مقاله پژوهشی

سنتز پلیمر قالب مولکولی برای اندازه‌گیری دیلتیازم به روش تجربی

فردین دلیلی[1]، محمدرضا وردست*[2]، ناصر رنجکش‌زاده[3]

تاریخ دریافت ۱۳۹۸/۰۱/۱۴ تاریخ پذیرش ۱۳۹۸/۰۳/۲۷

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: در این مطالعه از روش قالب‌گیری مولکولی برای اندازه‌گیری داروی دیلتیازم موردبررسی قرار گرفت. با توجه به ساختار و گروه عاملی دارو، متاکریلیک اسید به‌عنوان مونومر عاملی برای دیلتیازم انتخاب شد. و از اتیلن گلیکول دی متاکریلات و آزوبیس ایزوبوتیرونیتریل هرکدام به ترتیب به‌عنوان اتصال‌دهنده عرضی و آغازگر پلیمریزاسیون استفاده شدند. و حلال پروژن مورد استفاده هم، کلروفرم بود. به‌منظور بررسی ظرفیت جذب پلیمر از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا استفاده گردید که دارای ظرفیت جذب ۹/۵۰ میلی‌گرم دیلتیازم به ازای یک گرم پلیمر بود، که امکان اندازه‌گیری و آنالیز این دارو را در مایعات بیولوژیک و جداسازی آن از پساب‌های مختلف را فراهم می‌آورد.

مواد و روش کار: متاکریلیک اسید (MAA)، اتیلن گلیکول دی متاکریلیک اسید (EGDMA) و آزوبیس ایزو بوتیرو نیتریل (AIBN) از شرکت سیگما آلدریچ و دیلتیازم از شرکت سبحان دارو تهیه گردید. و نمونه‌های سرم هم از آزمایشگاه تشخیص طبی در ارومیه تهیه گردیده است. برای اندازه‌گیری غلظت دارو به روش تجربی در نمونه‌های موجود از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا با دتکتور UV استفاده شده است.

یافته‌ها: نتایج حاصل نشان‌دهنده ظرفیت جذب خوب این دارو توسط پلیمر سنتزی بوده و نتایج تکرارپذیر و استفاده مجدد از این پلیمر را برای دارو نشان می‌دهد، به‌نحوی‌که امکان ۶-۵ بار استفاده از این پلیمر را نشان می‌دهد و ظرفیت ۹/۵۰ میلی‌گرم دارو در هر گرم پلیمر را دارد.

بحث و نتیجه‌گیری: پلیمر قالب مولکولی می‌تواند به‌عنوان جاذب مناسبی برای جذب و اندازه‌گیری دیلتیازم با توجه به ساختار دارو به‌خوبی عمل نماید. لذا از متاکریلیک اسید به‌عنوان منومر پلیمریزاسیون استفاده شده و نتایج خوبی برای جذب این دارو نشان داده است.

کلیدواژه‌ها: اندازه‌گیری، پلیمر قالب مولکولی، دیلتیازم

مجله پزشکی ارومیه، دوره سی‌ام، شماره ششم، ص ۴۶۱-۴۵۴، شهریور ۱۳۹۸

آدرس مکاتبه: ارومیه، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، دانشکده داروسازی، گروه شیمی دارویی، تلفن:۰۹۱۴۳۹۲۲۹۵۶

