

اندازه گیری تیوپنتال در محیط آبی با استفاده از خواص الکتروکاتالیزوری کتکول

مصطفی نجفی^{۱*}، محسن عامری^۲، امید قادری^۳

۱- دانشیار دانشگاه جامع امام حسین (ع) ۲- دانشجوی دکتری ۳- استادیار دانشگاه سمنان

(دریافت: ۹۲/۱۲/۱۸، پذیرش: ۹۳/۱۰/۰۴)

چکیده

در این مقاله، اکسایش الکتروشیمیایی کتکول در حضور تیوپنتال در سطح الکتروود کربن شیشه‌ای (GC) در بافر فسفات (۰/۲ مول بر لیتر، pH=۶/۰) با استفاده از ولتامتری چرخه‌ای مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد جریان قله کاتدی کتکول در حضور غلظت‌های مختلف تیوپنتال کاهش می‌یابد و کتکول می‌تواند در یک واکنش افزایش ۴۰۱ میکال تحت یک سازوکار الکتروشیمیایی- شیمیایی (EC) با تیوپنتال واکنش دهد. در ادامه روش ولتامتری پالسی تفاضلی برای اندازه‌گیری تیوپنتال استفاده شد. کاهش جریان کاتدی کتکول یک رابطه خطی با غلظت‌های مختلف تیوپنتال در محدوده‌ی ۵/۰ تا ۱۲۵/۰ میکرومول بر لیتر و حد تشخیص ۲/۰ میکرو مول بر لیتر نشان می‌دهد. از این روش با موفقیت در تعیین تیوپنتال در نمونه‌های سرم انسانی استفاده شد.

کلید واژه‌ها: تیوپنتال، کتکول، الکتروود کربن شیشه‌ای، ولتامتری.

Determination of Thiopental in Aqueous Media Using Catechol Electrocatalytic Properties

M. Najafi*, M. Ameri, O. Ghaderi

Imam Hossein University

(Received: 09/03/2014; Accepted: 25/12/2014)

Abstract

In this paper, the electrochemical oxidation of catechol was studied in the presence of thiopental in phosphate buffer solution (0.2 mol L^{-1} , $\text{pH}=6.0$) at the surface of glassy carbon electrode (GC) by cyclic voltammetry technique. The results showed that cathodic peak current of catechol reduced in the presence of various concentrations of thiopental and catechol can participate in a 1,4-Michael addition reaction with thiopental under an electrochemical – chemical (EC) mechanism. Then, the differential pulse voltammetry technique is used for determination of thiopental. The decreasing of the cathodic current of catechol showed a linear relationship with the thiopental concentration in the range of 5.0×10^{-6} - $125.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ and a detection limit of $2.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. The method was successfully applied for determination of thiopental in human serum samples.

Keywords: Thiopental, Catechol, Glassy Carbon Electrode, Voltammetry.

۱. مقدمه

شد و با استفاده از بافر تا حجم ۱۵ میلی‌لیتر رقیق گردید. برای تهیه سرم خون انسانی به ترتیب زیر عمل شد. نمونه خون بلافاصله پس از دریافت و قبل از لخته شدن سانتریفیوژ شد. به ازای هر یک میلی‌لیتر از پلاسما حاصل حدود ۱/۲۵ میلی‌لیتر استونیتریل اضافه شد تا پروتئین‌های آن جدا شوند. سپس مخلوط به دست آمده دوباره سانتریفیوژ شده و قسمت بالای لوله سانتریفیوژ به عنوان سرم انسانی جدا شد. سرم تهیه شده برای جلوگیری از فاسد شدن در یخچال و در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شده و ۳ دقیقه قبل از استفاده از یخچال خارج شده است. تمامی مراحل افزودن استونیتریل و سانتریفیوژ در دمای محیط ($25 \pm 2^\circ \text{C}$) انجام گرفته است. در تمام آنالیزها ابتدا سطح الکتروود کربن شیشه‌ای در دوغابی از پودر آلومینای ۰/۵ میکرومتر با استفاده از یک پارچه نرم به خوبی صیقل داده شد، سپس با استفاده از آب دو بار تقطیر شسته شد.

۲-۲. دستگاه‌های مورد استفاده

دستگاه Metrohm 757 VA Computrace برای اندازه‌گیری‌های الکتروشیمیایی به کار رفته است. این دستگاه مجهز به یک سامانه سه الکتروود متشکل از الکتروود کار (الکتروود کربن شیشه‌ای)، الکتروود مرجع نقره/نقره کلراید Ag/AgCl و الکتروود کمکی پلاتین (دیسکی) می‌باشد. اندازه‌گیری pH بافرهای مختلف توسط دستگاه pH متر W₃B ساخت شرکت BEL (ایتالیا) انجام شد.

