دانشگاه الزهرا (س)
دانشکده علوم پایه

پایان نامه
جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد
رشته شیمی، گرایش تجزیه

عنوان
استخراج افدرین از مایعات بیولوژیکی بر اساس اعمال پتانسیل به فیبر متخلخل و اندازه گیری آن توسط کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

اساتید راهنما
دکتر لیدا فتوحی **دکتر یدالله یمینی**

استاد مشاور
دکتر مجید ممهد هروی

نگارش
سعیده مولایی

شهریور ۱۳۹۰

سپاس بی پایان خدایی را که چراغ دل به نور عشق بر افروخت و زبان را کلام بیاموخت تا نغمه سرای عشق باشد. سجده به درگاه خدایی می آورم که بخشنده است وکریم و رحمان است و رحیم. هر چه از قلم بر کاغذ می تراود از عشق او می سراید و قلم را حرمت وقداستی می بخشد که انسان قلم بر دست پاسدار این قداست است.

تقدیم و با سپاس از :

زحمات بی دریغ، تلاش های بی وقفه و راهنمایی های ارزشمند

اساتید گرانقدرم سرکار خانم دکتر فتوحی و جناب آقای دکتر یمینی

تقدیم به

پدر و مادر عزیزتر از جانم

به پاس تعبیر عظیم و انسانی شان از کلمه ایثار و از خودگذشتگان

به پاس عاطفه سرشار و گرمای امیدبخش وجودشان

به پاس قلب های بزرگشان که فریاد رس است و سرگردانی و ترس در پناهشان به شجاعت می گراید

و به پاس محبت های بی دریغشان که هرگز فروکش نمی کند

تقدیم به

آنان که آفتاب مهرشان در آستان قلبم همواره پا بر جاست

برادر عزیز و خواهر مهربانم

و سپاس و تقدیر از

از **جناب آقای صیدی** که تجربیات خویش را بی منت به من آموختند تا از این پس

فانوس راهم گردد

چکیده

در این مطالعه از دو روش استخراج تحت اعمال پتانسیل الکتریکی اطراف هالوفیبر ودیگری گرادیان pH به منظور استخراج و پیش تغلیظ افدرین از نمونه های بیولوژیکی استفاده شده است. در روش استخراج تحت اعمال پتانسیل الکتریکی اطراف غشای فیبر متخلخل افدرین از ۷ میلی لیتر محلول اسیدی در فاز دهنده با pH=۲ به درون حلال های آلی موجود درون حفرات فیبر متخلخل وارد شده و از آن جا یک استخراج ثانویه به درون محلول پذیرنده اسیدی موجود درون مجرای فیبر متخلخل با pH=۱ انجام می دهد. در این روش پتانسیل الکتریکی توسط منبع تغذیه به دو الکترود در فازهای دهنده و گیرنده در دو طرف فیبر اعمال می شود. به منظور رسیدن به مقادیر بهینه استخراج، پارامترهایی مانند نوع حلال های آلی، ولتاژ اعمالی، زمان استخراج، pH محلول های گیرنده و دهنده و سرعت همزدن بهینه شدند. تحت شرایط بهینه فاکتورهای تغلیظ ۱۲۰ و ۵۱ به ترتیب برای نمونه های ادرار و پلاسمای خون حاصل گردید. منحنی های درجه بندی در محدوده ۱۵-۷۵۰ و ۳۰-۱۰۰۰ نانو گرم بر میلی لیتر به صورت خطی و با ضرایب همبستگی ۰/۹۹۴ و ۰/۹۹۳ به ترتیب برای نمونه های ادرار و پلاسمای خون بدست آمدند.

در روش استخراج تحت گرادیان pH، افدرین از نمونه آبی بازی با pH=۱۱ به درون حلال های آلی موجود درون غشای فیبر متخلخل وارد شده و از آن جا وارد محلول پذیرنده اسیدی با pH=۳ می گردد. به منظور رسیدن به مقادیر بهینه

استخراج، پارامترهایی چون نوع حلال های آلی، زمان استخراج، pH محلول های گیرنده و دهنده، سرعت همزدن و اثر نمک بهینه شدند. تحت شرایط بهینه فاکتورهای تغلیظ ۳۵ و ۸ به ترتیب برای نمونه های ادرار و پلاسمای خون حاصل گردید. منحنی های درجه بندی در محدوده ۱۰۰-۳۰۰۰ و ۲۵۰-۴۰۰۰ نانو گرم بر میلی لیتر به صورت خطی و با ضرایب همبستگی ۰/۹۹۱ و ۰/۹۸۸ به ترتیب برای نمونه های ادرار و پلاسمای خون بدست آمدند.