Email: mrvardast@gmail.com

مقدمه

دیلتیازم یک گشادکننده‌ی عروقی یا بلوک کننده‌ی کانال کلسیمی بنزوتیازپینی هست که در درمان آنزین صدری پایدار و ناپایدار، فشارخون خفیف تا متوسط و به‌عنوان ضد آریتمی در درمان تاکیکاردی فوق بطنی به کار می‌رود با اینکه به‌طورکلی دارای عوارض جانبی مطلوبی می‌باشد. بااین‌حال، پاسخ ناکافی به درمان دیلتیازم یک مشکل است، حتی اگر بیماران دوز توصیه شده خود را دریافت کنند. از سوی دیگر، احتمال مسمومیت با تجویز دیلتیازم است. بنابراین لازم است که یک روش حساس و خاص برای مطالعات بالینی و فارماکوکینتیک دارو انجام گیرد (۱). روش‌های کمی برای اندازه‌گیری دیلتیازم در پلاسمای انسانی، ازجمله کروماتوگرافی لایه‌نازک (TLC) (۲)، کروماتوگرافی گازی (GC) (۳) و کروماتوگرافی گازی تلفیق‌شده با طیف‌سنجی جرمی (GC-MS) (۴) گزارش شده است. در سال‌های اخیر هم، کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) برای تعیین دیلتیازم در نمونه‌های بیولوژیکی مورداستفاده قرار گرفته است (۵).

پلیمرهای قالب مولکولی به‌وسیله کوپلیمریزاسیون یک عامل شبکه‌ای کننده با مونومرهای عاملی در حضور مولکول قالب (هدف) تهیه می‌شوند سپس اتصال بین مولکول هدف و مونومر عاملی با عمل پلیمریزاسیون انجام می‌شود و ترکیب هدف با شست‌وشو حذف

[1] دانشجوی دکتری عمومی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه؛ دانشکده داروسازی، ارومیه، ایران

[2] استادیار، شیمی تجزیه، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، دانشکده داروسازی، گروه شیمی دارویی، ارومیه، ایران (نویسنده مسئول)

[3] کارشناسی ارشد، شیمی تجزیه، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، دانشکده داروسازی، ، ارومیه، ایران

می‌شود و یک اثر (محل اتصال) را در پیکره پلیمری ایجاد می‌کند که می‌تواند تشخیص مولکولی بعدی باشد (۶). سنتز پلیمرهای قالب مولکولی می‌تواند با گونه‌های شیمیایی مختلف (سمی یا مفید) به‌عنوان مولکول هدف، صورت پذیرد. ازجمله کاربردهای پلیمرهای قالب مولکولی، می‌توان به کاربرد در حس‌گرها، سنتز ترکیبات آلی و کاتالیز واکنش‌ها اشاره نمود (۷-۱۰). دارورسانی، از کاربردهای مهم این فناوری در علوم پزشکی می‌باشد که می‌تواند بدون فرآیند تشکیل یا تخریب پیوند کووالانسی انجام پذیرد (۱۱). فن‌های دیگر دارورسانی با ایجاد پیوند کووالانسی بین گروه‌های عاملی دارو و پلیمر و سپس رهایش دارو در محیط اسیدی نیز گزارش گردید (۱۲). در این مطالعه پلیمر قالب مولکولی بر پایه متاآکریلیک برای اندازه‌گیری اختصاصی دیلتیازم طراحی شد و اندازه‌گیری آن را به‌صورت مطلوب از سرم انجام داد. نتایج نشان می‌دهد که این پلیمر امکان جداسازی و آنالیز دارو را در پساب‌ها و مایعات مختلف بیولوژیکی امکان‌پذیر می‌سازد.