۳. نتایج و بحث

۳-۱. بررسی رفتار الکتروشیمیایی کنتکول در حضور

تیوپنتال با استفاده از ولتامتری چرخه‌ای

ولتاموگرام چرخه‌ای محلول ۲/۰ میلی‌مول بر لیتر کنتکول در بافر فسفات (۰/۲ مول بر لیتر، pH=۶/۰، دمای اتاق) در شکل (۱) منحنی الف نشان داده شده است. در این ولتاموگرام قله آندی (A₁) مربوط به اکسایش کنتکول و تبدیل آن به ارتوکینون و یک قله کاتدی (C₁) مربوط به کاهش ارتوکینون و تبدیل آن به کنتکول (شکل (۱))، منحنی (a) می‌باشد. فرآیند اکسایش-کاهش کنتکول به صورت دو الکترونی و شبه برگشت‌پذیر می‌باشد [۱۳]. شکل (۱)، منحنی ب، ولتاموگرام چرخه‌ای ثبت شده برای محلول ۲/۰ میلی‌مول بر لیتر کنتکول را در حضور غلظت ۲/۰ میلی‌مول بر لیتر تیوپنتال در بافر فسفات (۰/۲ مول بر لیتر، دمای اتاق، pH=۶/۰) نشان می‌دهد. همان طور که در این منحنی مشاهده می‌شود قله کاتدی (C₁) کنتکول به علت واکنش شیمیایی همراه (واکنش افزایش ۴و۱ مایکل) اورتوکینون حاصله از اکسایش کنتکول با گروه گوگرد تیوپنتال، ناپدید می‌شود. با توجه به اینکه این کاهش در جریان قله کاتدی (C₁) به صورت مستقیم با غلظت تیوپنتال متناسب می‌باشد می‌توان از این کاهش جریان برای اندازه‌گیری غلظت تیوپنتال استفاده کرد.

سدیم تیوپنتال (سدیم پنتاتول یا سدیم تیوپنتون یا سدیم تراپانال) یک ترکیب آلی حاوی گوگرد است که دارای فرمول مولکولی C₁₁H₁₇N₂O₂NaS و جرم مولکولی ۲۶۴/۳۲ می‌باشد. این ماده جزء نمک‌های تیوباربتوریک^۱ است که می‌تواند به عنوان ماده بی‌حس کننده و همچنین به عنوان ماده بیهوشی در اتاق عمل استفاده شود [۱]. یکی از کاربردهای تیوپنتال استفاده به عنوان دارو برای بیهوشی‌های کوتاه مدت می‌باشد. مدت زمان لازم برای بیهوشی توسط تیوپنتال ۳۰ ثانیه گزارش شده است [۲]. از جمله مهم‌ترین اثرات تیوپنتال، التهاب ریوی، اثر بر روی کبد، خواب آلودگی نوزاد، جلوگیری و درمان کم خونی مغزی و همچنین ایجاد سمیت در شیر مادر [۳ و ۴] می‌باشد. تاکنون روش‌های محدودی از قبیل پتانسیومتری [۶ و ۵]، اسپکتروفوتومتری [۷]، کروماتوگرافی [۸-۱۰] و ولتامتری با عاری‌سازی جریان [۱۱] برای تعیین آن ارائه شده است. به تازگی نیز روشی برای تعیین تیوپنتال با یک حسگر ظرفیتی گزارش شده است [۱۲]. هر چند تمام این روش‌ها قابلیت‌های مخصوص به خود را دارند ولی دارای محدودیت‌هایی مانند نیاز به مراحل نمونه‌سازی، پیچیدگی و گران قیمت بودن تجهیزات هستند.

از خواص الکتروشیمیایی کنتکول برای توسعه روش‌های اندازه‌گیری ترکیبات مختلف دارویی استفاده شده است. در این روش، کنتکول به عنوان حد واسط الکترواکتیو عمل می‌کند و دنبال کردن افزایش یا کاهش جریان‌های پیک در ولتاموگرام کنتکول در حضور ترکیب آزمایشی، اساس توسعه یک روش جدید برای اندازه‌گیری آن ترکیب خواهد بود. مشتقات تیوراسیل^۲ [۱۳] و کاپتوپریل^۳ [۱۴] از جمله ترکیبات دارویی هستند که با استفاده از این روش اندازه‌گیری شده‌اند. بر همین مبنا در این کار تحقیقاتی، روشی ساده برای اندازه‌گیری تیوپنتال در محیط بیولوژیکی بدون نیاز به مراحل پیچیده جداسازی توسعه داده شده است. با توجه به اهمیت تعیین تیوپنتال در محیط‌های بیولوژیکی این روش می‌تواند پاسخگوی برخی نیازها در این حوزه باشد.

۲. بخش تجربی

۱-۲. مواد

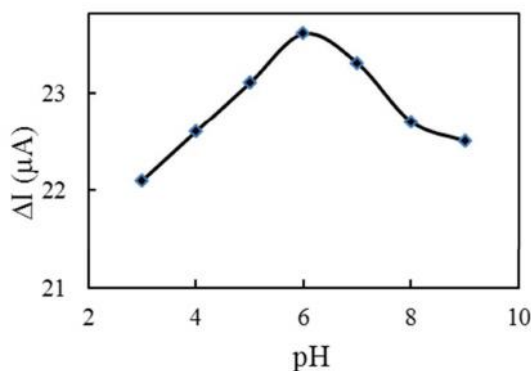
تیوپنتال خالص از شرکت داروسازی Sanduz Gmhp اتریش تهیه گردید. سایر مواد شیمیایی مورد استفاده در این تحقیق، از شرکت مرک یا فلوکا تهیه شده‌اند و بدون هیچ‌گونه خالص‌سازی مورد استفاده قرار گرفتند. در این تحقیق برای ساخت استانداردها غلظت‌های ۶ میلی‌مولار از کنتکول و تیوپنتال در بافر فسفات ساخت شده و برای ساختن غلظت‌های پایین از این محلول‌های مادر استفاده شد. برای ساخت نمونه‌های حقیقی نیز حجم لازم توسط میکروسرنج برداشته

