کلیه امتیازهای این پایان‌نامه به دانشگاه بوعلی سینا تعلق دارد. در صورت استفاده از تمام یا بخشی از مطالب این پایان‌نامه در مجلات، کنفرانس‌ها و یا سخنرانی‌ها، باید نام دانشگاه بوعلی سینا و استاد راهنمای پایان‌نامه و نام دانشجو با ذکر مأخذ و ضمن کسب مجوز کتبی از دفتر تحصیلات تکمیلی دانشگاه ثبت شود. در غیر این صورت مورد پیگرد قانونی قرار خواهد گرفت. درج آدرس‌های ذیل در کلیه مقالات خارجی و داخلی مستخرج از تمام یا بخشی از مطالب این پایان‌نامه در مجلات، کنفرانس‌ها و یا سخنرانی‌ها الزامی می‌باشد.

مقالات خارجی

……..……, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.

مقالات داخلی

.....، گروه .....، دانشکده .....، دانشگاه بوعلی سینا، همدان.

دانشکده شیمی
گروه آموزشی شیمی تجزیه

پایان نامه ارائه شده به عنوان بخشی از فعالیت‌های تحصیلی لازم جهت اخذ درجه دکتری تخصصی (Ph.D.)
در رشته شیمی (گرایش تجزیه)

عنوان:

کاربرد روشهای ریزاستخراج مایع - مایع و ریزاستخراج فاز جامد جهت اندازه‌گیری نمونه‌های زیست محیطی و دارویی با استفاده از تکنیک‌های کروماتوگرافی و اسپکتروفتومتری

استاد راهنما:
دکتر مهدی هاشمی

استاد مشاور:
پروفسور عباس افخمی

نگارش:
سید مصیب دریانورد

۳ مهر ۱۳۹۲

سپاس خدای راکه دریچه ای از دنیای دانش را در برابر دیدگانم گشود و مرا یاری داد تا بتوانم با موفقیت در این وادی گام نهم. سر بر سجده آن یگانه معبود خواهم نهاد تا سپاسگزار لطف او باشم. از او میخواهم تا مرا معبر آرامش قرار دهد، آنجا که نفرت هست عشق جاری کنم، آنجا که خطا هست بخشایش بگسترانم، آنجا که جدایی هست وصل بیافرینم، آنجا که لغزش و دروغ هست حقیقت بیافرینم، آنجا که تردید هست ایمان بنا کنم، آنجا که ظلمت هست نور بیافرینم وآنجا که اندوه عشق هست شادی وصل را نوید بخش باشم.

اکنون که برفراز سالهای تحصیلی خویش به افتخار ایستاده ام، قصد دارم با جملاتی هرچند کوتاه به تشکر از تمامی عزیزانی بپردازم که در طی این سال ها و انجام این پروژه به اینجانب لطف داشتند.

از استاد راهنمای بزرگوارم جناب آقای دکتر هاشمی، که کاستی‌های مرا با صبر فراوان تحمل نمودند و همواره در طی انجام این پژوهش مرا یاری نمودند، کمال تشکر و امتنان را دارم.

ازاساتید بزرگوارم جناب آقای پروفسور افخمی، جناب آقای پروفسور نعمت الهی، سرکار خانم پروفسور مدرکیان که در این دوره تحصیلی از محضر درس ایشان بهره مند شدم و لطف شان همیشه شامل حال بنده بود، قدردانی می نمایم.

از دوستان بسیار عزیزم، در همه ی آزمایشگاه های تحقیقاتی دانشکده شیمی و خوابگاه دانشگاه بوعلی سینا، بویژه آقایان حسین خوش سفر، توحید شیرزادمهر، حسن باقری، رضا احمدی و مصیب رضایی، که خاطراتی شیرین و به یاد ماندنی را با آنان داشتم کمال تشکر و قدردانی را دارم.

برگ سبزی تقدیم به

پدر بزرگوار و مادر دلسوزم

به پاس دعاهای خالصانه، عاطفه سرشار و گرمای امید بخش وجودشان

و

فرحناز عزیزم

همسر مهربان و صبورم

که کلمه به کلمه ی این پایان نامه، تلالوی زیبای محبت های اوست

و

برادران و خواهران عزیزم

به پاس حمایت های همیشگی و محبت های بی دریغشان

دانشگاه بوعلی سینا

مشخصات رساله/پایان نامه تحصیلی

عنوان:

کاربرد روشهای ریزاستخراج مایع - مایع و ریزاستخراج فاز جامد جهت اندازه‌گیری نمونه‌های زیست محیطی و دارویی با استفاده از تکنیک های کروماتوگرافی و اسپکتروفتومتری

نام نویسنده: سید مصیب دریانورد

نام استاد/اساتید راهنما: دکتر مهدی هاشمی

نام استاد/اساتید مشاور: پروفسور عباس افخمی

دانشکده: شیمی	**گروه آموزشی: شیمی تجزیه**

رشته تحصیلی: شیمی	**گرایش تحصیلی: تجزیه**	**مقطع تحصیلی: دکتری**
تاریخ تصویب پروپوزال: ۹۰/۶/۲۰	**تاریخ دفاع: ۹۲/۷/۳**	**تعداد صفحات: ۱۹۰**

چکیده:

در بخش اول این پروژه، توسعه‌ی روشهای ریزاستخراج مایع-مایع با رویکرد استفاده از امواج فراصوت در این روشها و کاربرد تکنیک ریزاستخراج با امولسیون سازی به کمک امواج فراصوت (USAE-ME) جهت اندازه‌گیری نمونه-های محیطی و بیولوژیکی مورد توجه قرار گرفته است.

