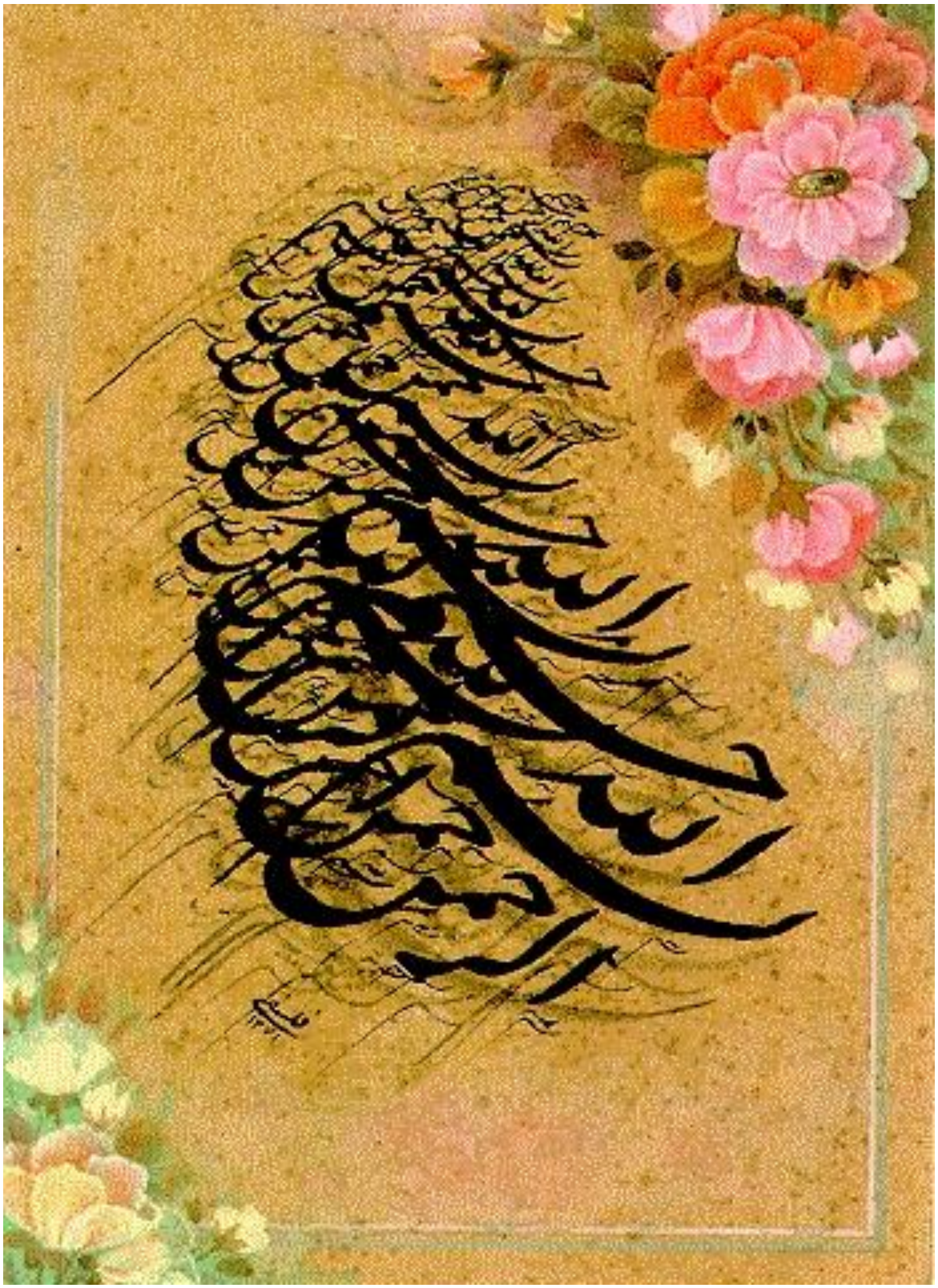

پایان نامه دکتری (Ph. D.)

شیمی تجزیه

به کارگیری روش‌های میکرواستخراج فاز مایع برای جداسازی و اندازه‌گیری مهار کننده‌های بتا با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) در نمونه‌های زیست محیطی

استاد راهنما:

دکتر علی سرافراز یزدی

استاد مشاور:

دکتر زرین اسحاقی

تحقیق و نگارش:

محمّد رضا عابدی

هوالعلیم

حمد و سپاس خدای را که توفیق کسب دانش را به من عطا فرمود و همواره در تمام مراحل زندگی یاری ام کرد.

بر خود واجب می‌دانم از زحمات بی‌دریغ، تلاش‌های بی‌وقفه و راهنمایی‌های ارزشمند اساتید گرامی، جناب آقای دکتر سرافراز یزدی و سرکار خانم دکتر اسحاقی در راستای انجام این پژوهش تشکر و قدردانی نمایم.

همچنین از اساتید بزرگوار جناب آقای دکتر رونقی، آقای دکتر چمساز و آقای دکتر ارباب زوار و سایر عزیزانی که در طول این سالهای تحصیل از محضر درس آنان استفاده نموده‌ام سپاس‌گزاری می‌نمایم.

از تمامی دوستان عزیز و بزرگوارم در دانشگاه آزاد اسلامی واحد قوچان که از مساعدت و همکاری آنها بهره برده‌ام بی‌نهایت متشکرم.

و در پایان تشکر و سپاس خاص خود را نثار خانواده عزیزم می‌نمایم که در تمام مراحل زندگی، دلسوزانه در کنارم بودند، و از خداوند، سلامتی و طول عمر با برکت برایشان خواستارم.

