شیمی سبز و فناوری های پایدار

توسعه روش استخراج نقطه ابری برای پیش تغلیظ و اندازه گیری اسپکتروفوتومتری فنیل آلانین از نمونه های دارویی

سید حمید احمدی*، زهره حمزه ای

پژوهشکده فناوریهای پاک، پژوهشگاه شیمی و مهندسی شیمی ایران، تهران، ایران
Emai:ahmadi@ccerci.ac.ir

چکیده

فنیل آلانین جزء آمینواسیدهای ضروری است که در اثر کمبود آنزیم فنیل آلانین هیدروکسیلاز، در مایعات بدن تجمع پیدا کرده و باعث آسیب‌های عصبی و بیماری فنیل کتونوریا می‌شود. این بیماری ارثی بوده و علایمی چون اختلالات رفتاری، اختلالات حرکتی و عقب ماندگی ذهنی دارد. در این پژوهش از روش استخراج نقطه ابری و روش اسپکتروفتومتری UV ، برای جداسازی و پیش تغلیظ فنیل آلانین موجود در نمونه های دارویی استفاده شد. استخراج در حضور سورفاکتانت غیریونی لوریل الکل اتوکسیله در حضور سولفات مس در دمای 60 درجه سانتیگراد انجام شد. پس از جداسازی فاز غنی از سورفاکتانت با سانتریفوژ،این فاز با اتانول به حجم یک میلی لیتر رقیق شده و سپس حجم مناسبی از آن برای سنجش فتومتری به مینی سلول کوارتز منتقل شد. پارامترهای موثر در جداسازی نظیر pH ،دما، مقدار الکترولیت و حجم محلول سورفاکتانت بررسی و شرایط بهینه جداسازی تعیین شد. در حالت بهینه حد آشکارسازی و گستره خطی سنجش 0/1 و 1000-1 میلی گرم برلیتر و انحراف استاندارد نسبی 0/9% بدست آمدند. روش پیشنهادی با موفقیت برای تعیین مقدار فنیل آلانین در نمونه های تجارتی داروهای کلشی سین، سیپروفلوکسازین و کوتریماکسوزول استفاده شد.

واژگان کلیدی: فنیل آلانین، استخراج نقطه ابری، پیش تغلیظ، سورفاکتانت.

Development of Cloud Point Extraction for the Preconcentration and Spectrophotometric Determination of Phenylalanine in Pharmaceutical Solids

Seyyed Hamid Ahmadi*, Zohre Hamzei

Faculty of Clean Technologies, Chemistry & Chemical Engineering Research Center of Iran, Tehran, Iran

Abstract: L-Phenylalanine is one of the essential amino acids, due to the deficiency of the phenylalanine hydroxylase enzyme accumulate in body fluids, causing neural damage and phenylketonuria disease. It is inherited and has symptoms such as behavioral disorders and mental retardation. In the first part of this study, cloud point extraction(CPE) method was used for extraction and pre-concentration of L-phenylalanine in pharmaceutical samples. The extraction of analytes from aqueous solution was performed in the presence of LAE7 as a non-ionic surfactant and copper sulphate in a 60°C bath. After separation of surfactant-rich phase by the centrifuge, the procedure was completed by diluting the extracted surfactant-rich phase with ethanol as a suitable solvent to 1.0 mL and transferring a suitable portion to a quartz mini cell prior to UV-photometric analysis. The influence of operation parameters such as pH, volume of surfactant solution, temperatue and electrolyte on the cloud point extraction of analyte were studied and optimum conditions were established. Under optimum condition, limit of detection (LOD), relative standard deviation (RSD) and linear range for the proposed method are obtained 0.1 mgL^{-1}, 0.9% and 1-1000 mg L^{-1}, respectively. The proposed CPE-UV method was successfully applied to monitor the phenylalanine content of Colchicine, Ciprofloxacin, and Co-Trimoxazole solid formulations.

Keywords: Phenylalanine,Cloud Point Extraction, Preconcentration, Surfactant.