در فصل دوم، توسعه و کاربرد تکنیک USAE-ME در ترکیب با اسپکتروفتومتری UV-Vis برای پیش‌تغلیظ و اندازه-گیری مقادیر اندک آنتیموان(V) در نمونه‌های آبی تشریح شده‌است. روش ارائه‌شده بر اساس تشکیل کمپلکس زوج-یونی بین آنیون $SbCl_6^-$ و رنگدانه کاتیونی رودامینB و بدنبال آن استخراج این زوج-یون و آشکارسازی اسپکتروفوتومتری آن استوار است. نتایج حاصل نشان داد که ترکیب تکنیک USAE-ME با اسپکتروفوتومترهای معمولی می‌تواند حساسیت اندازه‌گیری را به طرز چشمگیری افزایش دهد. فاکتور تغلیظ برابر ۴۰، اندازه‌گیری و تعیین مقادیر اندک از آنتیموان را در نمونه‌های مختلف آبی میسر می‌سازد. تحت شرایط بهینه‌شده روش به یون آنتیموان(V) تقریباً انتخاب‌پذیر عمل می‌کند. منحنی خطی کالیبراسیون برای آنتیموان (V) در گستره‌ی غلظتی $ngmL^{-1}$ ۳۰۰/۰ – ۵/۰ و مقدار R^2 برابر ۰/۹۹۸ بدست آمد. حدتشخیص روش ($3S_b$) برابر $ngmL^{-1}$ ۶/۰ محاسبه شد. دقت روش برحسب انحراف استاندارد نسبی (RSD٪) برای پنج بار اندازه‌گیری تکراری غلظت $ngmL^{-1}$ ۱۰۰/۰ از یون Sb(V) ٪۲/۴ بدست آمد. در فصل سوم، توسعه و کاربرد موفقیت آمیز روش USAE-ME جفت شده با اسپکتروفتومتری UV-Vis جهت اندازه‌گیری یون تیوسیانات در نمونه‌های مختلف آبی و همچنین سیال‌های زیستی انسان شرح داده‌شده است. منحنی خطی کالیبراسیون در گستره‌ی غلظتی $ngmL^{-1}$ ۳۸/۰ – ۸۷۰/۰ از یون تیوسیانات با مقدار R^2 برابر ۰/۹۹۷ بدست آمد. حدتشخیص (LOD) روش، بر پایه ی نسبت S/N=3 برابر $ng\ mL^{-1}$ ۰/۵ محاسبه شد. دقت روش برحسب انحراف استاندارد نسبی (RSD٪) برای پنج بار اندازه‌گیری تکراری غلظت $ngmL^{-1}$ ۲۰۰/۰ از یون تیوسیانات ۸/۲ ٪ بدست آمد. بازده‌های اندازه‌گیری یون SCN^- در نمونه‌های بزاق و ادرار انسان (سیگاری و غیرسیگاری) به ترتیب بین ۹۷/۵-۱۰۲/۶ درصد و ۹۷/۸-۱۰۳/۳ درصد بدست آمد. این نتایج نشان می‌دهد که اجزای بافت نمونه‌ی بزاق و ادرار انسان در اندازه‌گیری یون تیوسیانات به روش ارائه شده مزاحمت جدی نشان نمی‌دهند. در فصل

چهارم، توسعه و کاربرد تکنیک USAE-ME ترکیب‌شده با سیستم GC-FID برای تعیین برخی اسیدهای چرب فرار (VFAs) شامل پروپیونیک، بوتیریک، والریک و ایزو والریک اسید در نمونه‌های آب و پساب کشاورزی را شرح داده‌است. منحنی کالیبراسیون و حدتشخیص روش برای آنالیت‌های مورد بررسی، به ترتیب بین μgL^{-1} ۰/۲۵ - ۰/۰۲ و μgmL^{-1} ۰/۰۵ - ۰/۰۱ بدست آمد. دقت روش پیشنهادی به صورت انحراف استاندارد نسبی برای پنج بار اندازه‌گیری تکراری نمونه با غلظت μgmL^{-1} ۰/۵ از آنالیت‌ها در گستره‌ی ۶/۴ – ۵/۴ ٪ بدست آمد. تحت شرایط بهینه، فاکتور پیش تغلیظ، برای ترکیبات VFAs بین ۷۰۵ – ۴۱۰ بدست آمد.

