Medical Science Journal of Islamic Azad University Vol. 31, No. 4, Winter 2022 **ORIGINAL ARTICLE**

Optimized preconcentration of Imatinib using dispersive liquid-liquid microextraction coupled with HPLC-UV

Pegah Poormand[1], Mahnaz Qomi[2,3,4], Javad Hosseini[4]
[1] Department of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2] Active Pharmaceutical Ingredients Research Center (APIRC), Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[3] Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Chemistry, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[4] Department of Applied Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Chemistry, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Abstract

Background: Imatinib is an antineoplastic agent acting as a tyrosine kinase inhibitor to treat cancer such as lymphoblastic leukemia. The dosage of the anticancer drugs plays a critical role in the survival of the patients. For this reason, the patient's plasma and urine samples should be monitored to obtain the necessary information regarding the toxicity of the drug. In this study, the applicability of preconcentration and dispersive liquid-liquid microextraction for extraction of trace amount of Imatinib in aqueous samples, before a determination by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC), was evaluated.
Materials and methods: The targeted drug was extracted from an aqueous sample with pH= 11 (the donor phase) into an extraction solvent (n-octanol) in the dispersive solution (acetone) as an acceptor phase, which has been dispersed in the sample solution. Different variables on extraction efficiency were studied and optimized by chemometrics design and the Taguchi method. The variables were the donor phase's pH, type of extraction solvent, type of dispersive solvent, speed stirring, extraction time, and extraction temperature.
Results: The optimum conditions of the test were as pH of donor phase:11, type of extraction solvent: n-octanol, type of dispersive solvent: acetone, speed stirring: 500rpm , extraction time: 45min, extraction temperature: 65 centigrade.
Conclusion: The developed method was simple, rapid, sensitive, and suitable for determining trace amounts of Imatinib in aqueous samples.
Keywords: *High-performance liquid chromatography, Dispersive liquid-liquid microextraction, Preconcentration, Imatinib.*

Cited as: Poormand P, Qomi M, Hosseini J. Optimized preconcentration of Imatinib using dispersive liquid-liquid microextraction coupled with HPLC-UV. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2022; 31(4): **377-387.**

Correspondence to: Mahnaz Qomi
Tel: *+98 9126335396*
E-mail: Mahnaz.qomi@gmail.com
ORCID ID: 0000-0001-7264-871X
Received: 9 May 2020; **Accepted:** 4 Aug 2021

مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۳۱، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۰، صفحات ۳۷۷ تا ۳۸۷

Original Article

پیش تغلیظ داروی ایماتینیب به روش میکرواستخراج فاز مایع با استفاده از روش مایع-مایع پخشی با طراح کمومتری و اندازه‌گیری به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا در مقادیر ناچیز

پگاه پورمند[۱]، مهناز قمی [۲،۳،۴]، جواد حسینی[۴]

[۱] گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی تهران، ایران
[۲] مرکز تحقیقات مواد اولیه دارویی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی تهران، ایران
[۳] گروه شیمی دارویی، دانشکده شیمی دارویی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی تهران، ایران
[۴] گروه شیمی کاربردی، دانشکده شیمی دارویی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: *ایماتینیب، به عنوان مهارکننده تیروزین کیناز، در درمان سرطان‌هایی مانند لوسمی لنفوبلاستی استفاده می‌شود. دوز داروهای ضد سرطان نقش حیاتی در بقای بیماران دارد. به همین دلیل، نمونه‌های پلاسما و ادرار بیمار باید برای اطمینان از اطلاعات لازم در مورد سمیت دارو به دست آید. در این مطالعه، کاربرد میکرواستخراج مایع و مایع پراکنده و مایع پراکنشی برای استخراج مقدار ایماتینیب در نمونه‌های آبی قبل از تعیین کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) مورد ارزیابی قرار گرفت.*

روش بررسی: *داروی هدف از نمونه‌های آبی با pH=11 (فاز دهنده) به یک حلال استخراج (n-octanol) در محلول پراکنده (استون) به عنوان یک فاز گیرنده استخراج شد که در محلول نمونه پراکنده شد. به منظور دستیابی به کارایی بالای استخراج، اثرات متغیرهای مختلف بر بهره وری استخراج، با استفاده از روش تاگوچی مورد بررسی و بهینه سازی شد. متغیرها عبارت از pH فاز دهنده، نوع حلال استخراج، نوع حلال پراکنده، سرعت، زمان استخراج و دمای استخراج بودند.*

یافته‌ها: *شرایط مطلوب آزمون عبارت از pH فاز دهنده (۱۱)، نوع حلال استخراج (n-octanol)، نوع پراکنده (استون)، سرعت چرخش (۵۰۰rpm)، زمان استخراج (۴۵ دقیقه)، و درجه حرارت (۶۵ درجه سانتی‌گراد) بودند.*

نتیجه‌گیری: *روش توسعه یافته ساده، سریع، حساس و مناسب برای تعیین مقدار ردیابی ایماتینیب در نمونه‌های آبی است.*

واژگان کلیدی: *کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، میکرواستخراج مایع- مایع پراکنده، ایماتینیب.*

مقدمه

ایماتینیب با نام تجاری Gleevec عامل آنتی‌نئوپلاستیک و مهارکننده رشته تیروزین کینازی انکوپروتئین Bcr-Abl است و از فسفریلاسیون کینازی سوبسترا با ATP جلوگیری می‌کند که منجر به کاهش رشد سلولی یا آپوپتوز در برخی انواع سلول‌های سرطانی می‌شود. استفاده از این دارو به عنوان درمان خط اول استاندارد در بیماران فاز مزمن CML (Chronic myelogenous leukemia) و کریز بلاست و به عنوان خط دوم برای فاز حاد CML که با وجود درمان قبلی با اینترفرون α پیشرفت کرده تصریح شده است. همچنین در درمان تومورهای استرومایی گوارشی نیز مفید است (۱، ۲).

آدرس نویسنده مسئول: تهران، مرکز تحقیقات مواد اولیه دارویی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، مهناز قمی (**email**: Mahnaz.qomi@gmail.com)
ORCID ID: 0000-0001-7264-871X
تاریخ دریافت مقاله: ۹۹/۲/۲۰
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۵/۱۳

تهوع و استفراغ، احتباس مایعات همراه با ادم قوزک و دور چشم، اسهال، میالژی، نارسایی احتقانی قلب، کرامپ عضلانی، خونریزی دستگاه گوارش، سرکوب مغز استخوان، سردرد، دردهای استخوانی، راش پوستی و تب از عوارض جانبی این دارو هستند (۳).

