به نام خدایی که در این نزدیکی است

دانشگاه صنعتی اصفهان

دانشکده شیمی

طراحی و ساخت حد واسط اتصال ریز استخراج فاز جامد از فضای فوقانی با دستگاه طیف‌سنج تحرک یونی با منبع یونیزاسیون الکترواسپری و استفاده از آن برای اندازه‌گیری ونلافکسین در نمونه‌های ادرار و پلاسمای انسانی

پایان‌نامه کارشناسی ارشد شیمی تجزیه

امیر حسین عامری

اساتید راهنما

دکتر محمد تقی جعفری

دکتر محمد سراجی

دی ماه ۱۳۹۲

دانشگاه صنعتی اصفهان

دانشکده شیمی

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته شیمی تجزیه آقای امیر حسین عامری

تحت عنوان

طراحی و ساخت حد واسط اتصال ریز استخراج فاز جامد از فضای فوقانی با دستگاه طیف‌سنج تحرک یونی با منبع یونیزاسیون الکترواسپری و استفاده از آن برای اندازه‌گیری ونلافکسین در نمونه‌های ادرار و پلاسمای انسانی

در تاریخ ۱۳۹۲/۱۰/۲۴ توسط کمیته تخصصی زیر مورد بررسی و تصویب نهایی قرار گرفت.

۱- استاد راهنمای پایان نامه	دکتر محمد تقی جعفری
۲- استاد راهنمای پایان نامه	دکتر محمد سراجی
۳- استاد داور	دکتر تقی خیامیان
۴- استاد داور	دکتر حسن قاضی عسگر
سرپرست تحصیلات تکمیلی دانشکده	دکتر علیرضا نجفی

تعهد نامه اصالت رساله یا پایان نامه تحصیلی

اینجانب امیر حسین عامری دانش آموخته مقطع کارشناسی ارشد ناپیوسته در رشته شیمی تجزیه که در تاریخ ۹۲/۱۰/۲۴ از پایان نامه خود تحت عنوان طراحی و ساخت حد واسط اتصال ریز استخراج فاز جامد از فضای فوقانی با دستگاه طیف‌سنج تحرک یونی با منبع یونیزاسیون الکترواسپری و استفاده از آن برای اندازه‌گیری ونلافکسین درنمونه‌های ادرار و پلاسمای انسانی دفاع نموده ام بدینوسیله متعهد می‌شوم :

۱) این پایان نامه حاصل تحقیق و پژوهش انجام شده توسط اینجانب بوده و در مواردی که از دستاوردهای علمی و پژوهشی دیگران (اعم از پایان نامه، کتاب، مقاله و ...) استفاده نموده‌ام، مطابق ضوابط و رویه موجود، نام منبع مورد استفاده و سایر مشخصات آنرا در فهرست مربوطه ذکر و درج کرده‌ام.

۲) این پایان نامه قبلاً برای دریافت هیچ مدرک تحصیلی (هم سطح، پایین تر یا بالاتر) در سایر دانشگاهها و موسسات آموزش عالی ارائه نشده است.

۳) چنانچه بعد از فراغت از تحصیل، قصد استفاده و هرگونه بهره برداری اعم از چاپ کتاب، ثبت اختراع و ... از این پایان نامه یا رساله را داشته باشم، از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه صنعتی اصفهان، مجوزهای مربوطه را اخذ نمایم.

۴) چنانچه در هر مقطع زمانی خلاف موارد فوق ثابت شود، عواقب ناشی از آن را می‌پذیرم و دانشگاه صنعتی اصفهان مجاز است با اینجانب مطابق ضوابط و مقررات رفتار نموده و در صورت ابطال مدرک تحصیلی‌ام هیچگونه ادعایی نخواهم داشت.

نام و نام خانوادگی: امیر حسین عامری

تاریخ و امضاء:

به رسم سپاس و ادب

پس از حمد و ثنای الهی

از پدر و مادر و خانواده ام به خاطر همراهی در گام گام زندگی سپاسگزارم و قدر دان زحمات آنها هستم

از اساتید راهنمای این پروژه آقایان دکتر جعفری و دکتر سراجی به خاطر همراهی و راهنمایی بنده تشکر و قدردانی می نمایم

از اساتید داور آقایان دکتر خیامیان و دکتر قاضی عسکر که زحمت باز خوانی و داوری این پایان نامه را بر عهده گرفتند سپاسگذاری می نمایم

از اساتید محترم دانشکده ی شیمی آقایان دکتر انصافی، دکتر رضایی، دکتر نجفی و دکتر حدادزاده که از محضرشان کسب علم نمودم سپاسگذارم

از دوستان گرامی آقایان دکتر فرجمند، شرافتمند، جعفریان، ابراهیمی، شاهمرادی و خانم ها مهرافزا، جمشیدی، خلیلی و شاه رجبیان نیز سپاسگذاری می نمایم و برایشان آرزوی سعادت و کامیابی دارم

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

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فهرست مطالب ..... هفت
فهرست شکل‌ها ..... یازده
فهرست جداول ..... سیزده
چکیده ۱