بخش دوم این پروژه به توسعه‌ی روشهای ریزاستخراج فاز جامد با تاکید بر روشهای کوچک‌سازی شده و تمرکز بر توسعه-ی روش ریزاستخراج با سرنگ انباشته شده (MEPS) برای اندازه گیری آنالیت‌ها در نمونه‌های زیستی پرداخته است. هدف این پروژه توسعه و اعتبارسنجی روش MEPS به عنوان یک تکنیک آماده‌سازی نمونه سریع، صحیح، گزینش پذیر و تمام اتوماتیک برای اندازه گیری پپتید BAM در پلاسمای انسانی و همچنین بی‌حس کننده‌های موضعی در نمونه‌های پلاسما و ادرار انسان با بهره گیری از جاذب های سیلیکا و پلیمری بود. در فصل پنجم ، تکنیک MEPS با بهره گیری از پلیمرمولکول‌نگاری‌شده (MIP) سنتز شده به عنوان جاذب برای اندازه‌گیری گزینشی یک سری همولوگ از بی‌حس-کننده‌های موضعی شامل لیدوکائین، روپیواکائین، مپیواکائین و بوپیواکائین در نمونه های پلاسما و ادرار توسعه داده شد. در مقایسه با جاذب های معمول، بکارگیری MIP گزینش پذیری بسیار بالای استخراج و کاهش اثر زمینه را فراهم می آورد. در هردو نمونه‌ی ادرار و پلاسما یک ارتباط نزدیک بین غلظت و سطوح زیرپیک در گستره‌ی غلظتی $nmolL^{-1}$ ۲۰۰۰/۰ - ۵/۰ مشاهده گردید. مقادیر مربع ضریب همبستگی (R^2) برای ادرار و پلاسما ≤۹۹۹/۰ (n=۴) برای همه‌ی آنالیت-ها بدست آمد. در فصل ششم، بکارگیری بروی خط تکنیک MEPS با سیستم LC-MS/MS به عنوان وسیله ای برای اندازه گیری پپتید BAM در نمونه های پلاسما را شرح داده شده‌است. تکنیک MEPS امتیازات بالقوه ای از قبیل سرعت و سادگی فرایند آماده‌سازی نمونه را فراهم می‌آورد. در مقایسه با دیگر تکنیک‌های استخراج مانند رسوبدهی پروتئین و اولترافیلتراسیون تکنیک MEPS استخراج تمیزتر و بازده استخراج بالاتری بدست می‌دهد. منحنی کالیبراسیون در گستره غلظتی $nmol\ L^{-1}$ ۳۰۴۵/۰ - ۲۰/۰ در پلاسما بدست آمد. ضریب همبستگی رگرسیون برای نمونه های پلاسما ≤ ۰/۹۹ برای همه ی اندازه گیری ها (n=۶) بود. صحت و دقت برای اندازه گیری BAM8-22 به ترتیب ۱۳- تا ۲/۰- ٪ و از ۴/۰ تا ۱۴ ٪ بدست آمد. همچنین، صحت و دقت برای اندازه گیری پپتید BAM22-8 به ترتیب ۱۳- تا ۷/۰ ٪ و از ۳/۰ تا ۱۲ ٪ در نمونه ی پلاسما بدست آمد.

واژه‌های کلیدی: روشهای‌آماده‌سازی نمونه، ریزاستخراج مایع-مایع، امواج فراصوت، ریزاستخراج فازجامد، اسپکتروفتومتری، کروماتوگرافی گازی، اسپکترومتری جرمی، نمونه های زیست-محیطی، سیالهای بیولوژیکی.

فهرست مطالب

عنوان صفحه

فصل اول: مقدمه و تئوری

۱-۱ مقدمه ۳
۱-۱-۱ روشهای ریزاستخراج ۴
۱-۱-۲ ریزاستخراج فاز-مایع (LPME) ۵
۱-۱-۳ ریزاستخراج تک قطره (SDME) ۶
۱-۱-۴ ریزاستخراج قطره مستقیماً معلق شده (DSDME) ۹
۱-۱-۵ ریزاستخراج مایع-مایع توزیعی (DLLME) ۱۰
۱-۱-۶ ریزاستخراج فاز مایع با فیبر توخالی (HF-LPME) ۱۲
۱-۲ مقایسه تکنیک های LPME ۱۴
۱-۳ کابرد امواج فراصوت در شیمی تجزیه ۱۷
۱-۳-۱ مکانیسم عمل فراصوت در محیط شیمیایی ۲۰
۱-۳-۲ امولسیونی شدن به کمک امواج فراصوت (USAE) ۲۲
۱-۳-۳ ریزاستخراج امولسیونی یاری شده با امواج فراصوت (USAE-ME) ۲۳
۱-۳-۴ ریزاستخراج مایع-مایع توزیعی یاریشده با فراصوت (USA-DLLME) ۲۷
۱-۴ ریزاستخراج فاز-جامد (SPME) ۲۹
۱-۴-۱ ریزاستخراج فاز-جامد با فیبر (Fiber SPME) ۳۰
۱-۴-۲ ریزاستخراج فاز-جامد در لوله (In-tube SPME) ۳۴
۱-۴-۳ تکنیک استخراج جذبی با میله چرخان (SBSE) ۳۵
۱-۴-۴ ریزاستخراج فاز-جامد در نوک پیپت (In-tip SPME) ۳۷
۱-۴-۵ ریزاستخراج فاز-جامد در سوزن (In-needle SPME) ۳۸
۱-۵ ریزاستخراج در سرنگ انباشته شده (MEPS) ۳۸

فصل دوم:کاربرد تکنیک USAEME برای اندازه گیری آنتیموان

۲-۱ آنتیموان ۴۳
۲-۲ مروری بر کارهای انجام شده ۴۴
۲-۳ کاربرد تکنیک USAE-ME برای اندازه گیری آنتیموان ۴۵
۲-۴ بخش تجربی ۴۶
۲-۴-۱ مواد و محلول ها ۴۶
۲-۴-۲ دستگاهوری ۴۷
۲-۴-۳ دستورکار تجزیه ای ۴۷
۲-۵ بحث و نتایج ۴۹