استفاده همزمان از داروهای مهارکننده CYP3A4 مثل کتوکونازول، ایتراکونازول، کلاریترومایسین، اریترومایسین باعث کاهش متابولیسم و افزایش غلظت ایماتینیب می‌شود. ایماتینیب با مهار CYP3A4 باعث افزایش غلظت داروهایی که توسط CYP3A4 متابولیزه می‌شود، به خصوص HMG-CoA ردوکتازها مثل سیمواستاتین، می‌شود. باتوجه به اینکه وارفارین توسط CYP2C9 و CYP3A4 متابولیزه می‌شود، بیمارانی که نیاز به دریافت آنتی‌کواگولانت دارند، باید از فرم استاندارد هپارین یا LMWH (Low Molecular Weight Heparin) استفاده کنند. ایماتینیب با کاهش کلیرانس کبدی باعث کاهش غلظت استامینوفن می‌شود. مصرف همزمان این دارو با آنتی‌کواگولانت‌ها، NSAIDها، مهارکننده‌های پلاکت و عوامل ترومبولایتیک باعث افزایش احتمال خونریزی و ترومبوسایتوپنی می‌شود (۱، ۳، ۴).

برای درمان CML با دوز ۴۰۰ میلی‌گرم در روز شروع می‌شود که می‌توان تا ۶۰۰ میلی‌گرم و ۸۰۰ میلی‌گرم در روز افزایش داد. روش میکرواستخراج فاز مایع با استفاده از روش مایع-مایع پخشی این امکان را فراهم می‌کند تا بتوان با استفاده از این روش آسان و ارزان و با مصرف حجم کمی از حلال آلی، مقادیر اندک این دارو را در نمونه‌های آبی و بیولوژیک به دست آورد (۵).

مواد و روشها

مواد شیمیایی و تجهیزات دستگاهی

مواد شیمیایی، استانداردها و نمونه‌های حقیقی

استاندارد داروی ایماتینیب (پودر جامد) با درجه خلوص بالا از شرکت Merck آلمان تهیه شد. حلال متانول با درجه خلوص HPLC از شرکت Merck آلمان خریداری شد. حلال استفاده شده در استخراج از شرکت Merck آلمان خریداری شد و آب بدون یون (Deionized water) جهت استفاده در دستگاه HPLC و نیز سایر آزمایشات توسط دستگاه تولیدکننده آب بدون یون Aquamax ساخت کشور کره جنوبی تهیه شد.

سایر مواد شیمیایی به کار رفته از شرکت‌های Merck و Sigma Aldrich خریداری شدند و همگی دارای درجه خلوص تجزیه‌ای بودند.

تهیه محلول‌ها

محلول استاندارد اولیه ایماتینیب با غلظت (mg/l) ppm ۱۰۰ با توزین پودر استاندارد و به حجم رساندن توسط متانول در بالن به دست آمد. استانداردهای ثانویه از طریق رقیق کردن استاندارد اولیه در آب بدون یون تهیه شدند. همچنین محلول‌های استاندارد کاری روزانه با رقیق‌سازی مناسب محلول‌های استاندارد با آب بدون یون تا غلظت مورد نظر، تهیه شدند. تمامی محلول‌های استاندارد در یخچال در دمای ۸-۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده و هر روز به صورت تازه تهیه شدند.

تجهیزات دستگاهی

اندازه‌گیری دارو توسط دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) ساخت شرکت Yongline کره جنوبی صورت گرفت. این دستگاه مجهز به دو پمپ مدل YL9110 با چهار ورودی حلال، آشکارساز UV مدل ۹۱۲۰ محل تزریق دستی با حجم لوپ µL ۱۰ بود. جهت ثبت کروماتوگرام و اندازه‌گیری سطح زیر پیک از نرم‌افزار Autochro3000 استفاده شد.

جداسازی در ستون C_{18} به طول ۲۵ سانتی‌متر و قطر درونی ۴/۶ میلی‌متر پر شده با ذرات به ابعاد ۵ میکرومتر صورت گرفت.

تنظیم pH محلول‌ها توسط دستگاه pH متر مدل ۸۶۵۰۲ AZ ساخت کشور تایوان انجام گرفت.

جهت استخراج ظروف شیشه‌ای ته مخروطی ۱۵میلی لیتری استفاده شد. جهت تزریق محلول استخراج به داخل محلول نمونه از میکروسرنگ‌های ۱۰۰ میکرولیتری ساخت شرکت هامیلتون آمریکا و سوئیس استفاده شد.

عمل هم‌زدن محلول آنالیت توسط دستگاه vortexer با گستره چرخش ۰-۲۵۰۰ دور در دقیقه انجام گرفت. جهت اندازه‌گیری و برداشتن حجم‌های متفاوت از پی‌پت‌های حبابدار، پی‌پت مدرج و نیز سرنگ هامیلتون ۱۰۰ میکرولیتری استفاده شد.

هم‌چنین از مجموعه فیلتراسیون شامل قیف، فیلترهای استات سلولز و تفلون، ارلن خلاء و پمپ خلاء جهت فیلتراسیون حلال‌های مورد استفاده در HPLC به کار گرفته شد.

روش استخراج

مراحل استخراج به اختصار در زیر آمده است:

۱- ۱۰ میلی‌لیتر از محلول آبی نمونه با غلظت معین و pH مشخص درون یک ظرف شیشه‌ای ته مخروطی ریخته شد.

۲- برای تنظیم دمای محلول فاز دهنده ظرف شیشه‌ای حاوی محلول فاز دهنده را درون حمام آب گرم قرار گرفت.

۳- حجم مشخصی از مخلوط حلال استخراج‌کننده و پخش‌کننده را به ظرف حاوی نمونه اضافه کردیم و جهت جلوگیری از تبخیر حلال استخراج‌کننده و پخش‌کننده از درپوش مناسب بر روی ظرف استخراج‌کننده استفاده شد.

۴- محلول برای مدت زمان مشخص توسط دستگاه vortexer هم زده شد.

۵- ظرف حاوی نمونه به دستگاه سانتریفیوژ منتقل شد.

۶- حلال استخراج‌کننده در انتهای ظرف ته مخروطی جمع شده و توسط سرنگ هامیلتون جمع‌آوری و به دستگاه HPLC تزریق شد (۵، ۶).

میکرواستخراج مایع-مایع پخشی

در میکرواستخراج مایع-مایع همانطور که از عنوانش پیداست، در فرآیند استخراج دو فاز شامل فاز محلول آنالیت (دهنده) و فاز حاوی مخلوط حلال استخراج‌کننده و حلال پخش‌شونده که استخراج درون آن انجام می‌شود (فاز گیرنده)، درگیر هستند. در طی یک استخراج، آنالیت مورد نظر تحت شرایط مناسب وارد فاز گیرنده می‌شود (۷، ۸).

