بسم الله الرحمن الرحیم

دانشگاه صنعتی اصفهان

دانشکده شیمی

کاربرد ریزاستخراج مایع- مایع پخشی و ریزاستخراج فاز مایع با فیبر توخالی برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری برخی داروهای مخدر توسط کروماتوگرافی مایع- آشکارساز آرایه‌ی دیودی

پایان‌نامه کارشناسی ارشد شیمی تجزیه

ملیحه خلیلی بروجنی

استاد راهنما

دکتر محمد سراجی

۱۳۸۸

دانشگاه صنعتی اصفهان

دانشکده شیمی

پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته شیمی تجزیه خانم ملیحه خلیلی بروجنی

تحت عنوان

کاربرد ریزاستخراج مایع- مایع پخشی و ریزاستخراج فاز مایع با فیبر توخالی برای پیش-تغلیظ و اندازه‌گیری برخی داروهای مخدر توسط کروماتوگرافی مایع- آشکارساز آرایه‌ی دیودی

در تاریخ ۸۸/۱۲/۱۸ توسط کمیته تخصصی زیر مورد بررسی و تصویب نهایی قرار گرفت.

۱- استاد راهنمای پایان‌نامه	دکتر محمد سراجی
۲- استاد داور	پروفسور علی‌اصغر انصافی
۳- استاد داور	پروفسور بهزاد رضایی
سرپرست تحصیلات تکمیلی دانشکده	پروفسور بیژن نجفی

تقدیر و تشکر

سپاس و ستایش خدای را که نام‌هایش پاک، نعمت‌هایش سرشار و احسانش وافر است. سپاس خدایی را که هر گاه از او چیزی خواسته‌ایم عطا کرده و آنگاه که امیدی به او داشته‌ایم به امیدمان می‌رساند. خدای را بسی شاکرم که از روی کرم پدر و مادری فداکار نصیبم ساخته تا در سایه درخت پر بار وجودشان بیاسایم و از ریشه آنها شاخ و برگ گیرم و در سایه وجودشان در راه کسب علم ودانش تلاش نمایم. آموزگارانی که برایم زندگی؛ بودن و انسان بودن را معنا کردند. اکنون که با لطف و عنایت پروردگار این دوره را با موفقیت به پایان رسانده‌ام بر خود لازم می‌دانم تا سپاسگزار تمام عزیزانی باشم که مرا در پیمودن این مسیر یاری نمودند.

از خانواده عزیزم به خصوص پدر و مادرم که همواره مرا در پیمودن راه تحصیل یاری نموده‌اند تشکر و قدردانی می-نمایم.

از استاد عزیزم جناب آقای دکتر سراجی که در تمامی مراحل انجام این پروژه با صبر و شکیبایی مرا راهنمایی نمودند کمال تشکر را دارم. از کلیه اساتید و کارکنان دانشکده شیمی به خاطر زحمات ارزشمندشان صمیمانه تشکر می‌کنم.

از جناب آقای حاجی‌علی‌اکبری که در تمامی مراحل انجام این پروژه از تجربیات و راهنمایی‌های ایشان استفاده نمودم و از دوستان خوبم در آزمایشگاه تحقیقاتی خانم‌ها حسن‌زاده، هرندی‌زاده، موسوی، تن‌سازان، خراسانی، مهرافزا، شیروانی، یوسفی و آقایان فرجمند، سعادتی‌فر و شرافتمند سپاسگزارم.

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات و نوآوری‌های ناشی از تحقیق موضوع این پایان‌نامه متعلق به دانشگاه صنعتی اصفهان است.

تقدیم به

پدر و مادر عزیزم

به پاس عاطفه سرشار و گرمای امیدبخش وجودشان که در این سردترین روزگاران بهترین پشتیبان است،
به پاس قلب‌های بزرگشان که فریادرس است و سرگردانی و ترس در پناهشان به شجاعت می‌گراید،
به پاس اینکه زندگی و عشق را به من ارزانی داشتند و دلیلی بودند برای آنچه که امروز از زندگی می‌خواهم،
و به پاس محبت‌های بی دریغشان که هرگز فروکش نمی‌کند.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فهرست مطالب.....هشت
فهرست شکل‌ها.....دوازده
فهرست جدول‌ها.....چهارده
چکیده ۱
فصل اول: استخراج و آماده‌سازی نمونه ۲
مقدمه ۲
۱-۱- انتخاب و ارزیابی روش‌های جداسازی ۳
۱-۲- روش‌های متداول استخراج ۳
۱-۲-۱- استخراج مایع- مایع (LLE) ۴
۱-۲-۱-الف- تئوری استخراج مایع- مایع ۴
۱-۲-۱-ب- کاربرد استخراج مایع- مایع ۵
۱-۲-۲- استخراج با فاز جامد (SPE) ۶
۱-۲-۳- ریزاستخراج با فاز جامد (SPME) ۸
۱-۲-۳-ج- کاربرد ریزاستخراج با فاز جامد ۱۰
۱-۲-۴- ریزاستخراج فاز مایع (LPME) ۱۱
۱-۳- ریزاستخراج مایع- مایع پخشی (DLLME) ۱۵
۱-۳-۱- تئوری ریزاستخراج مایع- مایع پخشی ۱۸
۱-۳-۲- پارامترهای موثر بر بازیافت استخراج ۱۹
۱-۳-۳- مقایسه روش ریزاستخراج مایع- مایع پخشی با روش‌های مشابه ۲۲
۱-۳-۴- کاربردهای ریزاستخراج مایع– مایع پخشی ۲۲
۱-۴- ریزاستخراج فاز مایع با فیبر توخالی (HF-LPME) ۲۳
۱-۴-۱ تئوری ریزاستخراج فاز مایع با فیبر توخالی ۲۶
۱-۴-۲- مقایسه روش ریزاستخراج فاز مایع با فیبر توخالی با روش‌های مشابه ۲۷
۱-۴-۳- پارامترهای موثر بر بازدهی استخراج ۲۸
۱-۴-۴-کاربردهای ریزاستخراج فاز مایع با فیبر توخالی ۲۹
فصل دوم: داروهای مخدر و روش‌های اندازه‌گیری آن‌ها ۳۰
مقدمه ۳۰
۲-۱- اثر مواد مخدر بر سیستم عصبی ۳۱
۲-۲- فنتانیل ۳۲
۲-۳- آلفنتانیل ۳۵
۲-۴-سوفنتانیل ۳۶
۲-۵- مروری بر روش‌های به کار رفته برای اندازه‌گیری داروهای مخدر ۳۶