۲-۵-۱ نوع و حجم حلال استخراج کننده ۵۱
۲-۵-۲ اثر غلظت هیدروکلریک اسید ۵۲
۲-۵-۳ اثر غلظت رودامین B ۵۳
۲-۵-۴ اثر افزایش نمک ۵۴
۲-۵-۵ اثر زمان فراصوت ۵۵
۲-۵-۶ اثر زمان تعادل ۵۶
۲-۵-۷ اثر زمان سانتریفیوژ ۵۷
۲-۶ مطالعه‌ی اثر مزاحمتها ۵۷
۲-۷ مشخصات تجزیه ای روش ۵۸
۲-۸ آنالیز نمونه های حقیقی آب ۶۰
۲-۹ نتیجه گیری ۶۱

فصل سوم : کاربرد تکنیک USAEME برای اندازه گیری یون تیوسیانات

۳-۱ یون تیوسیانات (-SCN) ۶۵
۳-۲ مروری بر کارهای انجام شده ۶۶
۳-۳ کاربرد تکنیک USAE-ME برای اندازه گیری یون تیوسیانات ۶۷
۳-۴ بخش تجربی ۶۷
۳-۴-۱ مواد و استاندارد های شیمیایی ۶۷
۳-۴-۲ دستگاهوری ۶۸
۳-۴-۳ دستورکار تجزیه ای USAEME ۶۸
۳-۵ بحث و نتایج ۷۰
۳-۵-۱ بهینه سازی روش USAEME ۷۰
۳-۵-۲ نوع و حجم حلال استخراج کننده ۷۱
۳-۵-۳ اثر غلظت سولفوریک اسید و رودامین B ۷۳
۳-۵-۴ اثر قدرت یونی (اثر نمک) ۷۵
۳-۵-۵ اثر زمان اولترسونیک ۷۷
۳-۵-۶ اثر زمان تعادل و سانتریفیوژ ۷۸
۳-۶ بررسی اثر مزاحمت ها ۷۹
۳-۷ کارایی روش تجزیهای ۸۰
۳-۸ کاربرد روش در نمونه های حقیقی آب ۸۲
۳-۹ آنالیز نمونه‌های بزاق و ادرار انسان ۸۳
۳-۱۰ نتیجه گیری ۸۵

