01499-6
188. Liu H, Hwang T, Tsai I, Kuo C (2015) Use of high-conductivity sample solution with sweeping-micellar electrokinetic capillary chromatography for trace-level quantification of paliperidone in human plasma. *Electrophoresis* 36:534–542.
189. Kawai T, Koino H, Sueyoshi K, Kitagawa F, Otsuka K (2012) Highly sensitive chiral analysis in capillary electrophoresis with large-volume sample stacking with an electroosmotic flow pump. *J Chromatogr A* 1246:28–34. doi: 10.1016/j.chroma.2012.02.001

190. Peterson ZD, Bowerbank CR, Collins DC, Graves SW, Lee ML (2003) Advantages and limitations of coupling isotachopheresis and comprehensive isotachopheresis–capillary electrophoresis to time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr A* 992:169–179.
191. Liu Y-M n, Yang Y, Li J (2012) Du JJ. Capillary electrophoresis separation and sensitive electrochemiluminescence determination of β -blockers and study on interaction between human serum albumin and the drug. *Anal Methods* 4:2562–2568.
192. Zhu H, Lü W, Li H, Ma Y, Hu S, Chen H, Chen X (2011) A novel cross-H-channel interface for flow injection-capillary electrophoresis to reduce sample requirement and improve sensitivity. *Analyst* 136:1322–1328.
193. Liao H-W, Lin S-W, Wu U-I, Kuo C-H (2012) Rapid and sensitive determination of posaconazole in patient plasma by capillary electrophoresis with field-amplified sample stacking. *J Chromatogr A* 1226:48–54.
194. Huang S-W, Hsieh M-M, Chang SY (2012) Sensitive determination of sertraline by capillary electrophoresis with dispersive liquid–liquid microextraction and field-amplified sample stacking. *Talanta* 101:460–464.
195. Alshana U, Göğür NG, Ertaş N (2013) Dispersive liquid–liquid microextraction combined with field-amplified sample stacking in capillary electrophoresis for the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in milk and dairy products. *Food Chem* 138:890–897.
196. Hwang P, Wei S, Yeh H, Ko J, Chang C, Chen S (2010) Simultaneous determination of aripiprazole and its active metabolite, dehydroaripiprazole, in plasma by capillary electrophoresis combining on-column field-amplified sample injection and application in schizophrenia. *Electrophoresis* 31:2778–2786.
197. Zhou L, Glennon JD, Luong JHT (2010) Electrophoretic Analysis of Biomarkers using Capillary Modification with Gold Nanoparticles Embedded in a Polycation and Boron Doped Diamond Electrode. *Anal Chem* 82:6895–6903.
198. Fazeli-Bakhtiyari R, Sorouraddin MH, Farajzadeh MA, Somi MH, Jouyban A (2014) Salt-assisted LLE combined with field-amplified sample stacking in CE for improved determination of beta blocker drugs in human urine. *Bioanalysis* 6:319–334.
199. Huang L, Lin J, Yu L, Xu L, Chen G (2008) Field-amplified on-line sample stacking for simultaneous enantioseparation and determination of some β -blockers using capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 29:3588–3594.
200. Andrasi M, Bustos R, Gaspar A, Gomez FA, Klekner A (2010) Analysis and stability study of temozolomide using capillary electrophoresis. *J Chromatogr B* 878:1801–1808.

201. Soetebeer UB, Schierenberg M-O, Schulz H, Hempel G, Andresen P, Blaschke G (2001) Simultaneous quantification of etoposide and etoposide phosphate in human plasma by capillary electrophoresis using laser-induced native fluorescence detection. *Anal Chem* 73:2178–2182.
202. Dömötör O, Hartinger CG, Bytze AK, Kiss T, Keppler BK, Enyedy EA (2013) Characterization of the binding sites of the anticancer ruthenium (III) complexes KP1019 and KP1339 on human serum albumin via competition studies. *JBIC J Biol Inorg Chem* 18:9–17.
203. Cheng H-L, Chiou S-S, Liao Y-M, Lu C-Y, Chen Y-L, Wu S-M (2010) Analysis of methotrexate and its eight metabolites in cerebrospinal fluid by solid-phase extraction and triple-stacking capillary electrophoresis. *Anal Bioanal Chem* 398:2183–2190.
204. Huang Y, Zhao S, Shi M, Liang H (2011) A microchip electrophoresis strategy with online labeling and chemiluminescence detection for simultaneous quantification of thiol drugs. *J Pharm Biomed Anal* 55:889–894.
205. Kim HS, Wainer IW (2010) Simultaneous analysis of liposomal doxorubicin and doxorubicin using capillary electrophoresis and laser induced fluorescence. *J Pharm Biomed Anal* 52:372–376.
206. Mahnik SN, Rizovski B, Fuerhacker M, Mader RM (2004) Determination of 5-fluorouracil in hospital effluents. *Anal Bioanal Chem* 380:31–35.
207. Nguyen T V, Murray V (2012) Human telomeric DNA sequences are a major target for the antitumour drug bleomycin. *JBIC J Biol Inorg Chem* 17:1–9.
208. Lloyd DK, Cypess AM, Wainer IW (1991) Determination of cytosine- β -D-arabinoside in plasma using capillary electrophoresis. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 568:117–124.
209. Yang Y, Liu Q, Tao W, Nie L, Yao S (2007) Improved determination of 5-fluorouracil and its prodrug tegafur in pharmaceuticals by large-volume sample stacking in CE. *J Sep Sci* 30:3296–3301.
210. Flores JR, Nevado JJB, Penalvo GC, Caceres MIR (2003) Direct capillary electrophoretic determination of three chemotherapeutic drugs in human urine. *Chromatographia* 57:493–496.
211. Meloun M, Ferenčíková Z, Vrána A (2011) Determination of the thermodynamic dissociation constant of capecitabine using spectrophotometric and potentiometric titration data. *J Chem Thermodyn* 43:930–937. doi: 10.1016/j.jct.2011.01.012
212. Walko CM, Lindley C (2005) Capecitabine: A review. *Clin Ther* 27:23–44. doi: 10.1016/j.clinthera.2005.01.005