۲-۵-۱- کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا ۳۷
۲-۵-۲- کروماتوگرافی گازی ۳۸
۲-۵-۳- سایر روش‌های آنالیز داروهای مخدر ۳۹
فصل سوم: بخش تجربی ۴۰
۳-۱- دستگاه‌ها و وسایل مورد نیاز ۴۰
۳-۲- مواد شیمیایی و محلول‌های مورد نیاز ۴۱
۳-۲-۱- تهیه محلول‌های استاندارد داروهای مخدر ۴۱
۳-۳- ریزاستخراج مایع- مایع پخشی ۴۲
۳-۳-۱- روش کلی استخراج ۴۲
۳-۳-۲- بهینه‌سازی شرایط استخراج ۴۲
۳-۳-۲-الف- بررسی اثر نوع حلال استخراج‌کننده ۴۲
۳-۳-۲-ب- بررسی اثر نوع حلال پاشنده ۴۳
۳-۳-۲-ج- بررسی اثر حجم حلال استخراج‌کننده ۴۳
۳-۳-۲-د- بررسی اثر حجم حلال پاشنده ۴۴
۳-۳-۲-ن- بررسی اثر غلظت سدیم هیدروکسید ۴۴
۳-۳-۲-و- بررسی اثر افزایش نمک ۴۴
۳-۳-۳- ارقام شایستگی روش ۴۴
۳-۳-۳-الف- دقت روش ۴۵
۳-۳-۳-ب- فاکتور غنی‌سازی ۴۵
۳-۳-۳-ج- بررسی محدوده خطی و حد تشخیص روش ۴۵
۳-۳-۳-د- آماده‌سازی و آنالیز نمونه‌های حقیقی ۴۶
۳-۴- ریزاستخراج فاز مایع با فیبر توخالی ۴۶
۳-۴-۱- روش کلی استخراج ۴۶
۳-۴-۲- بهینه‌سازی شرایط استخراج ۴۷
۳-۴-۲-الف- بررسی نوع حلال آلی ۴۷
۳-۴-۲-ب- بررسی اثر غلظت سدیم هیدروکسید در محلول نمونه ۴۷
۳-۴-۲-ج- بررسی اثر غلظت سولفوریک اسید در محلول پذیرنده ۴۸
۳-۴-۲-د- بررسی اثر افزایش نمک ۴۸
۳-۴-۲-ن- بررسی اثر سرعت همزدن محلول نمونه ۴۸
۳-۴-۲-و- بررسی اثر دمای استخراج ۴۸
۳-۴-۲-ه- بررسی اثر زمان استخراج ۴۹
۳-۴-۳- ارقام شایستگی روش ۴۹
۳-۴-۳-الف- دقت روش ۴۹
۳-۴-۳-ب- فاکتور غنی‌سازی ۴۹

۳-۴-۳-ج- بررسی محدوده خطی و حد تشخیص روش ۴۹
۳-۴-۳-د- آماده‌سازی و آنالیز نمونه‌های حقیقی ۵۰
فصل چهارم: بحث و نتیجه‌گیری ۵۱
مقدمه ۵۱
۴-۱- بررسی شرایط مؤثر بر ریزاستخراج مایع- مایع پخشی ۵۲
۴-۱-۱- بررسی اثر نوع حلال استخراج‌کننده ۵۳
۴-۱-۲- بررسی اثر نوع حلال پاشنده ۵۴
۴-۱-۳- بررسی اثر حجم حلال استخراج‌کننده ۵۶
۴-۱-۴- بررسی اثر حجم حلال پاشنده ۵۸
۴-۱-۵- بررسی اثر غلظت سدیم هیدروکسید در محلول نمونه ۵۹
۴-۱-۶- بررسی اثر افزایش نمک ۶۰
۴-۲- ارقام شایستگی روش ریزاستخراج مایع- مایع پخشی ۶۱
۴-۲-۱- دقت روش ۶۲
۴-۲-۲- فاکتور غنی‌سازی ۶۲
۴-۲-۳- بررسی محدوده خطی ۶۳
۴-۲-۴- حد تشخیص روش ۶۳
۴-۲-۵- آنالیز نمونه حقیقی ۶۵
۴-۳- بررسی شرایط مؤثر بر ریزاستخراج فاز مایع با فیبر توخالی ۶۷
۴-۳-۱- بررسی اثر نوع حلال آلی ۶۸
۴-۳-۲- بررسی اثر غلظت سدیم هیدروکسید در محلول نمونه ۶۹
۴-۳-۳- بررسی اثر غلظت سولفوریک اسید در محلول پذیرنده ۷۰
۴-۳-۴- بررسی اثر افزایش نمک ۷۱
۴-۳-۵- بررسی اثر سرعت همزدن محلول نمونه ۷۱
۴-۳-۶- بررسی اثر دمای محلول نمونه ۷۲
۴-۳-۷- بررسی اثر زمان استخراج ۷۳
۴-۴- ارقام شایستگی روش ریز استخراج مایع با فیبر توخالی ۷۴
۴-۴-۱- دقت روش ۷۴
۴-۴-۲- فاکتور غنی‌سازی ۷۵
۴-۴-۳- بررسی محدوده خطی ۷۵
۴-۴-۴- حد تشخیص روش ۷۵
۴-۴-۵- آنالیز نمونه حقیقی ۷۸
۴-۵- مقایسه دو روش ریزاستخراج مایع- مایع پخشی و ریزاستخراج فاز مایع با فیبر توخالی ۸۳
۴-۵-۱- دقت روش ۸۳
۴-۵-۲- بررسی محدوده خطی ۸۳