فصل چهارم: کاربرد تکنیک USAEME برای اندازه گیری اسیدهای چرب فرار

۴-۱ اسید های چرب فرار (VFAs) ۸۹

۴-۲ مروری بر کارهای انجام شده ۹۰

۴-۳ بخش تجربی ۹۲

۴-۳-۱ مواد و واکنشگرها ۹۲

۴-۳-۲ دستگاهوری ۹۲

۴-۳-۳ دستورکار تجزیه ای روش USAEME ۹۳

۴-۴ بحث و نتایج ۹۴

۴-۴-۱ بهینه سازی شرایط استخراج ۹۴

۴-۴-۲ انتخاب حلال استخراجکننده ۹۴

۴-۴-۳ اثر حجم حلال استخراج کننده ۹۶

۴-۴-۴ اثر pH ۹۶

۴-۴-۵ زمان تعادل ۹۸

۴-۴-۶ اثر زمان اولتراسونیک ۹۹

۴-۴-۷ اثر غلظت نمک (قدرت یونی) ۹۹

۴-۴-۸ اثر زمان سانتریفیوژ

..... ۱۰۱

۴-۵ کارایی تجزیه ای روش پیشنهادی

..... ۱۰۱

۴-۶ نمونه های حقیقی ۱۰۴

۴-۷ نتیجه گیری ۱۰۶

فصل پنجم : کاربرد تکنیک MEPS برای اندازه گیری داروهای بی حس کننده موضعی

۵-۱ نقش آماده‌سازی نمونه در تجزیههای زیستی ۱۰۹

۵-۲ تکنیک های آماده‌سازی نمونهی متداول در تجزیه‌های زیستی ۱۰۹

۵-۲-۱ رسوبدهی پروتئین (PPT) ۱۰۹

۵-۲-۲ استخراج مایع – مایع (LLE) ۱۱۰

۵-۲-۳ استخراج فاز-جامد (SPE) ۱۱۰

۵-۲-۴ استخراج فاز جامد کوچکسازی شده ۱۱۱

۵-۲-۵ ریزاستخراج با سرنگ انباشته شده (MEPS) ۱۱۲

۵-۳ نقش LC-MS/MS در تجزیه زیستی ۱۱۳

۵-۴ استخراج و اندازه‌گیری داروها به کمک MEPS ۱۱۴

۵-۵ پلیمرهای مولکول نگاری شده (MIPs) ۱۱۶
۵-۶ داروهای بی حس کننده‌ی موضعی ۱۱۸
۵-۷ بخش تجربی ۱۲۰
۵-۷-۱ مواد شیمیایی ۱۲۰
۵-۷-۲ نمونه پلاسما ۱۲۱
۵-۷-۳ تهیه ی پلیمر MIP ۱۲۱
۵-۷-۴ دستگاهوری ۱۲۳
۵-۷-۵ شرایط کروماتوگرافی مایع (LC) ۱۲۴
۵-۷-۶ شرایط اسپکترومتر جرمی (MS) ۱۲۵
۵-۷-۷ دستورکار تجزیهای MEPS ۱۲۵
۵-۷-۸ تهیه نمونه های استاندارد و کنترل کیفی ۱۲۶
۵-۷-۹ روش رسوبدهی پروتئین برای نمونه پلاسما ۱۲۷
۵-۸ بحث و نتایج ۱۲۸
۵-۸-۱ توسعه و بهینه سازی دستورکار MEPS ۱۲۸
۵-۸-۲ محلول شستشو ۱۲۸
۵-۸-۳ محلول شویش ۱۳۰
۵-۸-۴ مقایسه جاذب های مختلف با پلیمر MIP ۱۳۲
۵-۹ اعتبارسنجی روش ۱۳۳
۵-۹-۱ کالیبراسیون، صحت و دقت ۱۳۳
۵-۹-۲ اثر پدیده‌ی Carry-over در سیستم ۱۳۴
۵-۹-۳ بازده استخراج ۱۳۶
۵-۹-۴ حدتشخیص و حد پائین کمی سازی ۱۳۷
۵-۹-۵ گزینش پذیری ۱۴۰
۵-۹-۶ اثربافت نمونه (ME) ۱۴۱
۵-۱۰ نتیجه‌گیری ۱۴۳

فصل ششم: کاربرد تکنیک MEPS برای اندازه گیری پپتیدهای BAM

۶-۱ پپتیدهای بووین آدرنال مدولا (BAM) ۱۴۸
۶-۲ استخراج و اندازه‌گیری پپتیدهای BAM به روش MEPS ۱۴۹
۶-۳ بخش تجربی ۱۵۰
۶-۳-۱ مواد شیمیایی ۱۵۰
۶-۳-۲ تهیه و نگهداری نمونه‌های کالیبراسیون ۱۵۱
۶-۳-۳ تهیه و نگهداری نمونه‌های کنترل کیفیت ۱۵۱
۶-۳-۴ جمع آوری، حمل و نگهداری نمونه ها ۱۵۲
۶-۳-۵ دستورکار تجزیهای MEPS ۱۵۲

۶-۳-۶ رسوبدهی پروتئین و اولترافیلتراسیون ۱۵۳
۶-۳-۷ دستگاهوری ۱۵۳
۶-۳-۸ شرایط کروماتوگرافی مایع (LC) ۱۵۴
۶-۳-۹ شرایط اسپکترومتر جرمی (MS) ۱۵۴
۶-۴ بحث و نتایج ۱۵۵
۶-۴-۱ توسعه روش LC-MS/MS ۱۵۶
۶-۴-۲ توسعه و بهینهسازی روش MEPS ۱۵۷
۶-۴-۳ مقایسه ی MEPS با رسوبدهی پروتئین (PPT) و اولترافیلتراسیون (UF) ۱۵۹
۶-۴-۴ مطالعه ی پایداری BAM در بافتهای مختلف ۱۵۹
۶-۵ اعتبارسنجی روش ۱۶۰
۶-۵-۱ کالیبراسیون ۱۶۰
۶-۵-۲ گزینش پذیری ۱۶۲
۶-۵-۳ صحت و دقت نمونههای QC ۱۶۳
۶-۵-۴ حد پائین کمّی سازی (LLOQ) ۱۶۵
۶-۵-۵ اثر و میزان carry-over در سیستم ۱۶۵
۶-۵-۶ اثر بافت نمونه (Matrix effect) ۱۶۶
۶-۶ نتیجهگیری ۱۶۷
منابع ۱۶۴