213. Twelves C, Wong A, Nowacki MP, Abt M, Burris H, Carrato A, Cassidy J, Cervantes A, Fagerberg J, Georgoulas V, Hussein F, Jodrell D, Koralewski P, Kröning H, Maroun J, Marschner N, McKendrick J, Pawlicki M, Rosso R, Schüller J, Seitz J-F, Stabuc B, Tujakowski J, Van Hazel G, Zaluski J, Scheithauer W (2005) Capecitabine as adjuvant treatment for stage III colon cancer. *N Engl J Med* 352:2696–704. doi: 10.1056/NEJMoa043116
214. Dhillon S, Scott LJ (2007) Capecitabine. *Drugs* 67:601–610. doi: 10.2165/00003495-200767040-00010
215. Pivot X, Chamorey E, Guardiola E, Magné N, Thyss A, Otto J, Giroux B, Mouri Z, Schneider M, Milano G (2003) Phase I and pharmacokinetic study of the association of capecitabine-cisplatin in head and neck cancer patients. *Ann Oncol* 14:1578–86. doi: 10.1093/annonc/mdg410
216. Etienne MC, Chatelut E, Pivot X, Lavit M, Pujol A, Canal P, Milano G (1998) Co-variables influencing 5-fluorouracil clearance during continuous venous infusion. A NONMEM analysis. *Eur J Cancer* 34:92–7. doi: 10.1016/S0959-8049(97)00345-6
217. Srinivasu K, Rao JV, Raju NA, Mukkanti K (2010) RP-HPLC Method for the Estimation of Capecitabine in Tablet Dosage Forms. *Asian J Chem* 22:3255–3259.
218. Reigner B, Blesch K, Weidekamm E (2001) Clinical pharmacokinetics of capecitabine. *Clin Pharmacokinet* 40:85–104.
219. Miwa M, Ura M, Nishida M, Sawada N, Ishikawa T, Mori K, Shimma N, Umeda I, Ishitsuka H (1998) Design of a novel oral fluoropyrimidine carbamate, capecitabine, which generates 5-fluorouracil selectively in tumours by enzymes concentrated in human liver and cancer tissue. *Eur J Cancer* 34:1274–81. doi: 10.1016/S0959-8049(98)00058-6
220. Zufía L, Aldaz A, Giráldez J (2004) Simple determination of capecitabine and its metabolites by liquid chromatography with ultraviolet detection in a single injection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 809:51–8. doi: 10.1016/j.jchromb.2004.06.004
221. Budman DR, Meropol NJ, Reigner B, Creaven PJ, Lichtman SM, Berghorn E, Behr J, Gordon RJ, Osterwalder B, Griffin T (1998) Preliminary studies of a novel oral fluoropyrimidine carbamate: capecitabine [In Process Citation]. *J Clin Oncol* 16:1795–1802.
222. Ali I, Haque A, Wani WA, Saleem K, Za'abi A (2013) Analyses of anticancer drugs by capillary electrophoresis: a review. *Biomed Chromatogr* 27:1296–1311.
223. Xu Y, Grem JL (2003) Liquid chromatography-mass spectrometry method for the analysis of the anti-cancer agent capecitabine and its nucleoside metabolites in human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 783:273–85. doi: 10.1016/S1570-0232(02)00674-8

224. Guichard SM, Mayer I, Jodrell DI (2005) Simultaneous determination of capecitabine and its metabolites by HPLC and mass spectrometry for preclinical and clinical studies. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 826:232–7. doi: 10.1016/j.jchromb.2005.09.010
225. Siethoff C, Orth M, Ortling A, Brendel E, Wagner-Redeker W (2004) Simultaneous determination of capecitabine and its metabolite 5-fluorouracil by column switching and liquid chromatographic/tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 39:884–889. doi: 10.1002/jms.655
226. Reigner B, Verweij J, Dirix L, Cassidy J, Twelves C, Allman D, Weidekamm E, Roos B, Banken L, Utoh M, Osterwalder B (1998) Effect of food on the pharmacokinetics of capecitabine and its metabolites following oral administration in cancer patients. *Clin Cancer Res* 4:941–8.
227. Vainchtein LD, Rosing H, Schellens JHM, Beijnen JH (2010) A new, validated HPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of the anti-cancer agent capecitabine and its metabolites: 5'-deoxy-5-fluorocytidine, 5'-deoxy-5-fluorouridine, 5-fluorouracil and 5-fluorodihydrouracil, in human plasma. *Biomed Chromatogr* 24:374–86. doi: 10.1002/bmc.1302
228. Deenen MJ, Rosing H, Hillebrand MJ, Schellens JHM, Beijnen JH (2013) Quantitative determination of capecitabine and its six metabolites in human plasma using liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 913–914:30–40. doi: 10.1016/j.jchromb.2012.11.033
229. Mader RM, Schrolnberger C, Rizovski B, Brunner M, Wenzel C, Locker G, Eichler HG, Mueller M, Steger GG (2003) Penetration of capecitabine and its metabolites into malignant and healthy tissues of patients with advanced breast cancer. *Br J Cancer* 88:782–7. doi: 10.1038/sj.bjc.6600809
230. Forough M, Farhadi K, Molaei R, Khalili H, Shakeri R, Zamani A, Matin AA (2017) Capillary electrophoresis with online stacking in combination with AgNPs@ MCM-41 reinforced hollow fiber solid-liquid phase microextraction for quantitative analysis of Capecitabine and its main metabolite 5-Fluorouracil in plasma samples isolated from ca. *J Chromatogr B* 1040:22–37.
231. Vichapong J, Burakham R, Srijaranai S, Grudpan K (2011) Room temperature imidazolium ionic liquid: A solvent for extraction of carbamates prior to liquid chromatographic analysis. *Talanta* 84:1253–1258. doi: 10.1016/j.talanta.2011.01.002
232. Wang C, Li C, Zang X, Han D, Liu Z, Wang Z (2007) Hollow fiber-based liquid-phase microextraction combined with on-line sweeping for trace analysis of Strychnos alkaloids in urine by micellar electrokinetic chromatography. *J Chromatogr A* 1143:270–5. doi: 10.1016/j.chroma.2007.01.027