۴-۵-۳- حد تشخیص روش ۸۴
۴-۶- نتیجه گیری نهایی ۸۵
مراجع ۸۵
چکیده انگلیسی ۹۶

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱- قیف جداکننده برای استخراج مایع- مایع. ۴
شکل ۱-۲- مراحل استخراج با فاز جامد. ۸
شکل ۱-۳- نحوه اتصال سرنگ ریزاستخراج فاز جامد به کروماتوگرافی مایع. ۹
شکل ۱-۴- ریزاستخراج با فاز جامد (الف) استخراج، (ب) واجذب و تزریق. ۱۰
شکل ۱-۵- سیستم به کار رفته توسط لیو و داسگوپتا برای استخراج قطره در قطره. ۱۲
شکل ۱-۶- (الف) طرح ریزاستخراج در فضای بالای محلول (ب) ریزاستخراج به روش غوطه‌وری مستقیم. ۱۲
شکل ۱-۷- مقایسه بین دو حالت (الف) ایستا و (ب) پویا در ریزاستخراج فاز مایع. ۱۳
شکل ۱-۸- شمایی از تکنیک استخراج مایع- مایع همگن. ۱۴
شکل ۱-۹- تشکیل مایسل. ۱۴
شکل ۱-۱۰- شمایی از استخراج نقطه ابری برای پیش‌تغلیظ فلزات. ۱۵
شکل ۱-۱۱- شمایی از روش ریزاستخراج مایع- مایع پخشی. ۱۶
شکل ۱-۱۲- مراحل انجام شده در روش ریز استخراج مایع- مایع پخشی. ۱۷
شکل ۱-۱۳- مراحل انجام شده در روش CIAME. ۱۸
شکل ۱-۱۴- شمای کلی ریزاستخراج فاز مایع با فیبر توخالی. ۲۴
شکل ۱-۱۵- تصویری میکروسکوپی از سطح مقطع یک غشاء پلیمری متخلخل. ۲۴
شکل ۱-۱۶- سیستم‌های استخراج دوفازی و سه‌فازی با استفاده از فیبرهای توخالی. ۲۵
شکل ۱-۱۷- شمای ریزاستخراج فاز مایع با انتقال‌گر فاز. ۲۶
شکل ۳-۱- نحوه اتصال فیبر توخالی به انتهای یک سرنگ الف) آرایش میله‌ای ب) U شکل. ۴۷
شکل ۴-۱- کروماتوگرام مربوط به محلول استاندارد ترکیبات مورد آنالیز با غلظت ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر. ۵۲
شکل ۴-۲- بررسی اثر نوع حلال استخراج‌کننده بر راندمان استخراج. ۵۴
شکل ۴-۳- بررسی اثر نوع حلال پاشنده بر راندمان استخراج. ۵۵
شکل ۴-۴- تغییرات حجم فاز ته‌نشینی با تغییر حجم کلروفرم. ۵۶
شکل ۴-۵- بررسی اثر حجم حلال استخراج‌کننده بر راندمان استخراج. ۵۷
شکل ۴-۶- بررسی اثر حجم حلال پاشنده بر راندمان استخراج. ۵۸
شکل ۴-۷- بررسی اثر غلظت سدیم هیدروکسید در محلول نمونه بر راندمان استخراج. ۶۰
شکل ۴-۸- بررسی اثر افزایش نمک در محلول نمونه بر راندمان استخراج. ۶۱
شکل ۴-۹- منحنی کالیبراسیون آلفنتانیل ۶۴
شکل ۴-۱۰- منحنی کالیبراسیون فنتانیل ۶۴
شکل ۴-۱۱- منحنی کالیبراسیون سوفنتانیل ۶۴
شکل ۴-۱۲- کروماتوگرام نمونه پلاسمای خون انسان حاوی داروهای مخدر با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر لیتر. ۶۶
شکل ۴-۱۳- کروماتوگرام الف) نمونه ادرار انسان بدون افزایش استاندارد (شاهد). ۶۷