مقدمه

فنیل‌آلانین[1] یکی از آمینو اسیدهای ضروری است که در بسیاری از مواد غذایی از جمله لبنیات، برخی از دانه‌های خاص مثل دانه‌های سویا، تخم کدوتنبل، تخم کدوسبز، تخم-مرغ، برخی از انواع گوشت قرمز، مرغ، بوقلمون و آسپارتام وجود دارد[1].این آمینواسید به دو فرم وجود دارد: ال‌فنیل-آلانین[2] و دی‌فنیل‌آلانین[3] . این دو فرم دارای ساختار ایزومری فضایی(انانتیومری) متفاوت هستند و ساختار مولکولی‌شان به‌جز از این جهت، یکسان است[2]. L فنیل آلانین: نسخه طبیعی این مکمل است و در پروتئین‌های بدن و در غذاها یافت می‌شود. D فنیل آلانین: یک تصویر آینه‌ای از ال فنیل آلانین است، به طور کلی در طبیعت یافت نمی‌شود و فقط برای برخی کاربردهای پزشکی آن را در آزمایشگاه سنتز می کنند[3و4].DL فنیل آلانین[4] ترکیبی از انواع DوL (50:50) است. این ترکیب به عنوان مکمل برای درمان افسردگی و ضد درد ، استفاده می‌شود. فرم‌های L و D بعد از جذب از روده وارد کبد شده و مقداری از D فنیل تبدیل به L فنیل می‌شود و فقط نوع L فنیل می‌تواند از جدار رگ‌های مغزی عبور کند. وارد شدن ال فنیل‌آلانین به داخل مغز باعث افزایش ساخت دوپامین و ترمیم گیرنده‌های آن می‌شود[5]. Dفنیل آلانین با مهار ورود کلسیم به داخل سلول‌های عصبی‌می‌تواند اثرات ضد درد و شادی آور داشته باشد. فرم L فنیل پس از ورود به بدن توسط آنزیم کبدی فنیل آلانین هیدروکسیلاز شکسته شده و به آمینو اسید غیر ضروری تیروزین[5] تبدیل می‌شود که خود باعث ساخت پروتئین‌های جدید یا تبدیل شدن به مولکول‌های دیگر می‌شود [6]. بسیاری از پروتئین های مهم در مغز، خون، عضلات، اندام‌های داخلی و تقریبا" در همه جای بدن وجود دارند. بنابراین بدن نیاز به فنیل آلانین و دیگر اسیدهای آمینه برای تولید پروتئین دارد. علاوه بر این، فنیل آلانین باعث تولید سه مولکول مهم دیگر هم می شود: اپی‌نفرین[6] و نوراپی نفرین[7] (هورمون هم انتقال دهنده عصبی در بدن) و دوپامین[8] (که نقش پیام‌رسان عصبی و در خون نقش هورمونی دارد[7]. ازدیاد و یا کمبود این آمینو اسید در بدن باعث بیماری و عوارض خطرناک می‌شود. ازدیاد این آمینو اسید در بدن افرادی که دچار نقص آنزیم کبدی فنیل هیدروکسیلاز هستند بسیار خطرناک و باعث آسیب‌های مغزی می‌شود.کمبود فنیل آلانین می‌تواند منجر به گیجی، بی‌قراری عاطفی، افسردگی، کاهش هوشیاری، کاهش حافظه، تغییرات رفتاری و کاهش ملانین شود[8].

فنیل آلانین در بسیاری از مواد غذایی حاوی پروتئین یافت می‌شود و به طور کلی توسط سازمان غذا و دارو FDA[9] به عنوان ماده ای بی‌خطر شناخته شده است. مقادیر یافت شده از این آمینو اسید در مواد غذایی برای افراد سالم مشکلی ایجاد نمی‌کند. کسانی که به اختلال متابولیسم اسید آمینه (فنیل کتونوریا[10]) دچار هستند نمی‌توانند به طور معمولی فنیل آلانین را هضم کنند، تراکم فنیل آلانین در خون این افراد 400 برابر بیشتر از کسانی است که به این اختلال مبتلا نیستند بنابراین افراد مبتلا به فنیل کتونوریا باید تحت رژیم کم پروتئین خاص قرار بگیرند. تراکم فنیل آلانین می‌تواند به آسیب مغزی، ناتوانی ذهنی و مشکلات انتقال سایر اسید-های آمینه به مغز منجر شود. البته با توجه به شدت این اختلال، نوزادان به طور کلی پس از تولد برای فنیل کتونوریا غربالگری[11] می‌شوند[9و10].

بروز این بیماری، همراه با افزایش مداوم فنیل آلانین در خون است و میزان وقوع آن بین 1 در 3000 تا 60000 بر حسب کشور متفاوت است. در ایران بر اساس نتایج برنامه غربالگری نوزادان از سال 1386 تا سال 1389 ، میزان وقوع آن 1 در 8000 است. این بیماری در بدو تولد با اندازه‌گیری فنیل آلانین خون قابل تشخیص است. تست اولیه برای این بیماری از طریق آزمایش روی قطره خونی که از پاشنه پای نوزاد گرفته می‌شود انجام می‌گیرد. درصورتی که این آزمایش

1 Phenylalnine
2 L-Phenylalanine(LPA)
3 D-Phenylalanine(DPA)
4 DL-Phenylalanine (DLPA)
5 Tyrosine
6 Epinephrine
7 Norepinephrine
8 Dopamine
9 Food and Drug Administration
10 Phenylketonuria (PKU)
11 screening

مقدماتی افزایش فنیل آلانین را نشان دهد فنیل آلانین و تیروزین سرم با روش HPLC باید اندازه‌گیری شوند. تاخیر در تشخیص بیماری از هفته دوم به بعد موجب صدمه مغزی می‌شود. بهترین زمان تشخیص هفته اول تا دوم تولد است. تنها راه درمان برای بیماری فنیل کتونوریا رژیم غذایی مناسب است . اقدامات درمانی این بیماری متمرکز بر کاهش فنیل آلانین و متابولیت‌های آن در خون و هدف آن ممانعت یا کاهش صدمه مغزی است[13-11].