فصل اول : مقدمه و تئوری

مقدمه ۲
۱-۱- استخراج ۳
۱-۲- ریزاستخراج فاز جامد (SPME) ۳
۱-۲-۱- نحوه انجام ریزاستخراج فاز جامد ۴
۱-۲-۱- الف- ریزاستخراج فاز جامد مستقیم ۴
۱-۲-۱- ب- ریزاستخراج فاز جامد از فضای بالای نمونه ۴
۱-۲-۲- اصول تئوری ۴
۱-۲-۳- عوامل موثر بر راندمان استخراج ۶
۱-۲-۳- الف- جاذب ۶
۱-۲-۳- ب- دما ۶
۱-۲-۳- ج- نمک ۶
۱-۲-۳- د- pH ۷
۱-۲-۳- ه- سرعت همزن ۷
۱-۲-۳- و- زمان ۷
۱-۲-۴- مزایا و معایب SPME ۷
۱-۲-۵- جاذب ها در SPME ۹
۱-۳- سل- ژل ۹
۱-۳-۱- سل ۹
۱-۳-۲- ژل ۹
۱-۳-۳- مواد و واکنش‌های شیمیایی اساسی در فرآیند سل- ژل ۹
۱-۳-۴- مزایای فرآیند سل-ژل ۱۰
۱-۳-۵- معایب فرآیند سل-ژل ۱۱
۱-۴- پلیمرهای هادی به‌عنوان جاذب SPME ۱۱
۱-۴-۱- مزایای پلیمرهای هادی و روش‌های الکتروشیمیایی تهیه فیبر ۱۱
۱-۴-۲- معایب پلیمرهای هادی به عنوان جاذب SPME ۱۱
۱-۵- جاذب‌های کامپوزیتی ۱۲

۱-۵-۱- کامپوزیت سل ژل – پلی‌پیرول ۱۲
۱- ۶- طیف‌سنجی تحرک یونی (IMS)..... ۱۲
۱-۶-۱- مزایای روش طیف‌سنجی تحرک یونی ۱۲
۱-۶-۲- تئوری و اساس طیف‌سنجی تحرک یونی..... ۱۳
۱-۶-۳- دستگاه طیف‌سنج تحرک یونی..... ۱۴
۱-۶-۴- یونیزاسیون الکترواسپری ۱۴
۱-۷- ونلافکسین..... ۱۶
۱-۷-۱- ساختار شیمیایی و داروشناختی ونلافکسین..... ۱۶
۱-۷-۲- مکانیسم عمل ونلافکسین..... ۱۶
۱-۷-۳- عوارض مصرف ونلافکسین..... ۱۸
۱-۷-۴- مروری بر تحقیقات انجام شده جهت اندازه‌گیری ونلافکسین..... ۱۸
۱-۸- روش SPME-IMS..... ۲۰
۱-۸-۱- واجذب آنالیت توسط دما..... ۲۱
۱-۸-۲- واجذب آنالیت به‌صورت شویش با حلال ۲۱
۱-۹- هدف از اجرای پروژه..... ۲۲

فصل دوم : بخش تجربی

مقدمه..... ۲۳
۲-۱- مواد شیمیائی..... ۲۳
۲-۲- محلول‌های ساخته شده در این پروژه..... ۲۴
۲-۳- دستگاه‌ها و تجهیزات استفاده شده..... ۲۴
۲-۴- اجزای مختلف سیستم IMS..... ۲۴
۲-۴-۱- مخازن گاز نیتروژن..... ۲۵
۲-۴-۲- منابع تغذیه..... ۲۵
۲-۴-۳- آون حرارتی..... ۲۵
۲-۴-۴- سل دستگاه ESI-IMS..... ۲۵
۲-۴-۴- الف- منبع یونیزاسیون الکترواسپری ۲۶
۲-۴-۴- ب- ناحیه حلال‌زدایی ۲۷
۲-۴-۴-ج- شبکه الکتریکی و دستگاه مولد پالس ۲۷
۲-۴-۴-د- ناحیه رانش ۲۷
۲-۴-۴- ه- شبکه محافظ ۲۸
۲-۴-۴- و-آشکارساز..... ۲۸
۲-۴-۵- تقویت‌کننده پاسخ ۲۸
۲-۴-۶- مبدل آنالوگ به دیجیتال ۲۸

۲-۵- نحوه محاسبه پاسخ دستگاه IMS ۲۸
۲-۶- طراحی و ساخت محفظه واجذب ۲۹
۲-۶-۱- طرح شماره‌ی یک برای محفظه‌ی شویش ۲۹
۲-۶-۱- الف- محل اتصال سرنگ SPME ۲۹
۲-۶-۱- ب- مجرای شویش ۳۰
۲-۶-۱-ج- معایب طرح شماره‌ی یک ۳۰
۲-۶-۲- طرح شماره دو برای محفظه‌ی واجذب ۳۰
۲-۷- نحوه اتصال اجزا در سیستم شویش با حلال ۳۳
۲-۸- ساختن جاذب کامپوزیت برای استخراج با استفاده از نشاندن الکتروشیمیایی ۳۵
۲-۸-۱- آماده‌سازی فیبر استیل برای نشاندن جاذب ۳۵
۲-۸-۲- تهیه محلول سل ژل ۳۵
۲-۸-۳- ایجاد جاذب کامپوزیت به روش الکتروشیمیایی ۳۵
۲-۹- روش کلی استخراج ۳۶
۲-۱۰- نمونه حقیقی ۳۷
۲-۱۰-۱- ادرار ۳۷
۲-۱۰-۱- الف- آماده سازی نمونه‌های ادرار قبل از آنالیز ۳۷
۲-۱۰-۲- پلاسما ۳۷
۲-۱۰-۲- الف- آماده سازی نمونه پلاسما قبل از آنالیز ۳۷