شکل ۴-۱۴- بررسی اثر نوع حلال آلی بر راندمان استخراج. ۶۸
شکل ۴-۱۵- بررسی اثرغلظت سدیم هیدروکسید بر راندمان استخراج. ۶۹
شکل ۴-۱۶- بررسی اثر غلظت سولفوریک اسید در محلول پذیرنده بر راندمان استخراج. ۷۰
شکل ۴-۱۷- بررسی اثر افزایش نمک بر راندمان استخراج. ۷۱
شکل ۴-۱۸- بررسی اثر سرعت همزدن محلول نمونه در محلول نمونه بر راندمان استخراج. ۷۲
شکل ۴-۱۹- بررسی اثر دمای محلول نمونه بر راندمان استخراج. ۷۳
شکل ۴-۲۰- بررسی اثر زمان استخراج بر راندمان استخراج. ۷۴
شکل ۴-۲۱- منحنی کالیبراسیون آلفنتانیل ۷۷
شکل ۴-۲۲- منحنی کالیبراسیون فنتانیل ۷۷
شکل ۴-۲۳- منحنی کالیبراسیون سوفنتانیل ۷۷
شکل ۴-۲۴- درصد بازیابی براساس رسوب‌دهی پروتئین پلاسما با حلال‌های مختلف. ۷۸
شکل ۴-۲۵- کروماتوگرام الف) نمونه پلاسمای خون انسان بدون افزایش استاندارد (شاهد). ۸۱
شکل ۴-۲۶- کروماتوگرام الف) نمونه ادرار انسان بدون افزایش استاندارد (شاهد). ۸۲

فهرست جدول‌ها

عنوان **صفحه**

جدول ۱-۱- خصوصیات فیزیکی حلال‌های استخراج‌کننده. ۲۰
جدول ۲-۱- ساختارهای مولکولی داروهای مخدر مطالعه شده در این تحقیق. ۳۲
جدول ۳-۱- حجم‌های مورد استفاده در بررسی اثر نوع حلال استخراج‌کننده ۴۲
جدول ۳-۲- حجم‌های مورد استفاده در بررسی اثر نوع حلال پاشنده ۴۳
جدول ۴-۱- زمان بازداری ترکیبات مورد آنالیز ۵۲
جدول ۴-۲- داده‌های حجم فاز ته‌نشین شده مربوط به بررسی اثر نوع حلال استخراج‌کننده ۵۳
جدول ۴-۳- بررسی اثر نوع حلال استخراج‌کننده بر راندمان استخراج. ۵۴
جدول ۴-۴- داده‌های حجم فاز ته‌نشین شده مربوط به بررسی اثر نوع حلال پخشی. ۵۵
جدول ۴-۵- بررسی اثر نوع حلال پاشنده بر راندمان استخراج. ۵۵
جدول ۴-۶- بررسی اثر حجم حلال استخراج‌کننده بر راندمان استخراج. ۵۷
جدول ۴-۷- داده‌های حجم فاز ته‌نشین شده مربوط به بررسی اثر حجم حلال استخراج‌کننده. ۵۷
جدول ۴-۸- بررسی اثر حجم حلال پاشنده بر راندمان استخراج. ۵۸
جدول ۴-۹- داده‌های حجم فاز ته‌نشین شده مربوط به بررسی اثر حجم حلال پاشنده. ۵۹
جدول ۴-۱۰- داده‌های حجم فاز ته‌نشین شده مربوط به بررسی اثر غلظت سدیم هیدروکسید. ۵۹
جدول ۴-۱۱- بررسی اثر غلظت سدیم هیدروکسید در محلول نمونه بر راندمان استخراج. ۶۰
جدول ۴-۱۲- بررسی اثر افزایش نمک در محلول نمونه بر راندمان استخراج. ۶۱
جدول ۴-۱۳- داده‌های حجم فاز ته‌نشین شده مربوط به بررسی اثر افزایش نمک. ۶۱
جدول ۴-۱۴- ضرایب تقسیم اکتانول-آب داروهای مخدر. ۶۲
جدول ۴-۱۵- فاکتور غنی‌سازی، درصد انحراف استاندارد نسبی در یک روز و بین روزها و حد تشخیص روش. ۶۳
جدول ۴-۱۶- مربع ضریب همبستگی، معادله خطوط نمودار کالیبراسیون و محدوده خطی روش. ۶۳
جدول ۴-۱۷- درصد بازیابی برای افزایش استاندارد در نمونه پلاسمای انسان. ۶۶
جدول ۴-۱۸- درصد بازیابی و درصد انحراف استاندارد نسبی برای افزایش استاندارد در نمونه ادرار انسان. ۶۶
جدول ۴-۱۹- بررسی اثر نوع حلال آلی بر راندمان استخراج. ۶۹
جدول ۴-۲۰- بررسی اثر غلظت سدیم هیدروکسید بر راندمان استخراج. ۷۰
جدول ۴-۲۱- بررسی اثر غلظت سولفوریک اسید در محلول پذیرنده بر راندمان استخراج. ۷۰
جدول ۴-۲۲- بررسی اثر افزایش نمک بر راندمان استخراج. ۷۱
جدول ۴-۲۳- بررسی اثر سرعت همزدن محلول نمونه بر راندمان استخراج. ۷۲
جدول ۴-۲۴- بررسی اثر دمای محلول نمونه بر راندمان استخراج. ۷۳
جدول ۴-۲۵- بررسی اثر زمان استخراج بر راندمان استخراج. ۷۴
جدول ۴-۲۶- فاکتور غنی‌سازی، درصد انحراف استاندارد نسبی در یک روز و بین روزها و حد تشخیص روش. ۷۶
جدول ۴-۲۷- مربع ضریب همبستگی، معادله خطوط نمودار کالیبراسیون و محدوده خطی روش. ۷۶
جدول ۴-۲۸- درصد بازیابی براساس رسوب‌دهی پروتئین پلاسما با حلال‌های مختلف. ۷۹

