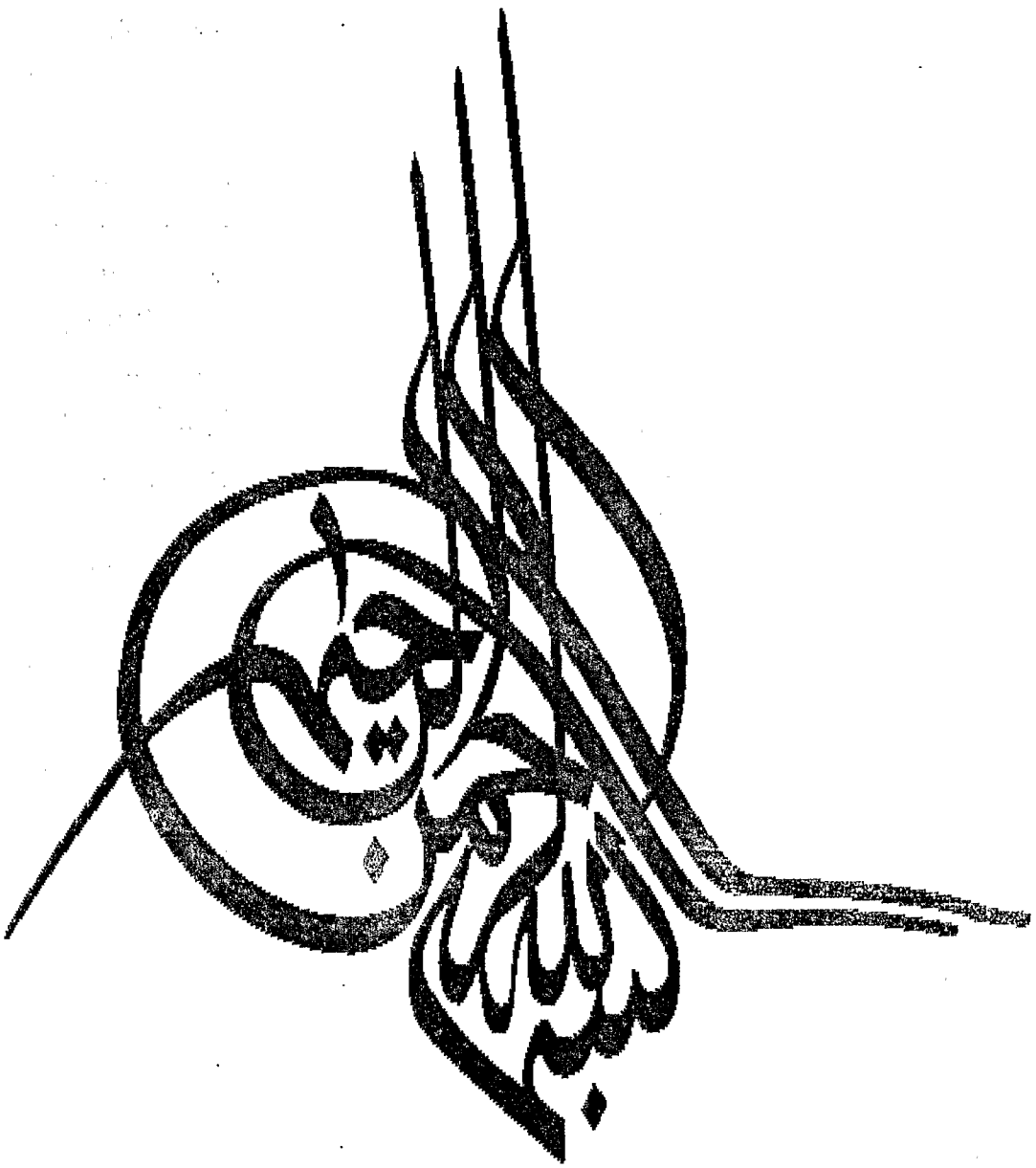


١١٠٤٤٨

۸۷/۱/۱۰۷۱۲
۸۸/۱۲۴

دانشگاه یاسوج

دانشکده علوم

گروه شیمی

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته‌ی شیمی گرایش تجزیه

جداسازی و تعیین مقدار هم‌زمان ویتامین‌های محلول در چربی به روش کروماتوگرافی مایع میکروامولسیونی

استاد راهنما:

دکتر فریبرز مومن‌بیک

استاد مشاور:

دکتر سیاوش ریاحی

پژوهشگر:

مصطفی روستا

۱۳۸۸/۱/۲۱

شهریور ماه ۱۳۸۷

۱۱۰۴۴۸

صورت جلسه دفاع از پایان‌نامه کارشناسی ارشد

پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته‌ی شیمی گرایش تجزیه آقای مصطفی روستا
تحت عنوان

جداسازی و تعیین مقدار همزمان ویتامین‌های محلول در چربی به روش کروماتوگرافی مایع میکروامولسیونی

در تاریخ ۱۳۸۷/۶/۳۰ توسط هیأت داوران زیر بررسی و با درجه عالی به تصویب نهایی رسید.

۱ـ استاد راهنمای پایان‌نامه	دکتر فریبرز مومن بیک	با مرتبه علمی استادیار	امضا
۲ـ استاد مشاور پایان‌نامه	دکتر سیاوش ریاحی	با مرتبه علمی استادیار	امضا
۳ـ استاد داور داخل گروه	دکتر حبیبا... خواجه‌شریفی	با مرتبه علمی استادیار	امضا
۴ـ استاد داور خارج از گروه	دکتر رضا تبارکی	با مرتبه علمی استادیار	امضا

امضای مدیر گروه
دکتر مهدی خیرمند

تقدیم به:

مادر مهربان و روان پاک پدرم

و به سلاله پاک حق گرایان

به نام خداوند بخشنده مهربان

سپاس بی‌انتها پروردگار بی‌همتا را سزاست که حمد را کلید یاد خودش و سبب فزونی فضل و رحمت خود و راهنمای نعمت‌ها و عظمتش قرار داده است.

بعد از ستایش خدای سبحان، درود بیکران خود را تقدیم خانواده‌ام می‌کنم که با پایه‌گذاری زیربنای فکریم مرا در امر تحصیل علم و دانش یاری کردند.