به یاد مرحوم پدر بزرگوارم

تقدیم به:

مادر نازنینم که وجودش سراسر قلبی است پر از عشق و محبت و ایثار

همسر مهربانم که با حضور خود، معنی عشق و آرامش را به زندگی‌ام بخشیده است

فرزندان عزیزم که باغ سرسبز زندگی‌ام را سرسبزتر نموده و نور وجودشان هستی‌ام را جلوه‌ای دیگر بخشیده است

و تقدیم به تمام کسانی که مرا به این لحظه رساندند.

فصل اول: ۵
کلیات ۵
۱-۱) آلاینده‌های محیط زیست ۱
۱-۲) روشهای آماده‌سازی نمونه ۲
۱-۳) روشهای میکرواستخراج ٦
۱-٤) میکرواستخراج با فاز جامد (SPME) ٦
۱-٤-۱) روشهای نمونه‌برداری در SPME ۸
۱-٤-۲) مزایا و معایب میکرواستخراج با فاز جامد ۱۱
۱-۵) روشهای میکرواستخراج با فاز مایع (LPME) ۱۲
۱-۵-۱) میکرواستخراج توسط تک قطره ۱٤
۱-۵-۲) میکرواستخراج با فاز مایع بوسیله فیبرتوخالی ۲۰
۱-۵-۳) میکرواستخراج مایع – مایع پراکنده شده ۳۰
۱-٦) ملاحظات تئوری در مورد روشهای میکرواستخراج توسط فاز مایع ۳۲
۱-٦-۱) محاسبات پایه‌ای روش میکرواستخراج با فاز مایع در سیستمهای دو فازی ۳۲
۱-٦-۲) محاسبات پایه‌ای روش میکرواستخراج با فاز مایع در سیستمهای سه فازی ۳۳
۱-۷) نانولوله‌های کربنی (CNT) ۳۵
۱-۸) انواع نانولوله‌های کربنی ۳٦
۱-۹) ساختار نانولوله‌های کربنی ۳۷
۱-۱۰) روش‌های تولید نانولوله‌های کربنی ۳۹
۱-۱۱) خواص نانولوله‌های کربنی ٤۰
۱-۱۲) کاربردهای نانولوله‌های کربنی ٤۲
۱-۱۲-۱) نانولوله‌های کربنی به عنوان تقویت کننده ٤۳
۱-۱۲-۲) استفاده از نانولوله‌های کربنی در صنعت الکترونیک ٤۳
۱-۱۲-۳) کاربرد نانولوله‌های کربنی در جذب سطحی مواد ٤۳
۱-۱۳) داروهای مهارکننده بتا ۵۰
۱-۱٤) دوپینگ (زورافزایی) ۵٤
۱-۱۵) جداسازی مهارکننده‌های بتا ۵۸
۱-۱۵-۱) جداسازی مهارکننده‌های بتا توسط HPLC ۵۹
۱-۱۵-۲) جداسازی ایزومرهای نوری ۵۹

۱-۱۵-۳) جداسازی مهارکننده‌های بتا توسط کروماتوگرافی گازی (GC) ٦١
۱-١٦) روش‌های استخراج مورد استفاده برای مهار کننده‌های بتا ٦٢

فصل دوّم: ***۶۵***
بخش تجربی ***۶۵***

قسمت اول: پیش‌تغلیظ مهارکننده‌های بتا به روش میکرواستخراج فاز مایع با فیبر توخالی ۶۶
۱-۱) مقدمه ٦٧
۱-۲) واکنشگرها و مواد شیمیایی ٦٨
۱-۳) تهیه محلولهای ذخیره و محلولهای کاری ٦٩
۱-٤) دستگاههای مورد استفاده ٦٩
۱-٥) شرایط HPLC ٧٠
۱-٦) آزمایشهای مقدماتی ٧٠
۱-٦-۱) تعیین طول موج ماکزیمم تهییج و نشر فلوئورسانس آنالیت‌ها ٧٠
۱-٦-۲) بهینه‌سازی شرایط کروماتوگرافی ٧١
۱-۷) تجهیزات LPME ٧٣
۱-۸) محاسبهٔ درصد بازیافت و فاکتور تغلیظ روش ٧٤
۱-۹) بهینه‌سازی پارامترهای مؤثر بر استخراج ٧٥
۱-۹-۱) حلال آلی ٧٥
۱-۹-۲) زمان استخراج ٧٨
۱-۹-۳) غلظت NaOH در فاز دهنده و غلظت HCl در فاز پذیرنده ٧٩
۱-۹-٤) سرعت همزدن ٨١
۱-۹-٥) حجم فازها ٨٢
۱-۹-٦) اثر افزایش نمک ٨٣
۱-۹-۷) اثر افزایش سورفکتانت ٨٤
۱-۱۰) عملکرد تجزیه‌ای روش HF-LPME-HPLC ٨٧
۱-۱۱) آنالیز نمونه‌های حقیقی ٨٧

قسمت دوم: ۸۹
پیش‌تغلیظ مهارکننده‌های بتا به روش میکرواستخراج مایع سه فازی توسط قطره آویزان ۸۹
۲-۱) واکنشگرها و مواد شیمیایی ۹۰