روش‌های متداول برای اندازه گیری فنیل آلانین در خون یا ادرار، شامل کروماتوگرافی مایع_مایع (HPLC)، فلورومتری، اسپکتروسکوپی، الکتروشیمی، روش‌های آنزیمی، کروماتوگرافی گازی_ طیف سنجی جرمی (GC-MS[12]) و روش(MS/ MS[13]) هستند. این روش‌ها قادر به ارائه حساسیت بسیار بالا و اطلاعات تجزیه‌ای قابل اعتماد هستند. با این حال، بسیاری از این روش‌ها نیازمند ابزارهای گران قیمت یا فرآیند تهیه نمونه‌ی پیچیده و وقت‌گیر، افراد آموزش دیده و متخصص، مواد شیمیایی سمی و خطرناک هستند[19-14].

برای اولین بار در سال 1978 یک روش غیر متعارف استخراج مایع-مایع که به عنوان نقطه ابری شناخته می شودتوسط واتانابه معرفی شد[20]. استخراج نقطه ابری برای استخراج تنوع گسترده ای از آنالیت ها نظیر یونهای فلزی، داروها، سموم، بیومواد و رنگ ها، از نمونه های غذایی، بیولوژیکی، دارویی، صنعتی و زیست محیطی بکاربرده شده است [21]. این روش در مقایسه با سایر روشهای استخراج مایع-مایع، روشی سبز به شمار می آید که بجای حلال های آلی سمی و زیان آور مقادیر کوچکی از سورفاکتانت های کم خطر را مصرف میکند[22].

در این پژوهش، روشی ساده و کارآمد، برای اندازه گیری اندازه‌گیری فنیل آلانین در نمونه‌های دارویی و خوراکی توسعه یافته است. در این روش ابتدا از استخراج نقطه ابری جهت جداسازی و پیش‌تغلیظ فنیل آلانین از نمونه و در پی آن از روش اسپکتروفتومتری جهت اندازه‌گیری فنیل آلانین در نمونه‌های دارویی و خوراکی استفاده شده است.

مواد و روش ها

مواد

فنیل آلانین ، سولفات مس 6 آبه، سود و لوریل الکل اتوکسیله (LAE7) همگی از شرکت مرک تهیه شدند.آب یون¬زدایی شده لازم برای تهیه تمامی محلول¬ها با استفاده از دستگاه MILLIPORE(Elix®) progard®2 تهیه گردید.

دستگاه‌ها و وسایل

تمامی اندازه‌گیری‌ها با طیف‌سنج UV-Vis ساخت شرکت Agilent مدل E8453 با آشکارساز آرایه فتودیود (PDA) و منبع تابش لامپ تنگستن هالوژن و مجهز به سل کوارتز با مسافت نوری یک سانتیمتر انجام شد. دستگاه سانتریفیوژ Hettich آلمان مدل ROTOFIX 32 A جهت جداسازی دو فاز بعد از استخراج استفاده شد. از pH متر Metrohm سوئیس مدل 780 برای تنظیم pH در مرحله ی اول تشکیل کمپلکس استفاده شده است. ترازوی مورد استفاده در این پروژه، ترازوی مدل ((Mettler AE240با دقت 10^{-4} گرم بود.