مواد و روش کار

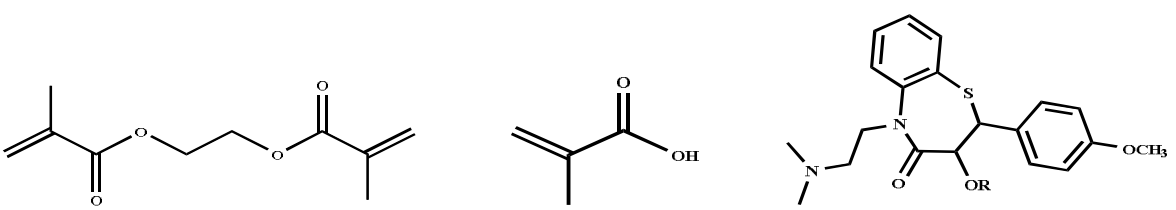
۱-مواد شیمیایی و دستگاه‌ها

متاکریلیک اسید (MAA)، اتیلن گلیکول دی متاکریلات (EGDMA) و آزوبیس ایزو بوتیرو نیتریل (AIBN) از شرکت سیگما آلدریچ و دیلتیازم از شرکت سبحان دارو تهیه گردید. سایر ترکیبات شیمیایی و کلیه حلال‌های به کار گرفته شده با درجه خلوص HPLC خریداری شد. غلظت محلول‌ها با استفاده از دستگاه HPLC (CECIL انگلیس) اندازه‌گیری شده‌اند. مورفولوژی سطح و بررسی توزیع ذرات پلیمر با استفاده از میکروسکوپ نیروی اتمی انجام پذیرفت. ساختار شیمیایی نیز با استفاده از FT-IR (PERKIN آمریکا) بررسی گردید.

۲-سنتز پلیمر قالب مولکولی دیلتیازم

ابتدا ۹۸ میلی‌گرم از دیلتیازم هیدرو کلراید را در ۳۰ میلی‌لیتر کلروفرم داخل بالن ۱۰۰ میلی‌لیتر حل نموده سپس ۲۳۹ میکرولیتر متاکریلیک اسید به آن اضافه نموده و بعد جهت پیش پلیمریزاسیون محلول حاصل به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۸ درجه سانتی‌گراد هم-زده شد، سپس ۲۶۰۰ میکرولیتر اتیلن گلیکول دی متاکریلات و ۵۸ میلی‌گرم ۲ و ۲ آزوبیس ایزوبوتیرونیتریل اضافه کردیم در مرحله بعدی چهار نوع مخلوط پلیمری تهیه‌شده بعد از ۵ دقیقه سونیکاسیون، به مدت ۱۰ دقیقه تحت گاز نیتروژن به‌منظور حذف اکسیژن از محیط پلیمریزاسیون قرار گرفتند. پلیمریزاسیون توسط حرارت دهی مخلوط فوق در دمای ۶۰ درجه سلسیوس شروع و تکمیل پلیمریزاسیون در مدت ۲۴ ساعت در این دما در حمام آب گرم انجام گرفت (شکل ۱).

برای خارج کردن دیلتیازم از ساختار پلیمر، پلیمرهای جامد نرم تولیدشده توسط محلول ۱۰ درصد حجمی/حجمی استیک اسید در متانول (محلول شستشو) به مدت یک روز شستشو داده شدند تا اینکه در حلال باقیمانده از شستشوی پلیمر، دیلتیازم قابل‌شناسایی با کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا نباشد. در مرحله‌ی نهایی به‌منظور جدا کردن باقیمانده محلول شستشو از پلیمر، پلیمرهای سنتز شده یک روز شسته شدند. سپس پلیمرها بعد شستشو در آون با دمای ۵۵ درجه سلسیوس خشک گردیدند.



اتیلن گلیکول دی متاکریلات متاکریلیک اسید دیلتیازم

شکل (۱): ساختار گسترده مواد اولیه واکنش

۳-نحوه بررسی ظرفیت اتصال در پلیمر

مقدار مشخصی از پلیمر سنتز شده با حجم معینی از محلول حاوی مولکول هدف (محلول جذب) در یک لوله فالکن مخلوط شد و در مدت‌زمان‌های مختلف در یک شیکر با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه هم زده شد تا یک تعادلی بین پلیمر و محلول حاوی مولکول هدف ایجاد شود (جدول ۱).

جدول (۱): شرایط لازم در آزمون جذب

نام دارو	مقدار پلیمر (mg)	حلال بکار رفته	حجم محلول (mL)	غلظت محلول (mg/L)	pH حلال	زمان هم‌زنی (دقیقه)
دیلتیازم	۵	آب، متانول، استونیتریل	۵	۱۰	۳،۴،۵،۶،۷،۸	۱۰،۲۰،۳۰،۶۰،۱۲۰