۲-۲) تهیه محلولهای ذخیره و محلولهای کاری..... ۹۰
۲-۳) دستگاههای مورد استفاده ۹۰
۲-٤) شرایط HPLC..... ۹۰
۲-٥) روش میکرواستخراج مایع سه فازی توسط قطره آویزان (DSD-LPME) ۹۰
۲-٦) بهینه‌سازی پارامترهای مؤثر بر استخراج ۹۲
۲-٦-۱) حلال آلی ۹۳
۲-٦-۲) غلظت NaOH در فاز دهنده و غلظت HCl در فاز پذیرنده..... ۹٤
۲-٦-۳) حجم فازها..... ۹٥
۲-٦-٤) زمان استخراج بین دو فاز دهنده و آلی (T_1) و زمان استخراج معکوس (T_2)..... ۹٦
۲-٦-٥) سرعت هم زدن..... ۹۸
۲-٦-٦) افزایش نمک به فاز آبی دهنده..... ۹۹
۲-۷) عملکرد تجزیه‌ای روش DSD-LPME-HPLC..... ۹۹
۲-۸) آنالیز نمونه‌های حقیقی..... ۱۰۰
۲-۹) نتیجه‌گیری..... ۱۰۱

قسمت سوم: ۱۰۳
پیش‌تغلیظ مهارکننده‌های بتا به روش فیبر توخالی تقویت شده با نانولوله‌های کربنی ۱۰۳
۳-۱) چکیده ۱۰٤
۳-۲) مقدمه..... ۱۰٥
۳-۳) عاملدار کردن نانولوله‌های کربنی..... ۱۰۸
۳-٤) واکنشگرها و مواد شیمیایی..... ۱۰۹
۳-٥) تهیه محلولهای ذخیره و محلولهای کاری..... ۱۰۹
۳-٦) دستگاههای مورد استفاده ۱۱۰
۳-۷) شرایط HPLC..... ۱۱۰
۳-۸) بررسی‌های کمّی..... ۱۱۰
۳-۹) روش میکرواستخراج ادغامی فاز جامد/ مایع با فیبر توخالی (HF–SLPME)..... ۱۱۱
۳-۱۰) بهینه‌سازی شرایط میکرواستخراج..... ۱۱۳
۳-۱۰-۱) حلال آلی استخراجی..... ۱۱٤
۳-۱۰-۲) اثر مقدار MWCNTs..... ۱۱٤
۳-۱۰-۳) اثر حجم فاز دهنده بر فرآیند میکرواستخراج ۱۱٥

۳-۱۰-٤) اثر غلظت NaOH در فاز دهنده بر فرآیند میکرواستخراج ۱۱٦
۳-۱۰-٥) اثر زمان بر فرآیند میکرواستخراج ۱۱۸
۳-۱۰-٦) اثر حلال واجذب بر فرآیند میکرواستخراج ۱۱۹
۳-۱۰-۷) اثر حجم حلال واجذب بر فرآیند میکرواستخراج ۱۲۰
۳-۱۰-۸) اثر زمان واجذب بر فرآیند میکرواستخراج ۱۲۱
۳-۱۰-۹) اثر افزایش نمک ۱۲۱
۳-۱۰-۱۰) اثر سرعت همزدن بر فرآیند میکرواستخراج ۱۲۳
۳-۱۱) ارزیابی عملکرد روش ۱۲٤
۳-۱۲) تجزیه نمونه حقیقی ۱۲٤
۳-۱۳) نتیجه‌گیری و پیشنهادات ۱۲٦

قسمت چهارم: ۱۲۸
اندازه‌گیری مهارکننده‌های بتا به روش طیف سنجی Uv/Vis و به کمک کالیبراسیون چند متغیره ۱۲۸
٤-۱) چکیده ۱۲۹
٤-۲) مقدمه ۱۲۹
٤-۳) تعریف کمومتریکس ۱۳۰
٤-٤) روش‌های کمومتریکس و دسته‌بندی روش‌های بکار رفته تجزیه‌ای ۱۳۱
٤-٥) روش‌های مدل‌سازی خطی و کالیبراسیون چند متغیره (MVC) ۱۳۳
٤-٦) روش حداقل مربعات جزئی (PLS) ۱۳٥
٤-۷) اندازه‌گیری همزمان متوپرولول و پروپرانولول ۱۳٦
٤-۷-۱) دستگاه‌ها و نرم‌افزارهای مورد استفاده ۱۳٦
٤-۷-۲) مواد شیمیایی، واکنشگرها و محلول‌ها ۱۳۷
٤-۷-۳) منحنی کالیبراسیون برای گونه‌های متوپرولول و پروپرانولول به صورت منفرد ۱۳۷
٤-۸) طراحی نمونه‌ها در کالیبراسیون ۱۳۹
٤-۹) کالیبراسیون و ارزیابی داده‌ها به کمک روش کالیبراسیون خطی PLS1 ..... ۱٤۲
٤-۱۰) محاسبه حد تشخیص آنالیت‌ها ۱٤٦
٤-۱۱) آنالیز نمونه‌های دارویی ۱٤۷
٤-۱۲) تائید روش کالیبراسیون چند متغیره به کمک روش HPLC ۱٤۸
٤-۱۲-۱) دستگاه مورد استفاده ۱٤۸

٤-١٢-٢) شرایط HPLC ١٤٨
٤-١٢-٣) روش آزمایش HPLC ١٤٩
٤-١٣) جمع‌بندی و نتیجه‌گیری ١٥٠