در کمال منت و فروتنی، از استاد بزرگوار و فرزانه‌ام جناب آقای دکتر فریبرز مومن بیک در سمت استاد راهمنا که با راهنمایی‌های عالمانه‌شان روشنگر راه علم و ادب آموزی بوده‌اند خالصانه تشکر و قدردانی می‌کنم.

از استاد ارجمند جناب آقای دکتر سیاوش ریاحی که مشاوره این پژوهش را به عهده داشتند صمیمانه تشکر و قدردانی می‌کنم. با نهایت احترام، از اساتید گرامی جناب آقای دکتر حبیبا... خواجه شریفی در سمت داور داخل گروه و همچنین جناب آقای دکتر رضا تبارکی در سمت داور خارج که در پربارتر شدن این پژوهش مرا راهنمایی نمودند تشکر می‌کنم. از نماینده محترم تحصیلات تکمیلی آقای دکتر بهروز واثقی تشکر می‌نمایم. همچنین از جناب آقای مهندس علی اکبر نیکوکار بخاطر همکاری و زحمات بیدریغشان در انجام این پژوهش صمیمانه تشکر و قدردانی می‌کنم.

از کلیه اساتید ارجمند، کارکنان و کارشناسان محترم گروه شیمی، حراست محترم دانشگاه، دانشجویان محترم کارشناسی و کارشناسی ارشد و همه دوستان و همراهان عزیزی که در مدت تحصیل مشوق من بودند و مرا یاری نمودند متشکرم و زحمات بیشائبه آن‌ها را ارج می‌نهم.

از خداوند متعال خواستارم تمامی این عزیزان را از علم و دانش بینا کند و مبنای حرکتشان را علم و حق قرار دهد.

مصطفی روستا

شهریور ۱۳۸۷

چکیده

روش‌های مختلفی برای اندازه‌گیری ویتامین‌ها وجود دارد که شامل دو دسته هم‌زمان و غیرهم‌زمان می‌باشند. از آنجا که روش‌های غیر هم‌زمان جهت جداسازی و تعیین مقدار ویتامین‌های محلول در چربی با مشکلات زیادی مثل وقت‌گیر بودن و حساسیت بسیاری از ویتامین‌ها به نور و گرما و احتمال تخریب آن‌ها در طی مراحل آماده‌سازی و جداسازی نمونه همراه است باید روشی ارائه نمود که علاوه بر رفع مشکلات موجود، سرعت، دقت و صحت مناسب را داشته باشد.

کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)، متداول‌ترین روش مورد استفاده برای جداسازی، شناسایی و تعیین مقدار ویتامین‌های محلول در چربی می‌باشد. استفاده از فازهای متحرک میکروامولسیونی در کروماتوگرافی مایع فاز معکوس (RP-LC)، در سال‌های اخیر توسعه یافته است. دلایل این توسعه را می‌توان توانایی این روش برای جداسازی هم‌زمان ترکیبات یونی و غیریونی، امکان تزریق نمونه‌های بیولوژیکی مثل سرم و پلاسما، هزینه پایین، سرعت، دقت، حساسیت بالا و غیر سمی بودن دانست.

هدف از اجرای این تحقیق، استفاده از فاز متحرک میکروامولسیونی جهت ارائه روش آنالیز کیفی و کمی ویتامین‌های محلول در چربی A، D، E، K و α-T با سرعت، دقت و صحت مناسب می‌باشد. فاز متحرک میکروامولسیونی مخلوطی به ظاهر همگن از آب، حلال آلی کمکی، سورفکتانت و ماده آلی روغنی به همراه افزودنی‌های دیگر مثل بافرها می‌باشد.

ابتدا عوامل موثر بر گزینش‌پذیری و کارایی مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور، اثر این عوامل که شامل غلظت سورفکتانت، درصد اصلاح‌گر آلی، درصد ماده آلی روغنی، دما و pH می‌باشد به صورت هم‌زمان با استفاده از روش بهینه‌سازی الگوریتم ژنتیک بهینه شد. در این روش بهینه سازی نیاز به یک تابع برازش بود که برای این منظور تابع پاسخ نمایی کروماتوگرافی اصلاح شده به کار رفت و برای برقراری ارتباط بین این تابع با مقادیر تجربی حاصل از آزمایش‌ها از یکسری ضرایب که با استفاده از روش رگرسیون خطی چندگانه به دست آمدند، استفاده شد. در نهایت با استفاده از برنامه الگوریتم ژنتیک طراحی شده، شرایط بهینه پیش‌بینی و به صورت عملی مورد تست قرار گرفت که ۷۳/۶ میلی‌مولار SDS، ۱۳/۶۴ درصد ۱- بوتانول، ۰/۴۸ درصد ماده آلی روغنی، دمای ۳۲/۵ درجه و pH برابر با ۶/۹۹ به عنوان شرایط بهینه به دست آمدند.

در شرایط بهینه فوق منحنی‌های کالیبراسیون برای هر یک از ویتامین‌ها رسم شد و مقادیر پارامترهای آماری حد تشخیص، درصد بازیابی، تکرارپذیری و دامنه خطی هر یک از آن‌ها محاسبه شد. در پایان، ویتامین‌های موجود در شربت مولتی‌ویتامین و کپسول روغن ماهی اندازه گیری شد. نتایج حاصل با دقت و صحت خوبی با مقادیر گزارش شده توسط شرکت‌های سازنده مطابقت دارند.