نتایج نشان دادند که در مقایسه با گرادیان pH، استخراج تحت اعمال پتانسیل الکتریکی، مکانیسم انتقال بسیار موثرتری را همراه با کارایی استخراج بالاتر در زمان کوتاه از خود نشان می دهد. علاوه بر آن روش استخراج بر پایه اعمال پتانسیل الکتریکی یک ابزار پر قدرت و سریع برای استخراج مقادیر اندک افدرین از نمونه های بیولوژیکی مانند ادرار و پلاسمای خون می باشد.

کلمات کلیدی: فیبر متخلخل، میکرو استخراج، غشای الکتریکی، ادرار، پلاسما، افدرین.

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه ۱

فصل دوم: بررسی منابع ۵

فصل سوم: تئوری ۱۵

۳-۱-مقدمه ۱۶

۳-۲- روش میکرواستخراج بر پایه فیبر متخلخل (HF-LPME) ۱۷

۳-۲-۱- روش میکرواستخراج دو فازی بر پایه فیبر متخلخل ۱۸
۳-۲-۲- میکرواستخراج سه فازی بر پایه فیبر متخلخل ۱۹
۳-۲-۲-۱- میکرو *استخراج با گرادیان pH* ۲۰
۳-۲-۲-۲- میکرو *استخراج با ترکیبات حامل* ۲۰
۳-۲-۲-۳ میکرواستخراج با اعمال پتانسیل الکتریکی (EME) ۲۱

فصل چهارم: مطالعات تجربی ۲۷

۴-۱- مقدمه ۲۸

۴-۲- شرایط تجربی ۲۸
۴-۲-۱- مواد شیمیایی ۲۸
۴-۲-۲- دستگاهوری ۲۹
۴-۲-۳- مراحل تهیه محلول ها ۳۰

۴-۳- تجهیزات لازم برای برپا کردن سیستم های EME و HF-LPME ۳۲

۴-۴- مراحل کار آزمایشگاهی ۳۲

۴-۴-۱- مراحل استخراج با روش HF-LPME ۳۲
۴-۴-۲- مراحل استخراج با روش EME ۳٤

۴-۵- محاسبات ۳۵

۴-۵-۱- معادلات فاکتور تغلیظ و درصد بازیابی ۳۵
۴-۵-۲- تکرار پذیری روش (RSD%) ۳٦

فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری ۳۷

۵-۱- مقدمه ۳۸

۵-۲- مراحل بهینه سازی شرایط استخراج ۳۸

۵-۲-۱- نوع حلال آلی ۳۹
۵-۲-۲- اثر pH در محلول گیرنده و دهنده ٤۲
۵-۲-۳- زمان استخراج ٤٦
۵-۲-۴- بررسی اثر سرعت هم زدن محلول دهنده ٤۸
۵-۲-۵ اثر نمک ۵۰
۵-۲-۶- اختلاف پتانسیل اعمالی ۵۲