¹ Thiobarbitoric

² Thiouracil

³ Captopril

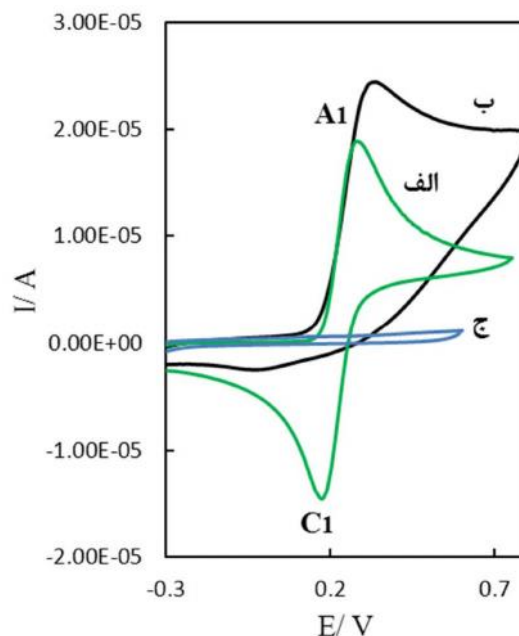
جریان قله کاندی در دو حالت به عنوان علامت تجزیه‌ای نسبت به pH رسم شد (شکل ۲). همان‌طور که در شکل (۲) مشاهده می‌شود، تا $\text{pH}=6/0$ با افزایش pH علامت تجزیه‌ای افزایش یافته است. به عبارت دیگر هر چه محلول اسیدی‌تر باشد علامت تجزیه‌ای کمتر است. با توجه به ثابت اسیدی تیوپنتال ($\text{pK}_a=7/4$) علت این کاهش مربوط به غیر فعال شدن تیوپنتال نسبت به واکنش شیمیایی است. از آن جا که در محیط‌های اسیدی غلظت H^+ زیادتر می‌شود گروه گوگرد تیوپنتال پروتونه شده و در نتیجه از قدرت نوکلئوفیلی آن کاسته می‌شود به همین دلیل میزان انجام واکنش شیمیایی همراه توسط تیوپنتال کاهش می‌یابد. با عبور pH از $6/0$ و با قلیایی شدن محلول نیز علامت تجزیه‌ای کاهش می‌یابد و هر چه افزایش pH بیشتر باشد این کاهش بیشتر است. علت این امر واکنش دیمیریزاسیون کنتکول در محیط‌های بازی است (دیپروتونه شدن اکسیژن‌های کنتکول و انجام واکنش‌های درون مولکولی) که سرعت انجام این واکنش بسیار بالاتر از سرعت واکنش شیمیایی همراه آن با تیوپنتال می‌باشد [۱۵]. بنابراین برای دستیابی به بیشترین علامت تجزیه‌ای، $\text{pH}=6/0$ به عنوان محیط بهینه انتخاب شد.



شکل ۲. بررسی اثر pH بر بزرگی علامت تجزیه‌ای تیوپنتال. غلظت کنتکول: $2/0 \text{ mmol L}^{-1}$ ، غلظت تیوپنتال: $2/0 \text{ μmol L}^{-1}$ ، سرعت روبش: 20 mV s^{-1}

بهینه‌سازی محلول الکترولیت: محلول‌های الکترولیت شامل بافرهای استات، فسفات، سیترات و بافر عمومی با $\text{pH}=6/0$ و غلظت $0/2$ مولار مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج نشان داد که جریان قله کاهش ارتوکینون در حضور تیوپنتال در محلول بافر فسفات به ترتیب کمترین (بیشترین مقدار واکنش‌پذیری بین کنتکول و تیوپنتال) و در غیاب تیوپنتال بیشترین مقدار (کمترین مقدار واکنش جانبی از جمله دیمیریزاسیون) است. بنابراین محلول بافر فسفات ($\text{pH}=6/0$) به عنوان الکترولیت حامل برای اندازه‌گیری تیوپنتال در حضور کنتکول انتخاب شد. به منظور بهینه‌سازی قدرت یونی، رفتار الکتروشیمیایی کنتکول در حضور تیوپنتال در سه قدرت یونی متفاوت $0/2$ ، $0/25$ و $0/3$ مول بر لیتر بررسی شد و نتایج نشان داد که این سه قدرت یونی (غلظت بافر) دارای جریان قله کاتدی تقریبی یکسانی می‌باشند.

همچنین منحنی c ولتاموگرام ثبت شده برای تیوپنتال در غیاب کنتکول را نشان می‌دهد. بیشتر بودن میزان جریان مشاهده شده برای کاهش پیک C_1 نسبت به افزایش پیک A_1 علت استفاده از پیک C_1 و ارجحیت آن به خواص کاتالیزوری پیک A_1 می‌باشد.



شکل ۳. ولتاموگرام‌های چرخه‌ای غلظت $2/0 \text{ mmol L}^{-1}$ کنتکول (الف) در غیاب و (ب) در حضور غلظت $2/0 \text{ mmol L}^{-1}$ تیوپنتال و (ج) غلظت $2/0 \text{ mmol L}^{-1}$ تیوپنتال در غیاب کنتکول در سطح الکترود کربن شیشه‌ای، در بافر فسفاتی ($0/2 \text{ mol L}^{-1}$ ، $\text{pH}: 6/0$). سرعت روبش: 50 mV s^{-1}

۳-۲. بررسی و بهینه‌سازی شرایط واکنش

به منظور دستیابی به بالاترین میزان حساسیت و همچنین کمترین میزان حد تشخیص متغیرهای مؤثر بر بزرگی جریان قله کاتدی کنتکول (در حضور و در غیاب تیوپنتال) مورد بررسی قرار گرفتند. در بررسی متغیرهای مؤثر، از روش بهینه‌سازی یک متغیر در یک زمان استفاده شد. در این روش همه متغیرها ثابت در نظر گرفته می‌شوند و فقط پارامترهایی که باید بهینه شود تغییر داده می‌شوند. پارامترهایی که مورد بررسی قرار گرفتند عبارتند از: pH، نوع و غلظت الکترولیت و زمان تجمع.