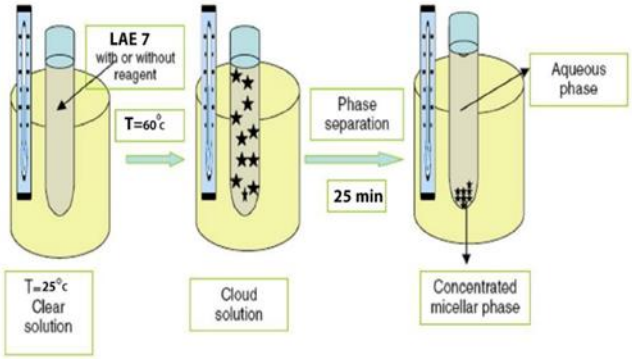
روش کار

برای استخراج نقطه ابری 25میلی لیترمحلول حاوی آنالیت، 5 میلی لیتر لوریل الکل اتوکسیله(5%وزنی:حجمی) ،0/1 میلی لیتر سود یک مولار و 2 میلی لیتر از محلول سولفات مس $1000mgL^{-1}$ در بالن 50 میلی لیتری به حجم رسانیده شد pH محلول در مقدار مورد نظر(برابر با6) توسط سود تنظیم شد. سپس مخلوط به مدت 25 دقیقه در حمام ترموستاتیک در دمای 60 درجه سانتیگراد گرم شد. برای جداسازی فاز غنی از سورفکتانت و فاز آبی محلول از سانتریفیوژ 3500 دور در دقیقه برای 5 دقیقه استفاده شد. سپس برای افزایش ویسکوزیته فاز غنی از سورفاکتانت لوله¬ی حاوی محلول در یک حمام یخ برای مدت10 دقیقه قرار گرفت. با استفاده از سرنگ، فاز آبی بالایی دور ریخته شد و فاز زیرین، (فاز غنی از سورفکتانت) با اتانول رقیق شده و

[12] Gas Chromatography/Mass Spectrometry

[13] Mass Spectroscopy

به حجم یک میلی لیتر رسانده شد. سپس جذب محلول حاصل، در طول موج 257 نانومتراندازه¬گیری گردید (شکل 1). عوامل مؤثر در روند استخراج مانند pH، مقدار سورفکتانت، زمان، دمای استخراج و غلظت نمک به منظور تعیین مقادیر بهینه هریک مورد بررسی قرار گرفتند.



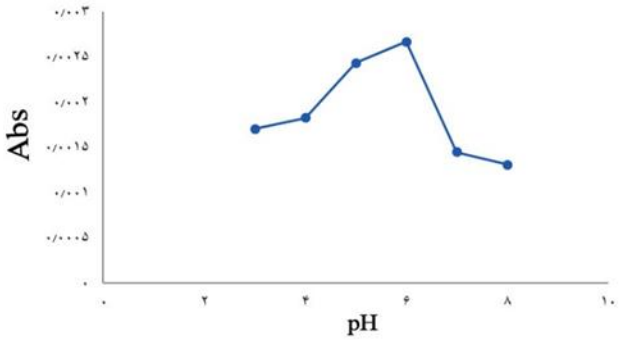
شکل 1: شماتیک روش آزمایشگاهی استخراج نقطه ابری،

نتایج و بحث

بهینه سازی پارامتر های اصلی موثر بر استخراج انجام و نتایج حاصله به دست آمد.

اثر pH

pHمحلول نمونه نقش کلیدی در استخراج آنالیت هدف دارد زیرا بر شکل¬های موجود از آنالیت و پراکندگی آن بین فاز مایسلی و فاز آبی و در نتیجه بر کارایی استخراج تاثیر می¬گذارد.تاثیر مقدار¬های pH در کارایی استخراج و سیگنال¬های به دست آمده در محدوده pH:3-8 مورد مطالعه قرار گرفت. با توجه به ثابت¬های اسیدی فنیل آلانین ($pk_{a1=}$ 1/83 و $pk_{a2=}$9/13)در pH بسیار اسیدی، فنیل آلانین کاتیونی می¬شود و بنابراین بازیابی کاهش می¬یابد در pH قلیایی، شکل آنیونی بیشتر وجود دارد و این باعث کاهش کارایی استخراج می¬شود. همانطور که درشکل 2 نشان داده شده است حداکثر کارایی استخراج در pH برابر با 6 بدست می¬آیدکه می¬توان آن را به برتری کمی فرم مولکولی این ماده، به فرم¬های کاتیونی و آنیونی مربوطه در شرایط مورد نظر مرتبط دانست به نحوی که در این pH به فنیل آلانین بیشترین پیوستگی به فاز سورفاکتانت را دارد و بنابراین بازده استخراج حداکثر است. در آزمایش های بعدی pH=6 به عنوان pH بهینه انتخاب شد.