سپس مخلوط تهیه‌شده به مدت ۵ دقیقه در ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. پلیمر باقیمانده در لوله فالکن پس از سانتریفیوژ کردن و جدا کردن محلول رویی، حدوداً ۲ میلی لیتر از آن در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. مایع رویی بعد از عبور از فیلتر سرسرنگی با قطر ۰/۲۲ میکرومتر، غلظت مولکول هدف باقیمانده در آن با استفاده از HPLC بدست آمد. هر یک از محلول‌ها در ۲ تکرار تهیه و آزمایش شدند. مقدار مولکول هدف جذب شده توسط پلیمر، از اختلاف غلظت اولیه و نهایی آن در محلول جذب بدست آمد. ظرفیت جذب پلیمر سنتز شده (میلی‌گرم به ازای گرم پلیمر) برای جذب مولکول هدف با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

$$Q= (Ci- Cf)*V/m$$

در این معادله V حجم محلول (لیتر)، m وزن پلیمر (گرم)، Ci و Cf غلظت اولیه و نهایی (میلی‌گرم بر لیتر) مولکول هدف در محلول جذب می‌باشد (۱۳).

شرایط مورد استفاده در HPLC به‌منظور شناسایی هر یک از مولکول‌های هدف در جدول (۲) آورده شده است.

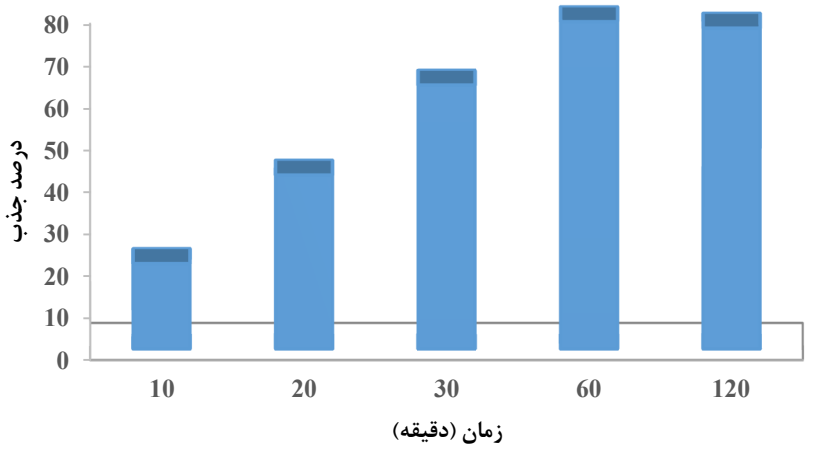
جدول (۲): شرایط مورد استفاده در HPLC برای شناسایی دیلتیازم

	دیلتیازم هیدروکلراید
ستون	C18 با اندازه۱۵۰mm×۴/۶µ×5µm
سرعت جریان	۱ میلی لیتر در دقیقه
فاز متحرک	پتاسیم دی هیدروژن فسفات و استونیتریل (۶۰٪: ۴۰٪)
زمان آزمون (دقیقه)	۵
آشکارساز- طول موج	UV- ۲۰۰ نانومتر
محلول شستشو	آب- متانول
منبع	(14)

