

ساخت یک حسگر الکتروشیمیایی حساس برای اندازه گیری کاربامازپین در

پلاسمای انسانی با استفاده از نانوذرات ZSM-5

سید کریم حسینی نژاد درزی* و فرشاد شجیع

دانشکده علوم، دانشگاه صنعتی بابل، بابل، ایران

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۱/۲۷

تاریخ تصحیح: -

تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۴/۰۱

چکیده

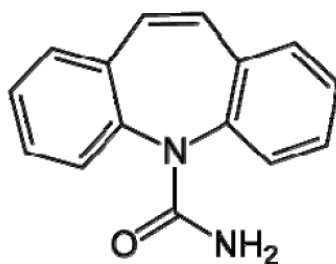
کاربامازپین (CBZ) یک داروی ضد تشنج است که برای درمان صرع مورد استفاده قرار می‌گیرد. اگرچه روش‌های کروماتوگرافی مایع برای اندازه‌گیری کاربامازپین از مزایایی مثل دقت و تکرارپذیری عالی برخوردارند اما مواردی مانند زمان طولانی مراحل آماده سازی و هزینه بالای تجهیزات و نگهداری، کاربرد آن‌ها را محدود کرده است. در این مطالعه حسگر الکتروشیمیایی جدید برای اندازه‌گیری کاربامازپین معرفی شده است. در این پژوهش، الکتروود خمیر کربن اصلاح شده، با استفاده از نانوذرات ZSM-5، پودر گرافیت و روغن پارافین ساخته شد. سپس رفتار الکتروشیمیایی الکتروود اصلاح شده برای اکسایش الکتروشیمیایی کاربامازپین با روش‌های ولتامتری بررسی شد. جریان‌های پیک ولتامتری پالسی تقاضی به طور خطی با غلظت CBZ در محدوده ۰٫۲۵ تا ۹۵ میکرومولار افزایش یافته و حد تشخیص ۰٫۱ میکرومولار بدست آمد. الکتروود خمیر کربن اصلاح شده با نانوذرات ZSM-5، امکان استفاده به عنوان یک حسگر عالی با تکرارپذیری، بازیابی خوب و حد تشخیص خیلی پایین را برای اندازه‌گیری کاربامازپین فراهم آورد. روش معرفی شده برای اندازه‌گیری کاربامازپین در نمونه‌های حقیقی نظیر پلاسمای انسانی مورد استفاده قرار گرفت و می‌تواند برای نمونه‌های بیمارستانی استفاده شود.

واژگان کلیدی: کاربامازپین، نانوذرات ZSM-5، CPE اصلاح شده، حسگر الکتروشیمیایی.

۱- مقدمه

مراقبت درمانی دارو، شاخه‌ای از شیمی بالینی و داروشناسی است که هدف اصلی آن اندازه‌گیری غلظت داروهای درمانی در خون و سایر مایعات بدن به منظور تعیین رژیم دارویی انفرادی در یک بیمار خاص می‌باشد. مراقبت درمانی بیشتر به داروهای اشاره دارد که از طرفی دارای عوارض جانبی خطرناک و احتمال بالای مسمومیت در صورت افزایش بیش از غلظت مجاز آن‌ها در پلاسما بوده و به همین دلیل دامنه درمانی محدودی دارند و از طرفی یک رابطه متغیر و غیرقابل پیش بینی در مورد میزان داروی تجویز شده و اثر درمانی از خود نشان می‌دهند. در نتیجه سرعت سوخت و ساز و دفع آن‌ها در بدن بیماران مختلف با وجود مقدار تجویز یکسان از دارو، متفاوت خواهد بود [۱].

کاربامازپین (CBZ) (شکل ۱) یک ترکیب دارویی بسیار قطبی است که به طور متداول به عنوان یک داروی ضد تشنج و پایدار کننده رفتاری برای انواع گوناگونی از بیماری صرع مورد استفاده قرار می‌گیرد [۲]. این ترکیب برای اولین بار در سال ۱۹۵۳ توسط والتر شیندلر ساخته شد و خواص ضد صرع آن در سال ۱۹۶۰ کشف شد و در اوایل ۱۹۷۰ برای درمان صرع به صورت مصرف خوراکی مورد استفاده قرار گرفت [۳]. مطالعات نشان داده است که استفاده از CBZ در دهه گذشته به طور چشمگیری افزایش یافته است و با دوز ۲۰۰-۱۲۰۰ میلی گرم در روز بسته به سن بیمار مصرف می‌شود [۴]. جذب CBZ در بدن آهسته و سرعت آن غیر قابل پیش بینی بوده و تقریباً ۲ تا ۳ درصد آن از طریق ادرار دفع می‌شود و حدود ۲۸ درصد آن نیز از طریق مدفوع به محیط زیست برمی‌گردد [۵]. بیشترین غلظت پلاسمایی این دارو ۴ تا ۸ ساعت پس از بلعیدن می‌باشد و به ۴ تا ۱۲ میلی گرم بر لیتر می‌رسد. اما ممکن است تا ۲۶ ساعت برای اثرگذاری زمان نیاز داشته باشد [۶]. افزایش بیش از حد مجاز و فراتر از دامنه دارویی غلظت کاربامازپین در بدن می‌تواند منجر به مشکلاتی از قبیل اختلال در سیستم عصبی، تاری دید، سرگیجه، اختلال در فعالیت‌های روزمره، حساسیت شدید و کاهش گلبول‌های سفید خون شود [۷]. بنابراین معرفی روشی کارآمد برای اندازه گیری غلظت این ماده در پلاسمای خون و سایر مایعات بیولوژیکی بدن و همچنین نمونه‌های دارویی نظیر قرص و کپسول بسیار حائز اهمیت می‌باشد. تاکنون روش‌های اندکی مانند کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا، کروماتوگرافی مایع جفت شده با طیف سنج جرمی، طیف سنجی نوری و طیف سنجی فلورسانسی برای اندازه گیری CBZ در ترکیبات تجاری و مایعات بیولوژیکی بدن انسان گزارش شده است [۸]. اگرچه روش‌های کروماتوگرافی مایع از مزایایی مثل دقت و تکرارپذیری عالی برخوردارند اما مواردی مانند زمان طولانی مراحل آماده سازی و هزینه بالای تجهیزات و نگهداری، کاربرد آن‌ها را در آزمایشگاه‌های بالینی محدود کرده است [۵]. در این مطالعه حسگر جدیدی برای اندازه گیری CBZ بر اساس اصول الکتروشیمیایی معرفی شده است.