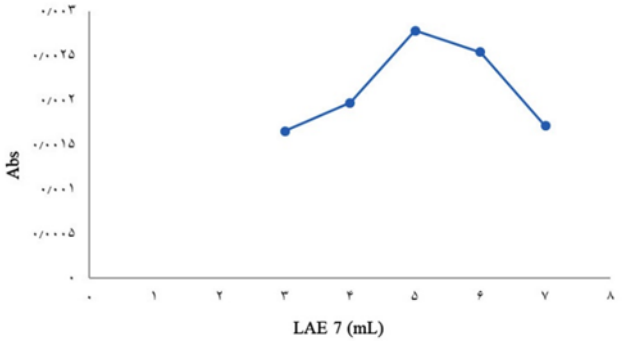


شکل 2: اثر pH بر کارایی استخراج فنیل آلانین

اثر حجم سورفکتانت

ابتدا به محلول آبی حاوی آنالیت(ها) سورفکتانت اضافه می¬شود. سپس به منظور ابری شدن محلول، شرایط تغییر داده می¬شود (تغییر دما، افزایش نمک). در این صورت مایسل¬ها در یک فاز با حجم کم به نام فاز غنی از سورفکتانت قرار می¬گیرند. گونه¬هایی که می¬توانند با اجتماع مایسل در محلول برهمکنش داشته باشند یا به فرم طبیعی¬شان و یا بعد از مشتق سازی به آسانی می¬توانند در حجم کوچک فاز غنی از سورفکتانت تغلیظ شوند. مقدار سورفکتانت بر راندمان استخراج، و حجم فاز غنی از سورفاکتانت تاثیر می گذارد. لوریل الکل¬های اتوکسیله سورفکتانت¬های غیر یونی هستند که از افزایش گاز اتیلن اکساید به الکل¬های چرب خطی که12 تا 14 اتم کربن دارند به دست می¬آیند. عدد 7در نام سورفاکتانت مورد استفاده، نشان دهنده میانگین تعداد مولکول¬های اکسید اتیلن است. LAE7 در دمای اتاق مایعی ویسکوز است. این ترکیب به دلیل دسترسی راحت، فرم همگن با خلوص بالا، گستره مناسب نقطه ابری (64-56درجه سانتیگراد)، خواص غیر سمی و هزینه پایین انتخاب شد. شکل(3) نشان می¬دهد که در ابتدا با افزایش غلظت و مقدار سورفکتانت کارایی استخراج افزایش می¬یابد ولی از غلظت مشخصی به بعد این افزایش کارایی کاهش می¬یابد. در غلظت¬های پایین از سورفکتانت، استخراج کامل انجام

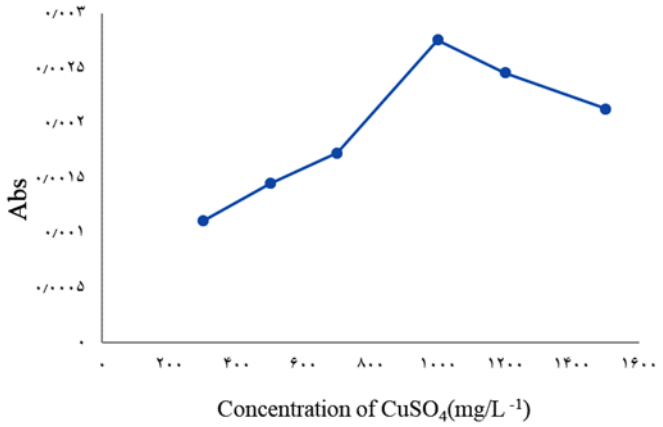
نمی¬شود و در غلظت¬های بالا از سورفکتانت، مقدار کمی از سورفکتانت و آنالیت در فاز آبی باقی می¬ماند و کارایی استخراج کاهش می¬یابد. حجم¬های مختلف محلول سورفکتانت از 3 تا 7 میلی لیتر در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت در حالی که سایر شرایط ثابت بود. جذب هر محلول با غلظت متفاوت از سورفکتانت اندازه گیری شد و طبق نتایج مقدار 5 میلی لیتر به عنوان حجم سورفکتانت بهینه برای بهینه سازی نقطه ابری سورفکتانت برای استخراج آنالیت مورد نظر انتخاب شد.



3: اثر حجم محلول سورفکتانت بر کارایی استخراج فنیل آلانین

اثر غلظت نمک

نقطه ابری محلول¬های مایسلی را می¬توان با اضافه کردن نمک، الکل، سورفکتانت¬های غیر یونی و برخی از ترکیبات آلی کنترل کرد. اضافه کردن نمک مناسب آنالیت و تشکیل کمپلکس پایدار باعث کاهش نقطه¬ی ابری ترکیب و افزایش کارایی سیستم می¬شود. در این سیستم از نمک $CuSO_4$ به دلیل تشکیل کمپلکس قوی و پایدار حرارتی با فنیل آلانین استفاده شد. با اضافه کردن مقادیر کمی از این نمک معدنی به سیستم، کاهش دمای نقطه ابری مشاهده شد. بر این اساس، تاثیر محلول مس سولفات در محدوده 1500-300میلی گرم برلیتر، در محلول¬های مایسلی از فنیل آلانین مورد بررسی قرار گرفت که طبق نتایج غلظت mgL^{-1} 1000 به عنوان غلظت بهینه محلول نمک بهینه (شکل 4) مشاهده شد. که کارایی استخراج با افزایش غلظت نمک مس (II)سولفات، ابتدا افزایش و سپس کاهش می یابد. در غلظت زیاد از نمک میزان پخش شدگی آنالیت در فاز غنی از سورفکتانت کاهش پیدا می¬کند و همین باعث کاهش کارایی استخراج فنیل آلانین از فاز آبی به فاز آلی می¬شود. طبق نتایج حاصل، تشکیل کمپلکس فنیل آلانین - مس نیز عامل مهمی در میزان افزایش جذب و پراکندگی در فاز غنی از سورفکتانت و در نتیجه افزایش کارایی استخراج است .