فهرست مطالب

فصل اول مقدمه و تئوری ۱
۱-۱- مقدمه ۱
۱-۲- ویتامین ۲
۱-۲-۱- ویتامین A ۳
۱-۲-۱-۱- ساختار و خواص فیزیکوشیمیایی ویتامین A ٤
۱-۲-۱-۲- منابع و اثرات ناشی از کمبود ویتامین A ٤
۱-۲-۲- ویتامین D ٥
۱-۲-۲-۱- ساختار و خواص فیزیکوشیمیایی ویتامین D ٥
۱-۲-۲-۲- منابع و اثرات ناشی از کمبود ویتامین D ٦
۱-۲-۳- ویتامین E ٦
۱-۲-۳-۱- ساختار و خواص فیزیکوشیمیایی ویتامین E ٦
۱-۲-۳-۲- منابع و اثرات ناشی از کمبود ویتامین E ۷
۱-۲-٤- ویتامین K ۷
۱-۲-٤-۱- ساختار و خواص فیزیکوشیمیایی ویتامین K ۷
۱-۲-٤-۲- منابع و اثرات ناشی از ویتامین K ۸
۱-۲-٥- تاریخچه اندازه‌گیری ویتامین‌های محلول در چربی ۸
۱-۳- کروماتوگرافی ۱۰
۱-۳-۱- کروماتوگرافی مایع ۱۰
۱-۳-۲- انواع کروماتوگرافی مایع ۱۱
۱-۳-۲-۱- کروماتوگرافی جذب سطحی ۱۱
۱-۳-۲-۲- کروماتوگرافی تبادل یونی ۱۱
۱-۳-۲-۳- کروماتوگرافی طرد اندازه (یون طردی) ۱۲
۱-۳-۲-٤- کروماتوگرافی توزیعی (تقسیمی) ۱۲
۱-۴- مواد فعال سطحی ۱٤
۱-٤-۱- طبقه‌بندی مواد فعال سطحی ۱٥
۱-٤-۱-۱- مواد فعال کننده سطحی آنیونی ۱٥
۱-٤-۱-۲- مواد فعال کننده سطحی کاتیونی ۱٥
۱-٤-۱-۳- مواد فعال کننده سطحی زوج‌یونی ۱٦
۱-٤-۱-٤- مواد فعال کننده سطحی غیریونی ۱۷
۱-٤-۱-٥- مواد فعال سطحی طبیعی ۱۷

۱-٤-۱-٦- ذرات بسیارریز جامد ۱۷
۱-٤-۱-۷- مواد فعال سطحی بیولوژیکی ۱۸
۱-۵- میکروامولسیون ۱۸
۱-۵-۱- خواص امولسیون ۱۹
۱-۵-۱-۱- نوع امولسیون و هدایت الکتریکی ۱۹
۱-۵-۱-۲- ظاهر امولسیون ۱۹
۱-۵-۱-۳- پایداری امولسیون ۲۰
۱-۵-۱-٤- گرانروی امولسیون ۲۰
۱-۵-۱-۵- توزیع اندازه قطرات در امولسیون ۲۰
۱-۵-۲- فرمول‌بندی امولسیون ۲۱
۱-۵-۲-۱- اجزای تشکیل دهنده امولسیون ۲۱
۱-۵-۲-۲- نوع امولسیون ۲۱
۱-۵-۲-۳- اندازه قطرات ۲۱
۱-۵-۲-٤- انتخاب امولسی‌فایر و چگونگی افزودن آن در سیستم ۲۲
۱-۵-۳- کاربرد میکروامولسیون در شیمی تجزیه ۲۲
۱-۵-۳-۱- میکروامولسیون در استخراج کمپلکس‌های فلزی ۲۲
۱-۵-۳-۲- میکروامولسیون‌ها در استخراج ترکیبات بیولوژیکی ۲۳
۱-۵-۳-۳- میکروامولسیون در HPLC ۲۳
۱-۵-۳-٤- میکروامولسیون در الکتروفورز موئینه(CE) ۲۳
۱-۶- کروماتوگرافی مایع میکروامولسیونی ۲۳
۱-۶-۱- اثر متغیرهای مختلف در جداسازی‌های MELC ۲٤
۱-۶-۱-۱- نوع سورفکتانت و غلظت آن ۲٤
۱-٦-۱-۲- نوع اصلاح‌گر(کمک سورفکتانت) و غلظت آن ۲۵
۱-٦-۱-۳- نوع و غلظت ماده آلی روغنی ۲۵
۱-۶-۱-۴- اثر PH بر کروماتوگرافی مایع میکروامولسیونی ۲٦
۱-٦-۲- مزایای کروماتوگرافی مایع میکروامولسیونی ۲٦
۱-٦-۳- مقایسه کروماتوگرافی مایع میکروامولسیونی با دیگر شیوه‌های جداسازی HPLC ۲۷
۱-٦-٤- تاریخچه کروماتوگرافی مایع میکروامولسیونی ۲۷
۱-۷- روش‌های بهینه‌سازی متغیرها ۲۹

۱-۷-۱- روش تک‌عاملی (یکی در یک زمان) ۲۹
۱-۷-۲- روش چندعاملی ۳۰
۱-۷-۳- بهینه‌سازی به روش الگوریتم ژنتیک ۳۱
۱-۷-۳-۱- ایده اصلی ۳۱
۱-۷-۳-۲- تئوری تکامل تدریجی ۳۲
۱-۷-۳-۳- چگونگی تبدیل تئوری تکامل به تکنیک‌های بهینه‌سازی ۳۳
۱-۷-۳-٤- مراحل اجرای الگوریتم ژنتیک ۳۳
۱-۷-۳-۴-۱- تعیین شکل جواب مسأله برای الگوریتم ژنتیک ۳٤
۱-۷-۳-۴-۲- تعیین جمعیت اولیه ۳٤
۱-۷-۳-۴-۳- تعیین تابع برازش ۳۵
۱-۷-٤- عملگرهای ژنتیک ۳٦
۱-۷-٤-۱- عملگر انتخاب ۳٦
۱-۷-٤-۲- عملگر تولید مثل ۳٦
۱-۷-٤-۳- جهش ۳۷
۱-۷-۵- تفسیر متغیرهای الگوریتم ژنتیک ۳۷
۱-۷-۵-۱- اندازه جمعیت ۳۷
۱-۷-۵-۲- تولید نسل ۳۸
۱-۷-۵-۳- احتمال جهش ۳۸
۱-۷-٦- شرایط خاتمه الگوریتم‌های ژنتیک ۳۸
۱-۷-۷- مقایسه الگوریتم ژنتیک با دیگر روش‌های بهینه‌سازی ۳۹
۱-۷-۸- مزایای روش بهینه‌سازی الگوریتم ژنتیک ۳۹
۱-۷-۹- کاربردهای الگوریتم ژنتیک ٤۰
۱-۷-۱۰- تاریخچه کاربرد الگوریتم ژنتیک در بهینه‌سازی کروماتوگرافی ٤۰
فصل دوم بخش تجربی ٤۱
۲-۱- مواد مصرفی ٤۱
۲-۲- مشخصات دستگاههای مورد استفاده ٤٤
۲-۳- دستگاه کروماتوگرافی HPLC ٤٤
۲-۳-۱- مخزن حلال ٤٤
۲-۳-۲- سیستم‌های پمپ کننده ٤۵
۲-۳-۳- سیستم‌های تزریق نمونه ٤٦