بهینه‌سازی pH: به منظور بررسی pH و دست‌یابی به pH بهینه برای انجام واکنش شیمیایی همراه بین ارتوکینون حاصله از اکسایش الکتروشیمیایی کنتکول و تیوپنتال، بررسی رفتار الکتروشیمیایی کنتکول در محیط بافری با pHهای ۳ تا ۹ انجام شد. پس از فراهم ساختن محلول‌های ذکر شده با pHهای مختلف، ولتاموگرام‌های چرخه‌ای غلظت $2/0$ میلی‌مول بر لیتر کنتکول یک بار در غیاب و بار دیگر در حضور غلظت $50/0$ میکرو مول بر لیتر تیوپنتال با سرعت روبش 20 میلی ولت بر ثانیه ثبت شد. اختلاف مشاهده شده در

۳-۳. تعیین سازوکار واکنش

برای تشخیص سازوکار واکنش مورد نظر از غلظت ۲ میلی‌مول بر لیتر کتکول در حضور غلظت ۲ میلی‌مول بر لیتر تیوپنتال (نسبت ۱ به ۱)، با سرعت روبش‌های متفاوت در محیط بهینه ولتاموگرام چرخه‌ای ثبت شد. با بررسی ولتاموگرام‌های به دست آمده در سرعت روبش‌های متفاوت و رسم منحنی‌های مربوطه و مقایسه نتایج با شروط لازم برای هر یک از سازوکارها، می‌توان سازوکار واکنش را تعیین کرد. به همین منظور ولتاموگرام چرخه‌ای غلظت ۲ میلی‌مول بر لیتر کتکول در حضور غلظت ۲ میلی‌مول بر لیتر تیوپنتال در محیط بهینه و با سرعت روبش‌های ۲۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌ولت بر ثانیه ثبت شد. ولتاموگرام‌های حاصل شده در شکل (۴-الف) مشاهده می‌شود. شکل (۴-ب) افزایش نسبت قله کاتدی به آندی را با افزایش سرعت روبش به صورت غیر خطی نشان می‌دهد که این امر گواه بر سازوکار EC واکنش کتکول با تیوپنتال می‌باشد [۱۶]. همچنین جابه‌جایی پتانسیل قله اکسایش به سمت مقادیر مثبت در اثر افزایش سرعت روبش، از دلایل دیگر EC بودن سازوکار مورد نظر می‌باشد [۱۶].

کاهش جزئی با افزایش سرعت روبش در منحنی شکل (۴-ج) نیز EC بودن سازوکار را اثبات می‌کند [۱۶]. برای تکمیل کردن اطلاعات در مورد سازوکار واکنش مورد نظر کولومتری تحت پتانسیل ۰/۵ ولت برای غلظت ۲ میلی‌مول بر لیتر کتکول در حضور غلظت ۲ میلی‌مول بر لیتر تیوپنتال در محیط بهینه انجام گرفت و تعداد الکترون درگیر در واکنش در طی انجام کولومتری حدود ۲ الکترون محاسبه شد. برای اطمینان از الکترولیز کامل، پتانسیل اعمال شده مقداری بیش از پتانسیل قله اکسایش کتکول در حضور تیوپنتال انتخاب شده است. با توجه به دو الکترونی بودن اکسایش کتکول و نتیجه به دست آمده برای کل الکترون‌های مصرفی در کولومتری (۲ الکترون)، یک مرحله‌ای بودن واکنش الکتروشیمیایی مورد بررسی اثبات می‌شود. بر این اساس سازوکار پیشنهادی واکنش کتکول و تیوپنتال در شکل (۵) آورده شده است.

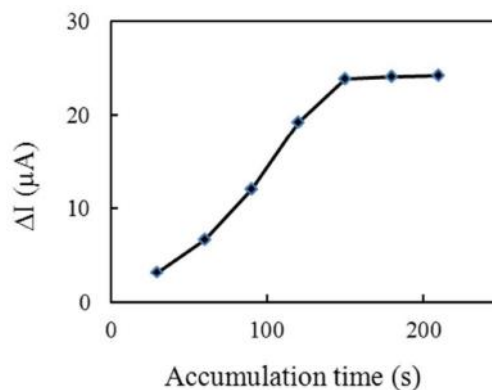
۳-۴. ولتامتری پالس تفاضلی و رسم منحنی کالیبراسیون

یکی از خصوصیات که در اندازه‌گیری‌های تجزیه‌ای مهم می‌باشد گستره دینامیکی خطی الکتروکود و کمترین مقدار قابل اندازه‌گیری آنالیت برای الکتروکود مورد نظر است. بنابراین پس از دستیابی به شرایط بهینه برای اندازه‌گیری تیوپنتال، منحنی کالیبراسیون رسم شد (شکل ۶-الف). ولتامتری پالس تفاضلی برای اندازه‌گیری مقادیر مختلف تیوپنتال به کار گرفته شد. ولتاموگرام‌های مربوطه برای غلظت ۲ میلی‌مول بر لیتر از کتکول تحت شرایط بهینه شده و در حضور غلظت‌های متفاوت تیوپنتال ثبت شد. ولتاموگرام‌ها به وضوح نشان می‌دهند که جریان قله کاهش (I_{PC1}) بر حسب غلظت تیوپنتال در محدوده ۵/۰ تا ۱۲۵/۰ میکرومول بر لیتر رابطه خطی دارد (معادله (۱)).