اصول تئوری

در DLLME به طور معمول، محلول پخش‌شونده شامل حلال پخش‌شونده و حلال استخراج‌کننده، به سرعت به نمونه آبی که شامل آنالیت موردنظر می‌باشد، تزریق می‌شود. سپس ترکیب حاصل به آرامی هم زده شده و در نهایت یک محلول کدر که حاوی قطره‌های ریز حلال استخراج‌کننده که در محلول نمونه پراکنده شده است، در لوله آزمایش ایجاد می‌شود. بنابراین سطح تماس بسیار بزرگی بین فاز آبی و حلال استخراج به وجود می‌آید؛ در نتیجه آنالیت به سرعت به داخل فاز استخراج، استخراج می‌شود. سپس فاز استخراج با سانتریفیوژ جدا می‌شود و آنالیت در فاز رسوب‌گذاری شده، غنی‌سازی می‌شود. کل فاز آلی استفاده شده در این فرآیند در حد میکرولیتر است. گفتنی است که باید حلال استخراج، غیرقابل اختلاط با آب و حلال پخش‌شونده قابل اختلاط با حلال‌های آبی و حلال استخراج باشد (۹-۱۱).

مراحل بهینه‌سازی

جهت بررسی اثر پارامترها در میزان استخراج آنالیت از روش بهینه‌سازی کمومتری به روش تاگوچی استفاده شد.

بهینه سازی شرایط جداسازی

به منظور دستیابی به زمان‌های جداسازی کوتاه و جلوگیری از مصرف زیاد حلال و نیز تفکیک مناسب پیک‌های آنالیت در کروماتوگرام، اثر ترکیب فاز متحرک و نیز سرعت جریان فاز متحرک بر زمان بارداری و نیز قدرت جداسازی آنالیت‌ها بررسی شد که نتایج آن در بخش بعدی آورده شده است (۱۴-۱۲).

بهینه‌سازی شرایط استخراج

در استخراج مایع-مایع پخشی، عوامل متعددی بر میزان استخراج و نیز میزان پیش‌تغلیظ آنالیت تأثیرگذار هستند. لذا جهت رسیدن به شرایط بهینه تأثیر عوامل متعددی نظیر نوع حلال استخراج‌کننده، نوع حلال پخش‌شونده، حجم حلال استخراج‌کننده، حجم حلال پخش‌شونده، pH فاز گیرنده، pH فاز دهنده، قدرت یونی فاز دهنده، سرعت همزدن محلول، دمای استخراج و همچنین زمان استخراج بر راندمان استخراج مورد بررسی قرار گرفت. جهت انجام بهینه‌سازی در مورد ایماتینیب از غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر در محلول آبی استفاده شد. جهت مطالعه نتایج استخراج از مساحت پیک‌های آنالیت در کروماتوگرام استفاده گردید.

اثر pH فاز دهنده

به منظور بهینه‌سازی اثر pH فاز دهنده، pH در محدوده ۱۱-۹ تنظیم شد.

اثر حجم حلال استخراج کننده

اثر حجم حلال استخراج کننده در محدوده ۲۰ تا ۴۰ بر کارایی استخراج مطالعه شد.

اثر قدرت یونی فاز دهنده

اثر قدرت یونی بر راندمان استخراج ایماتینیب در محدوده (w/v٪ ۳۰-۰) نمک NaCl بررسی شد.

اثر هم زدن محلول آنالیت

اثر همزدن محلول در محدوده ۷۵۰-۲۵۰ دور بر دقیقه بر راندمان استخراج آنالیت بررسی شد.

اثر زمان استخراج

اثر زمان استخراج بر راندمان استخراج از ۲۰ تا ۶۰ ثانیه مورد بررسی قرار گرفت.

اثر دما

اثر دمای فاز دهنده بر راندمان استخراج از ۶۵-۲۵ درجه سانتی‌گراد بررسی شد.

ارزیابی کارایی روش استخراج

ارقام شایستگی

برای بررسی قابلیت کاربرد عملی روش پیشنهادی، تعدادی پارامتر که بیانگر کارایی روش استخراجی هستند، تحت عنوان ارقام شایستگی، از قبیل فاکتور پیش‌تغلیظ (PF: Preconcentration Factor) ، تکرارپذیری (RSD: Relative Standard Deviation) ، حد تشخیص (LOD: Limit of

Detection) و حد شناسایی (Limit of Quantification :LOQ)، جهت استخراج دارو از نمونه‌های آبی تحت شرایط بهینه بررسی و تعیین شدند و نتایج مربوط به این قسمت در بخش بعدی آورده شده است (۱۸-۱۵).

منحنی درجه‌بندی (Calibration curve)

در این تحقیق منحنی درجه‌بندی در نمونه‌های آبی تهیه شد. جهت رسم منحنی محلول‌های استاندارد به غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۲ و ۵ میلی‌گرم بر لیتر از نمونه تهیه شدند. سپس استخراج تحت شرایط بهینه از محلول‌های استاندارد تهیه شده انجام و سطح زیر پیک به دست آمده برحسب غلظت اولیه نمونه در فاز دهنده رسم شد. نتایج مربوط به این قسمت در بخش بعدی آورده شده است (۱۹).

تعیین فاکتور پیش‌تغلیظ (PF)

برای تعیین میزان پیش‌تغلیظ ابتدا نیاز به تهیه منحنی درجه‌بندی (کالیبراسیون) تزریق مستقیم است. بدین منظور محلول‌های استاندارد ایماتینیب به غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۵، ۱، ۲ و ۵ میلی‌گرم بر لیتر در آب دیونیزه تهیه شدند. سپس مقدار ۱۰ میکرولیتر از هر یک از استانداردها به دستگاه HPLC تزریق و سطح زیر پیک بر حسب غلظت رسم شد. در ادامه برای تعیین فاکتور پیش‌تغلیظ، شیب منحنی کالیبراسیون پس از تغلیظ به شیب منحنی کالیبراسیون تزریق مستقیم تقسیم شد. نتایج مربوط به این قسمت در بخش بعدی آورده شده است.

تعیین تکرارپذیری (RSD)

برای تعیین دقت یا تکرارپذیری روش، استخراج سه بار از محلول استاندارد ۱ میلی‌گرم بر لیتر نمونه در یک روز کاری (Within-day RSD or intra-day RSD) (با توجه به شرایط بهینه) و ۹ تکرار در طول یک هفته (Between-day RSD or inter-day RSD) انجام شد و میزان انحراف استاندارد نسبی تعیین شد. نتایج مربوط به این قسمت در بخش بعدی آورده شده است.