جدول ۴-۲۹- درصد بازیابی، درصد انحراف استاندارد نسبی، معادله خط و مربع ضریب همبستگی برای افزایش استاندارد در نمونه پلاسمای انسان..... ۸۰
جدول ۴-۳۰- درصد بازیابی، درصد انحراف استاندارد نسبی، معادله خط و مربع ضریب همبستگی برای افزایش استاندارد در نمونه ادرار انسان. ۸۰
جدول ۴-۳۱- مقایسه روش‌های ریزاستخراج مایع- مایع پخشی و ریزاستخراج فاز مایع با فیبر توخالی. ۸۴

چکیده

مصرف عمده مخدرها در پزشکی، به منظور کاهش دردهای مزمن و شدید پس از عمل جراحی و یا در بیماران سرطانی می‌باشد. تعیین مقادیر داروهای مخدر در نمونه‌های بیولوژیکی از نظر پزشکی اهمیت فراوانی دارد. در این پروژه تحقیقاتی از تکنیک ریزاستخراج مایع- مایع پخشی و ریزاستخراج فاز مایع با فیبر تو خالی به همراه سیستم کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالابا آشکارساز آرایه دیودی برای استخراج واندازه‌گیری همزمان سه داروی مخدر (آلفنتانیل، فنتانیل و سوفنتانیل) از نمونه‌های بیولوژیکی استفاده شد.

استخراج با روش ریزاستخراج مایع- مایع پخشی، توسط افزایش ۲۰۰۰ میکرولیتر محلول پخشی با نسبت ۱۸۳۸ میکرولیتر متانول به ۱۶۲ میکرولیتر حلال استخراج‌کننده (کلروفرم)، به ۵ میلی‌لیتر محلول نمونه آبی توسط یک سرنگ ۲/۵ میلی‌لیتری گازبندی شده انجام گرفت. پس ازسانتریفوژ با سرعت ۳۵۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۵ دقیقه، فاز آلی ته‌نشین شده به طور کامل توسط یک سرنگ ۱۰۰ میکرولیتری به درون یک لوله شیشه‌ای کوچک دیگر با انتهای مخروطی شکل منتقل گردید و با جریان ملایمی از گاز نیتروژن تبخیر شد. سپس ۱۲/۵ میکرولیتر از مخلوط استونیتریل- آب با نسبت حجمی ۵۰:۵۰ به باقیمانده موجود در لوله اضافه و ۱۱ میکرولیتر از آن به سیستم کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا تزریق گردید. پارامترهای مؤثر بر ریزاستخراج مایع- مایع پخشی شامل نوع حلال استخراج‌کننده و پاشنده، حجم حلال استخراج‌کننده و پاشنده، غلظت سدیم‌هیدروکسید در محلول نمونه و مقدار افزایش نمک مورد مطالعه قرار گرفتند. بهترین راندمان استخراج با حلال استخراج‌کننده کلروفرم، حلال پاشنده متانول، حجم حلال استخراجی ۱۶۲ میکرولیتر، حجم حلال پاشنده ۱۸۳۸ میکرولیتر، سدیم هیدروکسید با غلظت ۰/۰۵ مولار و بدون افزایش نمک در نمونه آبی بدست آمد. در این روش درصد انحراف استاندارد نسبی در یک روز بین ۱/۲ تا ۳/۰ و بین روزها ۱۴/۲ تا ۱۵/۹ درصد و حدتشخیص بین ۰/۴ تا ۱/۹ میکروگرم بر لیتر بدست آمد. فاکتور غنی‌سازی و مربع ضریب همبستگی برای ترکیبات به ترتیب در محدوده ۲۷۵-۳۲۵ و ۰/۹۹۸۰-۰/۹۹۸۴ قرار دارد. در نهایت از این روش برای آنالیز نمونه‌های حقیقی پلاسما و ادرار انسان استفاده شد.

برای استخراج با روش ریزاستخراج فاز مایع با فیبر توخالی، ابتدا فاز آلی در منافذ فیبر متخلخل پلی‌پروپیلنی به طول ۳/۵ سانتی‌متر به حالت اشباع در آمده، درحالی‌که حجم داخلی فیبر توخالی توسط محلول سولفوریک‌اسید به عنوان محلول پذیرنده پرشده بود. فیبر به داخل ۵ میلی‌لیتر از نمونه‌ی آبی با pH قلیایی غوطه‌ور شده و آنالیت‌ها به داخل فاز پذیرنده استخراج گردیدند. پارامترهای مؤثر بر استخراج سه-فازی شامل نوع حلال آلی، غلظت سدیم‌هیدروکسید در محلول نمونه، غلظت سولفوریک اسید در محلول پذیرنده، مقدار افزایش نمک، سرعت همزدن محلول نمونه، دمای استخراج و زمان استخراج مورد مطالعه قرار گرفتند. بهترین راندمان استخراج با حلال ایزوآمیل‌بنزوات، غلظت ۰/۵ مولار هیدروکسید سدیم در محلول نمونه، غلظت ۰/۰۵ مولار از سولفوریک اسید به‌عنوان فاز پذیرنده، سرعت همزدن ۱۲۰۰ دور در دقیقه، مدت زمان استخراج ۲۰ دقیقه در دمای ۴۵ درجه سانتیگراد و بدون افزایش نمک به محلول نمونه بدست آمد. در این روش درصد انحراف استاندارد نسبی در یک روز بین ۲/۰ تا ۴/۱ درصد و بین روزها ۳/۳ تا ۱۰/۱ درصد و حدتشخیص در محدوده ۱/۱ تا ۲/۳ میکروگرم بر لیتر بدست آمد. فاکتور غنی‌سازی و مربع ضریب همبستگی برای ترکیبات به ترتیب در محدوده ۱۹۰-۲۳۷ و ۰/۹۹۷۱-۰/۹۹۸۱ قرار دارد. در نهایت از این روش برای آنالیز نمونه‌های حقیقی پلاسما و ادرار انسان استفاده شد.