شکل ۱- ساختار مولکولی کاربامازپین

۲- بخش تجربی

۲-۱- سنتز نانوزئولیت ZSM-5

مخلوطی از ۰/۳۵ گرم سدیم هیدروکسید و ۰/۱۴۷ گرم نمک سدیم آلومینات در آب تهیه و به مدت ۵ ساعت هم زده شد. سپس ۶۶ گرم سیلیکا سل کم کم به مخلوط فوق افزوده و مخلوط نهایی به مدت یک روز در دمای اتاق هم زده شد. پس از آن مخلوط یکنواخت شده به داخل راکتور استیلی حاوی تفلون منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۸۰ درجه سانتی گراد تحت فشار خود تولیدی حرارت داده شد. جامد حاصل سانتریفیوژ و با آب بدون یون شستشو داده شد تا pH آن به ۸ رسید. سپس به مدت ۵ ساعت در دمای ۵۵۰ درجه سانتی گراد کلسینه گردید.

۲-۲- تهیه الکتروُد

برای تهیه الکتروُد خمیر کربن اصلاح شده با نانوزئولیت ZSM-5، مقادیر مناسبی از نانوزئولیت سنتز شده، پودر گرافیت و روغن پارافین در یک هاون با یکدیگر مخلوط شده و به خوبی هم زده شد. خمیر حاصل شده در انتهای یک لوله شیشه ای، کاملاً فشرده شده و به منظور ایجاد اتصال الکتریکی از یک تکه سیمی مسی از انتهای دیگر شیشه به آن وارد شد.

۲-۳- روش تجزیه ای مورد استفاده

مجموعه ای از محلولهای بافر فسفات ۰/۱ مولار در محدوده pH=۳-۱۳ بوسیله ترکیب کردن مقادیر مناسبی از محلول های استاندارد ۰/۱ مولار فسفریک اسید، پتاسیم دی هیدروژن فسفات، پتاسیم مونوهیدروژن فسفات و پتاسیم فسفات بدست آمده و به عنوان الکتروولیت مورد استفاده قرار گرفتند. برای تهیه محلول های استاندارد با غلظت های مشخص از CBZ نیز ابتدا محلول ۰/۰۱ مولار از این ماده در استونیتریل تهیه شد تا از آن به عنوان محلول مادر برای ساخت محلول های استاندارد مورد استفاده قرار گیرد. سپس محلول های استاندارد در محدوده غلظتی ۰/۴۶ تا ۱۰۰ میکرومولار با رقیق سازی محلول مادر تهیه شدند. هر یک از این محلول ها به ترتیب از غلظت کم تا زیاد به سل الکتروشیمیایی منتقل شده و مقداری از بافر مورد نظر به آنها اضافه گردید. سپس ولتاموگرام های پالسی تفاضلی آن ها با اعمال پتانسیل الکتریکی مثبت در محدوده صفر تا ۱/۵ ولت ثبت شده و جریان پیک هر ولتاموگرام به دست آمد. در نهایت با استفاده از رابطه خطی جریان های پیک و غلظت محلول های استاندارد، نمودار کالیبراسیون آنها ترسیم گردید و از روی معادله کالیبراسیون غلظت محلول های مجهول محاسبه گردید. نمونه های مجهول تهیه شده در این مطالعه شامل نمونه های دارویی و نمونه های بیولوژیکی بودند.

۲-۴- آنالیز نمونه‌های دارویی

جهت اندازه‌گیری نمونه‌های دارویی و به‌کارگیری روش تجزیه‌ای در تعیین مقدار دقیق داروها در قرص‌های حاوی آن‌ها، تهیه محلول قرص‌ها برای تزریق به سل الکتروشیمیایی مورد نیاز است. ابتدا ده عدد از قرص CBZ در داخل هاون چینی ریخته شده، به صوت پودر درآمده و به خوبی با یکدیگر مخلوط و همگن شدند. از مخلوط قرص‌ها وزنی معادل یک قرص با ترازوی دیجیتال توزین و در ۵۰ میلی‌لیتر استونیتریل حل شد. پس از آن برای حذف ناخالصی‌ها و مواد پرکننده موجود در قرص، محلول سانتریفیوژ شده تا محلول شفافی به دست آمد. حجم مشخصی از محلول حاصله با میکروپیپت به سل ولتامتری تزریق گردید، مقداری از بافر با pH بهینه (pH=۵) به آن افزوده گردید و غلظت محلول در سل محاسبه شد و ولتاموگرام پالسی تفاضلی آن‌ها به دست آمد. سپس جریان پیک ایجادشده از محلول مجهول در معادله کالیبراسیون مربوطه قرار گرفته و غلظت مجهول، درصد خطا و مقدار بازیابی روش محاسبه گردید.

۲-۵- آنالیز نمونه‌های بیولوژیکی

به منظور اثبات قابلیت روش در اندازه‌گیری غلظت داروها در نمونه‌های بیولوژیکی مثل خون، پلاسما، سرم و ادرار انسانی، ابتدا ۱۰۰ میلی‌لیتر پلاسما از سازمان انتقال خون بابل تهیه شد. مقداری از پلاسما با حجمی از بافر با pH بهینه (pH=۵) رقیق شده به داخل سل ولتامتری منتقل شد. سپس ترکیبی از حجم‌های مشخص از محلول‌های استاندارد CBZ به داخل سل تزریق و ولتاموگرام آن‌ها ثبت شد. سپس پیک جریان حاصل از هر ولتاموگرام در معادله کالیبراسیون قرار و غلظت مجهول و میزان بازیابی روش محاسبه گردید.

۲-۶- تجهیزات مورد استفاده

به منظور مطالعات و اندازه‌گیری‌های الکتروشیمیایی، از دستگاه پتانسیواستات/گالوانواستات SAMA500 ساخت ایران- اصفهان استفاده شد. سیستم سه الکترودی شامل الکترود مرجع (3M) Ag/AgCl/KCl، الکترود کمکی (الکترود سیم پلاتین) و الکترود کار (الکترودمیر کربن اصلاح شده) می‌شود. برای سنتز نانوذولیت ZSM-5 از یک دستگاه همزن مغناطیسی، یک دستگاه آون الکتريکی، یک دستگاه اتوکلاو استیل با قابلیت ایجاد فشار خود تولیدی و یک دستگاه سانتریفیوژ دور بالا استفاده گردید. به منظور مطالعه ساختار مولکولی و گروه‌های عاملی نانوذولیت سنتز شده از یک دستگاه طیف‌سنج مادون قرمز تبدیل فوری (FT-IR) مدل Varian 670 ساخت کشور آمریکا استفاده شد. برای مطالعه ساختار بلوری نانوذولیت نیز از دستگاه پراش پرتو ایکس (XRD) مدل Shimadzu-Maxima-7000 ساخت کشور ژاپن استفاده شد. جهت تهیه تصاویر میکروسکوپی در مقیاس نانو از بلورهای ZSM-5 و سطح الکترودهای ساخته‌شده از میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی (FESEM) مدل MIRA 3 XM TESCAN ساخت کشور چک استفاده شد. تهیه محلول‌های بافر در pH های مختلف به کمک یک دستگاه

pH سنج از شرکت Huna صورت گرفت. جهت تهیه محلول‌های استاندارد از داروها در غلظت‌های مختلف نیز از یک ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم استفاده شد. همچنین جهت تزریق نمونه به سل الکتروشیمیایی از یک میکروپیپت با دقت ۱ میکرولیتر استفاده گردید.