فصل سوم : نتایج و بحث

مقدمه: ۳۹
۳-۱- طیف تحرک یونی ونلافکسین ۳۹
۳-۲- بررسی خطی بودن پاسخ دستگاه ۴۱
۳-۳- مقایسه شویش با جریان پویا و شویش با جریان ایستا ۴۳
۳-۴- بررسی پارامترهای موثر بر میزان واجذب آنالیت توسط حلال ۴۴
۳-۴-۱- مقدار جریان حلال ۴۴
۳-۴-۲- زمان ماند فیبر در مجرای شویش در حالت شویش با جریان حلال ایستا ۴۵
۳-۵- بررسی پارامترهای موثر بر راندمان استخراج ۴۶
۳-۵-۱- بررسی اثر نمک ۴۶
۳-۵-۲- اثر غلظت سدیم هیدروکسید ۴۷
۳-۵-۳- اثر دما ۴۹
۳-۵-۴- اثر سرعت همزن مغناطیسی ۵۰
۳-۵-۵- زمان تعادل ۵۰
۳-۵-۶- زمان استخراج ۵۱
۳-۶- ارزیابی روش ۵۲

۳-۶-۱- سرعت آنالیز ۵۲
۳-۶-۲- دقت روش ۵۲
۳-۶-۳- خطی بودن روش و حد تشخیص ۵۲
۳-۷- آنالیز داروی افزوده شده به نمونه‌های بیولوژیکی ۵۴
۳-۷-۱- نمونه ادرار ۵۵
۳-۷-۱-الف- بازیابی نسبی در آنالیز نمونه ادرار ۵۵
۳-۷-۱- ب- محدوده خطی در آنالیز نمونه ادرار ۵۶
۳-۷-۱- ج- دقت و حد تشخیص در آنالیز نمونه ادرار ۵۷
۳-۷-۱-د- آنالیز نمونه ادرار پس از مصرف دارو ۵۷
۳-۷-۲- نمونه پلاسما ۶۰
۳-۷-۲- الف - بازیابی نسبی دارو از نمونه پلاسما ۶۰
۳-۷-۲- ب- محدوده خطی در نمونه پلاسما ۶۱
۳-۷-۲-د- دقت و حد تشخیص در پلاسما ۶۲
۳-۷-۲-ه- آنالیز نمونه پلاسما پس از مصرف دارو ۶۳
۳-۸- مقایسه خصوصیات و ارقام شایستگی روش ارائه شده با روش‌های موجود ۶۵
۳-۹- نتیجه‌گیری نهایی ۶۶
۳-۱۰- آینده نگری ۶۷
منابع ۶۸

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل (۱-۱) : شمای ساده‌ای از دستگاه IMS با منبع یونیزاسیون الکترواسپری [۲۱] ۱۵
شکل (۱- ۲) : ساختار شیمیایی ونلافکسین ۱۷
شکل (۱- ۳) : ساختار شیمیایی اُ- دسمتیل ونلافکسین ۱۷
شکل (۱-۴) : شمایی از چگونگی عملکرد SNRI ها [۲۶] ۱۸
شکل(۲-۱) : شمایی از دستگاه IMS به‌کار رفته در این کار تحقیقاتی [۴۲] ۲۴
شکل (۲-۲) : طرح شماره‌ی یک برای محفظه‌ی واجذب ۳۱
شکل (۲-۳) : طرح شماره دو برای محفظه‌ی واجذب که در آن طول محفظه‌ی شویش ۱۳ میلی‌متر بیشتر از طرح شماره یک در نظر گرفته شده است. ۳۲
شکل(۲-۴) : انتهای سرنگ SPME به همراه اتصالات آب‌بندی کننده ۳۳
شکل (۲-۵) : نحوه‌ی قرار گرفتن اجزا در سیستم استفاده شده در این پروژه ۳۴
شکل(۲-۶) : مسیر عبور حلال، هنگامی که شیر در حالت بارگذاری قرار دارد(الف)، هنگامی که شیر در حالت تزریق قرار دارد(ب). ۳۴
شکل (۳-۱) : طیف IMS حاصل ازتزریق محلول ۵ میلی‌گرم بر لیتر ونلافکسین و طیف زمینه‌ی دستگاه ESI-IMS ۴۰
شکل (۳-۲) : پاسخ حاصل از تزریق محلول‌های استاندارد ونلافکسین به دستگاه ۴۲
شکل (۳-۳) : منحنی تنظیم برای تزریق استانداردهای ونلافکسین در حلال متانول ۴۲
شکل(۳-۴) : پروفایل شویش در حالت جریان پویا (الف), پروفایل شویش در حالت جریان ایستا، شرایط استخراج برای هر دو حالت یکسان در نظر گرفته شده است. ۴۴
شکل(۳-۵) : نمودار مربوط به اثر جریان حلال بر شویش، در حالت جریان حلال ایستا و غلظت ۰/۰۵ میلی گرم بر لیتر ونلافکسین ۴۵
شکل(۳-۶) : نمودار مربوط به زمان‌های مختلف ماند فیبر در حلال در محفظه‌ی واجذب ۴۶
شکل(۳-۷) : اثر افزایش نمک بر راندمان استخراج، غلظت ۰/۵۰ میلی‌گرم بر لیتر ونلافکسین، غلظت ۰/۰۵ مولار NaOH ، دمای ۹۳ درجه‌ی سانتی‌گراد ۴۷
شکل(۳-۸) : اثر pH بر راندمان استخراج محلول‌های ونلافکسین با غلظت ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر و در دمای ۹۳ درجه‌ی سانتی‌گراد، در حالت شویش با جریان حلال ایستا و جریان ۶ میکرولیتر بر دقیقه ۴۸
شکل (۳-۹) : اثر تغییر دما بر راندمان استخراج محلول‌های با غلظت ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر ونلافکسین و اشباع شده با نمک سدیم کلرید ۴۹
شکل (۳-۱۰) : اثر زمان تعادل بر راندمان استخراج ونلافکسین از محلول حاوی غلظت ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر آن، در دمای ۹۳ درجه سانتی‌گراد و در حجم ۸ میلی‌لیتر نمونه ۵۰
شکل (۳-۱۱) : اثر زمان استخراج بر راندمان استخراج ونلافکسین از محلول حاوی غلظت ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر آن، اشباع شده با نمک سدیم کلرید، با غلظت ۰/۰۷۵ مولار NaOH ، دمای ۹۳ درجه سانتی‌گراد و سرعت جریان حلال شویش برابر با ۶ میکرولیتر بر دقیقه ۵۱
شکل (۳-۱۲) : داده‌های حاصل از غلظت‌های مختلف ونلافکسین در نمونه آب ۵۳