قسمت پنجم: ١٥٢
بهینه‌سازی شرایط میکرواستخراج ادغامی فاز جامد/ مایع با فیبر توخالی (HF–SLPME) **تقویت شده با نانولوله های کربنی مهارکننده‌های بتا به روش طراحی آزمایش (**DOE**) ١٥٢**
٥-١) مقدمه ١٥٣
٥-٢) غربالگری ١٥٥
٥-٢-١) طراحی کامل فاکتوریل ١٥٥
٥-٢-٢) طراحی فاکتوریل جزئی ١٥٩
٥-٢-٣) طراحی پلاکت - برمن ١٦٠
٥-٣) بهینه‌سازی ١٦٠
٥-٣-١) طرح فاکتوریل کامل سه سطحی ١٦٥
٥-٣-٢) طرحهای دوهلرت ١٦٥
٥-٣-٣) طرح باکس – بنکن (BBD) ١٦٦
٥-٣-٤) طرح مختلط مرکزی ١٦٦
٥-٤) کاربردهای برگزیده ١٦٧
٥-٥) بخش تجربی ١٧١
٥-٦) واکنشگرها و مواد شیمیایی ١٧١
٥-٧) تهیه محلولهای ذخیره و محلولهای کاری ١٧١
٥-٨) دستگاههای مورد استفاده ١٧٢
٥-٩) شرایط HPLC ١٧٢
٥-١٠) روش میکرواستخراج ادغامی فاز جامد/مایع با فیبرتوخالی (HF –SLPME) تقویت شده با نانو ذرات کربنی ١٧٢
٥-١١) بهینه‌سازی شرایط میکرو استخراج ١٧٣
٥-١٢) بحث و نتیجه‌گیری ١٧٥
٥-١٢-١) گزینش مدل مناسب ١٧٥
٥-١٢-٢) آنالیز مدل برازش یافته ١٨٠

فهرست شکلها

شکل ۱-۱) مراحل یک فرآیند آنالیز شامل آماده‌سازی نمونه..... ٤
شکل ۱-۲) وسیله‌ی مورد استفاده در روش میکرواستخراج فاز جامد ۷
شکل ۱-۳) مراحل فرآیند SPME (مراحل A، B، C استخراج و D، E واجذبی) ۸
شکل ۱-٤) میکرواستخراج با فاز جامد (a) روش مستقیم(b) روش فضای فوقانی..... ۱۰
شکل ۱-۵) میکرواستخراج با فاز جامد و فیبر محافظت شده. ۱۰
شکل ۱-٦) میکرواستخراج با سیستم قطره، مدل میکروسرنگ. ۱۵
شکل ۱-۷) طرح سیستم میکرواستخراج قطره در فضای فوقانی (HS-SDME)..... ۱٦
شکل ۱-۸) میکرواستخراج با قطره مدل داخل محلول (A) و مدل فضای فوقانی (B) ۱۷
شکل ۱-۹) شمای سیستم میکرواستخراج قطره‌ی سه فازی ۱۹
شکل ۱-۱۰) طرح سیستم جدید میکرواستخراج سه فازی مایع با استفاده از تک قطره ۲۰
شکل ۱-۱۱) تصویر SEM از سطح مقطع یک فیبر توخالی پلی‌پروپیلن..... ۲۱
شکل ۱-۱۲) طرح یک سیستم میکرواستخراج با استفاده از فیبر توخالی ۲۲
شکل ۱-۱۳) پیکربندی ستاره‌ای میکرواستخراج با فاز مایع بوسیله فیبر توخالی..... ۲۳
شکل ۱-۱٤) وسیله مورد استفاده در روش میکرواستخراج دینامیکی توسط فیبرتوخالی ۲۵
شکل ۱-۱۵) یک نوع پیکربندی LPME با فیبر توخالی ۲٦
شکل ۱-۱٦) سیستم میکرواستخراج با فیبر تو خالی در فضای فوقانی ۲۸
شکل ۱-۱۷) فازهای دهنده و پذیرنده در روش HF- LPME..... ۲۹
شکل ۱-۱۸) تقسیم‌بندی انواع روشهای میکرواستخراج فاز مایع ۳۱
شکل ۱-۱۹) انواع آلوتروپ‌های کربن..... ۳٦
شکل ۱-۲۰) انواع نانولوله‌های کربنی الف- SWCNT ب- MWCNT..... ۳۷
شکل ۱-۲۱) فرمول شیمیایی کلّی مهارکننده‌های بتا: الف- دارای گروه انتهایی ایزوپروپیل،..... ۵۳
شکل ۱-۱) ساختار ترکیبات پروپرانولول، آتنولول و متوپرولول..... ٦۸
شکل ۱-۲) تجهیزات LPME..... ۷٤
شکل ۱-۳) اثر حلال آلی بر سطح زیر پیک (n=۳) ۷۸
شکل ۱-٤) اثر زمان استخراج بر روی سطح زیر پیک..... ۷۹

شکل ۱-۵) اثر غلظت **NaOH** بر روی سطح زیر پیک ۸۱
شکل ۱-٦) اثر سرعت همزدن بر روی سطح زیر پیک..... ۸۲
شکل ۲-۱) وسیله مورد استفاده در روش میکرواستخراج سه فازی مایع توسط قطره مستقیم آویزان،..... ۹۲
شکل ۲-۲) اثر زمان استخراج T_1 بر روی راندمان میکرواستخراج ۹۷
شکل ۲-۳) اثر زمان استخراج معکوس T_2 بر روی راندمان میکرواستخراج..... ۹۸
شکل ۳-۲) تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی فیبر پلی‌پروپیلن..... ۱۱۳
شکل ۳-۳) اثر مقدار MWCNTs بر روی میزان استخراج..... ۱۱۵
شکل ۳-٤) اثر حجم فاز دهنده بر روی میزان استخراج..... ۱۱٦
شکل ۳-۵) اثر غلظت NaOH بر روی میزان استخراج..... ۱۱۷
شکل ۳-٦) اثر زمان بر روی میزان استخراج..... ۱۱۹
شکل ۳-۷) اثر حلال واجذب بر روی میزان استخراج..... ۱۲۰
شکل ۳-۸) اثر افزایش نمک بر روی میزان استخراج..... ۱۲۳
شکل ۳-۹) کروماتوگرام جداسازی مهارکننده‌های بتا تحت شرایط بهینه ۱۲٦
شکل ٤-۱) طیف ماورای بنفش (UV) متوپرولول ($۱۰ mg L^{-1}$) و پروپرانولول ($۵ mg L^{-1}$)..... ۱۳۸
شکل ٤-۲) منحنی کالیبراسیون برای گونه‌های منفرد متوپرولول و پروپرانولول..... ۱۳۸
شکل ٤-۳) منحنی تغییرات RMSE بر حسب تعداد فاکتورها برای دو گونه متوپرولول و پروپرانولول ۱٤۳
شکل ٤-٤) کروماتوگرام حاصل از تزریق ۱۰ µL مخلوط $۵۰ mg L^{-1}$ متوپرولول و $۱۰ mg L^{-1}$ پروپرانولول. ۱٤۹
شکل ۵-۱) نمایش گرافیکی طرح فاکتوریل کامل برای سه متغیر؛ دایره‌های حاضر در رئوس مکعب معرف آزمایش‌ها هستند..... ۱۵۸