۲-۳-٤- ستون‌های کروماتوگرافی مایع ٤٦
۲-۳-٥- دستگاه تنظیم کننده دما ٤٧
۲-۳-٦- آشکارساز ٤٧
۲-۳-۷- سیستم پردازش پاسخ خروجی از آشکارساز ٤٧
۲-۳-۸- تذکرات لازم جهت حفظ ستون HPLC ٤٧
۲-۴- روش کار ٤٨
۲-٤-۱- تهیه نمونه‌های استاندارد ٤٨
۲-٤-۲- تهیه فاز متحرک ٤٨
۲-٤-۳- انتخاب سورفکتانت، اصلاحگر و ماده آلی روغنی ٤٩
۲-٤-٤- بهینه‌سازی متغیرها ٤٩
۲-٤-٥- منحنی کالیبراسیون ٥٣
۲-٤-٦- آماده‌سازی نمونه حقیقی ٥٣
فصل سوم بحث و نتیجه گیری ٥٤
۳-۱- انتخاب حلال آلی روغنی مناسب ٥٤
۳-۲- بهینه‌سازی هم‌زمان متغیرهای موثر در جداسازی ٥٧
۳-۲-۱- نتایج آماری با استفاده از رگرسیون خطی چندگانه(MLR) ٦٢
۳-۳- الگوریتم ژنتیک برای بهینه‌سازی متغیرها ٦٦
۳-۴- منحنی کالیبراسیون ۷۱
۳-٥- تکرارپذیری ۷۳
۳-۶- دامنه خطی ۷٤
۳-۷- حد تشخیص ۷٤
۳-۸- صحت ۷٥
۳-۹- نمونه حقیقی ۷٥
۳-۱۰- نتیجه گیری ۷۸
مراجع ۷۹

شکل ۱-۱- ساختار ترانس رتینول (ویتامین A)..... ٤
شکل ۱-۲- (الف) ساختار ارگوکلیسفرول (ویتامین D2) و (ب) کلوکلیسفرول (ویتامین D3)..... ٥
شکل۱-۳- ساختار ویتامین E..... ٦
شکل ۱-۴- (الف) ساختار فیلوکینون (ویتامین K_1) و(ب) منوکینون (ویتامین K_2)..... ٨
شکل ۱-۵- الف) میکروامولسیون آب در روغن و ب) میکروامولسیون روغن در آب..... ۱۹
شکل ۲-۱- ساختمان شیمیایی ویتامین‌های محلول در چربی..... ٤٢
شکل ۲-۲- شمایی از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا..... ٤٥
شکل ۳-۱- کروماتوگرام مخلوط ویتامین‌ها در شرایط فاز متحرک تهیه شده از ۵۰ میلی مولار SDS، ۱۰% حجمی ۱- بوتانول، ۰/۰۱ مولار بافر فسفات با PH برابر با ۶/۷۳ و ۱٪ حجمی سیکلو هگزان ، سرعت جریان فاز متحرک ۰/۹ میلی‌لیتر بر دقیقه، حجم تزریقی ML ۵، آشکار سازUV در طول موج ۲۸۵ نانومتر، ستون: C8 µM ۵ با ابعاد MM ۴/۶×۱۵۰، (۱) ویتامین D، (۲) A توکوفرول، (۳) ویتامین E، (۴) ویتامین K و (۵) ویتامین(A)..... ٥٥
شکل ۳-۲- کروماتوگرام مخلوط ویتامین‌ها در شرایط فاز متحرک تهیه شده از ۵۰ میلی مولار SDS، ۱۰٪ حجمی ۱- بوتانول، ۰/۰۱ مولار بافر فسفات با PH برابر با ۶/۷۳ و ۱٪ حجمی سیکلوهگزانول، سرعت جریان فاز متحرک ۰/۹ میلی‌لیتر بر دقیقه، حجم تزریقی ML ۵، آشکار سازUV در طول موج ۲۸۵ نانومتر، ستون: C8 µM ۵ با ابعاد MM ۴/۶×۱۵۰، (۱) ویتامین D، (۲) A توکوفرول، (۳) ویتامین E، (۴) ویتامین K و (۵) ویتامین(A)..... ٥٥
شکل ۳-۳- کروماتوگرام مخلوط ویتامین‌ها در شرایط فاز متحرک تهیه شده از ۵۰ میلی مولار SDS، ۱۰٪ حجمی ۱- بوتانول، ۰/۰۱ مولار بافر فسفات با PH برابر با ۶/۷۳ و ۱٪ حجمی هپتانول. سایر شرایط مشابه شکل ۳-۲..... ٥٦
شکل ۳-۴- کروماتوگرام مخلوط ویتامین‌ها در شرایط فاز متحرک تهیه شده از ۵۰ میلی مولار SDS، ۱۰٪ حجمی ۱- بوتانول، ۰/۰۱ مولار بافر فسفات با PH برابر با ۶/۷۳ و ۱٪ حجمی ایزوپروپیل‌اتر. سایر شرایط مشابه شکل ۳-۲..... ٥٦
شکل ۳-۵- کروماتوگرام مخلوط ویتامین‌ها در شرایط فاز متحرک تهیه شده از ۵۰ میلی مولار SDS، ۱۰٪ حجمی ۱- بوتانول، ۰/۰۱ مولار بافر فسفات با PH برابر با ۶/۷۳ و ۱٪ حجمی دی‌اتیل اتر. سایر شرایط مشابه شکل ۳-۲..... ٥٦
شکل ۳-۶- نمودار مقادیر MCEF بر حسب آزمایش‌ها..... ٦٠
شکل ۳-۷- کروماتوگرام مخلوط ویتامین‌ها در شرایط آزمایش ۱. فاز متحرک تهیه شده از ۵۰ میلی مولار SDS، ۹٪ حجمی ۱- بوتانول، ۰/۰۱ مولار بافر فسفات با PH برابر با ۳/۰ و ۰٪ حجمی دی اتیل اتر. دما ۴۰ درجه سانتیگراد. سایر شرایط مشابه شکل ۳-۲..... ٦٠