شکل (۳-۱۳) : منحنی تنظیم برای ونلافکسین در نمونه آب، اشباع شده با نمک NaCl ، غلظت ۰/۰۷۵ مولار از NaOH و در زمان استخراج ۳۰ دقیقه ۵۴
شکل (۳-۱۵) : منحنی تنظیم برای ونلافکسین افزوده شده به نمونه‌های ادرار شامل غلظت های ۱، ۲، ۵، ۱۰، ۲۰، ۵۰ و ۷۵ میکروگرم بر لیتر. ۵۷
شکل(۳- ۱۶) : مقادیر ونلافکسین در نمونه‌های ادرار در زمان‌های ۳، ۶ و ۸ ساعت پس از مصرف قرص ۵۸
شکل(۳-۱۷): طیف حاصل از دستگاه، طیف نمونه شاهد ادرار و طیف نمونه ادرار در ساعت سوم ۵۹
شکل(۳-۱۸) : طیف حاصل از نمونه شاهد پلاسما و طیف زمینه‌ی دستگاه ESI-IMS ۶۰
شکل (۳-۱۹) : نمودار داده‌های حاصل استخراج از غلظت‌های مختلف ونلافکسین افزوده شده به نمونه پلاسما ۶۲
شکل (۳-۲۰) : منحنی تنظیم برای ونلافکسین افزوده شده به نمونه پلاسما ۶۲
شکل(۳-۲۱): مقادیر ونلافکسین در نمونه های پلاسما گرفته شده از شخص داوطلب در ساعت های ۲، ۳/۵ و ۵/۵ پس از مصرف قرص ۶۳
شکل(۳-۲۲) : طیف حاصل از نمونه شاهد، نمونه پلاسما در ساعت دوم پس از مصرف قرص و نمونه‌ی پلاسما در ساعت دوم پس از مصرف قرص که ۳۰۰ میکرولیتر محلول استاندارد آبی ۱ میلی‌گرم بر لیتر ونلافکسین به آن افزوده شده است. ۶۴

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول (۱-۱) : مشخصات شیمیایی ونلافکسین ۱۷

جدول(۲-۱) : شرایط اعمالی دستگاه ESI/IMS ۲۹

جدول (۳-۱) : نتایج حاصل ازتزریق استانداردهای ونلافکسین ۴۳

جدول (۳-۲) : پارامترهای شایستگی روش در اندازه‌گیری ونلافکسین در نمونه‌های استاندارد در حلال متانول ۴۳

جدول(۳-۳) : نتایج ثبت شده مربوط به جریان‌های مختلف حلال در حالت شویش با جریان حلال ایستا ۴۶

جدول(۳-۴) : نتایج مربوط به زمان ماند در حلال واجذب کننده در محفظه‌ی واجذب ۴۷

جدول (۳-۵) : نتایج حاصل از افزایش غلظت نمک ۴۸

جدول(۳-۶) : بررسی اثر pH بر راندمان استخراج با استفاده از غلظت‌های مختلف NaOH، غلظت ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر ونلافکسین ۵۰

جدول (۳-۷) : نتایج حاصل از افزایش دمای استخراج روی راندمان استخراج محلول‌های با غلظت ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر ونلافکسین و اشباع شده با نمک سدیم کلرید ۵۱

جدول (۳-۸) : نتایج حاصل تغییر زمان تعادل روی راندمان SPME ۵۲

جدول (۳-۹) : نتایج حاصل از زمان‌های مختلف استخراج ۵۳

جدول (۳-۱۰) : نتایج حاصل از استخراج غلظت‌های مختلف دارو در آب ۵۵

جدول (۳-۱۱) : پارامترهای شایستگی روش در نمونه آب ۵۶

جدول (۳-۱۲) : نتایج حاصل از استخراج ازغلظت‌های مختلف ونلافکسین در نمونه ادرار ۵۷

جدول (۳-۱۳) : پارامترهای شایستگی روش در نمونه‌های ادرار حاوی مقادیر مختلف ونلافکسین افزوده شده ۵۹