233. Yang C, Guo L, Liu X, Zhang H, Liu M (2007) Determination of tetrandrine and fangchinoline in plasma samples using hollow fiber liquid-phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 1164:56–64. doi: 10.1016/j.chroma.2007.07.019
234. Yang Y, Chen J, Shi Y-P (2015) Recent developments in modifying polypropylene hollow fibers for sample preparation. *TrAC Trends Anal Chem* 64:109–117.
235. Hasanzadeh M, Shadjou N, de la Guardia M, Eskandani M, Sheikhzadeh P (2012) Mesoporous silica-based materials for use in biosensors. *TrAC Trends Anal Chem* 33:117–129. doi: 10.1016/j.trac.2011.10.011
236. Rodriguez-Flores J, Nevado JJB, Salcedo AMC, Diaz MPC (2005) Nonaqueous capillary electrophoresis method for the analysis of gleevec and its main metabolite in human urine. *J Chromatogr A* 1068:175–182.
237. Hartmann JT, Haap M, Kopp H-G, Lipp H-P (2009) Tyrosine kinase inhibitors-a review on pharmacology, metabolism and side effects. *Curr Drug Metab* 10:470–481.
238. Rodríguez-Flores J, Berzas Nevado JJ, Contento Salcedo AM, Cabello Díaz MP (2005) Nonaqueous capillary electrophoresis method for the analysis of gleevec and its main metabolite in human urine. *J Chromatogr A* 1068:175–182. doi: 10.1016/j.chroma.2004.09.089
239. Peng B, Lloyd P, Schran H (2005) Clinical pharmacokinetics of imatinib. *Clin Pharmacokinet* 44:879–894.
240. George S, Trent JC (2011) The role of imatinib plasma level testing in gastrointestinal stromal tumor. *Cancer Chemother Pharmacol* 67:45–50.
241. Arellano C, Gandia P, Lafont T, Jongejan R, Chatelut E (2012) Determination of unbound fraction of imatinib and N-desmethyl imatinib, validation of an UPLC–MS/MS assay and ultrafiltration method. *J Chromatogr B* 907:94–100.
242. Thomas J, Wang L, Clark RE, Pirmohamed M (2004) Active transport of imatinib into and out of cells: implications for drug resistance. *Blood* 104:3739–3745.
243. Picard S, Titier K, Etienne G, Teilhet E, Ducint D, Bernard M-A, Lassalle R, Marit G, Reiffers J, Begaud B (2007) Trough imatinib plasma levels are associated with both cytogenetic and molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia. *Blood* 109:3496–3499.
244. Wen PY, Yung WKA, Lamborn KR, Dahia PL, Wang Y, Peng B, Abrey LE, Raizer J, Cloughesy TF, Fink K (2006) Phase I/II study of imatinib mesylate for recurrent malignant gliomas: North American Brain Tumor Consortium Study 99-08. *Clin Cancer Res* 12:4899–4907.
245. Bende G, Kollipara S, Movva S, Moorthy G, Saha R (2010) Validation of an HPLC method for determination of imatinib mesylate in rat serum and its application in a pharmacokinetic study. *J Chromatogr Sci* 48:334–341.

246. Vadera N, Subramanian G, Musmade P (2007) Stability-indicating HPTLC determination of imatinib mesylate in bulk drug and pharmaceutical dosage form. *J Pharm Biomed Anal* 43:722–726.
247. Rosasco MA, Moyano MA, Pizzorno MT, Segall AI (2005) Validation of an HPLC method for the determination of imatinib mesylate in pharmaceutical dosage. *J Liq Chromatogr Relat Technol* 28:3283–3292.
248. Ivanovic D, Medenica M, Jancic B, Malenovic A (2004) Reversed-phase liquid chromatography analysis of imatinib mesylate and impurity product in Glivec® capsules. *J Chromatogr B* 800:253–258.
249. Vivekanand V V, Rao DS, Vaidyanathan G, Sekhar NM, Kelkar SA, Puranik PR (2003) A validated LC method for imatinib mesylate. *J Pharm Biomed Anal* 33:879–889.
250. Bakhtiar R, Khemani L, Hayes M, Bedman T, Tse F (2002) Quantification of the anti-leukemia drug STI571 (GleevecTM) and its metabolite (CGP 74588) in monkey plasma using a semi-automated solid phase extraction procedure and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 28:1183–1194.
251. Bakhtiar R, Lohne J, Ramos L, Khemani L, Hayes M, Tse F (2002) High-throughput quantification of the anti-leukemia drug STI571 (GleevecTM) and its main metabolite (CGP 74588) in human plasma using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 768:325–340.
252. Hsieh Y, Galviz G, Zhou Q, Duncan C (2009) Hydrophilic interaction liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the simultaneous determination of dasatinib, imatinib and nilotinib in mouse plasma. *Rapid Commun Mass Spectrom* 23:1364–1370.
253. Neville K, Parise RA, Thompson P, Aleksic A, Egorin MJ, Balis FM, McGuffey L, McCully C, Berg SL, Blaney SM (2004) Plasma and cerebrospinal fluid pharmacokinetics of imatinib after administration to nonhuman primates. *Clin cancer Res* 10:2525–2529.
254. Teoh M, Narayanan P, Moo KS, Radhakrisman S, Pillappan R, Bukhari NI, Segarra I (2010) HPLC determination of imatinib in plasma and tissues after multiple oral dose administration to mice. *Pak J Pharm Sci* 23:35–41.
255. De Francia S, D'Avolio A, De Martino F, Pirro E, Baietto L, Siccardi M, Simiele M, Racca S, Saglio G, Di Carlo F (2009) New HPLC–MS method for the simultaneous quantification of the antileukemia drugs imatinib, dasatinib, and nilotinib in human plasma. *J Chromatogr B* 877:1721–1726.
256. Roth O, Spreux-Varoquaux O, Bouchet S, Rousselot P, Castaigne S, Rigauddau S, Raggueneau V, Therond P, Devillier P, Molimard M (2010) Imatinib assay by HPLC with photodiode-array UV detection in plasma from patients with chronic myeloid leukemia: Comparison with LC-MS/MS. *Clin Chim Acta* 411:140–146.