شکل ۳-۸- کروماتوگرام مخلوط ویتامین‌ها در شرایط آزمایش ۹. فاز متحرک تهیه شده از ۵۰ میلی مولار SDS، ۹٪ حجمی ۱- بوتانول، ۰/۰۱ مولار بافر فسفات با PH برابر با ۷/۰ و ۰٪ حجمی دی اتیل اتر. دما ۳۰ درجه سانتیگراد. سایر شرایط مشابه شکل ۳-۲ ..... ۶۱
شکل ۳-۹- کروماتوگرام مخلوط ویتامین‌ها در شرایط آزمایش ۳۰. فاز متحرک تهیه شده از ۷۵ میلی مولار SDS، ۱۲٪ حجمی ۱- بوتانول، ۰/۰۱ مولار بافر فسفات با PH برابر با ۷/۰ و ۰/۵٪ حجمی دی اتیل اتر. دما ۳۵ درجه سانتیگراد. سایر شرایط مشابه شکل ۳-۲ ..... ۶۱
شکل ۳-۱۰- کروماتوگرام مخلوط ویتامین‌ها در شرایط آزمایش ۱۹. فاز متحرک تهیه شده از ۷۵ میلی مولار SDS، ۱۲٪ حجمی ۱- بوتانول، ۰/۰۱ مولار بافر فسفات با PH برابر با ۵/۰ و ۰/۵٪ حجمی دی اتیل اتر. دما ۳۵ درجه سانتیگراد. سایر شرایط مشابه شکل ۳-۲ ..... ۶۲
شکل ۳-۱۱- نمودار جاری الگوی کار الگوریتم ژنتیک ۶۶
شکل ۳-۱۲- شمایی از برنامه الگوریتم ژنتیک طراحی شده MLR-GA ۶۸
شکل ۳-۱۳- شمایی از پاسخ‌های به دست آمده حاصل از MLR-GA ۶۹
شکل ۳-۱۴- مقادیر کمینه تابع برازش در برابر تعداد تولید نسل در بهینه‌سازی MLR-GA ۷۰
شکل ۳-۱۵- کروماتوگرام مخلوط ویتامین‌ها در شرایط بهینه. فاز متحرک تهیه شده از ۷۳/۶ میلی مولار SDS، ۱۶/۶۳٪ حجمی ۱- بوتانول، ۰/۰۱ مولار بافر فسفات با PH برابر با ۶/۹۹ و ۰/۴۸٪ حجمی دی اتیل اتر. دما ۳۲/۵ درجه سانتیگراد. سایر شرایط مشابه شکل ۳-۲ ..... ۷۱
شکل ۳-۱۶- منحنی کالیبراسیون ویتامین D ۷۱
شکل ۳-۱۷- منحنی کالیبراسیون آلفا توکوفرول ۷۲
شکل ۳-۱۸- منحنی کالیبراسیون ویتامین E ۷۲
شکل ۳-۱۹- منحنی کالیبراسیون ویتامین K ۷۲
شکل ۳-۲۰- منحنی کالیبراسیون ویتامین A ۷۳
شکل ۳-۲۱- باقیمانده‌های Y روی یک خط ۷۴
شکل ۳-۲۲- کروماتوگرام مخلوط ویتامین‌ها در شربت مولتی ویتامین با تزریق مستقیم شربت. (۱) ویتامین E و (۲) ویتامین A سایر شرایط مانند شکل ۳-۱۵ ..... ۷۶
شکل ۳-۲۳- کروماتوگرام مخلوط ویتامین‌ها در شربت مولتی ویتامین با تزریق مستقیم شربت. شرایط: حجم تزریقی ۲۵ میکرولیتر (۱) ویتامین D، (۲) ویتامین E و (۳) ویتامین A، سایر شرایط مانند شکل ۳-۱۵ ..... ۷۶
شکل ۳-۲۴- کروماتوگرام مخلوط ویتامین‌ها در شربت مولتی ویتامین با تزریق شربت استخراج شده شرایط: (۱) ویتامین E و (۲) ویتامین A سایر شرایط مانند شکل ۳-۱۵ ..... ۷۶

شکل ۳-۲۵- کروماتوگرام مخلوط ویتامین‌ها در شربت مولتی ویتامین با تزریق شربت استخراج شده شرایط: (۱) ویتامین D، (۲) ویتامین E و (۳) ویتامین A سایر شرایط مانند شکل ۳-۱۵ ..... ۷۷
شکل ۳-۲۶- کروماتوگرام مخلوط ویتامین‌ها در کپسول روغن کبد ماهی هفت دریا. شرایط مانند شکل ۳-۱۵ ..... ۷۷

فهرست جدول‌ها

جدول ۱-۱- کمیت‌های مهم در کروماتوگرافی ۱۳

جدول ۱-۲- روابط و معادلات مهم در کروماتوگرافی..... ۱۳

جدول ۲-۱- مواد مصرف شده همراه با نام شرکت سازنده ٤۱

جدول ۲-۲- ویتامین‌های محلول در چربی مورد استفاده و کد یک حرفی مربوط به آنها..... ٤٤

جدول ۲-۳- محدوده مناسب متغیرها همراه با سطوح مربوطه..... ۵۰

جدول ۲-۴- شرایط مربوط به آزمایش‌های انجام شده (اعداد داخل پرانتز مقادیر کد شده هستند)..... ۵۱

جدول ۳-۱- مقادیر محاسبه شده R_{S1}-R_{S4} و T_F برای فازهای متحرک میکروامولسیونی با ماده آلی روغنی متفاوت..... ۵٤

جدول ۳-۲- مقادیر محاسبه شده R_{S1}-R_{S4} و T_F همراه با مقادیر MCEF..... ۵۹

جدول ۳-۳- مقادیر ضرائب به دست آمده برای معادلات R_1، R_2، R_3، R_4 وT_F همراه با داده‌های آماری ٦۳

جدول ۳-۴- مقادیر R_1،R_2 و R_3 تجربی همراه با مقادیر پیش‌بینی شده توسط MLR..... ٦٤