جدول (۳-۱۴) : غلظت‌های به‌دست آمده در نمونه ادرار بعد از مصرف قرص ونلافکسین ۶۰

جدول (۳-۱۵) : نتایج حاصل استخراج ازغلظت‌های مختلف دارو در نمونه‌های پلاسما ۶۳

جدول (۳-۱۶) : پارامترهای شایستگی روش HS-SPME-ESI-IMS برای ونلافکسین افزوده شده به نمونه‌ی پلاسما ۶۵

جدول (۳-۱۷) : غلظت به‌دست آمده ونلافکسین در پلاسمای شخص داوطلب بعد از مصرف قرص ۶۵

جدول (۳-۱۸) : مقایسه پارامترهای تجربه‌ای روش پیشنهاد شده جهت آنالیز ونلافکسین نسبت به روش‌های گزارش شده دیگر ۶۸

چکیده:

در این تحقیق، برای اولین بار تکنیک ریز استخراج فاز جامد به طیف‌سنج تحرک یونی با منبع یونیزاسیون الکترواسپری متصل شد. یک محفظه‌ی واجذب به‌عنوان حد واسط ، به‌منظور اتصال درخط تکنیک SPME به ESI-IMS طراحی و ساخته شد که در آن آنالیت توسط حلال الکترواسپری واجذب شده و به سوزن الکترواسپری وارد می گردد. مجرای شویش در محفظه‌ی واجذب دارای ارتفاع ۲۵ میلی‌متر و قطر داخلی ۰/۷ میلی‌متر می‌باشد و حجم مرده در آن بسیار کم است. این محفظه ساده، ارزان و کارآمد است. استخراج و تعیین مقدار داروی ونلافکسین در نمونه‌های بیولوژیکی از جمله ادرار و پلاسما به‌روش شرح داده شده انجام شد. روش مذکور توانایی مناسبی برای استخراج و تعیین مقدار آنالیت‌های ناپایدار حرارتی و دارای نقطه‌ی جوش بالا از خود نشان می‌دهد. فیبر SPME توسط کامپوزیت پلی‌پیرول/ سل- ژل پوشش داده شد. کامپوزیت پلی‌پیرول/ سل- ژل به‌صورت مستقیم روی سیم استیل ضد زنگ ، با استفاده از سیستم سه الکترودی و با اعمال پتانسیل ثابت ۱/۲ ولت به‌مدت ۱۰۰۰ ثانیه به‌روش الکتروشیمیایی نشانده شد. تاثیر پارامترهای مختلف شامل زمان استخراج، دما، pH و قدرت یونی بررسی شد و این پارامترها بهینه گردید. کامپوزیت پلی‌پیرول/ سل-ژل پس از قرار گرفتن در معرض متانول پایداری مناسبی از خود نشان داد و راندمان استخراج مناسبی برای ونلافکسین پس از استفاده از آن حاصل شد. منحنی تنظیم تحت شرایط بهینه ترسیم گردید و دامنه‌ی خطی ۵۰- ۰/۵ ، ۸۵- ۱ و ۱۰۰۰- ۲۰ میکروگرم بر لیتر به‌ترتیب برای محلول آبی استاندارد، نمونه‌ی ادرار با داروی افزوده شده و نمونه‌ی پلاسما با داروی افزوده شده به‌دست آمد. انحراف استاندارد نسبی ۱۱٪ و حد تشخیص ۰/۲ ، ۰/۶ و ۱۱ میکروگرم بر لیتر به‌ترتیب برای استخراج دارو از نمونه‌های استاندارد آبی، ادرار با داروی افزوده شده و پلاسما با داروی افزوده شده حاصل شد. بازیابی نسبی ۸۰٪ و۹۳٪ به‌ترتیب برای نمونه‌ی ادرار با داروی افزوده شده و پلاسما با داروی افزوده شده به‌دست آمد. به‌منظور بررسی و نشان دادن قابلیت روش برای آنالیز ونلافکسین در نمونه‌های بیولوژیکی حقیقی، ونلافکسین از نمونه‌های ادرار و پلاسمای گرفته شده از شخص داوطلب پس از مصرف دارو، با روش مذکور استخراج و تعیین مقدار شد.

کلمات کلیدی:

ریز استخراج فاز جامد، کامپوزیت پلی‌پیرول/ سل-ژل، ونلافکسین، محفظه‌ی شویش، طیف‌سنج تحرک یونی با منبع یونیزاسیون الکترواسپری

فصل اول
مقدمه و تئوری

مقدمه

امروزه، دانسته‌های بشری پیرامون نقش عوامل و گونه‌های مختلف شیمیایی در حوزه‌های سلامت، زیست‌شناسی، فیزیک، علوم مهندسی و شیمی صنعتی، پیشرفت و توسعه‌ی بسیاری داشته است. لذا، شناسایی دقیق کمّی و کیفی گونه‌های شیمیایی در بافت‌های پیچیده‌ی حقیقی از اهمیت فراوان برخوردار شده است. شناسایی کمّی و کیفی گونه‌های شیمیایی در حیطه‌ی عملکرد شیمی تجزیه قرار می‌گیرد و عموما به یکی از روش‌های الکتروشیمیایی[1] و یا طیف‌سنجی[2] انجام می‌شود. در یک آنالیز دقیق در بافت پیچیده‌ی حقیقی، لازم است گونه مورد نظر از سایر گونه‌های همراه جداسازی شده و تمام مزاحمت‌ها برطرف شود. روش‌های گوناگون جداسازی مانند: انواع کروماتوگرافی[3]، الکتروکروماتوگرافی[4]، الکترودیالیز[5]، دیالیز[6] و انواع روش‌های استخراج برای این منظور به‌کار گرفته می‌شود [۲،۱].