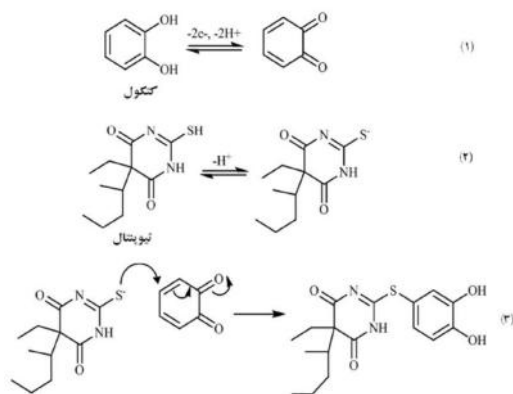
$$\Delta I (\mu A) = 431.14C (\text{mmol L}^{-1}) + 1.9985 \quad (1)$$

بنابراین غلظت ۰/۲ مول بر لیتر به عنوان غلظت بهینه برای محلول الکترولیت انتخاب شد.

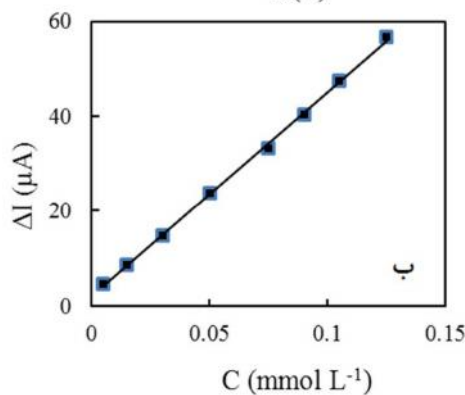
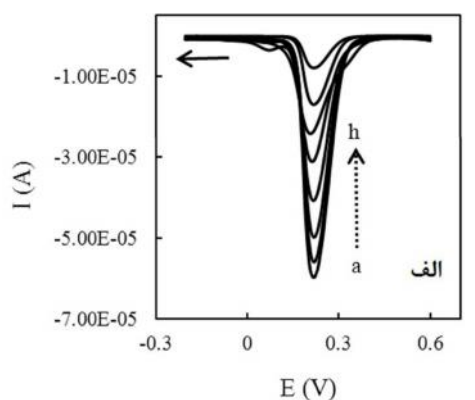
بهینه‌سازی زمان تجمع: زمان تجمع، زمان مورد نیاز برای پیش تغلیظ کتکول در سطح الکتروکود کربن شیشه‌ای قبل از اعمال پتانسیل اکسایش می‌باشد. همان‌طور که در قسمت قبل ذکر شد، برای به دست آوردن بهترین زمان جهت رسیدن به بیشترین علامت تجزیه‌ای محلولی با غلظت ۵۰/۰ میکرومول بر لیتر از تیوپنتال و ۲/۰ میلی‌مول بر لیتر از کتکول تهیه شد. برای اطمینان از اکسید شدن کامل کتکول و واکنش با تیوپنتال، این محلول تحت پتانسیل ۰/۶ ولت قرار گرفت و در زمان‌های مختلف ولتاموگرام‌های پالس تفاضلی آن در محدوده ۰/۶ تا ۰/۲ ولت ثبت شد. ولتاموگرام‌های مربوط به محلول کتکول ۲/۰ میلی‌مول بر لیتر (محلول شاهد) نیز تحت همان شرایط و در غیاب تیوپنتال به دست آمد. اختلاف بین جریان‌های قله کاتدی کتکول در دو حالت به عنوان علامت تجزیه‌ای در نظر گرفته شد. همان‌طور که در شکل (۳) نشان داده شده است، علامت تجزیه‌ای با افزایش زمان تجمع افزایش می‌یابد که این امر به علت افزایش غلظت ارتوکینون در سطح الکتروکود و در نتیجه افزایش میزان واکنش شیمیایی (واکنش افزایش مایکل) بین تیوپنتال و ارتوکینون می‌باشد. در مدت زمان ۱۵۰ ثانیه غلظت ارتوکینون تجمع یافته در سطح الکتروکود به بیشترین میزان خود رسیده و در نتیجه واکنش شیمیایی و علامت تجزیه‌ای نیز به حداکثر میزان خود می‌رسد. پس از مدت ۱۵۰ ثانیه سطح الکتروکود از ارتوکینون اشباع می‌شود و بنابراین با افزایش مدت زمان تجمع علامت ثابت می‌گردد که این امر به علت اشباع شدن سطح الکتروکود اتفاق می‌افتد. بنابراین ۱۵۰ ثانیه برای زمان تجمع انتخاب شد تا بیشترین علامت تجزیه‌ای تیوپنتال به دست آید.