کلمات کلیدی: ریزاستخراج مایع- مایع پخشی، ریزاستخراج فاز مایع با فیبر تو خالی، کروماتوگرافی مایع، داروهای مخدر، نمونه‌های بیولوژیکی.

فصل اول
استخراج و آماده‌سازی نمونه

مقدمه

مخدرها سالهاست به منظور کاهش دردهای مزمن و شدید پس از عمل جراحی و یا در بیماران سرطانی مورد استفاده قرار می‌گیرند. فنتانیل، آلفنتانیل و سوفنتانیل مخدرهای سنتزی با قدرت قابل توجهی می‌باشند که از این داروهای مخدر در دزهای[1] پایین استفاده می‌شود. این داروها دارای اثرات مشابه با سایر مخدرها می‌باشند و در دزهای مصرفی بالا موجب اختلالات هوشیاری، تنگی‌نفس و در نهایت کما و مرگ می‌شوند. از آنجا که غلظت مجاز این داروها در حد ۵۰-۲ میکروگرم در لیتر خون می‌باشد، اندازه‌گیری آنها در نمونه‌های بیولوژیکی، به دلیل غلظت کم مصرفی آن‌ها مشکل می‌باشد [۲,۱].

معمولاً به دلیل غلظت کم داروهای مخدر و مزاحمت‌های زیاد موجود در بافت[2] نمونه‌های بیولوژیکی مانند پلاسما، ادرار و ... لازم است قبل از آنالیز توسط دستگاه‌های تجزیه‌ای، پیش‌تغلیظ[3] و پاکسازی[4] روی نمونه‌های حقیقی انجام شود [۳]. بدین منظور روش‌های گوناگونی برای آماده‌سازی نمونه‌ها توسعه یافته‌اند که با توجه به پیچیدگی و ماهیت بافت نمونه، نوع گونه مورد آنالیز[5] و تکنیک دستگاهی مورد استفاده می‌توان آن‌ها را به کار برد [۴].

---

1 - Doses

2 - Matrix

3 - Preconcentration

4 - Clean-up

5 - Analyte

قسمت عمده‌ای از زمان آنالیز صرف آماده‌سازی نمونه می‌شود، بنابراین ضرورت بهبود تکنیک‌های آماده‌سازی نمونه بیش از پیش احساس می‌شود. بررسی‌ها نشان می‌دهد که بیش از ۶۰ درصد زمان آنالیز صرف آماده‌سازی نمونه می‌شود، در حالی‌که تنها ۷ درصد این زمان عملاً صرف اندازه‌گیری اجزای نمونه می‌گردد. بقیه این زمان صرف جمع‌آوری نمونه و بررسی اطلاعات گردآوری شده می‌شود [۵].

۱-۱- انتخاب و ارزیابی روش‌های جداسازی

مفهوم پایه برای آماده‌سازی نمونه تبدیل یک بافت حقیقی به شکلی است که برای آنالیز توسط تکنیک‌های تجزیه‌ای مناسب باشد. برای جداسازی کامل و مطمئن یک جزء از یک مخلوط، باید یک روش جداسازی کارآمد و گزینش‌پذیر را انتخاب کرد. این موضوع در جلوگیری از خطا و اشتباه، هدر رفتن هزینه، امکانات و زمان از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. مرحله آماده‌سازی نمونه در فرایندهای تجزیه‌ای شامل یک فرایند استخراج می‌باشد که برای جداسازی و تغلیظ ترکیبات مورد نظر از بافت نمونه به کار می‌رود. استخراج می‌تواند در درجه گزینش‌پذیری، سرعت و راحتی متفاوت باشد.

اهداف آماده‌سازی نمونه شامل رفع و حذف مزاحمت‌های پنهان (برای مرحله جداسازی یا تشخیص) از نمونه و به موجب آن افزایش گزینش‌پذیری روش، افزایش غلظت گونه مورد نظر و بنابراین افزایش حساسیت روش، در صورت نیاز تبدیل گونه مورد نظر به شکل مفیدتر برای مرحله جداسازی یا تشخیص و انجام یک روش تکرارپذیر که مستقل از ناپایداری‌های بافت نمونه باشد [۷,۶].

پیش‌تغلیظ و جداسازی را می‌توان با استفاده از روش‌های مختلف انجام داد که هر یک از این روش‌ها با توجه به عملکردشان در یکی از چهار گروه زیر دسته‌بندی می‌شوند.

الف) روش‌هایی که هدف از آنها آزادسازی گونه از بافت نمونه بیولوژیکی است که شامل هیدرولیز با اسید، باز یا آنزیم می‌باشد.

ب) روش‌هایی همچون کریستالیزاسیون[1]، استخراج مایع- مایع[2] (LLE) و استخراج با فاز جامد[3] (SPE) که شامل استخراج ترکیبات از درون محلول هستند.

ج) روش‌هایی برای ایجاد تغییر در مایع شامل رقیق‌سازی، تبخیر، انحلال، صاف‌کردن و ... .

د) روش‌هایی برای افزایش گزینش‌پذیری و حساسیت آنالیز مثل انجام مشتق‌سازی قبل و بعد از ستون [۸].