1- Electrochemical
2- Spectroscopy
3- Chromatography
4- Electro-chromatography
5- Electrodialysis
6- Dialysis

۱-۱- استخراج

روش‌های استخراج و ریز استخراج به‌عنوان رایج‌ترین روش‌های جداسازی، علاوه بر استحصال آنالیت مورد نظر از درون بافت نمونه، امکان تغلیظ آن را نیز همزمان با جداسازی به‌وجود می‌آورد و بدین ترتیب دستیابی به حد تشخیص‌های[۱] بسیار کم که یکی از پارامترهای شایستگی روش تجزیه‌ای است، امکان پذیر می‌شود.

هدف از تحقیقات و تلاش‌های علمی، در زمینه‌ی استخراج، ایجاد و توسعه‌ی روش‌های جدیدی است که در آنها، نیاز به استفاده از حلال‌های آلاینده و سمّی نباشد و یا به حداقل رسیده باشد، گزینش‌پذیری[۲] روش، جهت استخراج آنالیت‌های مختلف بهبود یابد، امکان آنالیز گونه‌های مورد نظر در نمونه‌های حقیقی مختلف فراهم شود، روش، قابلیّت اتصال به انواع دستگاه‌های جداسازی و شناسایی را داشته باشد، زمان لازم برای انجام استخراج به حداقل برسد، هزینه انجام استخراج حداقل باشد و پارامترهای شایستگی روش، شامل: حدتشخیص، حدکمّی بودن[۳]، دامنه خطی[۴] و حساسیت[۵] به‌سمت مطلوب سوق داده شود.

انتخاب روش استخراجی بستگی به نوع بافت نمونه، ماهیت آنالیت، اطلاعات مورد نیاز، حساسیت مورد نیاز و بودجه دارد. یکی از روش‌های استخراجی مفید و پرکاربرد ریز استخراج فاز جامد[۶] است.

۱-۲- ریزاستخراج فاز جامد (SPME)

این روش اولین بار در سال ۱۹۹۰ توسط پاولشین[۷] و همکارانش معرفی شد که در آن آنالیت از محلول نمونه به درون یک فاز جاذب (فیبر SPME) استخراج می‌شود [۳]. فاز جامد ساکن روی یک فیبر نازک شیشه‌ای یا فلزی نشانده شده و این فیبر به انتهای یک سرنگ نصب می‌شود، هنگامی که سرنگ درون نمونه وارد می‌شود با فشار دادن پیستون فیبر در محیط حاوی آنالیت قرار می‌گیرد، آنالیت به دلیل تمایل و همبستگی که با فاز جاذب دارد با فیبر در حالت تعادل قرار می‌گیرد، این تعادل به گونه ای برقرار می‌شود که غلظت آنالیت در فاز جاذب چندین برابر غلظت آن در نمونه است، اما چون مقدار فاز جاذب در مقایسه با مقدار نمونه خیلی کمتر است، تنها بین ۲ الی ۲۰ درصد آنالیت استخراج می‌شود. پس از استخراج، فیبر به‌منظور واجذب آنالیت استخراج شده وارد محفظه واجذب[۸] می‌شود و به یکباره تمام آنالیت استخراج شده، واجذب می‌گردد و مستقیماً وارد دستگاه می‌شود. کارایی استخراج SPME به زمان استخراج، ضخامت فاز جامد و بزرگی ضریب تقسیم[۹] گونه بستگی دارد [۱،۲،۴].

1- Detection limits
2- Selectivity
3- Limit of quantitation
4- Linear range
5- Sensitivity
6- Solid phase micro-extraction
7- Pawliszyn
8- Desorption chamber
9- Partition coefficient

۱-۲-۱- نحوه انجام ریزاستخراج فاز جامد

نحوه‌ی انجام ریز استخراج فاز جامد با توجه به مشخصات فیزیکی و شیمیایی آنالیت ، و همچنین نوع دستگاه به‌کار گرفته شده به‌عنوان دتکتور متفاوت است.

۱-۲-۱- الف- ریزاستخراج فاز جامد مستقیم[1]

در این روش، فیبر مستقیماً به داخل محلول نمونه وارد شده و استخراج آنالیت از داخل محلول انجام می‌شود تماس مستقیم فیبر با محلول نمونه موجب افزایش راندمان استخراج آنالیت می‌شود. فیبرهایی که به این روش جهت استخراج استفاده می‌شود باید پایداری کافی هنگام تماس با محلول نمونه را داشته باشد. در هنگام استخراج از نمونه‌های بیولوژیکی یا فاضلاب‌ها (نمونه‌های کثیف)، مقادیر زیادی از آلودگی‌ها روی سطح فیبر جذب می‌شود که علاوه بر تخریب و کاهش عملکرد فیبر در استخراج‌های بعدی، موجب افزایش مزاحمت‌ها در طیف‌بینی نیز می‌شود. به‌منظور رفع اثر این آلودگی‌ها، فیبر قبل از استخراج داخل یک غشای متخلخل[2] قرار داده شده و سپس غشا وارد محلول می‌شود [۱].