۵-۳- تعیین فاکتور تغلیظ و درصد بازیابی ۵۳

۵-۴- رسم منحنی درجه بندی و ارزیابی روش ۵۷

۵-۵- استخراج افدرین از پلاسما و ادرار ٦۲

۵-۶- جمع بندی ٦٤

منابع و مآخذ..... ٦٦

فصل اول

مقدمه

۱ - مقدمه

افدرین[1] یک مشتق آلکالوئید از گیاهان مختلف از دسته افدرا می باشد. این گیاه در مناطق بیابانی آسیای مرکزی یافت می شود. افدرین به شکل پودر جامد و یا کریستالی سفید رنگ می باشد. این دارو در حلال های آلی رایج نا محلول بوده و به راحتی در آب و الکل حل می گردد. افدرین دارای نام های گوناگونی از قبیل: ۲- (متیل آمینو) – ۱ – فنیل پروپان – ۱- ال، ۱- (متیل آمینو) بنزیل الکل، ۱- هیدروکسی – ۲- (متیل آمینو) ۱- فنیل پروپان، ۲- (متیل آمینو) ۱ – فنیل – ۱- پروپان می باشد و از لحاظ ساختاری شبیه به مشتقات نیمه سنتزی آمفتامین و متا آمفتامین ها است. این دارو دارای فرمول بسته $C_{10}H_{15}\ N\ O$ با جرم مولکولی ۱۶۵/۲ گرم بر مول می باشد. افدرین دارای یک هیدروژن دهنده، دو هیدروژن پذیرنده، سه پیوند چرخشی و دو گروه عاملی الکلی و آمینی می باشد و به دلیل حضور آمین دارای خصلت بازی است (جدول ۱-۱).

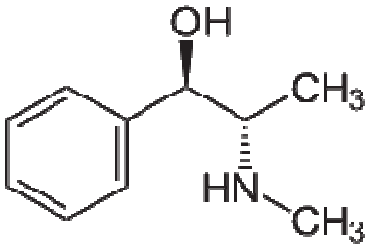
افدرین برای درمان علامتی آسم نایژه‌ای و انسداد برگشت پذیر راه های تنفسی، رفع احتقان بینی یا محرک سیستم اعصاب مرکزی مصرف می شود. این دارو همچنین با افزایش مختصر دمای بدن باعث سوخت و ساز بیشتر و در نتیجه تشدید فرآیندهای چربی سوزی می گردد. افدرین همچنین خواص کاتابولیسم نیز دارد، بنابراین می توان از این دارو برای حفظ حجم و توده عضلانی نیز بهره برد.

[1] ephedrine

ورزشکاران از این دارو برای افزودن بر شدت تمرینات بهره می برند و به همین جهت در لیست ترکیبات ممنوعه توسط کمیته بین المللی المپیک معرفی شده است.

به طور کلی افدرین به دو شکل قرص روکش دار و آمپول در بازار موجود می باشد. متابولیسم این دارو کبدی است و پس از تزریق عضلانی و یا زیر جلدی به سرعت جذب می شود. دفع دارو کلیوی است. اصلی‌ترین محصول متابولیتی این دارو شکل دمتیله آن به نام نورافدرین می باشد که درون کبد، کلیه، طحال و مغز جمع آوری می شود. در حدود ۹۰ درصد دوز مصرفی آن در طی ۲۴ ساعت توسط ادرار از بدن دفع می شود که در حدود ۵۵ تا ۷۵ درصد آن بدون تغییر، ۸ تا ۲۰ درصد به شکل نور افدرین و ۴ تا ۱۳ درصد از آن به شکل های بدون آمین افدرین می باشد [۱-۵].

جدول ۱-۱- اطلاعاتی در مورد افدرین

دارو	ساختار شیمیایی	نیمه عمر	pK_a	Log P
افدرین (Eph)		۳-۶ ساعت	۹/۶	۱/۱

فصل دوم

بررسی منابع

۲ - بررسی منابع

در سال ۱۹۷۸ کروماتوگرافی گازی با آشکار ساز یونیزاسیون شعله‌ای (GC-FID[1]) برای اندازه گیری افدرین در حضور آمفتامین، کدئین و مورفین استفاده شد. با به کارگیری عامل مشتق ساز فلوئوروآسیل، مشتقات پایدار با حساسیت بالا برای گیراندازی الکترون جهت آنالیز با کروماتوگرافی گازی به دست آمد. محدوده خطی ۱-۰/۱ و ۲/۵-۰/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر با ضرایب همبستگی بالاتر از ۰/۹۹۶ و مقادیر انحراف استاندارد نسبی ۲/۲ و ۲/۸ درصد نانوگرم بر میلی لیتر بدست آمدند [۶].

به منظور اندازه گیری افدرین موجود درون قرص در سال ۱۹۸۱ طیف بینی رزونانس مغناطیسی هسته (NMR[2]) با استاندارد درونی استامید به کار برده شد. مقادیر انحراف استاندارد نسبی ۱/۵ و ۱/۲ درصد به ترتیب برای داروی خالص و قرص با مقادیر نسبی بازیابی ۹۶/۸-۱۰۲/۲ درصد حاصل شدند [۷].