فهرست شکل‌ها

عنوان صفحه

شکل ۱-۱: تکنیک های متنوع LPME ۸
شکل ۱-۲: سیستم های فراصوت مورد استفاده ی معمول؛ میله پروب و حمام ۱۹
شکل ۱-۳: مکانیسم حفره سازی امواج فراصوت و عکس میکروسکوپی از فروپاشی حباب در فرایند حفره سازی ۲۱
شکل ۱-۴: شمای دستورکار تجزیه ای روش USAE-ME ۲۴
شکل ۱-۵: شمای دستورکار روش USAE-ME-SFO ۲۶
شکل ۱-۶: طرح شماتیک تکنیکهای SPME. ۳۳
شکل ۲-۱: شمای کلی دستورکار تجزیه ای USAE-ME برای استخراج و اندازه گیری Sb(V) در نمونه های آبی. ۴۸
شکل ۲-۲: طیف جذبی (a) کمپلکس زوج –یونی و (b) محلول شاهد پس از USAE-ME. ۵۰
شکل ۲-۳: اثر حجم های مختلف حلال استخراج کننده بروی بازده استخراج کمپلکس زوج – یونی و نمونه شاهد. ۵۲
شکل ۲-۴: اثر غلظت هیدروکلریک اسید بروی بازده استخراج (a) کمپلکس زوج – یونی و (b) نمونه شاهد. ۵۳
شکل ۲-۵: اثر غلظت واکنشگر رودامین B بروی بازده (a) استخراج کمپلکس زوج –یونی و (b) نمونه شاهد. ۵۴
شکل ۲-۶: اثر زمان اولتراسونیک روی بازده استخراج (a) کمپلکس زوج – یونی و (b) نمونه شاهد. ۵۶
شکل ۳-۱: چکیده تصویری مراحل کاربرد تکنیک USAE-ME برای تعیین یون تیوسیانات. ۶۹
شکل ۳-۲: طیف جذبی (a) کمپلکس زوج-یونی $[RhBH^+][SCN^-]$ و (b) نمونه شاهد، پس از USAE-ME. ۷۱
شکل ۳-۳: اثر حجم های متفاوت حلال استخراج کننده بروی جذب کمپلکس زوج-یونی. ۷۳
شکل ۳-۴: اثر غلظت های متفاوت سولفوریک اسید بروی جذب کمپلکس زوج-یونی. ۷۴
شکل ۳-۵: اثر غلظت واکنشگر رودامین B بروی جذب زوج-یون. ۷۵
شکل ۳-۶: اثر افزودن نمک بروی جذب کمپلکس زوج – یونی. ۷۶
شکل ۳-۷: اثر زمان اولتراسونیک روی جذب کمپلکس زوج- یونی. ۷۸
شکل ۴-۱: کروماتوگرام گازی بدست آمده پس از دستورالعمل USAE-ME برای نمونه های (A) پساب کشاورزی شاهد و (B) نمونه اسپایک شده پساب کشاورزی. ۹۵
شکل ۴-۲: اثر pH بروی پیک کروماتوگرام آنالیت های مورد نظر. ۹۷
شکل ۴-۳: اثر pH بروی مساحت سطح زیر پیک آنالیت های مورد مطالعه. ۹۸
شکل ۴-۴: اثر افزودن نمک بروی مساحت سطح زیر پیک آنالیت های مورد مطالعه. ۱۰۰
شکل ۵-۱: سرنگ تجاری MEPS (شرکت SGE، استرالیا) به همراه بستر انباشته شده ۱۱۳
شکل ۵-۲: نمایش شماتیک مراحل فرایند مولکول نگاری ۱۱۷
شکل ۵-۳: ساختار شیمیایی بی حس کننده های موضعی. ۱۲۱
شکل ۵-۴: ساختار مولکول الگو (پنتیکائین) برای تهیهی MIP بکار رفته در این مطالعه. ۱۲۳
شکل ۵-۵: تصویر سیستم LC-MS/MS بکار گرفته شده در این مطالعه به همراه نمونه گیر خودکار CTC-Pal. ۱۲۴
شکل ۵-۶: طرح شماتیک سرنگ MEPS. ۱۲۶
شکل ۵-۷: اثر میزان درصد متانول در محلول شستشو بروی پاسخ MS آنالیت های مورد مطالعه. ۱۲۹
شکل ۵-۸: اثر حجم محلول شستشو بروی پاسخ MS آنالیت های مورد مطالعه. ۱۳۰
شکل ۵-۹: اثر حجم محلول شویش ۱۳۱

شکل ۵-۱۰: تغییرات درصد بازیابی استخراج داروهای بی حس کننده موضعی مورد مطالعه از نمونه ی پلاسمای انسان با استفاده از ترکیبات MIP، C_8، C_{18} و+ENV به عنوان جاذب در MEPS. ۱۳۲
شکل ۵-۱۱: مقایسه سطح زیر پیک کروماتوگرام بدست آمده از نمونه ادرار اسپایک شده با بیحسکننده های موضعی در غلظت حد بالایی کمی سازی و اولین تزریق محلول شستشو برای تعیین اثر carry-over در سیستم. ۱۳۶
شکل ۵-۱۲: تغییرات پاسخ طیف سنج جرمی بر حسب سطح زیر پیک بصورت تابعی از تعداد چرخههای استخراج با MEPS برای داروی لیدوکائین در نمونه ی پلاسما. ۱۳۷
شکل ۵-۱۳: مقایسهی کروماتوگرام های بدست آمده از نمونه پلاسمای شاهد و نمونه پلاسمای اسپایک شده با بی حس کننده های موضعی در غلظت حد پائین کمی سازی..... ۱۳۹
شکل ۵-۱۴: کروماتوگرام های بدست آمده از نمونه ادرار شاهد و نمونه ادرار اسپایک شده با بی حس کننده های موضعی در غلظت حد پائین کمی سازی..... ۱۴۰
شکل ۶-۱: توالی اسید آمینه برای پپتیدهای BAM8-22 و BAM22-8..... ۱۴۹
شکل ۶-۲: طیف جرمی و جز به جز شدن یون های پیش ماده و محصول برای پپتید های BAM. ۱۵۶
شکل ۶-۳: کروماتوگرام های LC برای پپتیدهای BAM8-22 و BAM22-8 با استفاده از شویش گرادیانی مختلف: (A) ۱-۵ دقیقه، ۰-۹۰٪ فاز متحرک B؛ (B): ۱-۶ دقیقه، ۰-۵۰٪ فاز متحرک B؛ (C): ۱-۷ دقیقه، ۰-۴۰٪ فاز متحرک B. ۱۵۷
شکل ۶-۴: سطح زیرپیک برای پپتیدهای BAM8-22 و BAM22-8 نمونه پلاسما با جاذب های مختلف. ۱۵۹
شکل ۶-۵: درصد بازیابی استخراج پپتید BAM8-22 با استفاده از روشهای آماده سازی رسوبدهی پروتئین پلاسما (PPT)، اولترافیلتراسیون (UF) و ریزاستخراج با سرنگ انباشته شده (MEPS). ۱۶۰
شکل ۶-۶: کروماتوگرام مربوط به نمونه پلاسمای انسان با غلظت حد پائین کمی سازی برای پپتید BAM 8-22 . ..... ۱۶۲
شکل ۶-۷: کروماتوگرام مربوط به نمونه پلاسمای انسان با غلظت حد پائین کمی سازی برای پپتید BAM 22-8 . .... ۱۶۳