۱-۲-۱- ب- ریزاستخراج فاز جامد از فضای بالای نمونه[3]

هنگامی که آنالیت، یک گونه‌ی فرّار با فشار بخار قابل ملاحظه باشد از این روش می‌توان استفاده کرد. در این روش نمونه درون یک ظرف سربسته قرار می‌گیرد پس از حرارت دادن ظرف نمونه، ملکول‌های آنالیت بین محلول نمونه و فضای فوقانی آن در حالت تعادل قرار می‌گیرد. فیبر درون فضای فوقانی محلول نمونه قرارداده می‌شود و استخراج آنالیت از این ناحیه انجام می‌شود. این روش در مقایسه با روش ریز استخراج فاز جامد مستقیم از راندمان استخراج کمتری برخوردار است. در مواقعی که نمونه‌ها کثیف است و یا محدودیت در ورود آلودگی‌ها به محفظه واجذب و طیف‌بینی وجود دارد، ریز استخراج فاز جامد از فضای بالای نمونه می‌تواند به‌کار گرفته شود [۱].

۱-۲-۲- اصول تئوری

در استخراج از فضای فوقانی، روش سه فازی مطرح است که فاز اول پوشش فیبر، سپس فاز گازی (فضای فوقانی) و در پایان ماتریکس آنالیت سومین فاز می باشد، در طول فرایند استخراج، تعادل بین سه فاز بدون در نظر گرفتن خواص فیزیکی و شیمیایی آنالیت و ماتریکس برقرار می‌شود. جرم کل آنالیت در طول استخراج به‌صورت زیر است:

$$C_o V_s = C_c^{\infty} V_c + C_h^{\infty} V_h + C_s^{\infty} V_s \qquad (۱-۱)$$

1- Direct immersion SPME
2- Porous membrane
3- Headspace SPME

C_0 غلظت کلی آنالیت در ماتریکس، C_s^∞ و C_h^∞ و C_c^∞ به‌ترتیب غلظت نهایی یا تعادلی در نمونه، فضای فوقانی و پوشش فیبر است و V_c ، V_h و Vs به‌ترتیب حجم پوشش فیبر، فضای فوقانی و نمونه است.

ضریب توزیع فضای فوقانی/ پوشش می‌تواند به‌صورت زیر تعریف شود:

$$K_{ch} = C_c^\infty / C_h^\infty \qquad (۲-۱)$$

و ضریب توزیع نمونه/ فضای فوقانی:

$$K_{hs} = \frac{C_h^\infty}{C_s^\infty} \qquad (۳-۱)$$

بنابراین انتقال جرم مشاهده شده در پوشش به‌دست می‌آید با:

$$n = C_c^\infty V_c \qquad (۴-۱)$$

با جاگذاری روابط خواهیم داشت:

$$n = \frac{K_{ch} K_{hs}\, C_0\, V_c\, V_s}{K_{ch} K_{hs} V_c + K_{hs} V_h + V_s} \qquad (۵-۱)$$

همچنین:

$$K_{cs} = K_{ch} K_{hs} \qquad (۶-۱)$$

این رابطه زمانی صحیح است که نمونه در فضای فوقانی و سه فازی می‌باشد. اگر سیستم دو فازی باشد و به عبارتی جاذب به‌طور کامل در داخل نمونه قرار گیرد در این صورت می‌توان نوشت:

$$n = \frac{K_{cs} V_c C_o V_s}{K_{cs} V_c + V_s} \qquad (۷-۱)$$

در بعضی مواقع ثابت توزیع ماتریکس/ فیبر نسبتاً کم است و در نتیجه حجم نمونه از حجم پوشش خیلی بیشتر است. $V_c << V_s$ در این مورد ظرفیت ماتریکس نمونه بیشتر از ظرفیت پوشش فیبر بوده و معادله به‌صورت زیر است [۶،۵].

$$n = K_{cs} V_c C_o \qquad \Rightarrow \; V_s >> K_{cs} V_s \tag{۸-۱}$$

۱-۲-۳- عوامل موثر بر راندمان استخراج

پارامترهای متعددی به‌منظور بهبود سرعت، حساسیت و انتخاب‌گری در روش‌های ریز استخراج فاز جامد مورد مطالعه قرار می‌گیرد که در زیر بحث می‌گردد.

۱-۲-۳- الف- جاذب

میزان تخلخل، ضخامت جاذب ، مشابهت و همبستگی شیمیایی جاذب با آنالیت بر راندمان استخراج تاثیرگذار است. با افزایش تخلخل جاذب، سطح موثر برای جذب آنالیت بیشتر می‌شود و نزدیک بودن اندازه خلل و فرج جاذب با اندازه‌ی ملکول‌های آنالیت موجب بهبود انتخاب‌گری استخراج خواهد شد. جاذب‌های ضخیم‌تر ظرفیت بیشتری برای جذب دارند، اما هر چه ضخامت افزایش یابد زمان استخراج طولانی‌تر و اثر حافظه[۱] در فیبر بیشتر می‌شود. به‌تناسب افزایش مشابهت و همبستگی در گروه‌های عاملی[۲] آنالیت با جاذب، انتخاب‌گری و راندمان استخراج افزایش می‌یابد[۸،۷،۱].