۱-۲- روش‌های متداول استخراج

روش‌های استخراج گوناگونی برای آماده‌سازی نمونه قبل از جداسازی و اندازه‌گیری توسعه یافته‌اند. از جمله مهم‌ترین این روش‌ها می‌توان به استخراج مایع- مایع، استخراج با فاز جامد و انواع روش‌های ریزاستخراج که در سال‌های اخیر توسعه یافته‌اند اشاره نمود. هدف اصلی این روش‌ها عموماً پیش‌تغلیظ و پاکسازی نمونه می‌باشد [۵].

---

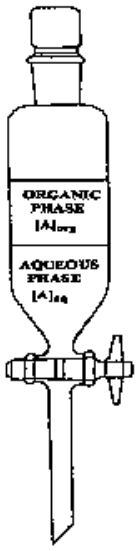
1 - Crystallization

2 - Liquid–Liquid Extraction

3 - Solid–Phase Extraction

۱-۲-۱- استخراج مایع- مایع (LLE)

استخراج مایع- مایع روشی برای جداسازی آنالیت از مزاحمت‌های بافت نمونه بوسیله انتقال گزینش‌پذیر یک یا چند ترکیب از یک مایع (معمولاً آب) به یک مایع غیرقابل‌امتزاج دیگر (حلال آلی) می‌باشد. معمولاً استخراج مایع- مایع تجزیه‌ای در یک قیف جداکننده انجام می‌شود (شکل ۱-۱).



شکل ۱-۱- قیف جداکننده برای استخراج مایع- مایع [۹].

ابتدا pH محلول نمونه به گونه‌ای تنظیم می‌شود که گونه مورد آنالیز به شکل مولکولی خود تبدیل شده، سپس این محلول چندین مرتبه با حلال آلی غیرقابل‌امتزاج با آب مخلوط و به شدت هم‌زده می‌شود تا یک امولسیون موقتی تشکیل شود. مساحت سطح تماس بین دو فاز باید به قدر کافی زیاد باشد تا انتقال جرم مواد حل شده مورد نظر از یک فاز به فاز دیگر سریع‌تر انجام شود. سپس امولسیون تشکیل شده باید شکسته شود و دو مایع به گونه‌ای با هم درآمیزند که دو فاز مایع پیوسته اما غیرقابل‌امتزاج تشکیل شود. یک مشکل عملی در استخراج مایع- مایع این است که بعضی مواقع امولسیون‌ها بسیار آهسته یا به طور ناقص می‌شکنند. هنگامی که دیگر امولسیونی وجود ندارد، بوسیله باز کردن شیر قیف جداکننده مایع پائینی تخلیه می‌شود. در نهایت مواد آبدوست بافت نمونه ترجیح می‌دهند در فاز آبی بمانند ولی ترکیبات آبگریز به فاز آلی منتقل می‌شوند. فاز آلی جمع‌آوری شده را می‌توان توسط تبخیر فاز آلی را تغلیظ نمود.

در مواقعی که آنالیز شیمیایی ماده حل شده بطور مستقیم در مایع آلی قابل انجام نباشد و یا مزاحمت‌ها نیز به درون فاز آلی انتقال یافته باشند، انجام استخراج برگشتی ضرورت پیدا می‌کند [۹,۵].

۱-۲-۱-الف- تئوری استخراج مایع- مایع

براساس خواص ترکیبات و چگونگی برهم‌کنش آنها با هر فاز و با این فرض که سیستم اشباع نشده است، هر گونه‌ای با یک نسبت معین و ثابت بین دو فاز تقسیم می‌شود. استخراج یک ماده حل شده به وسیله قانون توزیع

نرنست، که بیانگر توزیع یک ماده بین دو مایع امتزاج‌ناپذیر با نسبت‌های یکسان در حال تعادل است تعیین می‌گردد. بنابراین برای گونه حل شونده A که بین یک حلال آلی و آبی توزیع می‌گردد ضریب توزیع به صورت زیر تعریف می‌شود.

$$K_D = \frac{[A]_o}{[A]_a} \qquad (۱-۱)$$

$[A]_a$ و $[A]_o$ به ترتیب غلظت تعادلی A در فاز آبی و آلی و K_D ضریب توزیع می‌باشد که مستقل از غلظت کل ماده حل شونده است. باید دقت شود که دما و فشار ثابت فرض شده و A باید در هر دو فاز دقیقاً به یک شکل وجود داشته باشد.

هنگامی که گونه حل شونده بطور جزیی تفکیک شود و به اشکال مختلف مانند گونه خنثی، یون‌های آزاد و یا به صورت جفت‌یون با یون مخالف خود وجود داشته باشد مقدار K_D منعکس کننده توزیع کلی گونه حل شده بین دو فاز نیست در این صورت فرایند استخراج بوسیله کمیت نسبت توزیع D مورد بحث قرار می‌گیرد:

$$D = \frac{(C_A)_{org}}{(C_A)_{aq}} \qquad (۲-۱)$$

که $(C_A)_{org}$ و $(C_A)_{aq}$ به ترتیب نشان دهنده غلظت کل گونه A در تمام اشکال در فاز آلی و آبی می‌باشند. اگر برای گونه A هیچ واکنشی در دو فاز رخ ندهد آنگاه $D = K_D$ خواهد بود. اگر مقدار D و حجم‌های هر فاز مشخص باشد درصد استخراج[1] با رابطه زیر بیان می‌شود:

$$\%E = \frac{100D}{D + V_{aq} / V_{org}} \qquad (۳-۱)$$

که V_{aq} و V_{org} به ترتیب حجم‌های فاز آبی و آلی می‌باشند. طبق معادله (۱-۳) با کاهش نسبت $\frac{V_{aq}}{V_{org}}$ (برای مثال با افزایش حجم فاز آلی) درصد استخراج افزایش می‌یابد.