لیست مخفف‌ها

BBD	Box-Benkhen design
CCD	Central composite design
CE	Capillary electrophoresis
CLS	Classical least squares
CMC	Critical micellar concentration
CM-LPME	Carrier-mediated liquid phase microextraction
CNT	Carbon nanotube
CS	Calibration set
CVD	Chemical vapor deposition
DHF-LPME	Dynamic hollow fibre liquid-phase microextraction
DI-SDME	Direct immersion single-drop microextraction
DLLME	Dispersive liquid -liquid microextention
DOE	Design of experiment
DSD-LPME	Directly suspended droplet liquid-phase microextraction
EF	Enrichment factor
FL	Fluorescence
GC	Gas chromatography
HF-LPME	Hollow fiber liquid phase microextraction
HF-SLPME	Hollow fiber solid–liquid phase microextraction
HPLC	High performance liquid chromatography
HS-LPME	Head space - liquid phase microextraction
HS-SDME	Head space single-drop microextraction
HS-SPME	Head space - solid phase microextraction
ILS	Inverse least squares
LLE	Liquid liquid extraction
LOD	Limit of detection
LOQ	Limit of quantification
LPME	Liquid phase microextraction
MVC	Multivariate calibration
MWCNTs	Multiwalled carbon nanotubes
OFAT	One factor at a time
PCR	Principal component regression
PF	Preconcentration factor
PFE	Pressurised fluid extraction
PGC	Porous graphitic carbon
PLS	Partial least square
RMSEP	Root mean squared error of prediction
RSD	Relative standard deviation
RSE	Relative standard error
RSM	Response surface methodology
SDME	Single drop microextraction
SFE	Supercritical fluid extraction
SME	Solvent microextraction
SPE	Solid phase extraction
SPME	Solid phase microextraction
SWCNTs	Single walled carbon nano tubes
TS	Training set
UV	Ultra violet
UVC	Univariate calibration

چکیده

هدف از تحقیق حاضر، توسعه روشهای آماده‌سازی و پیش‌تغلیظ برای سه مهارکننده بتا (بتا بلاکر) به نامهای آتنولول، متوپرولول و پروپرانولول در نمونه‌های زیست محیطی و بر اساس میکرواستخراجهای فاز مایع و سپس جداسازی و اندازه‌گیری آنها با دستگاه HPLC می‌باشد. این پایان نامه در دو فصل تنظیم شده است؛ در فصل اول، مروری اجمالی بر انواع روشهای آماده‌سازی و پیش‌تغلیظ نمونه‌ها انجام شده است. در فصل دوم که فصل تجربی است و شامل پنج بخش می‌باشد؛ از روشهای مختلف و جدید میکرواستخراج فاز مایع با استفاده از فیبر توخالی، قطره معلق و فیبر توخالی تقویت شده با نانولوله‌های کربنی برای آماده‌سازی و پیش‌تغلیظ این مهارکننده‌های بتا استفاده شد.

در بخش اول فصل تجربی، استخراج مهار کننده‌های بتا از نمونه آب توسط فیبر توخالی (HF-LPME) قبل از تزریق به سیستم HPLC مورد بررسی قرار گرفته است. جهت بهبود راندمان استخراج، سورفکتانت غیریونی به نمونه اضافه شد. نتایج آماری زیر بدست آمدند. فاکتور تغلیظ برای آتنولول، متوپرولول و پروپرانولول به ترتیب ۲۱/۸، ۲۳۲/٦ و ۲٤٥ می‌باشد. منحنی کالیبراسیون برای این ترکیبات با رسم مساحت سطوح زیر پیک محلول‌های استاندارد پس از استخراج بر حسب غلظت استانداردها رسم شدند و گستره خطی روش برای آنالیتهای مذکور به ترتیب ٥۰۰۰-۳۷ ، ۱۰۰۰-۱/۳ و ٥۰۰-۰/۳ میکروگرم بر لیتر با ضریب همبستگی ۰/۹۹۹۷ ، ۰/۹۹۹٦ و ۰/۹۹۹۷ می‌باشد. حد تشخیص روش (LOD)، به طور عملی در نسبت (S/N =۳) با هفت بار تکرار آزمایش بدست آمد. حد تشخیص برای آنالیتهای مذکور به ترتیب ۱۲، ۰/٤ و ۰/۰۸ میکروگرم بر لیتر بود. تکرار پذیری یا دقت روش، به صورت انحراف استاندارد نسبی (RSD%) و با پنج بار تکرار آزمایش به ترتیب ٥/۸، ٤/۹ و ٥/۲ محاسبه گردید. بازیابی نسبی مهارکننده‌های بتا با این روش در نمونه‌های حقیقی آب بین ۹٥/۳ تا ۹۸/۱ درصد (برای آب لوله‌کشی)، ۹۰/٥ تا ۹٤/۱ درصد (برای پس آب بیمارستانی) و بین ۹۰/٦ تا ۹۳/٥ درصد (برای پس آب صنعتی) بود.