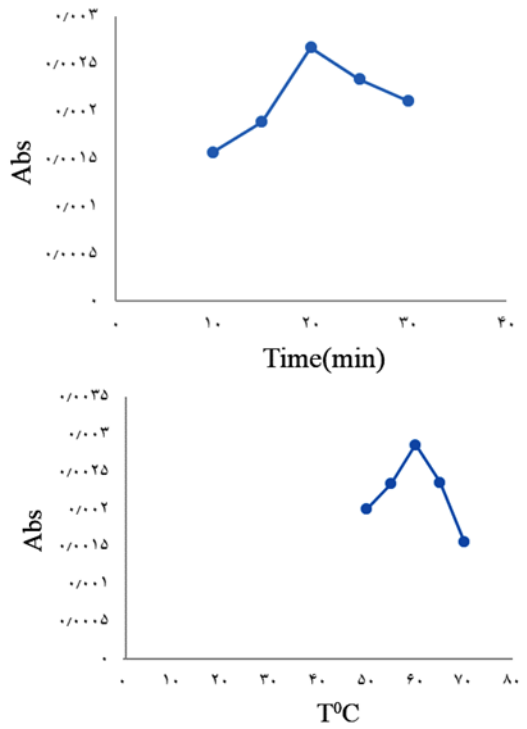


شکل4: تاثیر غلظت نمک مس(II) سولفات بر کارایی استخراج فنیل آلانین

اثر دما و زمان استخراج

دو عامل مهم در استخراج نقطه ابری عبارتند از دما و زمان استخراج. سورفکتانت¬ها تنها در دمای خاصی می¬توانند مایسل تشکیل دهند بنابراین بهتر است برای اطمینان از اتمام استخراج و جداسازی موثر فاز¬ها کوتاه¬ترین زمان استخراج و کمترین دمای تعادل را داشته باشیم. بر همین اساس، دما و زمان تعادل مورد بررسی قرار گرفتند. در این مطالعه دمای استخراج در گستره 55 تا 70 درجه سلسیوس، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج مربوط به دماهای اعمال شده در شکل5 نشان داده شده است. از نتایج پیداست که با افزایش دما میزان استخراج آنالیت کاهش می¬یابد. در دما و زمان کمتر، دو فاز نمی¬تواند شکل بگیرد، با این حال، دما و زمان بالاتر باعث جدا شدن مایسل فنیل آلانین می¬شود. دمای بسیار بالا می¬تواند باعث تجزیه آنالیت شود. بنابراین برای آزمایش-

های زیر، دمای استخراج 60درجه سانتی¬گراد و زمان مناسب برای حداکثر بازده استخراج در20 دقیقه بدست آمد .



شکل5: اثر زمان(بالا) و دما(پایین) بر کارایی استخراج فنیل آلانین

ارقام شایستگی

ارقام شایستگی روش پیشنهادی برای اندازه¬گیری فنیل آلانین تحت شرایط بهینه، مورد ارزیابی قرار گرفت. براساس نتایج گزارش شده مربوط به منحنی کالیبراسیون که در جدول 1 ارائه شده¬اند روش پیشنهادی برای اندازه¬گیری فنیل آلانین در شرایط بهینه به دست آمده در محدوده غلظتی $1000\text{-}1mgL^{-1}$ در طول موج جذب ماکزیمم فنیل آلانین(257nm) خطی است. مقادیر ضریب همبستگی برای محدوده غلظتی انتخاب شده برابر0/9988 است که بیانگر ارتباط خطی مناسب بین مقادیر جذب و غلظت فنیل آلانین در محدوده غلظتی اشاره شده است. مقادیر حد آشکارسازی (LOD)و انحراف استاندارد نسبی (RSD) روش پیشنهادی برای اندازه¬گیری فنیل آلانین در جدول 1 ، آمده است.