نتیجه گیری

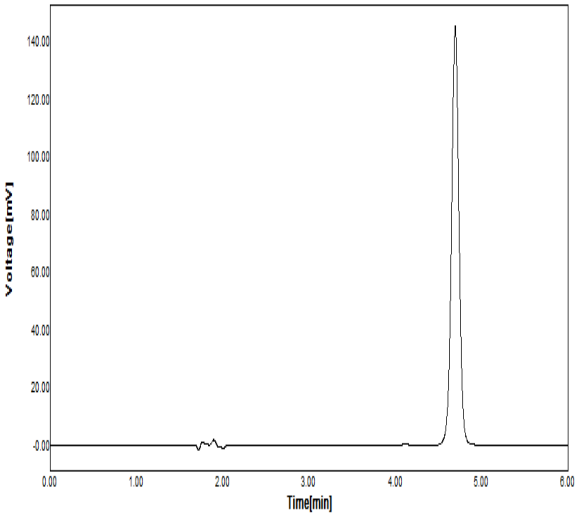
نتایج مراحل بهینه‌سازی

نتایج بهینه‌سازی شرایط جداسازی

به منظور دستیابی به جداسازی مناسب و پیک‌های متقارن، شرایط جداسازی در دستگاه کروماتوگرافی بهینه‌سازی شد. (نمودار ۱). نوع و نسبت حلال‌ها در فاز متحرک و همچنین سرعت جریان‌های فاز متحرک آزمایش شد و در نهایت شرایط جداسازی به دست آمد (۲۰، ۲۱).

بهینه‌سازی شرایط استخراج

عوامل متعددی بر استخراج به روش مایع-مایع پخشی تأثیرگذار هستند که عبارتند از: نوع حلال استخراج‌کننده، حجم حلال استخراج‌کننده، نوع حلال پخش شونده، حجم حلال پخش‌شونده، pH فاز دهنده، زمان استخراج، سرعت هم‌زدن، قدرت یونی فاز دهنده و دما. برای رسیدن به ماکزیمم کارایی استخراج جهت دستیابی به حساسیت و تکرارپذیری بالا، مطالعه نحوه تأثیر هر کدام از عوامل فوق به منظور بهینه‌سازی ضروری است.



نمودار ۱. کروماتوگرام حاصل از تزریق مستقیم ppm ۱۰۰ محلول آبی ایماتینیب. ستون: C_{18} به طول ۲۵ سانتی‌متر با قطر داخلی ۴/۶ میلی‌متر و قطر ذرات ۵ میکرومتر. دستگاه HPLC ساخت شرکت Younglin کره جنوبی؛ فاز متحرک: بافر فسفات و استو نیتریل به نسبت ۳۰/۷۰ طول موج : ۲۶۸ نانومتر، زمان بازداری : ۴/۶ دقیقه

نوع حلال استخراج‌کننده

انتخاب حلال مناسب جهت دستیابی به حداکثر استخراج و به منظور رسیدن به حساسیت خوب و گزینش‌پذیری و دقت بالا حائز اهمیت است. حلالی که انتخاب می‌شود بایستی واجد شرایط زیر باشد:

۱- گزینش‌پذیری خوبی برای استخراج آنالیت مورد نظر داشته باشد.

۲- باید حلالیت آن در آب کم باشد.

۳-در مجاورت حلال پخش‌شونده متشکل از قطرات ریز باشد.

۴- سازگار با رفتار کروماتوگرافی باشد.

۵- چگالی آن متفاوت با فاز آبی باشد که امکان جداسازی را فراهم آورد.

۶-در دسترس و مقرون به صرفه باشد.

جدول۱. سطوح مربوط به فاکتورهای بررسی شده در طراحی آزمایش

	(+1)	(0)	(-1)
pH فاز دهنده	۱۱	۱۰	۹
حجم حلال استخراجی(میکرولیتر)	۴۰	۳۰	۲۰
دور همزن	۷۵۰	۵۰۰	۲۵۰
زمان (ثانیه)	۶۰	۴۰	۲۰
دما (سانتی‌گراد)	۶۵	۴۵	۲۵
قدرت یونی	۳۰	۱۵	۰

جدول ۲. آزمایشات طراحی شده جهت شناسایی فاکتورهای مهم تأثیرگذار بر روی نتایج DLLME برای جداسازی و اندازه‌گیری ایماتینیب به روش تاگوچی

شماره آزمایش	pH فاز دهنده	حجم حلال استخراجی(میکرولیتر)	زمان (ثانیه)	دما (سانتی‌گراد)	قدرت یونی	دور همزن	area
۱	۹	۲۰	۲۰	۲۵	.	۲۵۰	۱۷۵
۲	۹	۳۰	۴۰	۴۵	۱۵	۵۰۰	۴۹۲
۳	۹	۴۰	۶۰	۶۵	۳۰	۷۵۰	۲۱۱
۴	۱۰	۲۰	۲۰	۴۵	۱۵	۷۵۰	۹۸
۵	۱۰	۳۰	۴۰	۶۵	۳۰	۲۵۰	۳۱۵
۶	۱۰	۴۰	۶۰	۲۵	۰	۵۰۰	۹۲۰
۷	۱۱	۲۰	۴۰	۲۵	۳۰	۵۰۰	۴۳۰
۸	۱۱	۳۰	۶۰	۴۵	۰	۷۵۰	۱۷۱۰
۹	۱۱	۴۰	۲۰	۶۵	۱۵	۲۵۰	۵۹۰
۱۰	۹	۲۰	۶۰	۶۵	۱۵	۵۰۰	۷۴۰
۱۱	۹	۳۰	۲۰	۲۵	۳۰	۷۵۰	۲۲۵
۱۲	۹	۴۰	۴۰	۴۵	۰	۲۵۰	۶۲۰
۱۳	۱۰	۲۰	۴۰	۶۵	۰	۷۵۰	۱۳۰
۱۴	۱۰	۳۰	۶۰	۲۵	۱۵	۲۵۰	۷۲۱
۱۵	۱۰	۴۰	۲۰	۴۵	۳۰	۵۰۰	۱۹۵
۱۶	۱۱	۲۰	۶۰	۴۵	۳۰	۲۵۰	۹۸
۱۷	۱۱	۳۰	۲۰	۶۵	۰	۵۰۰	۱۴۲۰
۱۸	۱۱	۴۰	۴۰	۲۵	۱۵	۷۵۰	۳۰۲

بدین منظور جهت انتخاب حلال استخراج‌کننده مناسب برای استخراج ایماتینیب، از حلال‌های مختلفی از جمله کلروفرم، دی‌کلرومتان و کلروبنزن استفاده شد و نتایج آن در نمودار ۲ آورده شده است. باتوجه به نتایج بدست آمده کلروفرم به عنوان حلال بهینه انتخاب شد.