در بخش دوم فصل تجربی، استخراج مهار کننده‌های بتا از نمونه آب توسط روش میکرواستخراج سه فازی قطره آویزان (DSD-LPME) مورد بررسی قرار گرفته است. فاکتور تغلیظ برای آتنولول، متوپرولول و پروپرانولول به ترتیب ۳٤/۸، ۱۳۸/٦ و ۱۷۱/٦ می‌باشد. گستره خطی روش برای آنالیتهای مذکور به ترتیب ٥۰۰۰-۳۰ ، ۱۰۰۰-۱٦ و ٥۰۰-۰/٤ میکروگرم بر لیتر با ضریب همبستگی ۰/۹۹۹۸ ، ۰/۹۹۹٦ و ۰/۹۹۹۷ می‌باشد. حد تشخیص (LOD) برای آنالیتهای مذکور به ترتیب ۱۰، ٥/۰ و ۰/۱ میکروگرم بر لیتر بود. تکرار پذیری روش، به صورت انحراف استاندارد نسبی (RSD%) و با پنج بار تکرار آزمایش به ترتیب ٦/۲، ٥/٦ و ٥/۸ محاسبه گردید. بازیابی نسبی مهارکننده‌های بتا با این روش در نمونه‌های حقیقی آب بین ۹٤/٥ تا ۹۷/۲ درصد (برای آب لوله‌کشی)، ۹۰/۱ تا ۹٦/۸ درصد (برای پس آب بیمارستانی) و بین ۹۰/۲ تا ۹۲/۷ درصد (برای پس آب صنعتی) بود.

در بخش سوم فصل تجربی، از روش میکرواستخراج فاز مایع-جامد فیبر توخالی (HF-SLPME) برای استخراج این سه مهارکننده بتا در نمونه‌های زیست محیطی استفاده شد. مهارکننده‌های بتا استخراج شده سپس توسط کروماتوگرافی مایعی با کارآیی بالا (HPLC) با آشکارسازی فلوئورسانس جداسازی، شناسایی و اندازه‌گیری شدند. در این روش یک فیبر توخالی پلی‌پروپیلنی پر شده با حلال آلی تقویت شده با نانولوله‌های کربنی چند دیواره (MWCNTs) که بعنوان یک تله برای پیش‌تغلیظ مهارکننده‌های بتا از نمونه‌های آبی عمل می‌کند استفاده می‌شود. هر دو انتهای فیبر توخالی توسط دو سوزن ته‌گرد کوتاه شده مسدود می‌شوند. این وسیله داخل محلول نمونه آبی قرار داده می‌شود و شبیه یک میله همزن مغناطیسی عمل می‌کند. پارامترهای موثر بهینه شدند. نتایج نشان می‌دهند که فاکتور پیش‌تغلیظ از ۲۵/۲ تا ۸۲۲ تغییر می‌کند. تحت شرایط بهینه استخراج، منحنی کالیبراسیون از دامنه خطی مطلوب برخوردار بوده و حد تشخیص آتنولول، متوپرولول و پروپرانولول به ترتیب ۱۵/۰، ۱۰/۰ و ۱/۰ میکروگرم بر لیتر بوده است. بازیابی نسبی مهارکننده‌های بتا در نمونه‌های حقیقی آب بین ۸۹/۷ تا ۹۳/۱ درصد (برای آب لوله‌کشی)، ۸۸/۹ تا ۹۰/۷ درصد (برای پس آب بیمارستانی) و بین ۹۱/۲ تا ۹۳/۸ درصد (برای پس آب صنعتی) بود و RSD بین ۷/۹ تا ۸/٤ درصد بود.

در بخش چهارم فصل تجربی، اندازه‌گیری همزمان مخلوط دوجزئی متوپرولول و پروپرانولول بدون آماده‌سازی نمونه و با استفاده از روش طیف‌سنجی Uv/Vis و به کمک کالیبراسیون چند متغیره انجام شد. منحنی کالیبراسون برای متوپرولول در بازه $mg\ L^{-1}$ ۱-۷۰ و برای پروپرانولول در بازه $mg\ L^{-1}$ ۰/۵-۳۰ خطی بود. در این تحقیق روش کالیبراسیون چند متغیره و با استفاده از آنالیز حداقل مربعات جزئی (PLS) داده‌های طیفی Uv مورد استفاده قرار گرفت. جهت تایید روش مورد استفاده، از روش HPLC با ستون فاز معکوس و به کمک فاز متحرک شامل مخلوط محلول NaH_2PO_4 ، ۰/۰۱ مولار (که pH آن توسط اسید فسفریک ۱ مولار روی ۳/۰ تنظیم شده است)، متانول و استونیتریل با درصد حجمی ٤٥:٤٥:۱۰ کمک گرفته شد. روش پیشنهادی بصورت موفقیت‌آمیزی برای اندازه‌گیری این دو ترکیب قابل استفاده است.