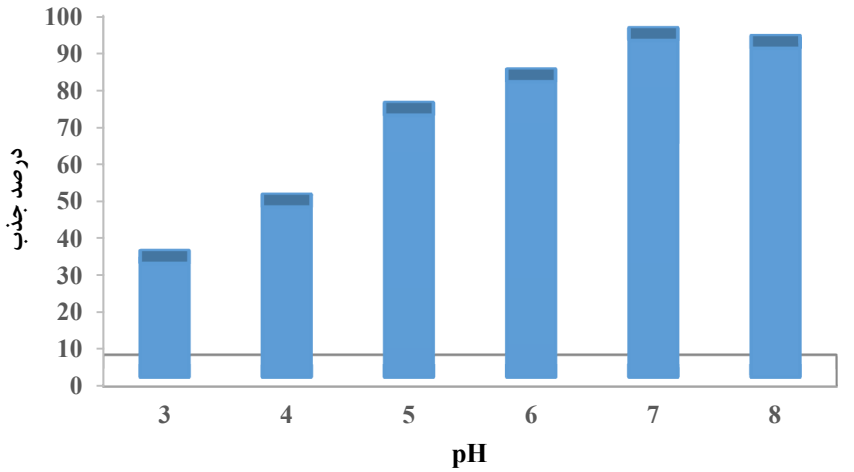
یافته‌ها

۱-بررسی اثر پارامترهای زمان و pH بر ظرفیت جذب پلیمر

میزان جذب پلیمر در حلال‌های مختلف که شامل حلال‌های متانول، استونیتریل و آب مورد بررسی قرار گرفت که در بین آنها پلیمر در آب بیشترین جذب را داشت. بعد از اینکه حلال آب انتخاب شد در حلال آب زمان‌ها (شکل (۳)) و pH های مختلف (شکل (۴)) آن بررسی گردید، که در مورد زمان جذبشان در ۶۰ دقیقه بیشترین میزان جذب و در مورد اثر گذاری pH بیشترین میزان جذب در pH برابر ۶ بود.



شکل (۳): تأثیر زمان بر میزان جذب



شکل (۴): تأثیر pH بر میزان جذب

۲- رسم منحنی کالیبراسیون

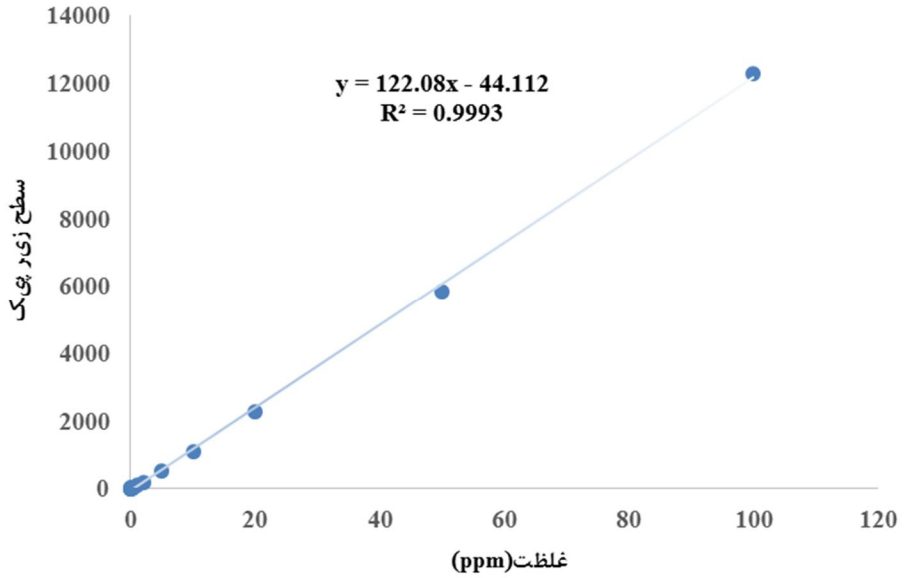
روش منحنی کالیبراسیون یک تکنیک شیمی تجزیه‌ای مهمی است که بر اساس آن پاسخ هر روش تجزیه‌ای، عملکرد دستگاه و ... یا برخی از استانداردها که معمولاً نوع ثانویه می‌باشند مورد مقایسه قرار می‌گیرد.

در این روش حجم‌های مشخصی از استاندار تهیه کرده و کروماتوگرام مربوط به هر مرحله را آنالیز و در نهایت سطح زیر پیک نمودارها را بر اساس حجم استاندارد اضافه شده رسم می‌کنیم.

جهت تهیه نمودار کالیبراسیون از استاندار ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر مقادیر ۰/۰۱، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۵، ۱، ۲، ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر تهیه شد. ۲۰ میکرولیتر از استانداردهای ساخته شده به دستگاه HPLC تزریق شد و از سطح زیر منحنی جهت رسم نمودار کالیبراسیون اولیه استفاده شد (جدول (۳)). ارزیابی خطی بودن و تعیین معادله خط کالیبراسیون در ماتریکس در جهت تعیین معادله و ضریب رگرسیون بدست آمد (شکل (۴)).