جدول ۳-۵- مقادیر R_4 وT_F تجربی همراه با مقادیر پیش‌بینی شده توسط MLR..... ٦۵

جدول ۳-۶- اثر تغییراندازه جمعیت اولیه بر روی مقدار MCEF..... ٦۷

جدول ۳-۷- اثر تغییر مقدار جهش بر روی مقدار MCEF..... ٦۷

جدول ۳-۸- اثر تغییر مقدار تقاطع بر روی مقدار MCEF..... ٦۷

جدول ۳-۹- مقادیر بهینه متغیرها همراه با MCEF پیش بینی شده با MLR-GA و تجربی..... ۷۰

جدول ۳-۱۰- داده‌های آماری حاصل از منحنی کالیبراسیون..... ۷۳

جدول ۳-۱۱- مقادیر ویتامین‌ها در نمونه شربت مولتی ویتامین شرکت دارویی امین..... ۷۵

جدول ۳-۱۲- مقادیر ویتامین‌ها در نمونه کپسول روغن ماهی هفت دریا و نتایج حاصل از اندازه‌گیری. ۷۸

فـــــصل اول

مقدمه و تئوری

۱-۱- مقدمه

به طور کلی، ویتامین‌ها موادی ضروری برای فعالیت بدن هستند که به مقدار کم مورد نیاز می‌باشند. این مواد در حد چند میلی‌گرم ویا میکروگرم، سوخت وساز بدن را به وسیله سیستم آنزیمی تنظیم می‌کنند و هر یک از آن‌ها نقش متابولیکی معینی را به عهده دارند. از آن‌جا که نقش ویتامین‌ها در سلامتی انسان بسیار حائز اهمیت می‌باشد، لذا تعیین مقدار دقیق و صحیح ویتامین‌ها در نمونه‌های بیولوژیکی، مواد غذایی، داروها و سایر منابع غذایی تأمین کننده ویتامین‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است [۱].

روش‌های مختلفی برای اندازه‌گیری ویتامین‌ها وجود دارد که شامل دو دسته هم‌زمان و غیرهم‌زمان می‌باشند. در روش غیرهم‌زمان، ویتامین‌های موجود در نمونه، پس از جداسازی مقدماتی، تحت یکی از فرایندهای اکسایش، کاهش و یا مشتق‌گیری قرار گرفته و با استفاده از روش‌های تجزیه‌ای مورد اندازه‌گیری قرار می‌گیرند. در بین روش‌های اندازه‌گیری هم‌زمان ویتامین‌ها، کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (HPLC) از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در اکثر روش‌های HPLC گزارش شده، از روش کروماتوگرافی مایع فاز معکوس (RPLC) با درصد بالایی از حلال آلی به صورت تک حلالی یا شویش شیبی استفاده شده است [۱۳-۲].

از آنجا که روش‌های غیرهم‌زمان جهت جداسازی وتعیین مقدار ویتامین‌های محلول در چربی با مشکلاتی از قبیل وقت‌گیر بودن و حساسیت بسیاری از ویتامین‌ها به نور و گرما واحتمال تخریب آن‌ها در طی مراحل آماده‌سازی و جداسازی نمونه همراه است، باید روشی ارائه نمود که علاوه بر رفع مشکلات موجود، سرعت، دقّت و صحت مناسب را دارا باشد. با توجه به این که HPLC تکنیکی سریع، دقیق و حسّاس می‌باشد، می‌توان از آن در جداسازی ویتامین‌های محلول در چربی استفاده نمود. یکی از شیوه‌های کروماتوگرافی مایع که در

سال‌های اخیر مورد استفاده قرار گرفته کروماتوگرافی مایع میکروامولسیونی[1](MELC) است که در این روش از فاز متحرک میکروامولسیونی استفاده می‌شود. میکروامولسیون، تعلیقی از قطرات با اندازه نانومتر از یک مایع امتزاج‌ناپذیر پراکنده شده در یک مایع امتزاج‌ناپذیر دیگر می‌باشد که به دو دسته روغن در آب(O/W) و آب در روغن(W/O) تقسیم می‌شوند. فاز متحرک میکروامولسیونی یک مخلوط به ظاهر همگن از آب، حلال آلی کمکی، سورفکتانت و روغن به همراه افزودنی‌های دیگر مانند بافرها می‌باشد. روش MELC در سال‌های اخیر در جداسازی و تعیین مقدار تعدادی از ترکیبات دارویی به کار گرفته شده است. استفاده از میکروامولسیون‌ها به عنوان فاز متحرک در HPLC دارای مزایایی به شرح ذیل است [۲۶-۱۴].

۱- توانائی حلالیت بسیار خوب برای ترکیبات آب‌دوست و آب‌گریز

۲- سرعت جداسازی بالا

۳- امکان استفاده از طول موج‌های پائین UV جهت آشکارسازی

۴- مصرف کم حلال‌های آلی با حفظ کارایی

۵- امکان تغییرات وسیع در ترکیب درصد فاز متحرک

۶- امکان استفاده از شویش شیبی و افزایش شیب از صفر تا صد در صد بدون تغییر ساختار فاز ساکن

۷- امکان تزریق مستقیم نمونه‌های بیولوژیکی مثل سرم و پلاسما

۸- غیرسمی بودن

۹- صرفه‌جویی در زمان و هزینه

۱۰- امکان تغییرات دمایی

۱۱- عدم نیاز به تعادل مجدد در شستشوهای متوالی

از نتایج این تحقیق، می‌توان در سنجش میزان ویتامین‌های محلول در چربی در فرآورده‌های غذایی، خوراک دام وداروهای حاوی ویتامین‌های محلول در چربی استفاده نمود. با توجه به مزایای نام برده، این روش می‌تواند جایگزین مناسبی برای روش‌های متداول فعلی جهت اندازه‌گیری‌های کیفی و کمی ویتامین‌های محلول در چربی در شرکت‌های سازنده محصولات حاوی این مواد باشد.

۱-۲- ویتامین

کلمه ویتامین[2] در سال ۱۹۱۰ به وسیله فونک[3] تعریف شد. در آن سال اوتوانست از پوسته برنج، ماده‌ای بلوری (ویتامین B_1) استخراج کندکه در پیش‌گیری و درمان بیماری بری‌بری مفید بود. وی به این عنصر نام آمین حیاتی(Vitamine) داد. با کشف سایر ترکیباتی که از لحاظ عملکرد مشابه ویتامین B_1 بودند معلوم شد که

---

[1] *Microemulsion Liquid Chromatography*

[2] *Vitamin*

[3] *Funk*

فونک در نام‌گذاری این ترکیبات اشتباه کرده است زیرا همه ترکیبات این دسته آمین نبودند و لذا کلمه Vitamine کوتاه‌تر شد و به Vitamin تبدیل شد [۲۸-۲۷و۱].