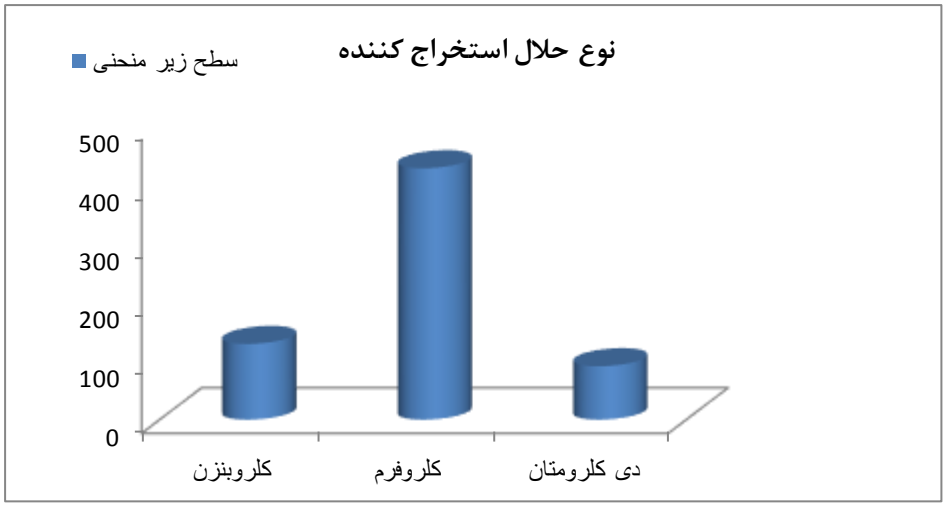
نوع حلال پخش‌کننده

در فرایند DLLME حلال پخش‌کننده باید هم در حلال استخراج‌کننده (فاز آلی) و هم در محلول نمونه (فاز آبی) قابل امتزاج باشد. لازم است که حلال استخراجی به قطرات بسیار ریز در فاز آبی پراکنده شود تا سطح تماس زیادی بین دو فاز به وجود آید به این ترتیب امکان مهاجرت سریع آنالیت‌ها از فاز آبی به فاز آلی فراهم شود که این شرایط با استفاده از حلال پخش‌کننده مناسب تحقق می‌یابد.

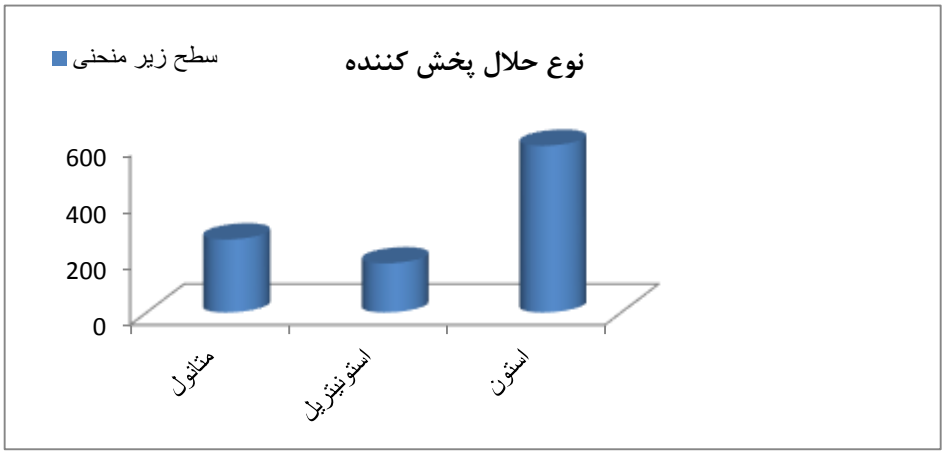
حلال‌های متداول مانند استن، استونیتریل و متانول مورد آزمون قرار گرفت. بیشترین بازده استخراج با استفاده از استن به عنوان حلال پخشی به دست آمد. بنابراین استن برای آزمون‌های بعدی انتخاب شد. در نمودار ۳ بررسی اثر نوع حلال پخش‌کننده بر میزان استخراج نشان داده شده است.

حجم حلال پخش‌کننده ثابت و معادل مقدار بهینه (۱/۵ میلی‌لیتر) در نظر گرفتیم.

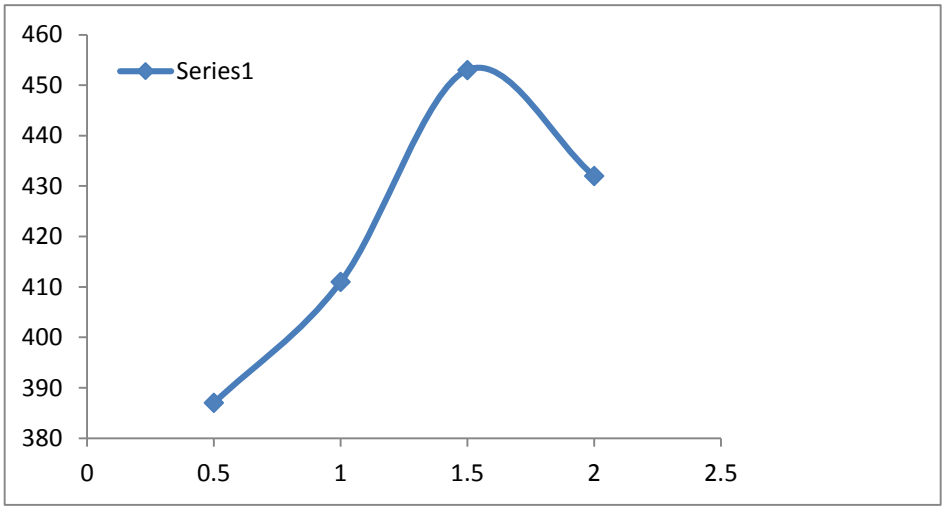
باتوجه به نتایج حاصل از آزمایشات انجام گرفته (نمودار ۴) حجم حلال پخش‌کننده تاثیر چشم‌گیری بر میزان استخراج نداشت، درنتیجه مقدار آن را در آزمایشات پیش‌رو