فهرست جدول‌ها

عنوان صفحه

جدول ۲-۱: نسبت های حد قابل تحمل یونهای متنوع بروی اندازه گیری آنتیموان (V) با غلظت. ۵۸
جدول ۲-۲: خلاصه مشخصات تجزیهای روش پیشنهادی..... ۵۹
جدول ۲-۳: مقایسه ی روش های اسپکتروفتومتری مختلف با روش پیشنهادی برای تعیین آنتیموان (V) ۶۰
جدول ۲-۴: تعیین آنتیموان (V) به کمک روش پیشنهادی در نمونه های آب اسپایک شده. ۶۱
جدول ۳-۱: حد قابل تحمل یون های مزاحم روی اندازه گیری یون تیوسیانات..... ۸۰
جدول ۳-۲: خلاصه مشخصات تجزیهای روش پیشنهادی..... ۸۱
جدول ۳-۳: مقایسه تکنیک USAE-ME با برخی روشهای گزارش شده برای اندازه گیری یون تیوسیانات..... ۸۲
جدول ۳-۴: اندازه گیری SCN^- در نمونه های آب اسپایک شده توسط روش پیشنهادی..... ۸۳
جدول ۳-۵: اندازه گیری تیوسیانات در نمونه های سیالهای زیستی انسان (بزاق و ادرار)..... ۸۴
جدول ۴-۱: نتایج کمی روش USAE-ME به کمک GC-FID برای اسیدهای چرب فرار مورد مطالعه. ۱۰۳
جدول ۴-۲: مقایسه روشهای آماده سازی نمونه مختلف جفت شده با کروماتوگرافی گازی برای اندازه گیری VFAs. ۱۰۴
جدول ۴-۳: آنالیز نمونه های حقیقی آب اسپایک شده با اسیدهای چرب مورد مطالعه..... ۱۰۵
جدول ۵-۱: غلظت های مختلف نمونههای کالیبراسیون و QC برحسب $nmol\ L^{-1}$ در نمونه های پلاسما و ادرار..... ۱۲۷
جدول ۵-۲: چکیده نتایج اعتبارسنجی روش MEPS برای اندازه گیری آنالیت های در پلاسما و ادرار انسان. ۱۳۴
جدول ۵-۳: مقادیر صحت و دقت تجزیه ای نمونه ی LLOQ در نمونه های پلاسما و ادرار انسان..... ۱۳۸
جدول ۵-۴: مقایسه ی میزان اثر بافت نمونه (ME) بروی نتایج تجزیه ای با MEPS و رسوبدهی پروتئین (PPT). ۱۴۳
جدول ۶-۱: غلظتهای پس- محاسبه شده اسپایک شده با پپتیدهای BAM در پلاسمای انسان. ۱۶۱
جدول ۶-۲: مقادیر دقت و صحت تجزیه ای درون- دسته ای برای BAM8-22 و BAM22-8 در پلاسما..... ۱۶۴
جدول ۶-۳: مقادیر دقت و صحت تجزیه ای برون- دسته ای BAM8-22 و BAM22-8 در پلاسما..... ۱۶۴
جدول ۶-۴: مقادیر تجزیه ای برای نمونه حدپائینی کمی‌سازی پپتیدهای BAM8-22 و BAM22-8 در پلاسما ۱۶۵

فصل اول:

مقدمه و تئوری

۱-۱ مقدمه

نمونه های محیطی و بافت‌های زیستی معمولاً پیچیده بوده و می‌توانند شامل ترکیباتی از قبیل نمک‌ها، اسیدها، بازها، پروتئین‌ها، چربی‌ها، داروها و بسیاری از دیگر ترکیبات آلی و معدنی با خواصی مشابه با آنالیت‌های مورد نظر برای اندازه‌گیری باشند که اغلب با غلظت‌های بسیارکم در نمونه‌ها حضور دارند. علی رغم توسعه‌ی دستگاه‌های تجزیه‌ای با کارایی فوق‌العاده از قبیل اسپکتروفتومتری UV-Vis، فلوریمتری، کروماتوگرافی مایع و گازی و روش‌های اندازه‌گیری ایمنی[۱] برای تعیین نهایی آنالیت‌ها در نمونه‌های مختلف، اکثر آنها نمی‌توانند با بافت نمونه مستقیماً وارد عمل شوند. بنابراین، به طور معمول نمونه‌برداری و آماده‌سازی نمونه ضروری به نظر می‌رسد تا آنالیت مورد نظر برای اندازه‌گیری از بافت نمونه پالایش[۲] و پیش تغلیظ[۳] شود. انتخاب یک روش آماده‌سازی نمونه به شدت روی قابل اعتماد بودن و صحت آنالیز تاثیر می‌گذارد. هدف نهایی یک روش تجزیه‌ای، معمولاً نشانگر میزان ضرورت آماده‌سازی نمونه برای آن روش می‌باشد.