پس از ارائه فرضیه ویتامین، دو گروه از دانشمندان به نام‌های اسبورن[1] و مندل[2]،مک‌کلوم[3] و دیویس[4]، به طور جداگانه وجود ماده‌ای در چربی که برای رشد و تولید مثل حیوانات ضروری است را گزارش دادند. این ماده ویتامین محلول در چربی A نام گرفت [۱].

تمام ویتامین‌هایی که تاکنون کشف شده‌اند در یکی از دو گروه زیر قرار می‌گیرند:

۱- ویتامین‌های محلول در چربی شامل چهار ویتامین A، D، K و E

۲- ویتامین‌های محلول در آب مانند ویتامین‌های C، B_{12}، B_1، B_2، B_3 و B_6

ویتامین‌های محلول در چربی در کبد ذخیره می‌شوند و به همین جهت اختلالات ناشی از کمبود آن‌ها دیرتر ظاهر می‌شود و عدم دفع آن‌ها ایجاد مسمومیت می‌کند. ولی ویتامین‌های محلول در آب در بدن ذخیره نمی‌شوند. یک تفاوت دیگر ویتامین‌های محلول در چربی با ویتامین‌های محلول در آب این است که نقش ویتامین‌های محلول در چربی به یک ترکیب معین، محدود و وابسته نمی‌باشد. به عنوان مثال ویتامین A دارای دو نوع ترکیب مختلف A_1 و A_2 است. لذا روش‌های تجزیه‌ای مورد استفاده جهت اندازه‌گیری میزان ویتامین‌های محلول در چربی می‌بایست قادر به اندازه‌گیری تمامی اشکال مختلف یک ویتامین باشند [۲۹].

هرکدام از ویتامین‌ها شامل یک گروه کوچکی از ترکیبات با ساختار و کاربرد بیولوژیکی به هم وابسته هستند. در نتیجه ترکیباتی که از نظر شیمیایی به هم وابسته می‌باشند، کاربردهای مشابهی هم دارند. به عنوان مثال همگی آن‌ها کاربردهای کاتالیزوری در بافت‌های زنده دارند و دوباره می‌توانند در چرخه‌های بیوشیمیایی مورد استفاده قرار بگیرند، در حالی که پروتیین‌ها و چربی‌ها نمی‌توانند مجددا وارد چرخه بیوشیمیایی شوند. این امر ضرورت به‌کارگیری روش‌های تجزیه‌ای برای اندازه‌گیری و استخراج ویتامین‌ها در حضور مقادیر زیاد مواد مزاحم را ایجاب می‌کند [۲۹]. ساختار و خواص هر کدام از ویتامین‌های محلول در چربی به صورت زیر می‌باشد.

۱-۲-۱- ویتامین A

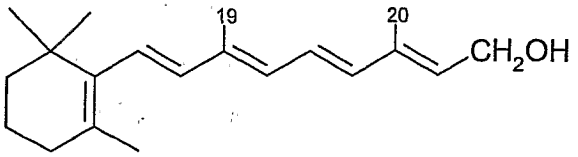
در سال ۱۹۱۳ مک‌کلوم و دیویس حضور ماده‌ای چربی‌مانند در کره و زرده تخم‌مرغ که برای موش‌ها لازم و ضروری است را گزارش دادند. در سال ۱۹۲۰ این ماده محلول در چربی به خاطر اهمیت آن در فرایند رشد و به خاطر تفاوت گذاشتن با ویتامین‌های محلول در آب (B)، ویتامین A نام گرفت. در سال ۱۹۳۱ ساختار ویتامین A تعیین شد [۲۹].

---

[1] *Asborne*
[2] *Mandel*
[3] *McCollum*
[4] *Davis*

۱-۲-۱-۱- ساختار و خواص فیزیکوشیمیایی ویتامین A

ساختار یکی از فرم‌های ویتامین A که دارای فعالیت بیولوژیکی است در شکل ۱-۱ نشان داده شده است. این فرم‌ها مربوط به شکل الکلی ویتامین A است که رتینول[1] نام دارد.



شکل ۱-۱- ساختار ترانس رتینول (ویتامین A)

رتینولی که تمام پیوندهای دوگانه آن ترانس باشد، در آب نامحلول و در چربی‌ها و حلال‌های آلی محلول و دارای قابلیت بالای اکسید شدن می‌باشد. اما در برابر برودت و گرما به اندازه کافی مقاوم است. زمانی که این ترکیب از بافت بیولوژیکی دور شود ناپایدار است و قابلیت تبدیل شدن به فرم سیس با فعالیت کمتر و خواص جزئی متفاوت را دارد. برای جلوگیری از خطا در طول فرآیند آنالیز که ناشی از قابلیت اکسید شدن و عدم پایداری در طول نگهداری و استخراج نمونه می‌باشد از روش‌های زیر استفاده می‌شود:

۱- خارج کردن اکسیژن از محلول با خلأ یا گاز بی‌اثری که جایگزین آن بشود

۲- اضافه کردن ضداکسیدکننده[2]

۳- استفاده از پایین‌ترین دما و حلال‌های با نقطه جوش پایین تا از تبدیل شدن ایزومر ترانس به سیس جلوگیری شود

۴- محافظت در برابر نور خورشید و انجام مراحل آنالیز در تاریکی و نگهداری محلول در شیشه‌های تیره

۵- عدم وجود اسید در محیط

۱-۲-۱-۲- منابع و اثرات ناشی از کمبود ویتامین A

روغن ماهی، سبزیجات تازه، جگر، چغندر، گندم و هویج از جمله منابع گیاهی و حیوانی این ویتامین می‌باشند. در صورت کمبود این ویتامین در رژیم غذایی، علائمی چون شب‌کوری، اگزوفتالمی[3]، اختلال در رشد، عفونت‌های تنفسی و اختلالات گوارشی و تنفسی ظاهر می‌شوند. به دلیل سمی بودن این ویتامین در مقادیر زیاد، باید از این ویتامین در سرم و پلاسما به مقدار معینی وجود داشته باشد [۲۷].