همچنین در این سال جهت اندازه گیری همزمان دو ایزومر نوری افدرین وسودوافدرین از روش‌های کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا با آشکارساز ماوراءبنفش (HPLC-UV[3])، کروماتوگرافی لایه نازک (TLC[4]) و NMR استفاده شد.

---

[1] Gas Chromatography- Flame Ionization Detector
[2] Nuclear Magnetic Resonance
[3] High Performance Liquid Chromatography-Ultra Violet
[4] Thin Layer Chromatography

در روش HPLC اندازه گیری در ستون فاز معکوس فنیل با فاز متحرک یک درصد استونیتریل در بافر فسفات در طول موج ۲۱۰ نانومتر انجام شد. صفحه فاز معکوس با ابعاد ۲۰×۲۰ سانتی متر با ضخامت ۰/۲۵ میلی متر با بافر بورات در روش TLC به کار برده شد. در مقایسه با دو روش دیگر، NMR دارای حساسیت کمتر و نیازمند حجم بالاتری از نمونه و زمان آنالیز طولانی‌تری بود. محدوده خطی ۰/۵-۰/۰۰۰۵ میلی گرم بر میلی لیتر و حد تشخیص ۰/۱ به وسیله روش HPLC محاسبه شد [۸].

اندازه گیری افدرین در مخلوط متیل افدرین، دی فنیل هیدرآمین، بنزوتنیوم توسط روش طیف بینی جذبی در سال ۱۹۸۶ صورت گرفت. در این روش از تترا برمو فنیل اتیل استر(TBPE) به منظور تولید کمپلکس های یونی این ترکیبات استفاده شد. دستگاه طیف بین مورد استفاده دارای دو مسیر نوری با جایگاه سل دارای کنترل دمایی بود. از روی نسبت میزان جذب به میزان دمای اعمال شده به سل، اندازه گیری کمی انجام شد و درصد های نسبی بازیابی در نمونه‌های مختلف با مقادیر ۵۰،۱۵۰ و ۲۰۰ میلی گرمی قرص افدرین، ۹۶/۲-۱۰۵ درصد گزارش شد [۹].

در سال ۱۹۹۰ کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا با ستون کایرال و آشکارساز چرخش نوری دوگانه- ماوراءبنفش (DOR-UV[1]) برای اندازه گیری خلوص انانتیومری دو ایزومر نوری افدرین و سودوافدرین به کار گرفته شد.

[1] Dual Optical Rotation-UV

محدوده خطی ۰/۰۶-۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر با ضریب همبستگی ۰/۹۹۹ برای (+)- افدرین هیدروکلراید و حد تشخیص ۱ میکروگرم به دست آمد. این روش بر خلاف روش‌های پلاریمتری مرسوم نیازی به نمونه‌های خالص نداشته و از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه بود [۱۰].

از الکترود غشایی پلی وینیل کلراید (PVC) بدون محلول مرجع داخلی برای اندازه گیری مستقیم افدرین در نمونه‌های دارویی در سال ۱۹۹۲ استفاده شد. در این روش از معرف کمپلکس دهنده تتراکیس (۴- کلروفنیل) بورات در ۲- نیترو فنیل اکتیل اتر (NPOE) به منظور تولید کمپلکس جفت یون با افدرین درون الکترود مورد نظر به کار گرفته شد. اندازه گیری پتانسیومتری افدرین درون نمونه‌هایی همچون قرص، قطره ی بینی و شربت انجام شد و درصد بازیابی نسبی ۹۹/۱ درصد بدست آمد. تکرار پذیری الکترود ۱± میلی ولت در طی ٦ ماه و زمان پاسخ گویی الکترود در محدوده غلظتی 10^{-5}-10^{-1} مولار، ٦ ثانیه گزارش شد [۱۱].

در سال ۱۹۹۳ رفتار الکتروشیمیایی افدرین بر سطح الکترود کربن شیشه ای بررسی شد و اندازه گیری افدرین بر سطح دو الکترود ساکن و صفحه‌ای چرخان با دو روش ولتامتری پویش خطی (LSV[1]) و پالس تفاضلی (DPV[2]) در نمونه ادرار انجام شد. در این روش از بافر رابینسون برایتون ۰/۰۴ مولار با pH=۱۰ به منظور محاسبه ضریب و ثابت سرعت انتقال بار استفاده شد. منحنی

[1] Linear-Sweep Voltammetry
[2] Differential Pulse Voltammetry