257. Oostendorp RL, Beijnen JH, Schellens JHM, Tellingen O van (2007) Determination of imatinib mesylate and its main metabolite (CGP74588) in human plasma and murine specimens by ion-pairing reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Biomed Chromatogr* 21:747–754.
258. D'Avolio A, Simiele M, De Francia S, Ariaudo A, Baietto L, Cusato J, Fava C, Saglio G, Di Carlo F, Di Perri G (2012) HPLC–MS method for the simultaneous quantification of the antileukemia drugs imatinib, dasatinib and nilotinib in human peripheral blood mononuclear cell (PBMC). *J Pharm Biomed Anal* 59:109–116.
259. Zhang Y, Qiang S, Yu Z, Zhang W, Xu Z, Yang L, Wen A, Hang T (2013) LC–MS–MS Determination of Imatinib and N-Desmethyl Imatinib in Human Plasma. *J Chromatogr Sci* 52:344–350.
260. Breitkopf SB, Yuan M, Helenius KP, Lyssiotis CA, Asara JM (2015) Triomics analysis of imatinib-treated myeloma cells connects kinase inhibition to RNA processing and decreased lipid biosynthesis. *Anal Chem* 87:10995–11006.
261. Nageswari A, Reddy KK, Mukkanti K (2012) Stability-indicating UPLC method for determination of Imatinib Mesylate and their degradation products in active pharmaceutical ingredient and pharmaceutical dosage forms. *J Pharm Biomed Anal* 66:109–115.
262. Boddy A V, Sludden J, Griffin MJ, Garner C, Kendrick J, Mistry P, Dutreix C, Newell DR, O'Brien SG (2007) Pharmacokinetic investigation of imatinib using accelerator mass spectrometry in patients with chronic myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 13:4164–4169.
263. Hammam E, El-Desoky HS, Tawfik A, Ghoneim MM (2004) Voltammetric behavior and quantification of the anti-leukemia drug imatinib in bulk form, pharmaceutical formulation, and human serum at a mercury electrode. *Can J Chem* 82:1203–1209.
264. Ajimura TO, Borges KB, Ferreira AF, de Castro FA, de Gaitani CM (2011) Capillary electrophoresis method for plasmatic determination of imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia patients. *Electrophoresis* 32:1885–1892.
265. Klawitter J, Zhang YL, Klawitter J, Anderson N, Serkova NJ, Christians U (2009) Development and validation of a sensitive assay for the quantification of imatinib using LC/LC-MS/MS in human whole blood and cell culture. *Biomed Chromatogr* 23:1251–1258.
266. Golabchifar A-A, Rouini M-R, Shafaghi B, Rezaee S, Foroumadi A, Khoshayand M-R (2011) Optimization of the simultaneous determination of imatinib and its major metabolite, CGP74588, in human plasma by a rapid HPLC method using D-optimal experimental design. *Talanta* 85:2320–2329.
267. Iqbal Z, Elliott M, Watson D, Holyoake T, Jørgensen H (2011) Analysis of imatinib in bone marrow and plasma samples of chronic myeloid leukaemia patients using solid phase extraction LC-ESI-MS. *Pak J Pharm Sci* 24:285–291.

268. Elhamili A, Bergquist J (2011) A method for quantitative analysis of an anticancer drug in human plasma with CE-ESI-TOF-MS. *Electrophoresis* 32:1778–1785.
269. Basheer C, Ali Alnedhary A, Rao BSM, Valliyaveetil S, Lee HK (2006) Development and application of porous membrane-protected carbon nanotube micro-solid-phase extraction combined with gas chromatography/mass spectrometry. *Anal Chem* 78:2853–2858. doi: 10.1021/ac060240i
270. Dhananjeyan MR, Liu J, Bykowski C, Trendel JA, Sarver JG, Ando H, Erhardt PW (2007) Rapid and simultaneous determination of capecitabine and its metabolites in mouse plasma, mouse serum, and in rabbit bile by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 1138:101–108. doi: 10.1016/j.chroma.2006.10.038
271. Selvakannan P, Mantri K, Tardio J, Bhargava SK (2013) High surface area Au-SBA-15 and Au-MCM-41 materials synthesis: tryptophan amino acid mediated confinement of gold nanostructures within the mesoporous silica pore walls. *J Colloid Interface Sci* 394:475–84. doi: 10.1016/j.jcis.2012.12.008
272. Yin A, Wen C, Dai W-L, Fan K (2011) Ag/MCM-41 as a highly efficient mesostructured catalyst for the chemoselective synthesis of methyl glycolate and ethylene glycol. *Appl Catal B Environ* 108–109:90–99. doi: 10.1016/j.apcatb.2011.08.013
273. Karkhanei N, Sepehrian H, Cheraghali R (2014) Preparation, characterization, and iodide sorption performance of silver-loaded mesoporous MCM-41. *Desalin Water Treat* 3096–3105. doi: 10.1080/19443994.2014.963684
274. Zhao H, Zhou J, Luo H, Zeng C, Li D, Liu Y (2006) Synthesis, characterization of Ag/MCM-41 and the catalytic performance for liquid-phase oxidation of cyclohexane. *Catal Letters* 108:49–54. doi: 10.1007/s10562-006-0024-z
275. Es'haghi Z, Rezaeifar Z, Rounaghi G-H, Nezhadi ZA, Golsefid MA (2011) Synthesis and application of a novel solid-phase microextraction adsorbent: Hollow fiber supported carbon nanotube reinforced sol-gel for determination of phenobarbital. *Anal Chim Acta* 689:122–128. doi: 10.1016/j.aca.2011.01.019
276. Chamberlain J (1995) *The Analysis of Drugs in Biological Fluids* 2nd Edition. CRC press
277. Song X-Y, Shi Y-P, Chen J (2012) A novel extraction technique based on carbon nanotubes reinforced hollow fiber solid/liquid microextraction for the measurement of piroxicam and diclofenac combined with high performance liquid chromatography. *Talanta* 100:153–161.
278. Es'haghi Z, Golsefid MA, Saify A, Tanha AA, Rezaeifar Z, Alian-Nezhadi Z (2010) Carbon nanotube reinforced hollow fiber solid/liquid phase microextraction: a novel extraction technique for the measurement of caffeic acid in *Echinacea purpurea* herbal extracts combined with high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 1217:2768–2775.