جدول (۳): جدول منحنی کالیبراسیون استاندارد دیلتیازم

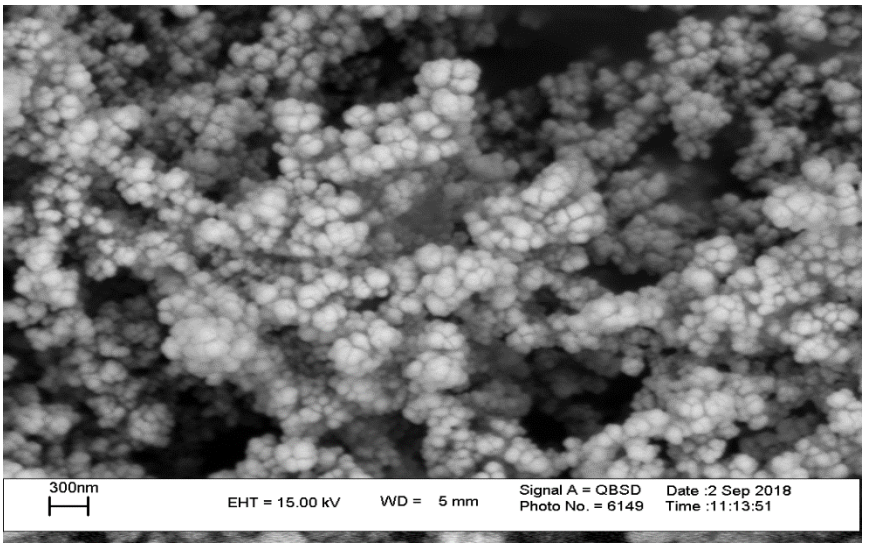
دارو	محدوده خطی ((ppm	LOD(ppm)	LOQ(ppm)	٪ RSD	λ_{MAX}
دیلتیازم	۰/۰۱-۱۰	۰/۰۰۲	۰/۰۰۶	٪۵/۲۰	۲۰۰



شکل (۴): منحنی کالیبراسیون دیلتیازم

۳-آنالیز میکروسکوپ الکترونی روبشی

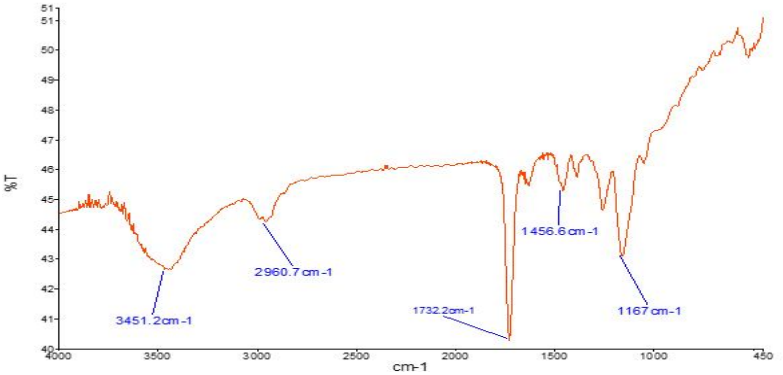
تصاویر میکروسکوپ الکترونی در شکل (۵) با بزرگنمایی ۳۰۰nm و با ولتاژ اندازه گیری ۱۵ کیلو ولت نمایش داده شده است. با توجه به شکل‌های بدست آمده از میکروسکوپ الکترونی سطوح ذرات پلیمر نسبتاً صاف و تا حدی کروی می‌باشد.



شکل (۵): تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از پلیمر قالب مولکولی

۴- آنالیز طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز

موقعیت و شدت باندها در طیف‌های FT-IR پلیمرهای قالب مولکولی اطلاعات سودمندی در مورد گروه‌های عاملی پلیمر و نحوه پوشش مونومرها می‌دهد طیف پلیمر دیلتیازم در شکل (۶) نشان داده شده است که باندهای ۳۴۵۱cm-1 و ۲۹۶۰ cm-1 به ترتیب مربوط به گروه N-C و حلقه‌ی آروماتیک ترکیب است.