۱-۲-۳- ب- دما

فرآیند جذب آنالیت بر روی سطح فیبر یک فرآیند گرمازا[۳] است، با افزایش دما تعادل به‌سمت نامطلوب پیش می‌رود و تاثیر ترمودینامیکی افزایش دما موجب کاهش راندمان فرآیند استخراج می‌شود. اما از طرف دیگر افزایش دما موجب بالا رفتن سرعت انتقال جرم و نفوذ گونه‌ها در فرآیند تعادلی جذب آنالیت روی جاذب می‌شود، در استخراج از فضای فوقانی، افزایش دما باعث افزایش فشار بخار آنالیت در فضای فوقانی می‌شود و سرعت رسیدن به تعادل بین فاز نمونه و فضای فوقانی افزایش می‌یابد. لذا تاثیر ترمودینامیکی[۴] و سینتیکی[۵] دما بر فرآیند جذب متفاوت و عکس یکدیگرند و آنچه در عمل و در حین فرآیند مشاهده می‌شود برآیند اثرات ذکر شده است [۱،۷،۸].

۱-۲-۳- ج- نمک

افزودن مقادیری نمک به محلول نمونه در ریز استخراج فاز جامد به‌ویژه هنگامی که استخراج از فضای فوقانی در حال انجام است، به افزایش راندمان استخراج گونه‌های آلی منجر می‌شود. پس از اینکه بلورهای کوچک نمک به محلول آبی وارد می‌شود، بلافاصله از هم پاشیده و به یون‌های مثبت و منفی تفکیک و به سرعت توسط ملکول‌های آب حلال‌پوشی[۶] می‌شود. ملکول‌های قطبی آب تمایل بیشتری برای قرارگرفتن در کنار یون‌ها دارد، لذا تعداد ملکول‌های آب پیرامون ملکول‌های آلی آنالیت کمتر می‌شود و در نتیجه، انتقال ملکول های آنالیت به فضای فوقانی

1- Memory effect
2- Functional groups
3- Exothermic
4- Thermodynamic
5- Kinetics
6- Solvation

و یا حرکت به سمت جاذب آسان تر انجام می‌گردد. افزایش قدرت یونی[1] محلول بر اثر افزودن نمک موجب کاهش راندمان استخراج در برخی موارد می‌شود، لذا افزودن نمک در استخراج مستقیم از نمونه، با توجه به ماهیت آنالیت استخراجی منجر به نتایج متفاوتی می‌گردد [۱،۷،۸].

۱-۲-۳- د- pH

اکثر جاذب‌ها در فیبرهای SPME دارای ماهیت غیر قطبی هستند و تمایل بیشتری نسبت به گونه‌های خنثی و ملکولی دارند، لذا گونه‌های باردار کمتر از گونه‌های مولکولی استخراج می‌شود، با تنظیم pH محلول امکان تبدیل گونه‌های کاتیونی یا آنیونی به مولکول‌های خنثی فراهم می‌شود. برای مثال اگر آنالیت ماهیت بازی داشته باشد، بالا بردن pH محلول مانع از یونیزه‌شدن آنالیت می‌شود و گونه در حالت ملکولی باقی می‌ماند [۱].

۱-۲-۳- ه- سرعت همزن

همزدن محلول با افزایش انتقال جرم و سرعت نفوذ، راندمان استخراج را بالا برده و زمان تعادل را کاهش می‌دهد، بالا بردن سرعت همزدن محلول تا زمانی که حرکت همزن مغناطیسی منظم بماند و حباب هوا تشکیل نشود، ادامه پیدا می‌کند [۱،۷،۸].

۱-۲-۳- و- زمان

فرایند جذب در SPME یک فرایند تعادلی است. هنگامی که تعادل بین فاز دهنده و جاذب برقرار شود استخراج کامل می‌شود و پس از آن با گذشت زمان میزان استخراج افزایش نمی‌یابد. مدت زمان رسیدن به تعادل با توجه به ضخامت جاذب، ماهیت جاذب و آنالیت، سرعت انتقال جرم و دما متغیر است [۱،۷،۸].

۱-۲-٤- مزایا و معایب SPME

SPME یک روش ارزان، سریع و آسان است که با استفاده از آن می‌توان طیف وسیعی از ترکیبات فرار و غیرفرار را از نمونه‌های مختلف بیولوژیکی و صنعتی به‌صورت مستقیم استخراج نمود، SPME قابلیت اتصال به دستگاه‌های HPLC، IMS، GC و MS را دارد. حدتشخیص پایین، تکرارپذیری[2] قابل قبول و وجود جاذب‌های مختلف و متنوع از ویژگی‌های این روش است [۱].

ازجمله معایب SPME می‌توان به انتخاب‌گری کم، محدودیت در عملکرد و تنوع فیبرهای تجاری در دسترس، همچنین راندمان کم استخراج برای آنالیت‌های قطبی در نمونه‌های حقیقی با ماتریکس قطبی اشاره کرد. تلاش‌ها و تحقیقات کنونی برای رفع این معایب و توسعه روش، از جمله اتصال به انواع دستگاه های تجزیه‌ای دارای قدرت جداسازی مانند MS، GC، HPLC و IMS در راستای بهبود انتخاب‌گری، و توسعه‌ی انواع مختلف جاذب‌ها و بسترها به‌عنوان فیبر، در حال انجام است [۱].

1- Ionic strength
2- Repeatability