279. Saleh TA, Gondal MA, Drmash QA (2010) Preparation of a MWCNT/ZnO nanocomposite and its photocatalytic activity for the removal of cyanide from water using a laser. *Nanotechnology* 21:495705.
280. Oter O, Ertekin K, Derinkuyu S (2009) Photophysical and optical oxygen sensing properties of tris (bipyridine) ruthenium (II) in ionic liquid modified sol-gel matrix. *Mater Chem Phys* 113:322–328.
281. Services USD of H and H, FDA F and DA, Food and Drug Administration, Administration F and D, FDA C, Services USD of H and H, FDA F and DA, Food and Drug Administration, Administration F and D (2001) Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. US Department of Health and Human Services. Food Drug Adm Cent Drug Eval Res (CDER), Cent Vet Med 34. doi: <http://www.labcompliance.de/documents/FDA/FDA-Others/Laboratory/f-507-bioanalytical-4252fml.pdf>
282. Anbia M, Ghaffari A (2009) Adsorption of phenolic compounds from aqueous solutions using carbon nanoporous adsorbent coated with polymer. *Appl Surf Sci* 255:9487–9492. doi: 10.1016/j.apsusc.2009.07.070
283. Kruk M, Jaroniec M, Sayari A (1997) Adsorption Study of Surface and Structural Properties of MCM-41 Materials of Different Pore Sizes. *J Phys Chem B* 101:583–589. doi: 10.1021/jp962000k
284. Beck JS, Vartuli JC, Roth WJ, Leonowicz ME, Kresge CT, Schmitt KD, Chu CTW, Olson DH, Sheppard EW, McCullen SB, Higgins JB, Schlenker JL (1992) A new family of mesoporous molecular sieves prepared with liquid crystal templates. *J Am Chem Soc* 114:10834–10843. doi: 10.1021/ja00053a020
285. Jiang Y, Lu Y, Han D, Zhang Q, Niu L (2012) Hollow Ag@Pd core-shell nanotubes as highly active catalysts for the electro-oxidation of formic acid. *Nanotechnology* 23:105609. doi: 10.1088/0957-4484/23/10/105609
286. Tadjarodi A, Zabihi F (2013) Thermal conductivity studies of novel nanofluids based on metallic silver decorated mesoporous silica nanoparticles. *Mater Res Bull* 48:4150–4156. doi: 10.1016/j.materresbull.2013.06.043
287. Xie Y, Quinlivan S, Asefa T (2008) Tuning Metal Nanostructures in Mesoporous Silica by a Simple Change of Metal Complexes and by Reduction with Grafted Imines and Hemiaminals. *J Phys Chem C* 112:9996–10003. doi: 10.1021/jp801992d
288. Nojavan S, Fakhari AR (2011) Chiral separation and quantitation of cetirizine and hydroxyzine by maltodextrin-mediated CE in human plasma: effect of zwitterionic property of cetirizine on enantioseparation. *Electrophoresis* 32:764–771. doi: 10.1002/elps.201000607

289. Liu S, Li Q, Chen X, Hu Z (2002) Field-amplified sample stacking in capillary electrophoresis for on-column concentration of alkaloids in *Sophora flavescens* Ait. *Electrophoresis* 23:3392–3397. doi: 10.1002/1522-2683(200210)23:19<3392::AID-ELPS3392>3.0.CO;2-X
290. Zhao J, Yang G, Duan H, Li J (2001) Determination of synthesized α -vitamin E by micellar electrokinetic chromatography. *Electrophoresis* 22:151–154.
291. Deng B, Liu Z, Luo G, Ma H, Duan M (2002) Rapid quantitative determination and assessment of insulin in oil formulation by micellar electrokinetic capillary chromatography. *J Pharm Biomed Anal* 27:73–80. doi: 10.1016/S0731-7085(01)00511-8
292. Jouyban A, Grosse SC, Coleman MW, Chan HK, Kenndler E, Clark BJ (2002) Calculation of electrophoretic mobility in mixed solvent buffers in capillary zone electrophoresis using a mixture response surface method. *Analyst* 127:1188–1192.
293. Ma X, Wang J, Wu Q, Wang C, Wang Z (2014) Extraction of carbamate pesticides in fruit samples by graphene reinforced hollow fibre liquid microextraction followed by high performance liquid chromatographic detection. *Food Chem* 157:119–24. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.02.007
294. Esrafil A, Yamini Y, Shariati S (2007) Hollow fiber-based liquid phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography for extraction and determination of some antidepressant drugs in biological fluids. *Anal Chim Acta* 604:127–33. doi: 10.1016/j.aca.2007.10.012
295. Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE, Halvorsen TG (2000) Liquid-liquid extraction procedures for sample enrichment in capillary zone electrophoresis. *J Chromatogr A* 902:91–105. doi: 10.1016/S0021-9673(00)00738-X
296. Tao Y, Liu J-F, Hu X-L, Li H-C, Wang T, Jiang G-B (2009) Hollow fiber supported ionic liquid membrane microextraction for determination of sulfonamides in environmental water samples by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 1216:6259–6266. doi: 10.1016/j.chroma.2009.06.025
297. Hatami M, Karimnia E, Farhadi K (2013) Determination of salmeterol in dried blood spot using an ionic liquid based dispersive liquid-liquid microextraction coupled with HPLC. *J Pharm Biomed Anal* 85:283–7. doi: 10.1016/j.jpba.2013.07.025
298. Abulhassani J, Manzoori JL, Amjadi M (2010) Hollow fiber based-liquid phase microextraction using ionic liquid solvent for preconcentration of lead and nickel from environmental and biological samples prior to determination by electrothermal atomic absorption spectrometry. *J Hazard Mater* 176:481–6. doi: 10.1016/j.jhazmat.2009.11.054