شکل (۶): طیف مادون قرمز پلیمر دیلتیازم

بحث

امروزه استفاده از روش‌هایی که امکان اندازه‌گیری داروها را در محیط‌های مختلف به‌صورت اختصاصی را فراهم آورند مورد توجه قرار گرفته است، در این میان روش‌های پلیمر قالب مولکولی بخاطر اختصاصی بودن و کم هزینه بودن مورد توجه و استفاده ویژه قرار گرفته است. در این طرح نخستین پلیمر قالب مولکولی برای دیلتیازم بر پایه متاآکریلیک اسید مطرح و تهیه و استفاده شده است.

نتایج حاصل نشان می‌دهدکه این پلیمر را می‌توان به‌صورت استخراج فاز جامد (SPE) و یا ستونهای کروماتوگرافی برای اندازه-گیری و آنالیز این دارو مورد استفاده قرار داد. وحتی به‌عنوان جاذب برای حذف این دارو از پساب‌ها کمک گرفت. باتوجه به ساختار این پلیمر امکان اصلاح و بهبود این پلیمر با نانومواد مغناطیسی و جاذب-های اصلاح کننده مانند گرافن و SBA-15 وجود دارد. نتایج حاصل از این مطالعه کارایی خوب این پلیمر را برای استفاده‌های متوالی از این جاذب برای حذف و اندازه‌گیری دیلتیازم را نشان می‌دهد.

نتیجه‌گیری

امروزه رشد مقالات منتشرشده دراین زمینه به صورت تصاعدی درحال افزایش است. این فناوری امید زیادی را برای تهیه آنزیم‌ها، هورمون‌ها، سنسورهای ویژه گزین، توسعه روش‌های جداسازی و تشخیصی، دارورسانی، استخراج مواد زیست فعال گیاهان دارویی، تغلیظ دارو، تصفیه آب، شیمی محیط زیست و بسیاری از زمینه‌های دیگر شیمی بوجود آورده است. در سال‌های اخیر در کشور ما نیز، این فناوری مورد توجه محققین قرار گرفته و امید است با انجام پروژه‌های هماهنگ بتوان این تکنیک را ارتقا بخشید.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح پژوهشی در قالب پایان‌نامه دوره دکتری عمومی به شماره ثبت ۹۵-۰۱-۳۶-۲۶۳۴ می‌باشد که با استفاده از اعتبارات پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه و امکانات دستگاهی آزمایشگاه رفرانس دانشکده داروسازی ارومیه انجام شد لذا لازم است از افرادی که در این زمینه ما را یاری نمودند تشکر و قدردانی نمایم.

References:

1. Li K, Zhang X, Zhao F. HPLC determination of diltiazem in human plasma and its application to pharmacokinetics in humans. Biomed Chromatogr 2003; 17: 522–5.
2. Witek A, Przyborowski L. Chromatographic (TLC) analysis of diltiazem in pharmaceutical form in

presence of other antiarrhythmics. Acta Pol Pharm 1996; 53: 9.