شکل ۳. نمودار علامت تجزیه‌ای (اختلاف جریان) غلظت $2/0 \text{ mmol L}^{-1}$ کتکول در حضور و غیاب تیوپنتال در بافر فسفات (pH: ۶/۰) در سطح الکتروکود کربن شیشه‌ای در زمان‌های مختلف تحت پتانسیل ۰/۶ ولت. سرعت روبش: 20 mV s^{-1}



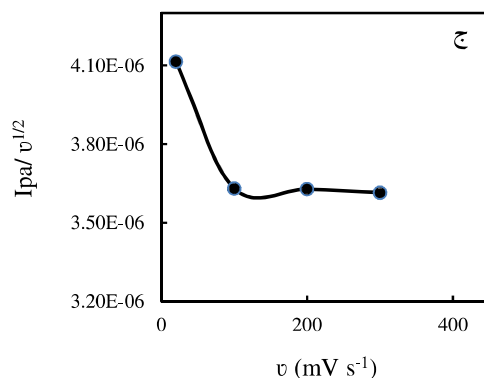
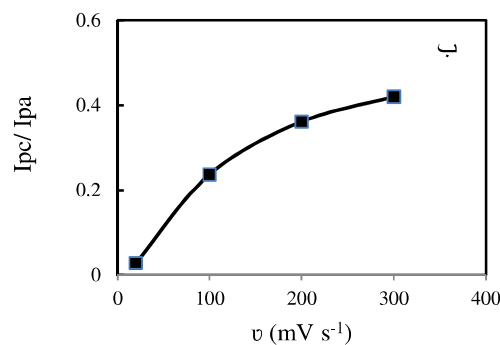
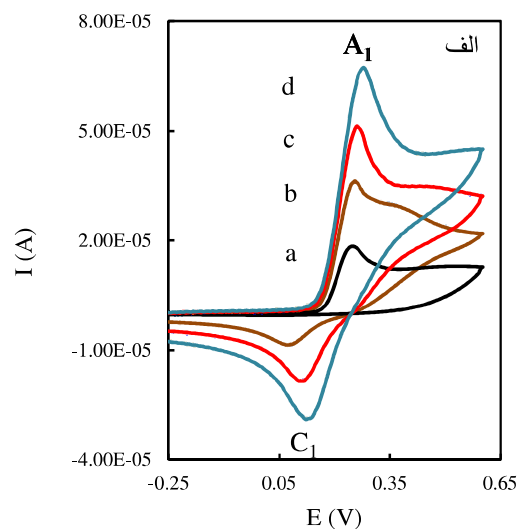
شکل ۵. نمایش سازوکار پیشنهادی واکنش بین کتکول و تیوپنتال



شکل ۶ الف) ولتاموگرام‌های پالسی تفاضلی غلظت $2/0 \text{ mmol L}^{-1}$ کتکول در حضور غلظت‌های مختلف تیوپنتال در بافر فسفاتاتی $(2/0 \text{ mol L}^{-1}, \text{pH}: 6/0)$ و پس از 150 ثانیه تجمع تحت پتانسیل $0/6$ ولت. ب) منحنی کالیبراسیون. غلظت‌های تیوپنتال عبارتند از: (a) 0.15 ، (b) 0.30 ، (c) 0.45 ، (d) 0.50 ، (e) 0.75 ، (f) 0.90 ، (g) 1.05 و (h) $1.20 \mu\text{mol L}^{-1}$. سرعت روبش: 20 mV s^{-1}

۵-۳. دقت واحد تشخیص

برای بررسی تکرارپذیری روش غلظت $55/0$ میکرومول بر لیتر تیوپنتال مورد استفاده قرار گرفت. به این منظور 7 اندازه‌گیری تکراری بر روی محلول تیوپنتال $55/0$ میکرومول بر لیتر در حضور غلظت $2/0$ میلی‌مول بر لیتر کتکول در محدوده‌ی پتانسیل $0/6$ تا $-0/2$ ولت تحت شرایط



شکل ۴. الف) ولتاموگرام‌های غلظت $2/0 \text{ mmol L}^{-1}$ کتکول در حضور غلظت $2/0 \text{ mmol L}^{-1}$ تیوپنتال در سطح الکتروود کربن شیشه‌ای در محلول بافر فسفاتاتی $(2/0 \text{ mol L}^{-1}, \text{pH}: 6/0)$ و سرعت روبش‌های مختلف. ب) نمودار نسبت جریان کاتدی به آندی بر حسب سرعت روبش. ج) نمودار تابع جریان بر حسب سرعت روبش سرعت روبش‌ها از (a) تا (d) به ترتیب عبارتند از: $200, 100, 20$ و 300 mV s^{-1}

شیب خط $431/1$ (میکروآمپر بر حسب میلی‌مول بر لیتر)، حد تشخیص $2/02$ میکرو مول بر لیتر و ضریب همبستگی $0/9991$ به دست آمد که در شکل (۶ ب) مشاهده می‌شود.

۱.۷-۴ اندازه‌گیری نمونه حقیقی

ابتدا برای آماده‌سازی نمونه میزان ۱۰ میلی‌لیتر از سرم خون با ۵ میلی‌لیتر از بافر فسفات مخلوط شد. سپس مقدار تیوپنتال (اضافه شده) موجود در آن در حضور کتکول با استفاده از روش افزایش استاندارد اندازه‌گیری شد. داده‌های حاصل در جدول (۳) ارائه شده است. نتایج بیانگر دقت و صحت بالای روش برای اندازه‌گیری تیوپنتال در سرم است.