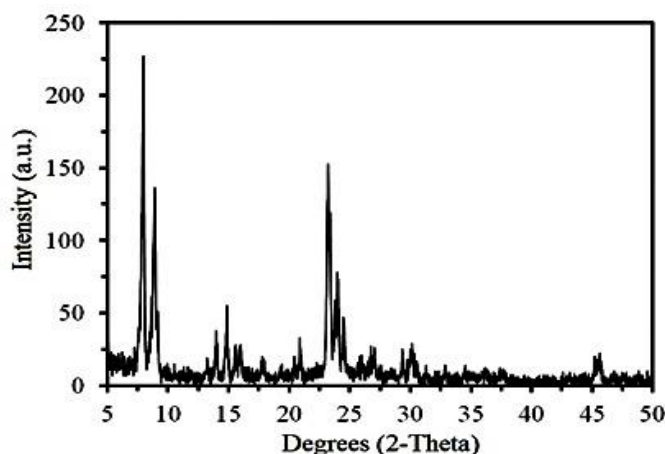
۳- بحث و نتیجه گیری

۳-۱- تعیین خصوصیات نانوزئولیت ZSM-5 سنتزی

الگوی پراش اشعه ایکس به دست آمده از نانوزئولیت ZSM-5 سنتزی در شکل ۲ آمده است. وجود پیک‌های مشخصه ساختار شبکه‌ای ZSM-5 شامل پیک‌هایی با شدت بالا در مقادیر 2θ معادل ۷/۹۸، ۸/۹، ۲۳/۲ و ۲۴/۵ و پیک‌های ضعیف‌تر در موقعیت‌های دیگر (۴۶/۱، ۳۰/۸، ۲۰/۹، ۱۴/۹، ۱۳/۹ = 2θ) می باشد که نشان‌دهنده بلورینگی مناسب نمونه سنتز شده است [۹-۱۴]. با توجه به طیف XRD به دست آمده و با استفاده از رابطه دبی-شرر (رابطه ۱)، می‌توان اندازه بلورها را تخمین زد [۱۵].

$$D = \frac{0.9\lambda}{\beta \cos\theta} \quad (1)$$

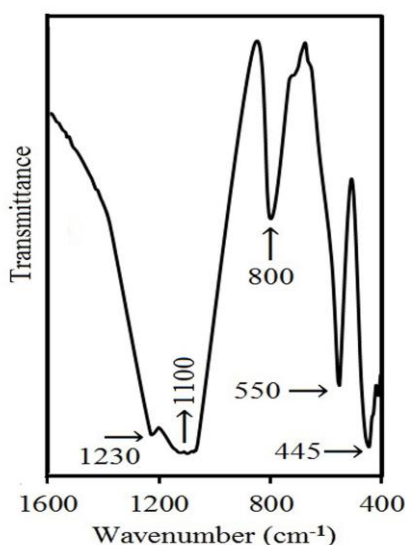
در این فرمول، λ طول موج پرتو ایکس (۰/۱۵۴۱۸ نانومتر)، β پهنای پیک اصلی در نصف ارتفاع بیشینه‌ی آن (FWHM) برابر ۰/۱۴۶ درجه (۰/۰۲۵۴۸ رادیان) و θ زاویه‌ی پراش پیک اصلی (در موقعیت $2\theta = 7.98$ درجه) می‌باشد. اندازه بلورهای نانوزئولیت سنتز شده با استفاده از فرمول دبی-شرر ۵۴/۶۶ نانومتر تخمین زده شد.



شکل ۲- الگوی پراش پرتو ایکس نانوزئولیت سنتزی

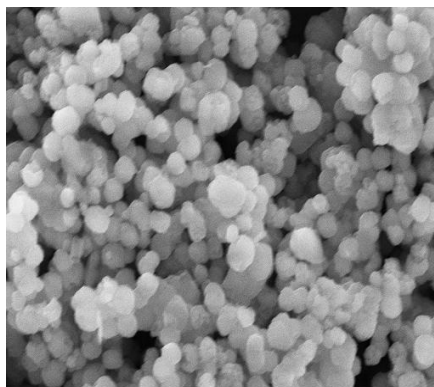
شکل ۳ طیف مادون قرمز تبدیل فوریه (FT-IR) نانوزئولیت ZSM-5 سنتزی را در محدوده طول موج $400-4000\text{ cm}^{-1}$ نشان می‌دهد. حضور پیک‌های مشخصه ZSM-5 در این شکل، نشان از سنتز موفقیت‌آمیز این نانوزئولیت دارد. نوار جذبی در

طول موج 445 cm^{-1} مربوط به پیوندهای Si-O و Al-O داخل شبکه می باشد. پیک موجود در ناحیه 550 cm^{-1} به دلیل ارتعاش های ناشی از حلقه های پنج ضلعی موجود در اتصالات خارجی می باشد. نوار جذبی در ناحیه 800 cm^{-1} مربوط به ارتعاشات کششی متقارن پیوندهای خارجی و نوار 1100 cm^{-1} مربوط به ارتعاشات کششی نامتقارن پیوندهای داخلی می باشند. پیک موجود در طول موج 1230 cm^{-1} ناشی از ارتعاش کششی نامتقارن پیوندهای خارجی مربوط به چهاروجهی های SiO_4 یا AlO_4 می باشند. نوارهای موجود در نواحی 1630 و 3450 cm^{-1} نیز مربوط به جذب سطحی آب و گروه هیدروکسیل می باشند [۱۶, ۱۷].