3. Clozel JP, Caille G, Taeymans Y, Theroux P, Biron P, Besner JG. Improved gas chromatographic determination of diltiazem and deacetyldiltiazem in human plasma. J Pharm Sci 1984; 73: 207.
4. Lillsunde P, Korte T. Comprehensive Drug Screening in Urine Using Solid-Phase Extraction and Combined TLC and GC/MS Identification. J Anal Toxicol 1991; 15: 71-81.
5. Jouyban A, Sorouraddin MH, Farajzadeh MA, Somi MH, Fazeli-Bakhtiyari R. Determination of five antiarrhythmic drugs in human plasma by dispersive liquid–liquid microextraction and high-performance liquid chromatography. Talanta 2015; 134: 681-9.
6. Whitcombe MJ, Vulfson EN. Imprinted polymers. Adv. Mater 2001; 13: 467–78.
7. Alvarez-Lorenzo C, Concheiro C. Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences. J Chromatogr B 2004;804: 231.
8. Ramstrom O, Ye L, Krook M, Mosbach K. Application of molecularly imprinted materials as selective adsorbents: Emphasis on enzymatic equilibrium shifting and library screening. Chromatographia 1998; 47: 465.
9. Heilmann J, Maier WF. Selective catalysis on silicon dioxide with substracte-specific cavities. Angew Chem Int Ed 1994; 33: 471-3.
10. Liu XC, Mosbach K, Studies towards a tailor-made catalyst for the Diels-Alder reaction using the technique of molecular imprinting. Macromol Rapid Commun 1997; 18: 609-15.
11. Suedee R, Srichana T, Rattananont T. Enantioselective release of controlled delivery granules based on molecularly imprinted polymers. Drug Delivery 2002; 9: 19-30.
12. Khazaei A, Amini Manesh A, Golbagh M. Synthesis of acrylic acid-based molecular imprinted polymers and its application in catechin extraction. J Appl Chem 2012; 7: 11.
13. Clausen DN, Pires IMR, Tarley CRT. Improved selective cholesterol adsorption by molecularly imprinted poly (methacrylic acid)/silica (PMAA–SiO2) hybrid material synthesized with different molar ratios. Mate Sci Eng C 2014; 44: 99-108.
14. Ivanova V, Zendelovska D, Stefova M, Stafilov T. HPLC method for determination of verapamil in human plasma after solid-phase extraction. J. Biochem. Biophys. Methods 2008; 70: 1297-303.

Original Article

SYNTHESIS OF MOLECULARLY IMPRINTED POLYMER FOR DETERMINATION OF DILTIAZEM BY EXPERIMENTAL METHOD

Fardin Dalil[1]i, Mohammadreza Vardast[2], Naser Ranjkeshzadeh[3]

Received: 01 Apr, 2019; Accepted: 22 Jun, 2019

Abstract

Background & Aims: In this study, a magnetic molecular imprinted polymer was used to measure the diltiazem drug. Based on the structure and pharmaceutical agent group, methacrylic acid was selected as a monomer for Diltiazem. Ethylene glycol de-methacrylate and azobisisobutyronitrile were used as cross-linkers and polymerisation initiators, respectively. Also, chloroform was used as a porogenic solvent. In order to investigate the polymer absorption capacity, a high-performance liquid chromatography system was used which had an absorption capacity of 9.59 mg / g. This allows the measurement and analysis of this drug in biological fluids and separates them from various wastewater.
Materials & Methods: Methacrylic acid (MAA), ethylene glycol de-methacrylic acid (EGDMA), and azobisisobutyronitrile (AIBN) were obtained from Sigma Aldrich while Diltiazem was obtained from Sobhan-Dar Company. Serum samples were prepared from the medical diagnostic laboratory in Urmia. High-performance liquid chromatography with UV detector was used to determine the concentration of drug in existing samples by experimental method.
Results: The results indicate that this drug is well absorbed by the synthetic polymer, and shows the results of repeated etiology and re-use of this polymer for the drug. It is possible to use this polymer for 5-6 times and it has a capacity of 9.50 mg / g of drug per gram of polymer.
***Conclusion*:** Polymer molecular membrane can act as a good absorbent for absorbing and measuring this drug with respect to the structure of the drug. Therefore, methacrylic acid has been used as polymerization monomer and has shown good results for drug absorption.
Keywords: Determination, Polymer Molecular Imprinted, Diltiazem

Address: Department of Medicinal Chemistry, School of pharmacy, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran.
Tel: (+98)9143922956
Email: mrvardast@gmail.com, vardast_m@umsu.ac.ir

SOURCE: URMIA MED J 2019: 30(6): 461 ISSN: 1027-3727

[1] *Urmia University of Medical Sciences, School of Pharmacy, Urmia, Iran*
[2] *Assistant Professor, Analytical Chemistry, School of Pharmacy, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran (Corresponding Author)*
[3] *M.Sc., Analytical Chemistry, Urmia University of Medical Sciences, Faculty of Pharmacy, Urmia, Iran*