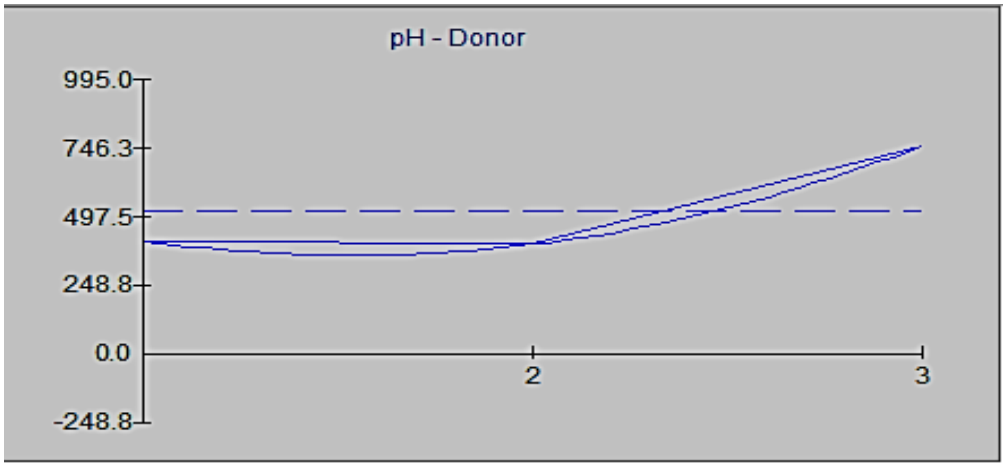
نمودار ۲. بررسی اثر نوع حلال استخراج‌کننده



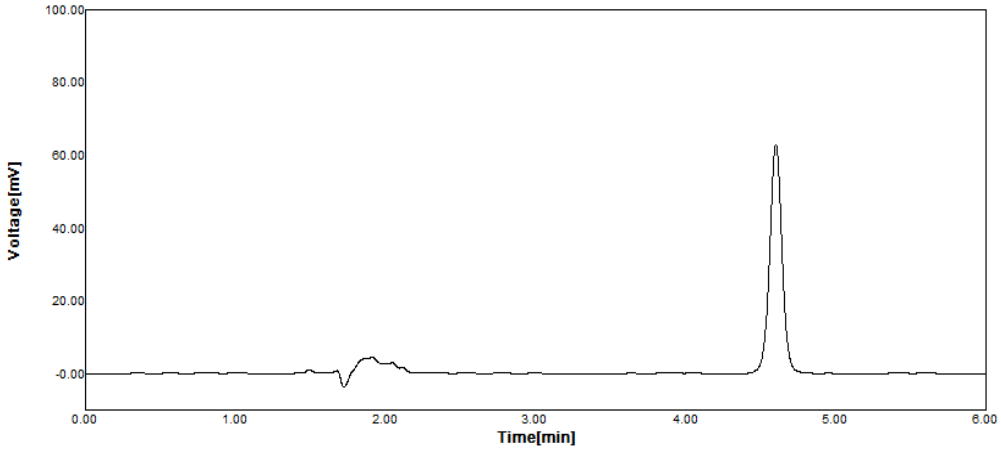
نمودار ۳. بررسی اثر نوع حلال پخش‌کننده بر میزان استخراج



نمودار ۴. بررسی اثر حجم حلال پخش‌کننده بر میزان استخراج



نمودار ۵. اثر pH فاز دهنده بر میزان استخراج



نمودار ۶. کروماتوگرام حاصل از استخراج داروی ایماتینیب با غلظت ppm ۱ در شرایط بهینه استخراج

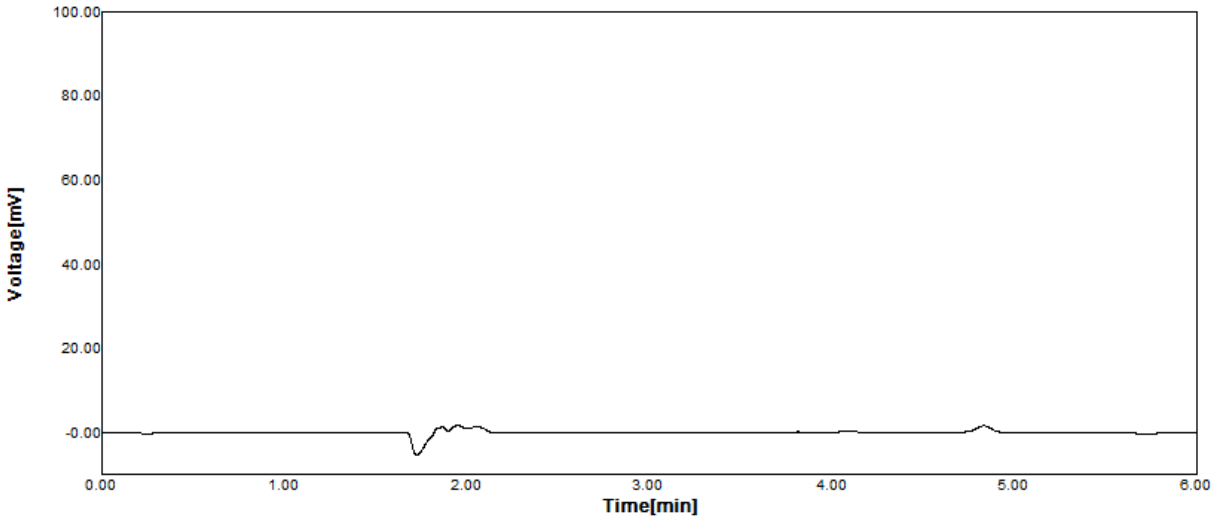
طراحی آزمایش

از آن جایی که فاکتورهای مختلفی می‌توانند بر روی میزان و کارایی استخراج تأثیر بگذارند، به منظور دستیابی به فاکتور تغلیظ بالا، اثر این فاکتورها باید بررسی و بهینه شود. pH فاز دهنده، حجم حلال استخراج‌کننده، قدرت یونی، دما، زمان استخراج و سرعت هم‌زدن از جمله فاکتورهایی هستند که باید میزان تأثیر آن‌ها بر روی پاسخ آزمایشات بررسی شود. در این پژوهش طراحی آزمایش به روش تاگوچی و با استفاده از نرم‌افزار Qualitek-4 انجام گرفت. روش تاگوچی با استفاده از آرایه‌های متعامد (Orthogonal Arrays) تعداد آزمایش‌ها را بسیار کاهش داده و موجب صرفه‌جویی در زمان و انرژی و کاهش هزینه‌ها خواهد شد. آرایه‌های متعامد مورد نظر به روش خاصی از بین تعداد کل آزمایش‌ها در روش فاکتوریل کامل، انتخاب می‌شوند. روش تاگوچی ادعا نمی‌کند که جواب بهینه حتماً در آزمایش‌های منتخب وجود دارد، بلکه با استفاده از محاسبات مربوط به آزمایش‌های آرایه می‌توان شرایط بهینه را تعیین کرد. در پایان با انجام آزمایش تأییدکننده (Confirming Test) می‌توان صحت آنالیزها را مشخص کرد.

در این تحقیق ۶ فاکتور ذکر شده در ۳ سطح مورد بررسی قرار گرفتند (جدول ۱). طراحی انجام شده شامل ۱۸ آزمایش به همراه نتایج به کمک نرم‌افزار Qualitek-4 برای داروی ایماتینیب در جدول ۲ آورده شده است. نتایج ارائه شده براساس سطح نسبی زیر پیک گونه‌ها است.