جدول 1: ارقام شایستگی روش پیشنهادی

پارامتر	مقدار
حد آشکارسازی (mg/L)	0/1
حد اندازه گیری(mg/L)	1
گستره خطی (mg/L)	1-1000
تکرارپذیری (٪)و n=5	0/6
فاکتور حجمی پیش تغلیظ	25
فاکتورغنی سازی	22
معادله کالیبراسیون	y=0/0011x+0/0211
R^2=0/9988	

بررسی اثر گونه های مزاحم

. با توجه به اهمیت اثرات یون های ماتریس بر روی انتخابی بودن و کاربردی بودن روش، امکان تداخل یون های مختلف و ترکیبات آلی در محلول 10 میلی گرم برمیلی لیتر از فنیل آلانین با روش پیشنهادی مورد مطالعه قرار گرفت. تغییر بیش از 5±٪ در سیگنال تجزیه ایی که از گونه های خارجی ناشی می شود به عنوان تداخل در نظر گرفته شد. نتایج در حاصله موید آن است که اکثر گونه های مورد بررسی تداخلی از خود نشان نداده و مزاحمت آنها در سطوح بسیار بالا تحمل می شود(جدول 2).

جدول2- بررسی اثر گونه های مزاحم

گونه های مزاحم	حدود قابل تحمل تداخلی (mg/L)
گلوکز، گوانین	500
آلانین، آدنین، سیتوزین	500
والین، تریپتوفان، سیستسین	250
آسکوربیک اسید، اوره	250
کلرید، اگزالات، بیکربنات	500
Na^{+} , K^{+} , Zn^{2+}, Mg^{2+}, Cd^{2+}, Ni^{2+}, Co^{3+}, Ba^{2+}, Al^{3+}, Fe^{3+}, Fe^{2+}, Co^{+2}	1000

کاربرد روش برای آنالیز نمونه های دارویی

برای بررسی عملکرد روش در نمونه¬های فرمولاسین دارویی از 3 قرص سیپروفلوکسازین (500 میلی گرمی) ت کلشی سین (1 میلی گرمی) و کوتریموکسازول(سولفامتوکسازول 400+ تری متوپریم 80 میلی گرمی) استفاده شد. ابتدا مقادیر مناسب از دارو پس از توزین، پودر کرده و به کمک اولتراسونیک در آب مقطر حل شدند. پس از جداسازی جامدات معلق به کمک سانتریفوژ، محلول بالای رسوب جهت استخراج مورد استفاده قرار گرفت. سرانجام محلول استخراجی مورد آنالیز فتومتری در طول موج 257 نانومتر قرار می گیرد.

این محلول¬ها همانند استانداردهای فنیل آلانین مورد آنالیز قرار گرفتند. نتایج نشان داده شده در جدول 3، اثبات می¬کنندکه ماتریکس نمونه واقعی، اثر خاصی روی روش استخراج نقطه ابری ندارد. بنابراین روش استخراج نقطه ابری نمونه های دارویی استفاده کرد .

نتیجه گیری

هدف این پروژه اندازه گیری و جداسازی فنیل آلانین در نمونه¬های دارویی و خوراکی با استفاده از یک روش ساده و کم هزینه است. این جداسازی با استفاده از یک سورفکتانت غیر یونی و نمک $CuSO_4$ و در شرایط بهینه pH=6 و در زمان 20 دقیقه و دمای استخراج 60درجه انجام شد. با توجه به شرایط تشکیل کمپلکس و اثر نمک بر روی کارایی استخراج، برای آنالیت مورد نظر نمک سولفات مس انتخاب شد. توانایی تشکیل کمپلکس مس با فنیل آلانین از سایر نمک¬ها، مثل $MgCl_2$،$CaNO_3$،NaCl بیشتر می¬باشد.سورفکتانت استفاده شده با توجه به داشتن دمای نقطه ابری پایین انتخاب شد. حجم و غلظت سورفکتانت و کاهش دمای نقطه ابری شدن آن با توجه به آنالیت و نمک استفاده شده، نتایج قابل قبولی را بدست آورد. از این روش با موفقیت در آنالیز نمونه¬های دارویی استفاده شده است. با این وجود ، امکان بررسی روش با تغییر شرایط مثل تغییر نمک و تغییر سورفکتانت برای داشتن زمان استخراج کمتر و نقطه ابری پایین¬تر وجود دارد.

منابع

[1]Wu, G., Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. Amino acids 2009, 37 (1),- 1-17.

[2]Pickering, P.; Chaudhuri, J., Enantioselective extraction of (d)-phenylalanine from racemic ()-phenylalanine using chiral emulsion liquid membranes. Journal of membrane science 1997, 127 (2), 115-130.

[3]Mann, J.; Peselow, E. D.; Snyderman, S.; Gershon, S., D-phenylalanine in endogenous depression. The American journal of psychiatry 1980,137 (12), 1611-1612.