جدول ۲. بررسی مزاحمت برخی گونه‌ها در اندازه‌گیری تیوپنتال در غلظت $50/0 \mu\text{mol L}^{-1}$ تیوپنتال

حد مجاز غلظت گونه به غلظت	گونه‌های مورد بررسی
۱۰۰۰	$\text{HPO}_4^{2-}, \text{H}_2\text{PO}_4^-, \text{C}_2\text{O}_4^{2-}, \text{Cl}^-, \text{NO}_3^-, \text{SO}_4^{2-}$ $\text{Al}^{3+}, \text{Ni}^{2+}, \text{Pb}^{2+}, \text{Cd}^{2+}$
۵۰۰	$\text{Mg}^{2+}, \text{ClO}_4^-, \text{Ba}^{2+}, \text{Ca}^{2+}$
۱	باربیتوریکه $\text{Fe}^{2+}, \text{Cu}^{2+}$

جدول ۳. نتایج اندازه‌گیری تیوپنتال در سرم (درجه اطمینان ۹۵٪)

نمونه	مقدار اضافه شده* $\mu\text{mol L}^{-1}$	مقدار یافت شده $\mu\text{mol L}^{-1}$	میزان بازبایی (%)	%RSD
سرم	۵۵	$54/2 \pm 0/4$	۹۸/۵	۳/۲
	۱۱۰	$111/3 \pm 0/6$	۱۰۱/۲	۲/۲
	۰	۰	-	-

* میانگین سه اندازه‌گیری تکراری

۴. نتیجه‌گیری

در این تحقیق، اکسایش الکتروشیمیایی کتکول در حضور تیوپنتال با تکنیک ولتامتری چرخه‌ای مورد بررسی قرار گرفت. همچنین، اثر pH محلول بافر و سرعت روبش پتانسیل شرح داده شد. حضور تیوپنتال باعث کاهش جریان قله کاهش کتکول می‌شود که این رفتار نشان دهنده برهمکنش شیمیایی بین ارتوکینون حاصل شده از اکسایش الکتروشیمیایی کتکول و تیوپنتال می‌باشد. برهمکنش تیوپنتال با کتکول می‌تواند برای اندازه‌گیری مقادیر میکرومولار تیوپنتال به کار رود. این تکنیک برتری‌های ویژه‌ای نسبت به الکترودهای کربن شیشه‌ای اصلاح شده معمول دارد، به ویژه سادگی آن که مانند الکترودهای اصلاح شده نیازی به آماده‌سازی پیچیده ندارد. کم بودن گونه‌های مزاحم، حد تشخیص مناسب، محدوده دینامیک خطی خوب، حساسیت بالا از ویژگی‌های این روش می‌باشد. به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که از این روش می‌توان برای اندازه‌گیری مقادیر اندک تیوپنتال با دقت و صحت بالا استفاده کرد.

بهینه شده انجام شد. بعد از ثبت ولتاموگرام‌ها، جریان کاتدی اندازه‌گیری شد. سپس جریان کاتدی مربوط به غلظت ۲/۰ میلی‌مول بر لیتر کتکول نیز در محدوده پتانسیل فوق به عنوان علامت شاهد ۷ بار اندازه‌گیری شد و میانگین جریان‌های کاتدی مورد استفاده قرار گرفت. از تفاضل جریان قله کاتدی مربوط به حضور تیوپنتال (I_b) با جریان قله کاتدی در غیاب تیوپنتال (I_0)، جریان خالص برای هر اندازه‌گیری به دست می‌آید. پس از آن انحراف استاندارد و انحراف استاندارد نسبی جریان محاسبه می‌شود. مقدار انحراف استاندارد نسبی به دست آمده دقت بسیار خوب روش را نشان می‌دهد (جدول (۱)).

جدول ۱. بررسی تکرار پذیری روش در شرایط بهینه

%RSD	میانگین جریان (μA)	جریان اندازه‌گیری شده (μA)		
		۲۳/۴	۲۳/۹	۲۳/۵
۱/۳	۲۳/۷	۲۳/۳	۲۳/۸	۲۴/۲

سرعت روبش: 20 mV s^{-1} ، غلظت تیوپنتال: $50/0 \mu\text{mol L}^{-1}$

برای تعیین حد تشخیص روش از معادله (۲) استفاده شد [۱۷]. در این رابطه S_{bk} انحراف استاندارد علامت شاهد و m شیب منحنی کالیبراسیون است. برای به دست آوردن انحراف استاندارد علامت شاهد در شرایط بهینه، ۷ اندازه‌گیری تکراری با سرعت روبش ۲۰ میلی‌ولت بر ثانیه در گستره پتانسیل ۰/۶ تا -۰/۲ ولت بر روی محلول شاهد (غلظت ۲ میلی‌مول بر لیتر کتکول) تحت شرایط بهینه انجام شد. پس از اندازه‌گیری شدت جریان کاتدی مربوط به غلظت ۲ میلی‌مول بر لیتر کتکول در محلول شاهد، انحراف استاندارد علامت شاهد مقدار $0/291$ میکروآمپر محاسبه شد که با توجه به شیب منحنی کالیبراسیون ($m=431/14 \mu\text{Ammol}^{-1} \text{L}$) حد تشخیص ۲/۰ میکرومول بر لیتر به دست آمد.

$$\text{LOD} = \frac{3S_{bk}}{m} \quad (2)$$

۳-۶. بررسی اثر مزاحمت‌ها

برای بررسی اثر مزاحمت‌ها در اندازه‌گیری تیوپنتال در حضور کتکول، از غلظت ۵۰/۰ میکرومول بر لیتر تیوپنتال در حضور غلظت ۲ میلی‌مول بر لیتر کتکول در بافر فسفات (۰/۲ مول بر لیتر، ۶/۰ pH) تحت شرایط بهینه استفاده شد. مواد بالقوه مزاحم از گروهی از مواد که می‌توانند همراه با تیوپنتال وجود داشته باشند، انتخاب شدند. حد مجاز به عنوان حداکثر غلظت ماده که به اندازه $\pm 5/0\%$ در اندازه‌گیری تیوپنتال خطای نسبی ایجاد می‌کند، تعیین شد. نتایج در جدول (۲) خلاصه شده است.