اثر pH فاز دهنده بر میزان استخراج

در روش استخراج DLLME، نیروی پیش برنده استخراج گرادیان pH است. پس بهینه‌سازی pH یکی از مهم‌ترین آزمایشات است. برای افزایش میزان استخراج با توجه به ساختار و PKa دارو (PKa دارو ۸,۹ است)، pH فاز دهنده باید به گونه‌ای تنظیم شود که بتواند آنالیت مورد نظر را به طور موثر دیونیزه کند (pHبالاتر از PKa) و به دنبال آن با کاهش حلالیت در آب، باعث افزایش استخراج آنالیت به حلال آلی شود. حال با توجه به این موضوع و آگاهی داشتن



نمودار ۷. کروماتوگرام حاصل از استخراج داروی ایماتینیب با غلظتppm ۱ به صورت مستقیم

جدول۳. تکرار پذیری روش

LOD (ng mL^{-1})	LOQ (ng mL^{-1})	Linearity (ng mL^{-1})	R^2	PF	RSD%	
					Intra	Inter
۵	۱۵	۱۵-۵۰۰۰	۰/۹۹۸۴	۹۰	۴/۸	۶/۳

از میزان دیونیزه شدن دارو درpHهای مختلف می‌توان به افزایش کارایی استخراج کمک کرد. در pH=۱۱ راندمان استخراج به حداکثر مقدار خود می‌رسد. این مسأله نشانگر این است که در این pH، آنالیت بیشتر به فرم مولکولی وجود دارد؛ لذا انتقال به فاز آلی به سهولت روی می‌دهد (نمودار ۵).

اثر حجم حلال استخراج‌کننده بر میزان استخراج

حجم حلال استخراج‌کننده استفاده شده می‌تواند بر میزان کارایی و همچنین بازه استخراج موثر باشد. لذا حجم حلال استخراج‌کننده در گستره ۲۰-۴۰ میکرولیتر از کلروفرم مورد مطالعه قرار گرفت. همان طور که در نمودار ۶ مشاهده می‌شود با افزایش حجم حلال استخراج‌کننده تا حد متوسط میزان استخراج افزایش می‌یابد و در ادامه در حجم‌های بالاتر سطح زیر پیک‌ها در کروماتوگرام با کاهش مواجه میشود. لذا بیشترین کارایی در حد متوسط حجم حلال استخراج‌کننده به دست می‌آید.

اثر سرعت هم زدن محلول آنالیت

میکرواستخراج DLLME بر مبنای برقراری تعادل بین فاز آلی و آبی استوار است. سرعت کلی استخراج در مرحله انتقال آنالیت در فصل مشترک فاز دهنده- فاز آلی محدود می‌شود. هم زدن محلول معمولاً برای بهتر کردن کینتیک و کاهش زمان استخراج به کار می‌رود چرا که با هم زدن محلول، تعادل بین این دو فاز سریع‌تر برقرار می‌شود و در این تحقیق برای هم زدن محلول از vortexer استفاده شد. اثر سرعت چرخش بر میزان استخراج در محدوده‌ی ۷۵۰-۲۵۰ دور در دقیقه بررسی شد. نمودار ۷ تأثیر این عامل را به خوبی نشان می‌دهد. در این روش وقتی سرعت چرخش خیلی بالا می‌رود، باعث ایجاد حباب در محلول می‌شود که منجر به کاهش انتقال آنالیت به داخل قطرات حلال استخراج‌کننده و در نهایت کاهش کارایی، تکرارپذیری و دقت کار می‌شود. سرعت ۵۰۰ دور بر دقیقه به عنوان سرعت چرخش بهینه انتخاب شد.

اثر قدرت یونی فاز دهنده بر میزان استخراج

در این تصویر اثر افزایش نمک به فاز دهنده بر روی راندمان استخراج بررسی شد. به طور کلی هنگامی که نمک به آب اضافه می‌شود، دو پدیده به طور هم زمان اتفاق می‌افتد: پدیده اول که به اثر Salting-out معروف است به این صورت روی می‌دهد که مولکول‌های آب در اطراف مولکول‌های یونی نمک، کره‌های آبپوشی تشکیل می‌دهند و این موضوع باعث کاهش مولکول‌های آب برای آبپوشی مولکول‌های آنالیت شده و نتیجه آن رانش مولکول‌های آنالیت به سمت حلال آلی و در نتیجه افزایش کارآیی استخراج است. پدیده دوم بر هم کنش الکتروستاتیکی مولکول‌های آنالیت و نمک است که این بر هم کنش باعث

کاهش تحرک مولکول‌های آنالیت، در نتیجه کاهش کارایی استخراج می‌شود. از سوی دیگر اضافه کردن نمک می‌تواند باعث افزایش ویسکوزیته محلول نمونه و برهم‌کنش‌های الکترواستاتیکی در محلول شده که منجر به کاهش حرکت آنالیت از فاز دهنده به حلال می‌شود. به طور کلی افزودن نمک بسته به ماهیت آنالیت ممکن است باعث افزایش، کاهش و یا عدم تغییر راندمان استحراج شود.

در این تحقیق اثر افزایش نمک، با افزودن نمک Nacl در محدوده ۰-۳۰ ٪ وزنی- حجمی بر روی راندمان استخراج بررسی شد. از روی نتایج نشان داده شده می‌توان مشاهده کرد که افزودن نمک به طور چشم‌گیری موجب کاهش استخراج دارو شده است.

اثر زمان استخراج بر میزان استخراج

استخراج و بازیافت آنالیت تحت‌تأثیر زمان هم خوردن نمونه است که منجر به تسهیل انتقال آنالیت از فاز دهنده به حلال آلی و در نهایت فاز گیرنده می‌شود. در این تحقیق اثر زمان استخراج از ۲۰ تا ۶۰ ثانیه مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج نشان می‌دهد که با افزایش زمان، میزان استخراج افزایش می‌یابد.

اثر دما بر میزان استخراج

در این مرحله اثر دما بر روی راندمان استخراج آنالیت مورد مطالعه قرار گرفت. انتظار می‌رود که افزایش دما باعث افزایش فاکتور تغلیظ به دلیل افزایش ضریب انتشار آنالیت به درون قطرات حلال آلی شود و از سوی دیگر زمان رسیدن به تعادل کاهش یابد. در این تحقیق اثر دما بر راندمان استخراج در محدوده ۲۵ تا ۶۵ درجه سانتی‌گراد بررسی شد.

با بررسی اثر افزایش دما به طور مستقل، راندمان استخراج افزایش می‌یابد.