با استفاده از معادله زیر می‌توان مقدار گونه باقیمانده در فاز آبی را برای هر بار استخراج با حجم‌های مساوی از فاز آلی محاسبه کرد:

$$X_n = A\left(\frac{V_{aq}}{DV_{org} + V_{aq}}\right)^n \qquad (۴-۱)$$

که X_n غلظت گونه باقیمانده در فاز آبی بعد از n بار استخراج با حجم‌های V_{org} از فاز آلی است و A غلظت اولیه ماده در فاز آبی است. بنابراین واضح است که انجام چندین استخراج با حجم‌های کم از محلول آلی، نسبت به یک استخراج با حجم زیاد، از کارایی بیشتری برخودار است [۸,۱۰-۱۲].

۱-۲-۱-ب- کاربرد استخراج مایع- مایع

وسیع‌ترین کاربرد این روش در اندازه‌گیری فلزات با مقادیر کم در مواد معدنی و آلی فلزی گوناگون است. برای مثال، استخراج گزینش‌پذیر و اندازه‌گیری طیف‌سنجی فلزات به صورت کمپلکس‌های رنگی در تجزیه نمونه‌های

1 - Extraction Percent

زمین‌شناسی، فلزشناسی، محصولات نفتی، مواد غذایی، بافت‌های گیاهی، جانوری و مایعات بدن را می‌توان نام برد. شیوه‌های استخراج برای گونه‌های آلی خالص، گزینش‌پذیری سیستم‌های شامل فلزات را ندارد، که به علت عدم وجود عامل کمپکس‌کننده و واکنش‌های استتار مناسب برای گونه‌های آلی می‌باشد. با این وجود، گروهی از ترکیبات نظیر هیدروکربن‌ها، اسیدها، چربی‌ها، موم‌ها و ... را می‌توان قبل از تجزیه توسط سایر روش‌ها، جداسازی نمود [۱۲].

استخراج مایع- مایع به دلیل سادگی و عدم نیاز به دستگاه‌های گران‌قیمت و پیچیده، کاربرد فراوانی در پیش-تغلیظ، استخراج و آنالیز نمونه‌های زیست‌محیطی دارد که با انتخاب حلال آلی مناسب و تنظیم pH، استخراج تمیز با گزینش‌پذیری خوب برای گونه مورد آنالیز می‌توان بدست آورد. البته این روش با وجود کاربردهای فراوان دارای معایبی نظیر، زمان انجام فرایند استخراج طولانی،نیاز به چندین مرحله آماده‌سازی و استخراج (که آلودگی و از دست رفتن نمونه در هر مرحله را به دنبال دارد)، نیاز به حجم زیاد از نمونه (حداقل ۰/۵-۱ میلی‌لیتر)، حجم زیاد حلال آلی مورد استفاده و در نتیجه تبخیر زیاد حلال و دور ریختن حلال‌های گران‌قیمت و سمی و اغلب قابل‌اشتعال می‌باشد. بعضی مواقع تشکیل امولسیون نیز مسئله‌ساز است زیرا ممکن است به سادگی برطرف نشود، خودکار کردن این روش نیز بسیار مشکل می‌باشد و در مجموع زمان و هزینه آنالیزها بالاست [۸,۴]. با توسعه روش‌های جدید استخراج که با مصرف کمتر حلال و زمان کوتاه همراه است، کاربرد استخراج مایع- مایع در کارهای تجزیه‌ای محدود شده است.

۱-۲-۲- استخراج با فاز جامد (SPE)

در گذشته استخراج مایع- مایع در حذف مزاحمت‌ها و تغلیظ گونه‌ی مورد آنالیز نقش عمده‌ای داشت، اما بازیابی اجزای نمونه بوسیله استخراج مایع به ندرت به طور کامل صورت می‌گیرد و مستلزم کار زیادی است، نگرانی‌های زیست محیطی نیز به کارگیری و دفع مقادیر زیادی از حلال‌های آلی را مشکل‌تر نموده است. استخراج با فاز جامد در سال ۱۹۷۰ برای حذف و یا حداقل کردن مشکلات استخراج مایع- مایع معرفی شد [۴].

در استخراج با فاز جامد، گونه‌های مورد آنالیز از یک فاز مایع به درون یک فاز جامد استخراج می‌شوند. معمولاً فاز جامد شامل ذرات کوچک و متخلخل سیلیکا می‌باشد که به یک فاز آلی یا یک پلیمر آلی پیوند داده شده‌اند. در این روش ماده استخراج‌کننده را در یک لوله کوچک انباشته می‌کنند و نمونه را از درون این لوله عبور می‌دهند. استخراج فاز جامد، تنها به کاربرد ذرات جامد برای استخراج مواد حل شده از نمونه‌های مایع محدود نمی‌شود. هوا یا دیگر نمونه‌های گازی را نیز می‌توان به منظور استخراج بخارات آلی یا دیگر موادی که در آن نمونه وجود دارند از یک ستون انباشته عبور داد. موادی که بوسیله ذرات جامد استخراج می‌شوند را می‌توان با شستشو توسط یک حلال مناسب جدا نمود. معمولاً حجم حلال مورد نیاز برای شویش کامل گونه‌های مورد آنالیز بسیار کمتر از حجم نمونه اصلی می‌باشد، به این ترتیب یک محلول تغلیظ شده‌ای از گونه مورد نظر به دست می‌آید.

انواع روش‌های استخراج با فاز جامد شامل استخراج به روش فاز برگشتی، فاز طبیعی و روش تبادل یونی می‌باشد.