شکل ۳- طیف سنجی مادون قرمز نانوزئولیت سنتزی

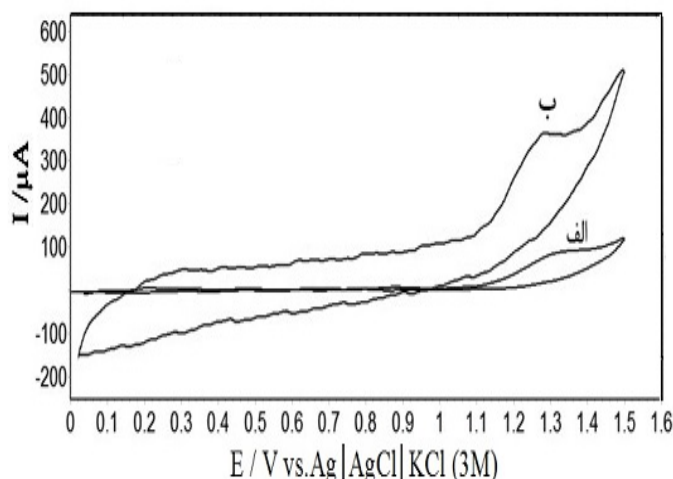
عکس FESEM به دست آمده از شکل ظاهری نانوبلورهای زئولیت ZSM-5 سنتز شده در شکل ۴ آمده است. حالت بلوری ذرات در این تصاویر مشخص است و همان گونه که مشاهده می شود ذرات دارای یکنواختی خوبی می باشند که این یکنواختی اندازه ی ذرات منجر به افزایش سطح کاتالیزور و نیز بهبود کارایی فرآیند کاتالیز خواهد شد چرا که یکنواختی اندازه ذرات، پدیده های انتقال مانند نفوذ واکنشگرها و محصولات را در حین فرآیند تأمین خواهد کرد. بر اساس تصاویر به دست آمده از FESEM، ذرات سنتز شده در محدوده ی ۵۶ تا ۷۳ نانومتر قرار دارند.



شکل ۴- تصویر FESEM از ذرات نانوزئولیت ZSM-5

۳-۲- بررسی رفتار الکتروشیمیایی کاربامازپین در سطح الکتروکد خمیر کربن اصلاح شده

رفتار الکتروشیمیایی ۰/۱ میلی مولار کاربامازپین در pH=۵ و در سطح الکتروکد CPE و ZSM-5/CPE با استفاده از تکنیک ولتامتری چرخه‌ای مورد مطالعه قرار گرفته و با یکدیگر مقایسه شدند. همان‌طور که در شکل ۵ ملاحظه می‌شود، با استفاده از الکتروکد CPE کاربامازپین یک پیک ضعیف و پهن را نشان می‌دهد درحالی‌که با استفاده از الکتروکد ZSM-5/CPE پیک اکسایش قویاً افزایش یافته و تیزتر شده و از ۹۰ به ۳۶۵ میکروآمپر رسیده است. پتانسیل پیک اکسایش نیز اندکی کاهش یافته و از ۱/۳۲ ولت بر روی الکتروکد CPE به ۱/۲۵ ولت بر روی الکتروکد ZSM-5/CPE رسیده است که نشان از کاهش اضافه ولتاژ مورد نیاز با استفاده از الکتروکد اصلاح‌شده دارد. این تغییرات نشان دهنده افزایش سطوح فعال واکنشی و تسهیل فرآیند انتقال الکترون بر روی سطح الکتروکد ZSM-5/CPE می‌باشد. همچنین هیچ پیک کاهش در مرحله برگشت مشاهده نمی‌شود که نشان از برگشت ناپذیر بودن فرآیند اکسایش الکتروشیمیایی دارد. از طرفی وجود تنها یک پیک اکسایش موید این موضوع است که انتقال الکترون طی فرآیند اکسایش تنها در یک مرحله صورت می‌گیرد [۱۸]. رفتار الکتروشیمیایی الکتروکدهای CPE و ZSM-5/CPE در غیاب کاربامازپین بررسی شد و مطابق انتظار هیچ پیک اکسایش و کاهش حاصل نشده است. زیرا هیچ‌گونه فعال الکتروشیمیایی در این محیط وجود ندارد.



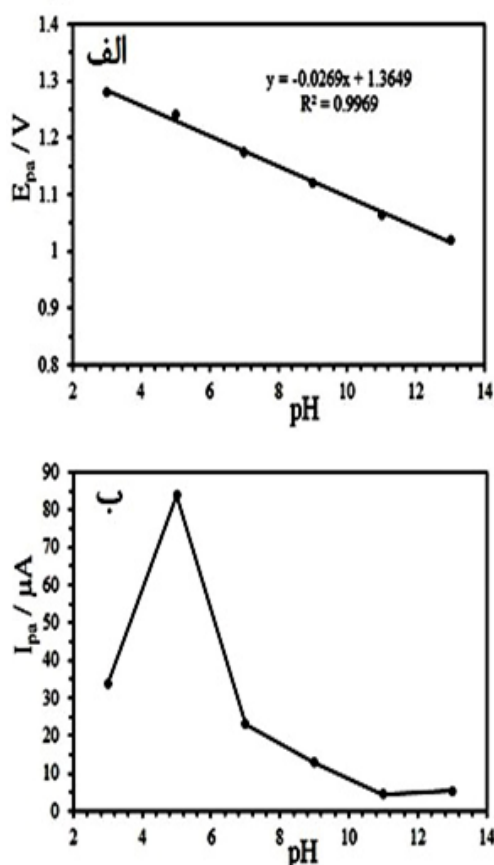
شکل ۵- ولتاموگرام چرخه‌ای ۰/۱ mM کاربامازپین در محلول بافر فسفات (pH = ۵) بر سطح الکتروده CPE (الف) و ZSM-5 /CPE (ب)

۳-۳- بررسی اثر pH بر روی اکسایش الکتروشیمیایی CBZ

اثر pH بر روی پتانسیل و جریان پیک اکسایش ۰/۱ میلی مولار از کاربامازپین در pH های ۳، ۵، ۷، ۹، ۱۱ و ۱۳ در سطح الکتروده ZSM-5/CPE مورد مطالعه قرار گرفت که نتایج آن در شکل ۶ آمده است. همان‌گونه که در نمودار شماره ۶- (الف) مشاهده می‌شود، بین pH محلول الکترولیت و پتانسیل اکسایش ارتباطی مستقیم و خطی وجود داشته و با افزایش pH از ۳ به ۱۳، پتانسیل مورد نیاز برای اکسایش به سمت مقادیر کمتر میل پیدا کرده و کاهش می‌یابد که این موضوع نشان‌دهنده حضور پروتون در فرایند اکسایش CBZ است [۱۸]. رابطه خطی بین پتانسیل اکسایش و pH به صورت $E_{pa} (V) = -0.0269 \text{ pH} + 1.3649$ ($R^2=0.9969$) می‌باشد. با استفاده از قدر مطلق شیب حاصل از نمودار و رابطه (۲) می‌توان نسبت تعداد پروتون به تعداد الکترون‌های موجود در فرآیند اکسایش کاربامازپین را محاسبه کرد که بر این اساس نسبت m/n برابر ۰/۴۵ به دست آمد و نشان می‌دهد که تعداد پروتون‌های آزاد شده در فرآیند اکسایش، نصف تعداد الکترون‌ها می‌باشد [۱۹].

$$dE_p/dpH = 2.303mRT/nF = 0.059 \text{ m/n} \quad (2)$$

در شکل ۶- (ب) نیز ارتباط جریان پیک اکسایش کاربامازپین در pH های مختلف نشان داده شده است و همانطوری که مشاهده می‌شود در pH=۵ جریان به طور محسوسی نسبت به سایر pHها افزایش داشته است بنابراین pH=۵ به عنوان pH بهینه برای اعمال روش تجزیه ای و اندازه گیری کاربامازپین مورد استفاده قرار گرفت.