در خلال دهه‌های گذشته، روش‌ها و تکنیک‌های معمول آماده‌سازی نمونه از قبیل استخراج مایع-مایع (LLE)[۴] ، استخراج با سیال فوق بحرانی (SFE)[۵] ، و استخراج فاز-جامد (SPE)[۶] برای جداسازی و پیش‌تغلیظ آنالیت‌ها توسعه یافتند. استخراج مایع- مایع بصورت سنتی، معمول‌ترین روش استخراج است؛ هرچند این روش زمان‌بر و خسته کننده بوده، حساسیت کافی به مقادیر اندک آنالیت‌ها نشان نداده و نیازمند حجم‌های بالای حلال‌های آلی سمّی می باشد. با اینکه روش SPE نیازمند مصرف حلال بسیار کمتری نسبت به روش LLE است، برای آماده‌سازی و شویش[۷]

[1] Immunoassay

[2] Clean-up

[3] Preconcentration

[4] Liquid-liquid extraction

[5] Super-critical fluid extraction

[6] Solid-phase extraction

[7] Elution

یک ستون SPE نیز از حلال‌های آلی استفاده می‌شود. در استخراج با سیال فوق بحرانی، استخراج باید در فشار بالا (psi ۵۰۰۰ -۱۰۰۰) انجام شود تا حلال در حالت فوق بحرانی بماند، که هزینه-ی اجرای آنالیز را افزایش می‌دهد. همچنین بخاطر قطبیت پائین حلال‌های فوق بحرانی ازقبیل CO_2، کاربرد SFE به ترکیبات نسبتاً غیرقطبی محدود می‌شود[۱]. بر اساس حقایق ذکر شده، نیازی حیاتی به تکنیک‌های آماده‌سازی نمونه با توانایی پالایش نمونه‌ها با فاکتور پیش‌تغلیظ بالا وجود دارد که برای آنالیت‌های با خواص فیزیکی-شیمیایی متنوع قابل استفاده باشد. در سال های اخیر، یک دیدگاه سبز[۱] برای توسعه‌ی تکنیک‌های آماده‌سازی نمونه توجه بسیاری از شیمیدانان تجزیه‌ای را به خود معطوف نموده است. این مسئله با کوچک‌سازی[۲] فاز استخراج‌کننده به مقیاس میکرو (لیتر/ گرم) دست یافتنی‌شده و منجر به توسعه‌ی روش‌های استخراج و آنالیز ارزان، سریع، دوست‌دار محیط زیست و با فاکتور پیش‌تغلیظ بالا می شود؛ این روش ها، تکنیک های ریز استخراج[۳] نامیده می‌شوند.

۱-۱-۱ روش‌های ریزاستخراج

پیشرفت های اخیر در روش‌های آماده‌سازی نمونه منجر به توسعه دو تکنیک ریز استخراج موثر بنام ریزاستراج فاز-جامد (SPME)[۴] و ریز استخراج فاز-مایع (LPME)[۵] شده است. معرفی تکنیک SPME مرحله ای شاخص در توسعه‌ی کوچک‌سازی روش‌های آماده سازی نمونه بود. در این روش، که روشی بدون حلال[۶] محسوب می‌شود، یک فیبر پلیمر- نشانده شده[۷] درون نمونه و یا در

[1] Green
[2] Miniaturization
[3] Microextraction techniques
[4] Solid-phase microextraction
[5] Liquid-phase microextraction
[6] Solvent-free
[7] Coated-fiber

فضای فوقانی[1] نمونه قرار می‌گیرد. ترکیب مورد نظر می تواند در زمان معینی جذب شده و سپس در یک دستگاه مانند کروماتوگرافی گازی واجذب شود. آرتور[2] و پاولیزین[3] در ۱۹۹۰ [۲]، با استفاده از یک فیبر پلیمری پوشش داده شده که ترکیب مورد مطالعه می‌توانست بروی آن جذب شود، روشی جدید را بنام ریزاستخراج فاز-جامد معرفی نمودند. فیبر مذکور می‌تواند درون نمونه و یا در فضای فوقانی نمونه قرار گیرد. جهت برطرف نمودن برخی از مشکلات SPME، روشی ساده و ارزان بنام ریزاستخراج فاز- مایع (LPME) اخیراً معرفی گردید. در تکنیک LPME، حجم بسیار اندکی از حلال استخراج‌کننده برای استخراج آنالیت از بافت‌های نمونه استفاده می‌شود. روش LPME، دستوالعمل حلال-کاهش یافته‌ی روش سنتی LLE است که در آن بجای صدها میلی‌لیتر از حلال مورد نیاز در LLE، فقط چند µL از حلال استخراج‌کننده برای تغلیظ آنالیت از نمونه‌های مختلف مورد نیاز است. این روش با دستگاه‌های کروماتوگرافی گازی (GC)، الکتروفورز موئینه‌ای (CE) و کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) سازگاری بسیار خوبی نشان داده است.

۱-۱-۲ ریزاستخراج فاز-مایع (LPME)

در سیستم LPME، استخراج بطور متداول درون مقدار کمی از حلال امتزاج ناپذیر با آب (فاز پذیرنده) از نمونه‌ی آبی حاوی آنالیت (فاز دهنده) اتفاق می‌افتد. این روش را می توان به سه دسته اصلی تقسیم نمود؛

(۱) ریزاستخراج تک قطره (SDME)

(۲) ریزاستخراج مایع-مایع توزیعی (DLLME)

(۳) ریزاستخراج فاز مایع با فیبر توخالی (HF-LPME)

[1] Head-space

[2] Arthur

[3] Pawliszyn