299. Polo M, Gómez-Noya G, Quintana JB, Llompart M, García-Jares C, Cela R (2004) Development of a solid-phase microextraction gas chromatography/tandem mass spectrometry method for polybrominated diphenyl ethers and polybrominated biphenyls in water samples. *Anal Chem* 76:1054–62. doi: 10.1021/ac030292x
300. Shihabi ZK (2000) Stacking in capillary zone electrophoresis. *J Chromatogr A* 902:107–117. doi: 10.1016/S0021-9673(00)00743-3
301. Huang L, Lin J-M, Yu L, Xu L, Chen G (2008) Field-amplified on-line sample stacking for simultaneous enantioseparation and determination of some beta-blockers using capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 29:3588–94. doi: 10.1002/elps.200700811
302. Zhang C-X, Thormann W (1998) Head-Column Field-Amplified Sample Stacking in Binary System Capillary Electrophoresis. 2. Optimization with a Preinjection Plug and Application to Micellar Electrokinetic Chromatography. *Anal Chem* 70:540–548.
303. Zhao Y, Lunte CE (1999) pH-mediated field amplification on-column preconcentration of anions in physiological samples for capillary electrophoresis. *Anal Chem* 71:3985–91. doi: 10.1021/ac9902421
304. Services USD of H and H, FDA F and DA, Food and Drug Administration, Administration F and D (2001) Guidance for industry: bioanalytical method validation (2001). <http://www.fda.gov/cvm>. doi: <http://www.labcompliance.de/documents/FDA/FDA-Others/Laboratory/f-507-bioanalytical-4252fml.pdf>
305. Viswanathan CT, Bansal S, Booth B, DeStefano AJ, Rose MJ, Sailstad J, Shah VP, Skelly JP, Swann PG, Weiner R (2007) Quantitative bioanalytical methods validation and implementation: Best practices for chromatographic and ligand binding assays. *Pharm Res* 24:1962–1973. doi: 10.1007/s11095-007-9291-7
306. Administration USF and D Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, Centre for Drug Evaluation and Research, Rockville, MD, 2001.
307. Büchel B, Rhyn P, Schürch S, Bühr C, Amstutz U, Largiadèr CR (2013) LC-MS/MS method for simultaneous analysis of uracil, 5,6-dihydrouracil, 5-fluorouracil and 5-fluoro-5,6-dihydrouracil in human plasma for therapeutic drug monitoring and toxicity prediction in cancer patients. *Biomed Chromatogr* 27:7–16. doi: 10.1002/bmc.2741
308. Piórkowska E, Kaza M, Fitatiuk J, Szlaska I, Pawiński T, Rudzki PJ (2014) Rapid and simplified HPLC-UV method with on-line wavelengths switching for determination of capecitabine in human plasma. *Pharmazie* 69:500–5. doi: 10.1691/ph.2014.3223
309. Licea-Perez H, Wang S, Bowen CL, Licea-Perez H (2009) Development of a sensitive and selective LC-MS/MS method for the determination of α -fluoro- β -alanine, 5-fluorouracil and capecitabine in human plasma. *J Chromatogr B* 877:1040–1046. doi: 10.1016/j.jchromb.2012.11.035

310. Jouyban A, Sorouraddin MH, Farajzadeh MA, Somi MH, Fazeli-Bakhtiyari R (2015) Determination of five antiarrhythmic drugs in human plasma by dispersive liquid-liquid microextraction and high-performance liquid chromatography. *Talanta* 134:681–9. doi: 10.1016/j.talanta.2014.12.008
311. van de Merbel N, Savoie N, Yadav M, Ohtsu Y, White J, Riccio MF, Dong K, de Vries R, Diancin J (2014) Stability: Recommendation for Best Practices and Harmonization from the Global Bioanalysis Consortium Harmonization Team. *AAPS J* 16:392–399. doi: 10.1208/s12248-014-9573-z
312. Singh J (2015) International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. *J Pharmacol Pharmacother* 6:185.
313. Deng P, Ji C, Dai X, Zhong D, Ding L, Chen X (2015) Simultaneous determination of capecitabine and its three nucleoside metabolites in human plasma by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 989:71–79. doi: 10.1016/j.jchromb.2015.03.002
314. Salvador a., Millerioux L, Renou a. (2006) Simultaneous LC-MS-MS Analysis of Capecitabine and its Metabolites (5'-deoxy-5-fluorocytidine, 5'-deoxy-5-fluorouridine, 5-fluorouracil) After Off-Line SPE from Human Plasma. *Chromatographia* 63:609–615. doi: 10.1365/s10337-006-0799-5
315. Montange D, Béard M, Demarchi M, Muret P, Piédoux S, Kantelip JP, Royer B (2010) An APCI LC-MS/MS method for routine determination of capecitabine and its metabolites in human plasma. *J Mass Spectrom* 45:670–677. doi: 10.1002/jms.1759
316. Anderson D, Kerr DJ, Blesing C, Seymour LW (1997) Simultaneous gas chromatographic-mass spectrophotometric determination of alpha-fluoro-beta-alanine and 5-fluorouracil in plasma. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 688:87–93.
317. Baymak MS, Celik H, Ozkan SA (2015) The Application of Differential Pulse Polarography to the Analysis of Capecitabine and Investigation of Its Electroreduction Mechanism. *J Electrochem Soc* 162:G29–G35. doi: 10.1149/2.0021507jes
318. Pani Kumar AD, Venkata Raju Y, Sunitha G, Rama Krishna K, Ceema M, Rao V (2011) Development of validated stability indicating RP-HPLC method for the estimation of Capecitabine in pure and pharmaceutical formulations. *Int J Res Pharm Biomed Sci* 2:175–181.
319. Farkouh A, Ettlinger D, Schueller J, Georgopoulos A, Scheithauer W, Czejka M (2010) A rapid and simple HPLC assay for quantification of capecitabine for drug monitoring purposes. *Anticancer Res* 30:5207–11. doi: 10.3181/0359-5165.30.12.5207 [pii]