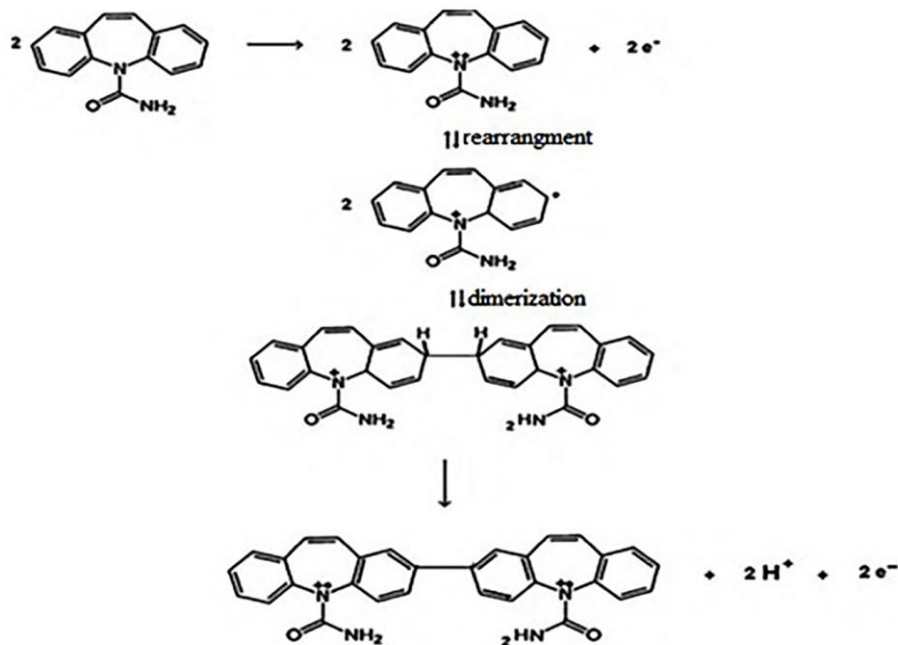


شکل ۶- (الف) ارتباط بین پتانسیل پیک اکسایش CBZ و pH و (ب) ارتباط بین جریان پیک اکسایش CBZ و pH

۳-۴- مکانیسم اکسایش الکتروشیمیایی CBZ

بر اساس اطلاعات به دست آمده از ولتامتری چرخه‌ای، اثر pH و سایر مطالعاتی که پیش از این بر روی اکسایش الکتروشیمیایی کاربامازپین صورت گرفته است، مکانیسم اکسایش این ماده در سطح الکتروود را می‌توان به صورت فرآیند نشان داده شده در شکل ۷ تعریف کرد که طی آن ابتدا دو مولکول کاربامازپین به طور همزمان درگیر فرآیند اکسایش شده و از اتم نیتروژن موجود در حلقه آن‌ها یک الکترون جدا شده و کاتیون‌های رادیکالی به وجود می‌آیند. سپس مولکول‌های رادیکالی به فرم رزونانسی خود تبدیل شده و به دنبال آن بلافاصله با یکدیگر دایمر می‌شوند (دایمر شدن فرآیندی متداول برای رادیکال‌های کاتیونی ناپایدار است). در مرحله بعد، دایمر به وجود آمده نیز طی فرآیند اکسایش دو الکترون و دو پروتون از دست می‌دهد. نتیجه نهایی فرآیند از دست دادن چهار الکترون و دو پروتون با مشارکت دو مولکول کاربامازپین می‌باشد. لازم به ذکر است که به دلیل مساحت سطح زیاد و توانایی انتقال الکترون بالای اصلاح کننده‌ها، مراحل موجود در فرآیند اکسایش

از جمله دو مرحله از دست دادن الکترون، به طور همزمان صورت گرفته و قابل تفکیک در ولتاموگرام نیستند. به همین دلیل نیز فقط یک پیک اکسایش در ولتامتری چرخه‌ای کاربامازپین مشاهده می‌شود [۱۸، ۲۰].



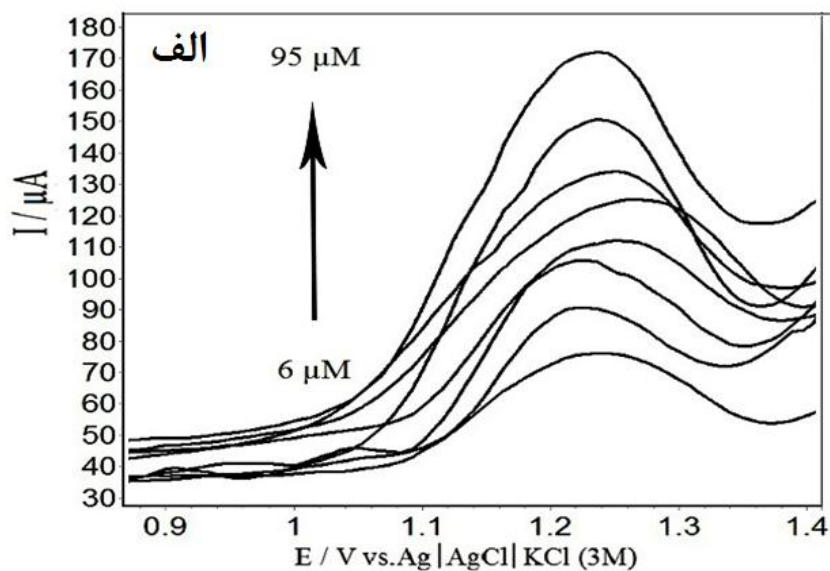
شکل ۷- مکانیسم اکسایش الکتروشیمیایی کاربامازپین در سطح الکتروود ZSM-5/CPE