در بخش پنجم فصل تجربی، روش میکرواستخراج فاز مایع-جامد فیبر تو خالی (HF-SLPME) برای استخراج دو مهارکننده بتا (متوپرولول و پروپرانولول) در نمونه‌های زیست محیطی توسط روش طراحی آزمایش (DOE) بهینه‌سازی شد. در این بخش پنج پارامتر اصلی موثر در این فرآیند میکرواستخراج یعنی حجم فاز دهنده، زمان استخراج، درصد نمک، سرعت همزدن و حجم حلال واجذب به روش طرح مختلط مرکزی (CCD) و با پنج سطح مختلف بهینه‌سازی شدند. بعلاوه معادله مربوط به ارتباط فاکتور پیش تغلیظ و پارامترهای اصلی بدست آمد.

Abstract

The main aim of this research is to develop the preconcentration and sample preparation methods, based on liquid phase microextraction procedure prior to HPLC. This thesis consists of two chapters. In the first part, some of sample preparation methods were reviewed. But in the second part, which has five sections, new methods of some liquid phase microextraction techniques, such as hollow fiber liquid phase microextraction (HF-LPME), directly suspended droplet liquid phase microextraction (DSD-LPME) and hollow fiber solid/liquid phase microextraction (HF-SLPME) were introduced for the determination of three *β*-blockers in environmental water samples.

In section one, hollow fiber liquid phase microextraction (HF-LPME) was utilized to extract three *β*-blockers namely atenolol, metoprolol and propranolol in environmental waters. The drugs were enriched by a factor of 21.8, 232.6 and 245 for atenolol, metoprolol and propranolol, respectively. Linearity was obtained in the range of 37-5000 μg L^{-1} for atenolol (r^2, 0.9997), 1.3-1000 μg L^{-1} for metoprolol (r^2, 0.9996) and 0.3-500 μg L^{-1} for propranolol (r^2, 0.9997). The detection limits were 12 μg L^{-1} for atenolol, 0.4 μg L^{-1} for metoprolol and 0.08 μg L^{-1} for propranolol. Relative recovery of *β*-blockers in real water samples were between 95.3 - 98.1 for tap water, 90.5 -94.1 for clinical waste water and 90.6-93.5 for industrial waste water.

In section two, directly suspended droplet liquid phase microextraction (DSD-LPME) was utilized to extract these three *β*-blockers in environmental waters. The drugs were enriched by a factor of 34.8, 138.6 and 171.6 for atenolol, metoprolol and propranolol, respectively. Linearity was obtained in the range of 30-5000 μg L^{-1} for atenolol (r^2, 0.9998), 16-1000 μg L^{-1} for metoprolol (r^2, 0.9996) and 0.4-500 μg L^{-1} for propranolol (r^2, 0.9997). The detection limits were 10 μg L^{-1} for atenolol, 5.0 μg L^{-1} for metoprolol and 0.1 μg L^{-1} for propranolol. Relative recovery of *β*-blockers in real water samples were between 94.5 - 97.2 for tap water, 90.1 -96.8 for clinical waste water and 90.2-92.7 for industrial waste water.

In section three, hollow fiber solid/liquid phase microextraction (HF-SLPME) was utilized to extract three *β*-blockers; atenolol, metoprolol and propranolol in environmental waters. The extracted *β*-blockers were then separated, identified, and quantified by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. In HF-SLPME a porous polypropylene hollow fiber filled with MWCNTs reinforced organic solvent that acts as an analyte trap to pre-concentrate *β*-blockers from water samples. Both ends of the hollow fiber segment are sealed with magnetic stoppers. This device is placed inside the aqueous feed solution and plays the rule of a pseudo-stir bar. The effective parameters are optimized. The results showed that practical pre-concentration factors varied from 25.2 to 822. Under the optimized extraction conditions, the method showed good linearity and low limits of detections, 15.0, 10.0, 1.0 μg L^{-1} for atenolol, metoprolol and propranolol respectively. Relative recovery of *β*-blockers in real water samples were between 89.7 - 93.1 for tap water, 88.9 -90.7 for clinical waste water and 91.2-93.8 for industrial waste water with RSDs between 7.9 to 8.4%.

In section four, simultaneous determination of metoprolol and propranolol in binary mixtures without sample pre-treatment has been successfully achieved, using chemometric-assisted spectrophotometry. The method describes the use of multivariate spectophotometric calibration by using partial least squares (PLS) analysis of UV spectral data. Calibration curve was linear in the range of 1-70 mg L^{-1} for metoprolol and in the range of 0.5-30 mg L^{-1} for propranolol. The proposed method was validated by high performance liquid chromatography (HPLC) method. HPLC was performed by using reversed phase column and a mobile phase composed of 0.01 mol L^{-1} NaH_2PO_4 (adjusted to pH 3.0 with phosphoric acid) - methanol - acetonitril (45:45:10, v:v:v). The proposed method was validated and results obtained by the method was statistically analyzed.

In section five, hollow fiber solid/liquid phase microextraction (HF-SLPME) method was optimized using design of experiments (DOE) to extract two *β*-blockers namely metoprolol and propranolol in environmental waters. The effective parameters such as donor phase volume, extraction time, salt percent, volume of desorption solvent and stirring speed were optimized using central

composite design (CCD) with five levels. In addition, equation relating preconcentration factor to main parameters was derived.