---

[1] *Retinol*
[2] *Antioxidant*
[3] *Exophthalmia*

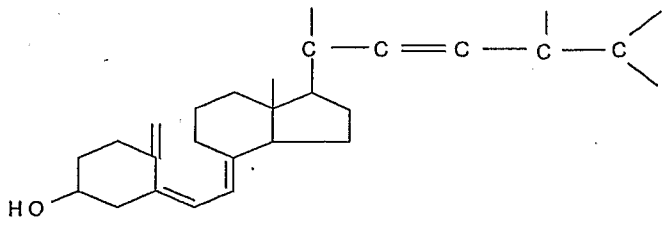
۱-۲-۲- ویتامین D

در سال ۱۹۱۸ یک متخصص تغذیه انگلیسی برای نخستین بار به وجود یک ماده‌ای در چربی با خواص ضد راشیتیسم پی برد. در سال ۱۹۲۲ خصوصیات ضد راشیتیسم روغن کبد و ماهی توسط مک‌کلوم مورد بررسی قرار گرفت. این ویتامین محلول در چربی را ویتامین D نامیدند که به دو فرم D_2 و D_3 وجود دارد. ساختار ویتامین D_2 (ارگوکلیسفرول[1]) در سال ۱۹۳۲ شناسایی شد. ویتامین D_3 (کلوکلیسفرول[2]) از نظر ساختاری در سال ۱۹۳۶ مشخص و به عنوان عامل موثر در درمان راشیتیسم شناسایی شد [۳۰و۲۹].

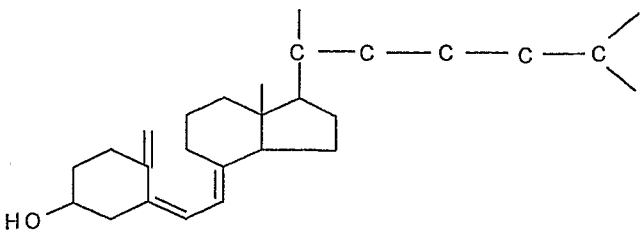
۱-۲-۲-۱- ساختار و خواص فیزیکوشیمیایی ویتامین D

ساختار ویتامین D_2 و D_3 در شکل ۱-۲ نشان داده شده است. تنها تفاوت این دو ترکیب در یک پیوند دوگانه و یک گروه متیل اضافی درشاخه جانبی ویتامین D_2 است. به خاطر همین ساختار به هم وابسته، از نظر خواص فیزیکوشیمیایی خیلی به هم شبیه هستند. این ویتامین در غیاب نور، آب، محیط اسیدی و درجه حرارت پایین پایدار است. فرایند ایزومری شدن درحضور نور و شرایط اسیدی، تسریع می‌شود و در حضور اکسیدکننده‌ها، این ویتامین تخریب می‌شود.

ویتامین D یک عامل تثبیت کلسیم است و امروزه آن را هم به عنوان یک ویتامین و هم به عنوان یک هورمون می‌شناسند. این ترکیب در چربی، روغن‌ها و الکل‌ها، محلول و در اتر و کلروفرم بسیار محلول است. به علت حساسیت به نور و اکسیژن آن را در شیشه‌های تیره و دربسته که هوای آن توسط یک گاز خارج شده باشد نگهداری می‌کنند.



الف)



ب)

شکل ۱-۲- (الف) ساختار ارگوکلیسفرول (ویتامین D2) و (ب) کلوکلیسفرول (ویتامین D3)

[1] *Ergocalciferol*
[2] *Cholecalciferol*

۱-۲-۲-۲- منابع و اثرات ناشی از کمبود ویتامین D

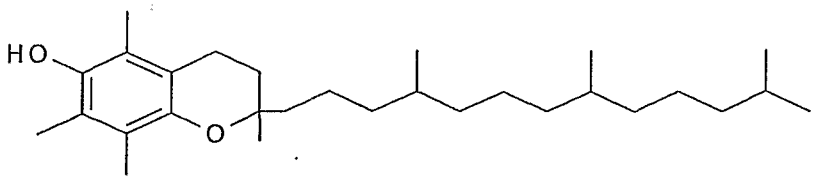
این ویتامین در روغن جگر بعضی از ماهی‌ها، کره و زرده تخم‌مرغ یافت می‌شود. مهم‌ترین منابع آن برای انسان، تابش نور خورشید به پوست بدن است که باعث تثبیت ویتامین از طریق پوست می‌شود. کمبود آن در رژیم غذایی موجب بیماری‌های استخوانی و بیماری راشیتیسم می‌شود. به دلیل اثرات سرطان‌زایی و سمیت در غلظت‌های بالا، می‌بایست از مصرف زیاد آن خودداری کرد و همیشه مقدار آن در سرم و پلاسما در یک مقدار معینی ثابت نگه داشته شود [۲۷].

۱-۲-۳- ویتامین E

این ویتامین در سال ۱۹۲۲ به عنوان یک ماده ضروری توسط اوانس[1] و بیشاب[2] شناخته شد و هم‌زمان با آن‌ها شور[3] و ماتیل[4] نیز به نتایج مشابهی رسیدند. در سال ۱۹۲۲ این ویتامین برای تولید مثل در حیوانات لازم شناخته شد [۱].

۱-۲-۳-۱- ساختار و خواص فیزیکوشیمیایی ویتامین E

واژه ویتامین E به حداقل هشت گروه از ترکیبات شیمیایی که دارای خواص بیولوژیکی مشابه می‌باشند اطلاق می‌گردد و به نام توکوفرول خوانده می‌شوند. توکوفرول در اصطلاح لاتین به معنی الکل عامل تولید مثل است. توکوفرول در ساختمان خود، دارای یک بنیان هیدروکسیل می‌باشد که به عنوان فنول عمل می‌کند. تاکنون تعدادزیادی توکوفرول (آلفا، بتا و گاما) در طبیعت شناخته شده‌اند که در بین آن‌ها آلفاتوکوفرول از نظر خواص ویتامینی و فراوانی در طبیعت از اهمیت بیشتری برخوردار است [۱]. ساختار آلفاتوکوفرول در شکل ۱-۳ نشان داده شده است.



شکل ۱-۳- ساختار ویتامین E

[1] *Evans*
[2] *Bishop*
[3] *Sure*
[4] *Mettil*