[4]Russell, A.; McCarty, M., DL-phenylalanine markedly potentiates opiate analgesia–an example of nutrient/pharmaceutical up-regulation of the endogenous analgesia system. Medical hypotheses 2000. 55(4), 283-288.

[6]Hori, H.; Kunugi, H., Dopamine agonist-responsive depression. Psychogeriatrics 2013, 13(3), 189-195.

[6]Webster, D; Wildgoose, J., Tyrosine supplementation for phenylketonuria. Cochrane Database of Systematic Reviews 2013 (6), CD001507.

[16]Jeong, J.-S.; Sim, H.-J.; Lee, Y.-M.; Yoon, H.-R.; Lee, D. H.; Hong, S.-P., Determination of phenylalanine in blood by high-performance anion-exchange chromatography–pulsed amperometric detection to diagnose phenylketonuria. Journal of Chromatography A 2009, 1216 (30), 5709-5714.

[17]Lee, H., Park, S., Lee, G., Determination of phenylalanine in human serum by isotope dilution liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Rapid Communications in Mass Spectrometry: An International Journal Devoted to the Rapid Dissemination of Up-to-the-Minute Research in Mass Spectrometry 2006, 20 (12), 1913-1917.

[18]Wang, Z., Chen, Y.-z.; Zhang, S.; Zhou, Z., Investigation of a phenylalanine-biosensor system for phenylketonuria detection, Engineering in Medicine and Biology Society, 2005. IEEE-EMBS 2005. 27th Annual International Conference of the, IEEE: 2006; pp 1913-1916.

[19]Arakawa, T.; Koshida, T.; Gessei, T.; Miyajima, K.; Takahashi, D.; Kudo, H.; Yano, K.; Mitsubayashi, K., Biosensor for L-phenylalanine based on the optical detection of NADH using a UV light emitting diode. Microchimica Acta 2011, 173 (1-2), 199-205.

[20] Watanabe, H.; Tanaka, H.; A non-ionic surfactant as a new solvent for liquid-liquid extraction of zinc(II) with 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol, Talanta 1978, 25(10) 585-589.

[21] Madej, K., Persona, K., Drug screening in human plasma by cloud-point extraction and HPLC. Central European Journal of Chemistry, 2013,11, 94–100.

[22]. Mandal, S, Lahiri, S, A review on extraction, preconcentration and speciation of metal ions by sustainable cloud point extraction, Microchemical Journal, 2022, 175, 10715.

[7]Hyldebrandt, J. A.; Agger, P.; Sivén, E.; Wemmelund, K. B.; Heiberg, J.; Frederiksen, C. A.; Ravn, H. B., Effects of milrinone and epinephrine or dopamine on biventricular function and hemodynamics in right heart failure after pulmonary regurgitation. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology 2015, 309 (5), H8600-H866.

[8]Bartus, A.; Palasti, F.; Juhasz, E.; Kiss, E.; Simonova, E.; Sumanszki, C.; Reismann, P., The influence of blood phenylalanine levels on neurocognitive function in adult PKU patients. Metabolic Brain Disease 2018, 33(5), 1609-1615.

[9]van Spronsen, F. J., Mild hyperphenylalaninemia: to treat or not to treat. Journal of inherited metabolic disease 2011, 34 (3), 656-661.

[10]Berry, S. A.; Brown, C.; Grant, M.; Greene, C. L.; Jurecki, E.; Koch, J.; Moseley, K.; Suter, R.; van Calcar, S. C.; Wiles, J., Newborn screening 50 years later: access issues faced by adults with PKU. Genetics in Medicine 2013, 15 (8), 591-59.

[11]Erlandsen, H.; Stevens, R. C., The structural basis of phenylketonuria. Molecular genetics and metabolism 1999, 68 (2), 103-125.

[12]Waisbren, S. E.; Noel, K.; Fahrbach, K.; Cella, C.; Frame, D.; Dorenbaum, A.; Levy, H., Phenylalanine blood levels and clinical outcomes in phenylketonuria: a systematic literature review and meta-analysis. Molecular genetics and metabolism 2007, 92(1),63-70.

[13]Dougherty, F. E.; Levy, H. L., Present newborn screening for phenylketonuria. Mental retardation and developmental disabilities research reviews 1999, 5 (2), 144-149.

[14]Allard, P.; Cowell, L. D.; Zytkovicz, T. H.; Korson, M. S.; Ampola, M. G., Determination of phenylalanine and tyrosine in dried blood specimens by ion-exchange chromatography using the Hitachi L-8800 analyzer. Clinical biochemistry 2004, 37 (10), 857-862.

[15]Kand'ár, R.; Žáková, P., Determination of phenylalanine and tyrosine in plasma and dried blood samples using HPLC with fluorescence detection. Journal of Chromatography B 2009, 877 (30), 3926-3929.