۳-۵- اندازه گیری CBZ در محلول‌های استاندارد و منحنی کالیبراسیون

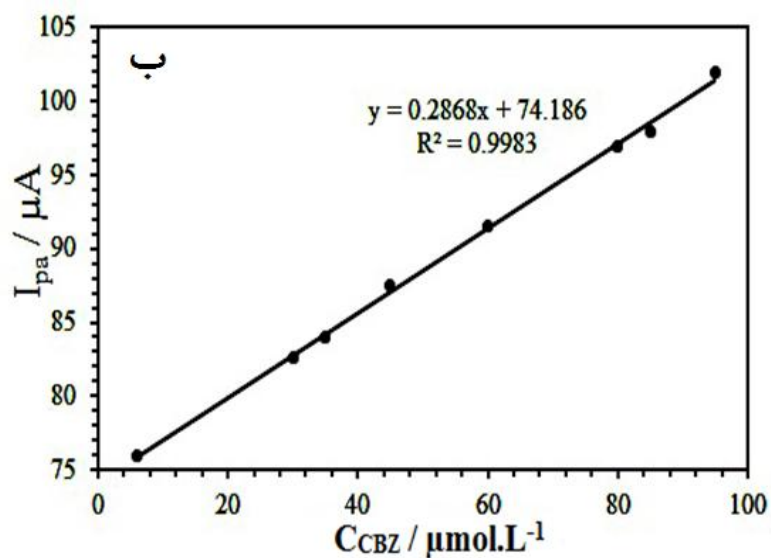
فعالیت الکتروکاتالیزوری عالی الکتروود ZSM-5/CPE که در بخش‌های قبل مورد بررسی قرار گرفت، امکان اندازه‌گیری کاربامازپین را در غلظت‌های کم میسر می‌سازد. به این منظور و جهت آنالیز نمونه‌های دارویی و بیولوژیکی ابتدا نیاز به تهیه منحنی کالیبراسیون می‌باشد تا با استفاده از آن اندازه‌گیری غلظت نمونه‌های مجهول صورت گیرد. برای تهیه منحنی کالیبراسیون نیز محلول‌هایی با غلظت‌های متفاوت و مشخص از کاربامازپین (از ۶ تا ۹۵ میکرومولار) تهیه شد و با استفاده از تکنیک DPV، ولتاموگرام آن‌ها به دست آمد که در شکل ۸ نشان داده شده است. مشاهده می‌شود که با افزایش تدریجی غلظت کاربامازپین، جریان پیک اکسایش آن نیز زیادتر می‌شود و یک رابطه مستقیم و خطی بین غلظت و جریان پیک اکسایش وجود دارد. این رابطه خطی، معادله کالیبراسیون کاربامازپین است که در شکل ۹ نشان داده شده است. با استفاده از شیب نمودارها و هم‌چنین محاسبه انحراف استاندارد محلول شاهد، حد تشخیص روش (LOD) و حد اندازه‌گیری کمی (LOQ) مربوط به هر دارو به ترتیب با استفاده از رابطه‌های (۳) و (۴) محاسبه شد. گستره دینامیکی خطی (LDR) نیز با توجه به محدوده خطی نمودار کالیبراسیون و میزان LOQ به دست آمد.

$$LOD = \frac{3S_{bl}}{m} \quad (3) \quad LOQ = \frac{10S_{bl}}{m} \quad (4)$$

در این رابطه، نماد S_{bl} مقدار انحراف استاندارد محلول شاهد (محلول بافر فسفات در غیاب دارو) و m مقدار شیب نمودار کالیبراسیون مربوط به دارو می‌باشد [۲۱]. نتایج حاصله در جدول شماره ۱ قابل ملاحظه است.



شکل ۸- ولتاموگرام پالس تفاضلی ZSM-5/CPE در محلول بافر فسفات (pH = ۵) با غلظت‌های مختلف از CBZ



شکل ۹- نمودار منحنی کالیبراسیون CBZ

جدول ۱- پارامترهای نمودار کالیبراسیون به دست آمده از اندازه گیری CBZ

معادله کالیبراسیون	R ²	LOD(μM)	LOQ(μM)	LDR(μM)
y = 0.2868 x + 74.186	0.9983	0.1	0.35	0.35-95

۳-۶- آنالیز نمونه های دارویی حاوی کاربامازپین

با در اختیار داشتن منحنی کالیبراسیون می توان اقدام به اندازه گیری و آنالیز مقدار دارو در نمونه های حقیقی کرد. به این منظور ابتدا آنالیز قرص کاربامازپین در دستور کار قرار گرفت و برای این کار، دو نوع قرص با دوزهای مختلف تهیه گردید و مطابق آنچه پیشتر گفته شد، از آنها محلول هایی ساخته شد. محلول ها به سل ولتامتری منتقل گشته و ولتاموگرام آنها ثبت گردید و سپس از روی پیک جریان به دست آمده از ولتاموگرام و با استفاده از معادله کالیبراسیون غلظت دارو محاسبه گردید که نتایج آنها در جدول شماره ۲ آمده است.

جدول شماره ۲- اندازه گیری مقدار CBZ در نمونه های دارویی

آنالیت	مقدار واقعی	مقدار اندازه گیری	غلظت واقعی در سل	غلظت اندازه گیری	میزان بازیابی	انحراف استاندارد نسبی حاصل
	(میلی گرم)	شده (میلی گرم)	ولتامتری (μM)	شده (μM)	روش (درصد)	از ۵ اندازه گیری (درصد)
قرص ۲۰۰ میلی گرمی	۲۰۰	۲۰۲٫۲۴	۱۶٫۷۰	۱۶٫۸۹	۱۰۱٫۱۲	۲٫۷۸
قرص ۴۰۰ میلی گرمی	۴۰۰	۳۹۸٫۷۶	۳۳٫۵۰	۳۳٫۳۹	۹۹٫۶۹	۲٫۷۸

۳-۷- اندازه گیری کاربامازپین در پلاسماي انسانی

روش تجزیه ای معرفی شده، برای اندازه گیری کاربامازپین در پلاسماي انسانی مورد استفاده قرار گرفت. به این منظور ۱۰ میلی لیتر پلاسما به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه تحت سانتریفیوژ قرار گرفته و پس از آن ذرات شناور آن جدا شدند. سپس ۲ میلی لیتر از محلول به دست آمده با ۱۰ میلی لیتر از بافر فسفات (pH=۵) رقیق شده و به سل ولتامتری منتقل شد. سپس محلول هایی با غلظت های مختلف از CBZ تهیه شده و به محلول داخل سل اضافه گردید تا ولتاموگرام پالس تفاضلی آن ها به دست آید. پس از آن، جریان پیک مربوط به هر ولتاموگرام یادداشت گردید. این اندازه گیری ۵ مرتبه برای هر مخلوط تکرار شد (n=۵) و میانگین جریان های به دست آمده در معادله کالیبراسیون مربوط به کاربامازپین قرار داده شده و غلظت آن ها محاسبه گردید. در نهایت با مقایسه غلظت های به دست آمده با غلظت های واقعی که به سل تزریق شده بود، میزان

بازیابی روش برای هریک از محلول ها به دست آمد. انحراف استاندارد نسبی برای هر محلول نیز با توجه به جریان‌های ایجاد شده در ۵ اندازه‌گیری تکراری محاسبه شد. مجموع نتایج حاصل شده در جدول شماره ۳ گردآوری شده است. نتایج موجود در جداول ۲ و ۳ نشان می‌دهد که الکترود ZSM-5/CPE می‌تواند به طور موفقیت آمیزی برای اندازه‌گیری کاربامازپین در نمونه‌های دارویی و بیولوژیکی مورد استفاده قرار گیرد.