شرایط بهینه استخراج داروی ایماتینیب به روش DLLME

نتایج تکرار پذیری روش (RSD) در جدول ۳ آورده شده است.

بحث

هدف ما در این پژوهش ارائه روش ساده‌تر، مقرون به صرفه‌تر، سریع‌تر و سازگارتر با محیط زیست بود که براساس بررسی صورت گرفته روش DLLME واجد این شرایط است، به طوری که:

۱- این روش قابلیت استفاده در صنعت برای اندازه‌گیری ایماتینیب در فرم‌های دارویی را دارد.

۲- این روش می‌تواند در آینده برای مطالعات و کارهای کلینیکی، بالینی و فارماکولوژی استفاده شود.

طبق مطالعه‌ای که انجام شد شرایط بهینه جهت بالاترین میزان استخراج این دارو از نمونه آبی مشخص شد که می‌توان از این داده‌ها و نتایج در جهت انجام مطالعات فارماکوکینتیک و بالینی در آینده استفاده کرد.

REFERENCES

1. Larson RA, Druker B J, Guilhot F, O'Brien SG, Riviere GJ, Krahnke T, et al. Imatinib Pharmacokinetics and Its Correlation with Response and Safety in Chronic-Phase Chronic Myeloid Leukemia: A Subanalysis of the IRIS Study. Blood 2008; 111: 4022–4028.

2. Christoforidis JB, DeAngelo DJ, D'Amico DJ. Resolution of Leukemic Retinopathy Following Treatment with Imatinib Mesylate for Chronic Myelogenous Leukemia. Am J Ophthalmol 2003;135:398–400.

3. Verboom MC, Kloth JSL, Swen JJ, Sleijfer S, Reyners AKL, Steeghs N, et al. Genetic polymorphisms in ABCG2 and CYP1A2 are associated with imatinib dose reduction in patients treated for gastrointestinal stromal tumors. Pharmacogenomics J 2019;19:473-479.

4. Suttorp M, Bornhäuser M, Metzler M, Millot F, Schleyer E. Pharmacology and Pharmacokinetics of Imatinib in Pediatric Patients. Expert Rev Clin Pharmacol 2017; 11 :219–231.

5. Saraji M, Boroujeni MK. Recent Developments in Dispersive Liquid–Liquid Microextraction. Anal Bioanal Chem 2013; 406 :2027–2066.

6. Tehrani MS, Givianrad MH, Mahoor N. Surfactant-Assisted Dispersive Liquid–Liquid Microextraction Followed by High-Performance Liquid Chromatography for Determination of Amphetamine and Methamphetamine in Urine Samples. Anal Methods 2012;4 :1357.

7. Amoli-Diva M, Taherimaslak Z, Allahyari M, Pourghazi K, Manafi MH. Application of dispersive liquid-liquid microextraction coupled with vortex-assisted hydrophobic magnetic nanoparticles based solid-phase extraction for

determination of aflatoxin M1 in milk samples by sensitive micelle enhanced spectrofluorimetry. Talanta 2015;134:98-104.

8. Ahmadi-Jouibari T, Fattahi N, Shamsipur M. Rapid extraction and determination of amphetamines in human urine samples using dispersive liquid-liquid microextraction and solidification of floating organic drop followed by high performance liquid chromatography. J Pharm Biomed Anal 2014;94:145-51.

9. Amiri Pebdani A, Dadfarnia S, Haji Shabani AM, Khodadoust S, Talebianpoor MS. Modified dispersive liquid-phase microextraction based on sequential injection solidified floating organic drop combined with HPLC for the determination of phenobarbital and phenytoin. J Sep Sci 2018;41:509-517.

10. Kiszkiel-Taudul I, Starczewska B. Dispersive Liquid-Liquid Microextraction of Famotidine and Nizatidine from Water Samples. J Chromatogr Sci 2019;57:93-100.

11. Rezaee M, Khalilian F. A novel method for the determination of trace thorium by dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic drop. Quim Nova 2016; 39: 167-171.

12. Ebrahimzadeh H, Mollazadeh N, Asgharinezhad AA, Shekari N, Mirbabaei F. Multivariate optimization of surfactant-assisted directly suspended droplet microextraction combined with GC for the preconcentration and determination of tramadol in biological samples. J Sep Sci 2013;36:3783-90.

13. Ghasemi E. Optimization of solvent bar microextraction combined with gas chromatography mass spectrometry for preconcentration and determination of tramadol in biological samples. J Chromatogr A 2012;1251:48-53.

14. Wang Q, Wong CH, Chan HYE, Lee WY, Zuo Z. Statistical Design of Experiment (DoE) based development and optimization of DB213 in situ thermosensitive gel for intranasal delivery. Int J Pharm 2018;539:50-57.

15. Darvish M, Qomi M, Akhgari M, Raoufi P. Determination of Trace Amounts of Methamphetamine in Biological Samples by Hollow Fiber Liquid-Phase Microextraction Followed by High Performance Liquid Chromatography. Biosci Biotechnol Res Asia 2015:12:587–597.

16. Emadzadeh S, Qomi M, Saadat M, Piroozi F. Three-Phase Hollow Fiber Liquid-Phase Micro Extraction for Determination and Analysis of Terazosin in Biological Fluids Via High Performance Liquid Chromatography at Trace Levels. Curr Anal Chem 2016;12:489–495.

17. Charmahali G, Qomi M, Akhavan S, Chaharmahali M, Tafti F. Determination of Trace Amounts of Risperidone in Human Urine Sample by Hollow Fiber Liquid-Phase Microextraction Combined with High Performance Liquid Chromatography. Biosci Biotechnol Res Asia 2015;12 : 539–548.

18. Faridi N, Ghasemi N, Qomi M, Ramezani M. Selective Method for Determination and Microextraction of Imatinib at Trace Levels: A Possible Dose Monitoring Technique in Cancer Patients. Curr Anal Chem 2018;14:495–503.

19. Rezaee R, Qomi M, Piroozi F. Hollow-Fiber Micro-Extraction Combined with HPLC for the Determination of Sitagliptin in Urine Samples. J Serbian Chem Soc 2015;80: 1311–1320.

20. Ghorbani M, Bagherian A. Optimization of astrazon blue adsorption onto sulfunated styrene-co-divinylbenzene resin by experimental design methodology. Nashrieh Shimi va Mohandesi Shimi Iran (NSMSI) 2016;35:25-35. [In Persian]

21. Asadollahi BM, Aghakhani AI. Application of solid phase microextraction and chemometrics in analysis of volatile components in cinnamon extract. Nashrieh Shimi va Mohandesi Shimi Iran (NSMSI) 2017;96:105-113. [In Persian]