فصل اول:
کلیات

۱-۱) آلاینده‌های محیط زیست

طی سالهای گذشته در بسیاری از کشورهای پیشرفته و صنعتی و همچنین کشورهای در حال توسعه، انواع مختلفی از مواد و ترکیبات شیمیایی در صنایع گوناگون تولید و یا مصرف شده‌اند؛ لذا، ورود مقادیر بسیار زیادی از این ترکیبات به صورت مواد زاید در چرخه محیط زیست اجتناب ناپذیر بوده است. این مواد زاید به عنوان آلاینده‌های زیست محیطی در نظر گرفته می‌شوند که اثرات نامطلوبی بر روی سلامتی بشر و همچنین محیط زیست دارند. امروزه با توجه به توسعه‌ی صنایع مختلف و در نتیجه تولید و مصرف انواع جدید این ترکیبات، مشکل آلایندگی بیشتر محیط زیست تبدیل به یکی از معضلات اصلی جوامع صنعتی گشته است. بنابراین، شناسایی و اندازه‌گیری این ترکیبات آلاینده، جهت کنترل خطرات زیست محیطی ناشی از آنها یک اقدام اساسی و موثر می‌باشد. امروزه، مشخص شده است که بسیاری از این ترکیبات شیمیایی علاوه بر خواص سمّی شناخته شده‌ای که دارند، دارای خاصیت سرطان‌زایی نیز می‌باشند و می‌توانند حتی در مقادیر بسیار کم نیز باعث ایجاد بیماریهای بسیار خطرناکی در انسان و سایر جانداران گردند. لذا، اندازه‌گیری مقادیر بسیار کم این ترکیبات در نمونه‌های زیست محیطی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

یکی از عوامل مهم آلوده کننده محیط زیست داروها هستند. در حقیقت چندین تن دارو بصورت سالانه در سراسر دنیا تولید می‌شود تا توسط انسانها و حیوانات مصرف شود [۱ و ۲]. مشخص‌ترین راه ورود این داروها به محیط زیست از طریق ادرار، مدفوع، دور ریختن داروهای تاریخ گذشته یا داروهای غیرلازم از طریق دستشویی یا زباله‌ها می‌باشد [۳ و ٤].

این داروها را به ۹ گروه زیر تقسیم‌بندی می‌کنند [٥]:

- داروهای غیراستروئیدی ضدالتهابی[۱]
- عوامل کاهش دهنده چربی خون
- آنتی بیوتیک‌ها
- هورمون‌های جنسی
- داروهای ضد صرع[۲]
- بتابلاکرها (مهارکننده‌های بتا)
- داروهای ضد افسردگی
- داروهای تشخیصی برای کمک به گرفتن تصاویر اشعه X [۳]
- داروهای ضد سرطان[٤]

۱-۲) روشهای آماده‌سازی نمونه[۵]

در طی دو دهه گذشته، تلاشهای زیادی در زمینه‌ی توسعه و ابداع روشهای نوین، به منظور اندازه‌گیری بقایای اندک ترکیبات شیمیایی سرطان‌زا و سمّی، در انواع مختلف نمونه‌های زیست محیطی، بیولوژیکی و صنعتی صورت گرفته است. از آنجایی که اندازه‌گیری این مواد در نمونه‌های حقیقی به طور مستقیم امکان‌پذیر نمی‌باشد و با توجه به اینکه، آزمایش‌گرها قادر به ارائه مستقیم نمونه‌های حقیقی به همراه زمینه و بافت[٦] آن به دستگاههای تجزیه‌ای موجود نمی‌باشند و از طرف دیگر، چون این دستگاهها قابلیت تشخیص غلظتهای بسیار کم آنالیت‌ها را در

1 Non-steroidal anti-inflammatory drugs
2 Antiepileptics
3 X-ray contrast media
4 Antineoplasics
5 Sample Preparation
6 Matrices

نمونه ندارند؛ بنابراین، ضروری است که قبل از اندازه‌گیری نهایی، یک مرحله‌ی اولیه‌ی آماده‌سازی[1] نمونه‌ها، جهت دستیابی به غلظت و همچنین بافت مناسب نمونه‌ی آزمایشی صورت گیرد.

بنابراین، می‌توان گفت که آماده‌سازی نمونه با اهداف پیش‌تغلیظ آنالیت و فراهم آوردن امکان اندازه‌گیری مقادیر کم آنالیت و همچنین افزایش انتخابگری روش و نیز تبدیل بافت نمونه‌ی حقیقی به حالتی که برای شناسایی و اندازه‌گیری با دستگاههای تجزیه‌ای مناسب‌تر باشد، صورت می‌گیرد. همچنین در روشهای آماده‌سازی، با استخراج گونه‌های مورد نظر از بافت نمونه، جداسازی آنالیت‌ها از مواد ناخواسته‌ای که همراه آنها در بافت نمونه‌ی حقیقی وجود دارند؛ انجام می‌پذیرد، که به این فرآیند اصطلاحاً پاکسازی[2] گفته می‌شود. از طرف دیگر، با اجرای فرآیند آماده‌سازی، تبدیل آنالیت به شکل مناسب‌تر برای جداسازی و تشخیص بهتر نیز صورت می‌گیرد.

باید در نظر داشت که روشهای مختلفی برای آماده‌سازی و تهیه‌ی نمونه‌ها، بسته به ساختار فیزیکی و همچنین ماهیت شیمیایی آنها وجود دارد؛ که ضروری است کلیه‌ی این روشها، تکرارپذیر و کارآمد بوده و مستقل از تغییرات بافت نمونه‌های حقیقی عمل نمایند. علاوه بر این، شرایط دیگری نیز در این روشها باید مد نظر قرار گیرند؛ که عبارتند از: استفاده از حجمهای کم نمونه‌ی اولیه، ویژه[3] و یا انتخابی[4] عمل کردن روش مورد استفاده، توانایی روش جهت خودکار شدن و بخصوص نیاز کمتر روش به استفاده از حلالهای آلی و دیگر ترکیبات شیمیایی سمّی و

1 Sample preparation
2 Clean up
3 Specifity
4 Selectivity