320. Švobaitė R, Solassol I, Pinguet F, Mazard T, Ivanauskas L, Ychou M, Bressolle FMM (2010) A liquid chromatography-mass spectrometry method for the simultaneous determination of capecitabine, 5'-deoxy-5-fluorocytidine, 5'-deoxy-5-fluorouridine, 5-fluorouracil, and 5-fluorodihydrouracil in human plasma. *J Liq Chromatogr Relat Technol* 33:1705–1719. doi: 10.1080/10826076.2010.503842
321. Singhal P, Shah PA, Shah J V, Sharma P, Shrivastav PS (2015) determination of capecitabine-An anticancer drug in dried blood spot by LC-ESI-MS/MS. *Int J Pharm Pharm Sci* 7:238–245.
322. Lee J, Lee HK, Rasmussen KE, Pedersen-Bjergaard S (2008) Environmental and bioanalytical applications of hollow fiber membrane liquid-phase microextraction: a review. *Anal Chim Acta* 624:253–268.
323. Ghaemi F, Amiri A, Yunus R (2014) Methods for coating solid-phase microextraction fibers with carbon nanotubes. *TrAC Trends Anal Chem* 59:133–143.
324. Scida K, Stege PW, Haby G, Messina GA, García CD (2011) Recent applications of carbon-based nanomaterials in analytical chemistry: critical review. *Anal Chim Acta* 691:6–17.
325. Li J, Huang Y, Huang L, Ye L, Zhou Z, Xiang G, Xu L (2012) Determination of imatinib mesylate and related compounds by field amplified sample stacking with large volume sample injection capillary electrophoresis. *J Pharm Biomed Anal* 70:26–31.
326. Fanali S, Cristalli M, Nardi A, Ossicini L, Shukla SK (1990) Capillary zone electrophoresis in pharmaceutical analysis. *Farm (Societa Chim Ital)* 1989) 45:693–702.
327. Huang C, Jensen H, Seip KF, Gjølstad A, Pedersen-Bjergaard S (2016) Mass transfer in electromembrane extraction—The link between theory and experiments. *J Sep Sci* 39:188–197.
328. Naing NN, Li SFY, Lee HK (2015) Electro membrane extraction using sorbent filled porous membrane bag. *J Chromatogr A* 1423:1–8.
329. Yaripour S, Mohammadi A, Nojavan S (2016) Electromembrane extraction of Tartrazine from food samples: effects of nano-sorbents on membrane performance. *J. Sep. Sci* 39:2642–2651.
330. Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE (2006) Electrokinetic migration across artificial liquid membranes: new concept for rapid sample preparation of biological fluids. *J Chromatogr A* 1109:183–190.
331. Rezazadeh M, Yamini Y, Seidi S (2011) Electromembrane extraction of trace amounts of naltrexone and nalmefene from untreated biological fluids. *J Chromatogr B* 879:1143–1148.

332. Gjelstad A, Pedersen-Bjergaard S, Seip KF (2015) Electromembrane extraction as a rapid and selective miniaturized sample preparation technique for biological fluids. *Bioanalysis* 7:2203–2209.
333. Domínguez NC, Gjelstad A, Nadal AM, Jensen H, Petersen NJ, Hansen SH, Rasmussen KE, Pedersen-Bjergaard S (2012) Selective electromembrane extraction at low voltages based on analyte polarity and charge. *J Chromatogr A* 1248:48–54.
334. Kubáň P, Strieglerová L, Gebauer P, Boček P (2011) Electromembrane extraction of heavy metal cations followed by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. *Electrophoresis* 32:1025–1032.
335. Hasheminasab KS, Fakhari AR, Shahsavani A, Ahmar H (2013) A new method for the enhancement of electromembrane extraction efficiency using carbon nanotube reinforced hollow fiber for the determination of acidic drugs in spiked plasma, urine, breast milk and wastewater samples. *J Chromatogr A* 1285:1–6.
336. Flores JR, Berzas JJ, Castaneda G, Rodriguez N (2003) Direct and fast capillary zone electrophoretic method for the determination of Gleevec and its main metabolite in human urine. *J Chromatogr B* 794:381–388.
337. Petersen NJ, Rasmussen KE, Pedersen-Bjergaard S, Gjelstad A (2011) Electromembrane extraction from biological fluids. *Anal Sci* 27:965.
338. Hasheminasab KS, Fakhari AR (2015) Application of nonionic surfactant as a new method for the enhancement of electromembrane extraction performance for determination of basic drugs in biological samples. *J Chromatogr A* 1378:1–7.
339. Blasdel C, Egorin MJ, Lagattuta TF, Druker BJ, Deininger MW (2007) Therapeutic drug monitoring in CML patients on imatinib. *Blood* 110:1699–1701.
340. Jouyban A, Sorouraddin MH, Farajzadeh MA, Somi MH, Fazeli-Bakhtiyari R (2015) Determination of five antiarrhythmic drugs in human plasma by dispersive liquid-liquid microextraction and high-performance liquid chromatography. *Talanta* 134:681–689. doi: 10.1016/j.talanta.2014.12.008
341. Vessman J, Stefan RI, van Staden JF, Danzer K, Lindner W, Burns DT, Fajgelj A, Müller H (2001) Selectivity in analytical chemistry (IUPAC Recommendations 2001). *Pure Appl Chem* 73:1381–1386.
342. Oedit A, Ramautar R, Hankemeier T, Lindenburg P (2016) Electroextraction and electromembrane extraction—advances in hyphenation to analytical techniques. *Electrophoresis* 37: 1170-1186.
343. Velpandian T, Mathur R, Agarwal NK, Arora B, Kumar L, Gupta SK (2004) Development and validation of a simple liquid chromatographic method with ultraviolet detection for the determination of imatinib in biological samples. *J Chromatogr B* 804:431–434.