جدول ۳- اندازه‌گیری CBZ در پلاسما انسانی

آنالیت	غلظت افزوده شده به سل ولتامتری (μM)	غلظت اندازه‌گیری شده (μM)	میزان بازیابی روش (درصد)	انحراف استاندارد نسبی حاصل از ۵ اندازه‌گیری (درصد)
نمونه ۱	۵۰	۴۹٫۲۶	۹۸٫۵۲	۳٫۲۷
نمونه ۲	۲۵	۲۴٫۸۶	۹۹٫۴۳	۲٫۵۵
نمونه ۳	۹۰	۸۸٫۱۱	۹۷٫۹۰	۳٫۷۸
نمونه ۴	۷۰	۷۱	۱۰۱٫۴۳	۳٫۴۵

۳-۸- اثر گونه‌های مزاحم بیولوژیکی

اثر حضور تعدادی از گونه‌های مزاحم بر روی پاسخ الکتروشیمیایی CBZ مورد بررسی قرار گرفت. به این صورت که محلولی شامل $10 \mu\text{M}$ کاربامازپین در بافر فسفات با $\text{pH} = 5$ تهیه شده، به سل ولتامتری منتقل و جریان پیک هر دارو با روش DPV به دست آمد. سپس به این محلول هر بار یکی از گونه‌های مزاحم با غلظت $100 \mu\text{M}$ افزوده و مجدداً جریان پیک داروها اندازه‌گیری شد. این آزمایش ۵ مرتبه برای هر گونه ($n = 5$) تکرار گردید و مقدار میانگین جریان‌های به دست آمده از CBZ در حضور گونه مزاحم با مقادیر آن‌ها در غیاب گونه مزاحم مقایسه شده و درصد تغییر جریان گزارش گردید. برای افزودن گونه‌های بعدی، سطح الکترود پولیش داده شده و مجدداً محلولی تازه از CBZ و گونه مزاحم جدید تهیه شد. داروهایی که به عنوان گونه مزاحم مورد استفاده عبارتند از: دکسترومتورفان، دی فنیل هیدرامین، مترونیدازول، فنوباریتال، فنی توئین، تریپتوفان و تنوفیلین که نتایج آن‌ها در جدول ۴ گزارش شده است. همانگونه که مشاهده می‌شود حضور گونه‌های مزاحم تغییراتی اندک و جزئی را در پاسخ ولتامتری کاربامازپین ایجاد کرده‌اند. میزان این تغییرات در مورد همه گونه‌های مزاحم کمتر از ۵ درصد بوده است. پس می‌توان نتیجه گرفت که روش تجزیه‌ای معرفی شده از گزینش‌پذیری مطلوبی برای اندازه‌گیری کاربامازپین برخوردار است.

جدول ۴- اثر گونه‌های مزاحم بیولوژیکی بر روی پاسخ ولتامتری کاربامازپین

گونه مزاحم	غیاب گونه مزاحم	دکسترومتورفان	دی فنیل هیدرامین	مترونیدازول	فنوباربیتال	فنی توئین	تریپتوفان	تئوفیلین
میانگین جریان CBZ	۱۵,۵۷	۱۵,۲۱	۱۵,۰۷	۱۶,۱۲	۱۴,۸۶	۱۵,۳۵	۱۵,۷۵	۱۶,۰۳
درصد تغییر جریان CBZ	_____	۲,۳۱	۳,۲۱	۳,۵۳	۴,۵۶	۱,۴۱	۱,۱۵	۲,۹۵

۳-۹- بررسی تکرارپذیری و پایداری الکتروود اصلاح شده

تکرارپذیری الکتروود ZSM-5/CPE بوسیله ثبت ولتاموگرام‌های پالس تفاضلی (DPV) مکرر (n=۱۰) از غلظت‌های ثابتی از کاربامازپین (۰/۱ میلی‌مولار) در pH=۵ و استخراج جریان‌های پیک حاصل شده از هر ولتاموگرام مورد بررسی قرار گرفت و انحراف استاندارد نسبی (RSD) نتایج به دست آمده برابر ۲/۷٪ محاسبه شد که نشان از تکرارپذیری عالی نتایج الکتروود اصلاح شده و دقت بالای روش تجزیه‌ای معرفی شده دارد. همچنین بررسی پایداری الکتروود نیز با پولیش دادن سطح الکتروود و ثبت ولتاموگرام ۰/۱ میلی‌مولار کاربامازپین در pH=۵ و سپس نگهداری الکتروود به مدت دو هفته در شرایط محیطی و ثبت مجدد ولتاموگرام و مقایسه آن با ولتاموگرام اولیه انجام پذیرفت که مشخص شد جریان پیک‌های به دست آمده پس از گذشت دو هفته برابر ۹۶٪ مقادیر اولیه آن‌ها بوده است □ این آزمایش پس از یک ماه و سه ماه مجدداً بر روی الکتروود انجام گرفت و جریان‌های به دست آمده به ترتیب به ۹۴٪ و ۹۱٪ مقادیر اولیه خود رسیده بودند که این موضوع نشان از پایداری خوب الکتروود و امکان نگهداری طولانی مدت آن دارد. قابلیت تولید مجدد الکتروود ZSM-5/CPE نیز به وسیله ساخت ۵ الکتروود به طور مستقل ولی با شرایط یکسان و سپس ثبت ولتاموگرام پالسی تفاضلی غلظت‌های ثابتی از کاربامازپین در pH=۵ مورد مطالعه قرار گرفت که نتایج آن‌ها بسیار به یکدیگر نزدیک بوده و انحراف استاندارد نسبی بین آن‌ها برابر ۳/۴٪ محاسبه شد. این موضوع نشان می‌دهد که امکان تولید مجدد الکتروود اصلاح شده در صورت تخریب یک الکتروود امکان پذیر است.