گونه‌های Fe^{2+} ، Cu^{2+} ، و باربیتوریک از طریق تغییر پتانسیل قله کاتدی (C_1)، تغییر دادن شکل قله و کاهش جریان قله کاتدی (C_1) در اندازه‌گیری تیوپنتال در حضور کتکول تداخل ایجاد می‌کنند.

۵. مراجع

- [9] Kelner, M.; Bailey, D.N. "Reversed-Phase Liquid-Chromatographic Simultaneous Analysis for Thiopental and Pentobarbital in Serum"; *Clin. Chem.* 1983, 29, 1097-1100.
- [10] Zakrzewski, R.; Ciesielski, W. "Determination of Thiopental in Urine Sample with High-Performance Liquid Chromatography Using Iodine-Azide Reaction as a Postcolumn Detection System"; *J. Chromatograph. B* 2005, 824, 327-332.
- [11] Ali, A. M. M.; Farghaly, O. A.; Ghandour, M. A. "Determination of Thiopentone Sodium in Aqueous and Biological Media by Cathodic Stripping Voltammetry"; *Anal. Chim. Acta* 2000, 99-110.
- [12] Najafi, M.; Baghbanan, A. A. "Capacitive Chemical Sensor for Thiopental Assay Based on Electropolymerized Molecularly Imprinted Polymer"; *Electroanal.* 2012, 24, 1236 – 1242.
- [13] Shahrokhian, S.; Saberi, S. "Differential Pulse Voltammetric Determination of Propyl Thiouracil and Methyl Thiouracil using their Catalytic Effects on the Electrochemical Oxidation of Catechol"; *Int. J. Electrochem. Sci.* 2007, 2, 158-168.
- [14] Ensafi, A. A.; Karimi-Maleh, H.; Mallakpour, S.; Rezaei, B. "Highly Sensitive Voltammetric Sensor Based on Catechol-Derivative-Multiwall Carbon Nanotubes for the Catalytic Determination of Captopril in Patient Human Urine Samples"; *Colloids and Surfaces B.* 2011, 87, 480-488.
- [15] Fotouhi, L.; Khakpour, M.; Nematollahi, D.; Heravi, M. M. "Investigation of the Electrochemical Behavior of Some Catechols in the Presence of 4,6-Dimethylpyrimidine-2-Thiol"; *Arkivoc.* 2008, 43-52.
- [16] Bard, A. J.; Faulkner, L. R. "Electrochemical Methods, Fundamental and Applications"; John Wiley & Sons, Inc.; 2001.
- [17] Long, G. L.; Winefordner, J. D. "Limit of Detection. A Closer Look at the IUPAC Definition" *Anal. Chem.*, 1983, 55 712A-724A
- [1] Khan, S. N.; Islam, B.; Rajeswari, M. R.; Usmani, H.; Khan, A. U. "Interaction of Anesthetic Supplement Thiopental with Human Serum Albumin"; *Acta. Biochim. Pol.* 2008, 55, 399-409.
- [2] Coppa, G.; Testa, R.; Margarucci, G. A.; Testa, I.; Tocchini, M.; Bonfigli, A. R. "Fast, Simple and Cost-Effective Determination of Thiopental in Human Plasma by a New HPLC Technique"; *Clin. Chim. Acta.* 2001, 305, 41-45.
- [3] Coolong, K.; Mcgough, E.; Vacchiano, C.; Pellegrini, J. "Comparison of the Effects of Propofol Versus Thiopental Induction on Postoperative Outcomes Following Surgical Procedures Longer than 2 Hours"; *AANA. Journal* 2003, 71, 215-222.
- [4] Nashwa, R.; Samah, A.; Salem, H.; Yasser, A. "Thiopental and Phenytoin as Novel Ionophores for Potentiometric Determination of Lead (II) Ions"; *Sensors* 2009, 9, 1860-1875.
- [5] Baiulescu, G.E.; Cosofret, V.V. "A Liquid State Hg²⁺-Sensitive Electrode"; *Talanta* 1976, 23, 677-678.
- [6] Rizk, N. M. H., Othman, A. H. M. "Membrane Sensors for the Selective Determination of Thiopental"; *Anal. Sci.* 2005, 21, 107-110.
- [7] Saleh, G. A. "Charge-Transfer Complexes of Barbiturates and Phenytoin"; *Talanta* 1998, 46, 111-121.
- [8] Ebling, W. F.; Mills-Williams, L.; Harapat, S. R.; Stanski, D. R. "High-Performance Liquid Chromatographic Method for Determining Thiopental Concentrations in Twelve Rat Tissues: Application to Physiologic Modeling of Disposition of Barbiturate"; *J. Chromatogr.* 1989, 490, 339-353.