344. Demetri GD, Von Mehren M, Blanke CD, Van den Abbeele AD, Eisenberg B, Roberts PJ, Heinrich MC, Tuveson DA, Singer S, Janicek M (2002) Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N Engl J Med* 347:472–480.
345. Delbaldo C, Chatelut E, Ré M, Deroussent A, Séronie-Vivien S, Jambu A, Berthaud P, Le Cesne A, Blay J-Y, Vassal G (2006) Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of imatinib and its main metabolite in patients with advanced gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res* 12:6073–6078.
346. Rodriguez J, Castaneda G, Munoz L, Lopez S (2014) Development and validation of a non-aqueous capillary electrophoresis method for the determination of imatinib, codeine and morphine in human urine. *Anal Methods* 6:3842–3848.
347. Widmer N, Béguin A, Rochat B, Buclin T, Kovacsics T, Duchosal MA, Leyvraz S, Rosselet A, Biollaz J, Decosterd LA (2004) Determination of imatinib (Gleevec®) in human plasma by solid-phase extraction–liquid chromatography–ultraviolet absorbance detection. *J Chromatogr B* 803:285–292.
348. Guetens G, De Boeck G, Highley M, Dumez H, Van Oosterom AT, de Bruijn EA (2003) Quantification of the anticancer agent STI-571 in erythrocytes and plasma by measurement of sediment technology and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1020:27–34.
349. Rochat B, Fayet A, Widmer N, Lahrichi SL, Pesse B, Decosterd LA, Biollaz J (2008) Imatinib metabolite profiling in parallel to imatinib quantification in plasma of treated patients using liquid chromatography–mass spectrometry. *J mass Spectrom* 43:736–752.
350. Solassol I, Bressolle F, Philibert L, Charasson V, Astre C, Pinguet F (2006) Liquid chromatography-electrospray mass spectrometry determination of imatinib and its main metabolite, N-desmethyl-Imatinib in human plasma. *J Liq Chromatogr Relat Technol* 29:2957–2974.
351. Titier K, Picard S, Ducint D, Teilhet E, Moore N, Berthaud P, Mahon F-X, Molimard M (2005) Quantification of imatinib in human plasma by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Ther Drug Monit* 27:634–640.
352. Mičová K, Friedecký D, Faber E, Polýnková A, Adam T (2010) Flow injection analysis vs. ultra high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry for determination of imatinib in human plasma. *Clin Chim Acta* 411:1957–1962.
353. Schleyer E, Pursche S, Köhne CH, Schuler U, Renner U, Gschaidmeier H, Freiberg-Richter J, Leopold T, Jenke A, Bonin M (2004) Liquid chromatographic method for detection and quantitation of STI-571 and its main metabolite N-desmethyl-STI in plasma, urine, cerebrospinal fluid, culture medium and cell preparations. *J Chromatogr B* 799:23–36.

354. Goswami D, Gurule S, Lahiry A, Anand A, Khuroo A, Monif T (2016) Clinical development of imatinib: an anticancer drug. *Futur. Sci. OA* 2: FSO92.
355. Chahbouni A, Den Burger JCG, Vos RM, Sinjewel A, Wilhelm AJ (2009) Simultaneous quantification of erlotinib, gefitinib, and imatinib in human plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Ther Drug Monit* 31:683–687.



Abstract:

Capillary electrophoresis (CE) has been used increasingly more over the last decade in the area of medicinal and drug analysis. Numerous pharmaceutical products and prodrug components have been analyzed using this technique because of its high efficiency and short separation times in comparison with other chromatographic techniques. However, the inherent lack of detection sensitivity in CE-based techniques especially in complex bio-matrices is one of the contributing factors to the limited development on CE in this particular area of bio-analysis. In this project, the potential of CE as a tool in the analysis and determination of some widely used orally-administered chemotherapy drugs in blood samples from patients with gastrointestinal cancers was investigated.

The purpose of the first part of present study is development and validation of a simple, novel, selective and fast off-line microextraction technique combining capillary electrophoresis with in-column filed-amplified sample injection (FASI) for simultaneous determination of capecitabine (CAP) and its active metabolite, 5-Flourouracil (5-FU), in human plasma. At the moment, there is a lack of using cost-effective CE tool combined with novel nanotechnology-based sample clean-up/preconcentration techniques for simultaneous analysis of these important anti-cancer agents in plasma samples. This research intends to fill this gap and describe a simple off-line sample pretreatment by means of AgNPs@MCM-41 reinforced HF-solid/liquid phase microextraction (AgNPs@MCM41-HF-SLPME) with subsequent quantitation by FASI-CE. The separation of analytes was performed using a BGE containing 60 mM phosphate-Tris buffer (pH 7) with 10% (v/v) methanol as an organic modifier. Various parameters affecting the off-line microextraction efficiency as well as FASI were optimized. The linearity, sensitivity, precision, accuracy, recovery, selectivity, specificity, stability as well as the robustness of the method was evaluated from spiked human plasma samples during the course of validation. The results revealed that the presented analytical technique demonstrates acceptable accuracy and precision, miniaturized sample preparation and a reduced need for complicated equipment along with an acceptable analysis time. The validated method is successfully applied to determine CAP and 5-FU in plasma samples obtained from the patients who received CAP.

The focus of the second part of this study is development of a new, convenient, rapid and sensitive electro-membrane extraction approach (based on an ionic liquid-supported MWCNTs/ZnO reinforced hollow fiber, for the first time) as an off-line sample clean-up/preconcentration method coupled with capillary electrophoresis (CE) using field-amplified sample injection (FASI) for quantification of Imatinib mesylate in human plasma. The nano-hybrid sorbent, coated by 1-octyl-3-methylimidazolium bromide ionic liquid ([OMIm]Br) in this research, was prepared by a feasible basic catalyzed sol-gel method. Then, it was immobilized (supported by capillary forces and sonication) in pores of a segment of a polypropylene hollow fiber membrane as the extraction unit after dispersing in 2-nitrophenyl octyl ether (NPOE) solvent and subsequently served as the supported liquid membrane (SLM) composition. Significant variables affecting the proposed method were evaluated and optimized to achieve the maximum extraction performance. The developed method was validated according to FDA guidelines. Regarding the validation results, the method is proved to be linear ($R^2=0.998$) over concentrations ranging from 20 to 1500 ng mL⁻¹. The mean RSD values for intra- and inter-day precision studies were 6.83 and 7.71%, respectively. Finally, the validated method was successfully applied to determine Imatinib mesylate in patient's plasma samples.

Keywords: Capillary electrophoresis, Orally-administered chemotherapy drugs, Determination, Validation, Sample preparation, Nanotechnology, Biological samples, Cancer.



Urmia University

Faculty of Science

Department of Chemistry

A Dissertation submitted in fulfilment of the requirement for the degree of

Doctor of Philosophy (Ph.D) in Analytical Chemistry

Entitled:

Development and validation of capillary electrophoresis method coupled with novel nano-based microextraction techniques for analysis of some orally-administered chemotherapy drugs in blood samples from patients with gastrointestinal cancers

By:

Mehrdad Forough

Supervisors:

Dr. Khalil Farhadi - Dr. Amir Abbas Matin

Advisor:

Dr. Reza Malekzadeh

March, 2017

(All copyright is reserved for Urmia University)