۴- نتیجه گیری

در این مطالعه، اندازه گیری الکتروشیمیایی کاربامازپین در نمونه‌های دارویی و پلاسمای انسانی با استفاده از الکتروود خمیر کربن اصلاح شده با نانوذرات ZSM-5 مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور ابتدا ZSM-5 در مقیاس نانو سنتز شد و سپس در ترکیب با پودر گرافیت، الکتروود اصلاح شده به طور دستی ساخته شد. فعالیت کاتالیزوری اصلاح کننده در شناسایی و اندازه‌گیری کاربامازپین بوسیله تکنیک‌های ولتامتری چرخه‌ای و پالس تفاضلی مورد بررسی قرار گرفت. همچنین اثر pH بر روی پاسخ الکتروشیمیایی کاربامازپین مطالعه شد و pH=۵ به عنوان بهترین محیط بافری انتخاب شد. روش معرفی شده در

این تحقیق ساده، سریع، حساس و به خصوص در مقایسه با سایر روش های متداول مثل کروماتوگرافی مایع، ارزان است. در نهایت الکتروود اصلاح شده به طور موفقیت آمیزی در اندازه گیری کاربامازپین مورد استفاده قرار گرفت و حد تشخیص بسیار خوب ۰/۳۵ میکرومولار حاصل شد. همچنین در جدول ۵ نتایج به دست آمده از اندازه گیری کاربامازپین در این تحقیق با تعدادی از سایر روش های الکتروشیمیایی که پیش از این برای اندازه گیری این دارو مورد استفاده قرار گرفته اند، مقایسه شده است.

جدول ۵- مقایسه کار حاضر با تعدادی از روش های الکتروشیمیایی انجام شده در اندازه گیری CBZ

الکتروود	روش	pH	LOD(μ M)	LDR(μ M)	مرجع
[BnMIM]PF6/CPE	DPV	۶٫۸	۰٫۹۸	۷-۷۰۰	[۲۲]
Gold	CV	۷	۰٫۰۱	۰٫۱-۱۰۰	[۲۳]
GCE	DPV	۷٫۳	۴۶٫۵	□□□	[۲۴]
ERGO-SWCNT/GCE	آمپرومتری	۵	۰٫۰۲۹	۰٫۰۵-۳	[۲۵]
MWCNTs-GCE	LSV	۶٫۹	۰٫۰۴	۰٫۱۳-۱٫۶	[۱۸]
Fulleren-C ₆₀ /GCE	DPV	۷	۰٫۹۱	۱-۲۵۰۰	[۱۹]
Ag/TiO ₂ -CPE	DPV	۲	۰٫۸۶	۲٫۵-۱۰۰	[۲۰]
ZSM-5/CPE	DPV	۵	۰٫۱	۰٫۳۵-۹۵	کار حاضر

۵- مراجع

- [1] E. Pretorius, H. Klinker and B. Rosenkranz, *Therapeutic drug monitoring*, **33** (2011) 265-274
- [2] M. Dalby, *Epilepsia*, **12** (1971) 325.
- [3] W. Schindler and F. Häfliger, *Helvetica Chimica Acta*, **37** (1954) 472.
- [4] R. H. Mattson, *Epilepsia*, **36** (1995) S22.
- [5] E. Doods LJ. *Drugs in Use: Clinical Case Studies for Pharmacists*, London, *Pharmaceutical Press*, (2010).

- [6] O. Guneyssel, O. Onur, A. Denizbasi and M. Saritemur, *Journal of Medical Case Reports*, **2** (2008) 242.
- [7] J. M. Pellock, *Epilepsy & Behavior*, **3** (2002) S14.
- [8] T. Takayasu, Y. Ishida, A. Kimura, M. Nosaka, Y. Kuninaka, M. Kawaguchi and T. Kondo, *Forensic Toxicology*, **28** (2010) 124.
- [9] A. Gürses, Ç. Doğar, M. Yalçın, M. Açıkyıldız, R. Bayrak and S. Karaca, *Journal of Hazardous Materials*, **131** (2006) 217.
- [10] K. A. Khatamian M, Haghighi M, Ghadiri M. , *Appl. Surf. Sci.*, **258** (2011) 865.
- [11] S. K. H. Nejad-Darzi, A. Samadi-Maybodi and M. Ghobakhluo, *Journal of Porous Materials*, **20** (2013) 909.
- [12] N. Viswanadham, S. K. Saxena, J. Kumar, P. Sreenivasulu and D. Nandan, *Fuel*, **95** (2012) 298.
- [۱۳] ج. محمودی، م. ن. لطف اللهی ، ع. حقیقی اصل، مجله شیمی کاربردی (اندیشه علوم)، شماره ۳۱ (۱۳۹۳) ص ۱۹.
- [۱۴] ب. محمدخانی، م. حقیقی ، ع. آقایی، مجله شیمی کاربردی (اندیشه علوم)، شماره ۳۹ (۱۳۹۵) ص ۶۵.
- [15] A. Patterson, *Physical Review*, **56** (1939) 978.
- [16] M. Khatamian, S. Hashemian and S. Sabae, *Materials Science in Semiconductor Processing*, **13** (2010) 156.
- [17] N. F. Zainudin, A. Z. Abdullah and A. R. Mohamed, *Journal of Hazardous Materials*, **174** (2010) 299.
- [18] A. Veiga, A. Dordio, A. P. Carvalho, D. M. Teixeira and J. G. Teixeira, *Analytica Chimica Acta*, **674** (2010) 182.
- [19] S. S. Kalanur, S. Jaldappagari and S. Balakrishnan, *Electrochimica Acta*, **56** (2011) 5295.
- [20] R. R. Mashhadizadeh MH, Amereh E., *Analytical and Bioanalytical Electrochemistry* **3** (2013) 270.
- [21] R. Jain, D. C. Tiwari and S. Shrivastava, *Materials Science and Engineering: B*, **185** (2014) 53.
- [22] L.-H. Liu, C.-Q. Duan and Z.-N. Gao, *Journal of the Serbian Chemical Society*, **77** (2012) 483.
- [23] N. P. Trišović, B. Đ. Božić, S. D. Petrović, S. J. Tadić and M. L. Avramov-Ivić, *Hemijaska Industrija*, **68** (2014) 207.
- [24] S. Atkins, J. Gonzalez-Rodriguez, J. Sevilla, M. Blazquez, T. Pineda and R. Jimenez-Perez, *International Journal of Electrochemical Science*, **8** (2013) 2056.
- [25] B. Unnikrishnan, V. Mani and S.-M. Chen, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **173** (2012) 274.