بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه صنعتی اصفهان

دانشکده شیمی

اندازه گیری داروهای وین کریستین و وین‌بلاستین در نمونه گیاه پروانش با استفاده از روش ریزاستخراج مایع- مایع- مایع بر پایه فیبر تو خالی توسط دستگاه کروماتوگرافی مایع و آشکارساز اسپکترومتری جذب مولکولی

پایان نامه کارشناسی ارشد شیمی تجزیه

آذر شمس

استاد راهنما

دکتر محمد سراجی

۱۳۹۰

اکنون که در سایه لطف و عنایت پروردگار مهربانم توانستم مرحله دیگري از تحصیلاتم را با موفقیت به پایان رسانم به رسم ادب و سنت حسنه سپاس لازم می‌دانم از تمام کساني که مرا در این مسیر یاري نمودند، تشکر و قدرداني نماییم:

با سپاس بی‌پایان از خانواده گرامي و عزیزم که همواره مشوق من بوده و در همه حال مایه دلگرمي‌ام در طول تحصیلاتم بودند به خصوص پدر و مادر عزیز و مهربانم و با تشکر فراوان از همسر عزیز و گرامي‌ام

و با سپاس فراوان از استاد فرزانه‌ام:

جناب آقاي دکتر سراجي

که دانایی‌شان، علم کلامشان، روشنایی و شاگردیشان افتخار را برایم به همراه داشت.

استاد گرانقدري که با راهنمایی‌هاي گرانقدرشان مرا در پیمودن راه یاري نمودند.

. از جناب آقاي دکتر انصافي و جناب آقاي دکتر خیامیان که زحمت مطالعه، داوري و تصحیح این پایان‌نامه را تقبل نمودند، صمیمانه سپاسگزارم.

و از تمام استادان دانشکده شیمي دانشگاه صنعتي اصفهان که چگونه زیستن را از آنان آموختم.

از دوستان عزیزم در دانشکدهٔ شیمي بخصوص آزمایشگاه تحقیقاتي شیمي تجزیه، کمال تشکر را دارم.

تشکر و قدرداني مي نمایم از کلیه دوستانم در دانشگاه صنعتي اصفهان که هریک به نحوي مرا مورد لطف و عنایت خود قرار دادند که ذکر نام آنها در این مجال نمي‌گنجد.

آذر شمس

اسفند ۱۳۹۰

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.....هشت
فهرست شکل‌ها.....یازده
فهرست جدول‌ها..... سیزده
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 ۴
۱-۲-۲- تئوری استخراج مایع- مایع ۴
۱-۲-۳-کاربرد استخراج مایع- مایع ۶
۱-۳- استخراج با فاز جامد (SPE) ۶
۱-۳-۱- اصول استخراج با فاز جامد ۶
۱-۴- روشهای ریزاستخراج ۸
۱-۴-۱- ریزاستخراج با فازجامد ۸
۱-۴-۲- ریز استخراج فاز مایعLPME ۹
۱-۵- ریزاستخراج فاز مایع با فیبر توخالی (HF-LPME) ۱۰
۱-۵-۱ تئوری ریزاستخراج فاز مایع با فیبر توخالی ۱۲
۱-۵-۲- مقایسه روش ریزاستخراج فاز مایع با فیبر توخالی با روش‌های مشابه ۱۴
۱-۵-۳- پارامترهای موثر بر بازدهی استخراج ۱۵
۱-۵-۴- کاربردهای ریزاستخراج فاز مایع با فیبر توخالی ۱۷
فصل دوم: روش‌های اندازه‌گیری وین‌کریستین و وین‌بلاستین ۱۸
مقدمه ۱۸
۲-۱- آلکالوئیدها ۱۹
۲-۱-۱- نحوه عملکرد آلکالوئیدها و منابع گیاهی آن‌ها ۱۹
۲-۲- وین‌بلاستین ۲۲
۲-۳-وین‌کریستین ۲۴
۲-۴- مروری بر روش‌های به کار رفته برای اندازه‌گیری داروهای ضد سرطان ۲۵
۲-۴-۱- کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا ۲۵
۲-۴-۲- کروماتوگرافی گازی ۲۷

فصل سوم: بخش تجربی ۲۹
۳-۱- دستگاه‌ها و وسایل مورد نیاز ۲۹
۳-۲- مواد شیمیایی و محلول‌های مورد نیاز ۳۰
۳-۲-۱- تهیه محلول‌های استاندارد داروهای ضد سرطان ۳۰
۳-۳- ریزاستخراج فاز مایع با فیبر توخالی ۳۰
۳-۳-۱- روش کلی استخراج ۳۰
۳-۳-۲- بهینه‌سازی شرایط استخراج ۳۲
۳-۳-۲-الف- بررسی نوع حلال آلی ۳۲
۳-۳-۲-ب- بررسی اثر غلظت سدیم هیدروکسید در محلول نمونه ۳۲
۳-۳-۲-ج-بررسی اثر نوع اسید در محلول پذیرنده ۳۲
۳-۳-۲-د- بررسی اثر غلظت استیک اسید در محلول پذیرنده ۳۲
۳-۳-۲-ه- بررسی اثر سرعت همزدن محلول نمونه ۳۳
۳-۳-۲-و- بررسی اثر افزایش نمک ۳۳
۳-۳-۲- ز- بررسی اثر زمان استخراج ۳۳
۳-۳-۲-ح- بررسی اثر دمای استخراج ۳۳
۳-۳-۲-ط-بررسی اثر pH محلول نمونه ۳۴
۳-۴- ارقام شایستگی روش ۳۴
۳-۴-۱- دقت روش ۳۴
۳-۴-۲- فاکتور غنی‌سازی ۳۴
۳-۴-۳- بررسی محدوده خطی و حد تشخیص روش ۳۴
۳-۴-۴- آماده‌سازی و آنالیز نمونه‌های حقیقی ۳۵
فصل چهارم: بحث و نتیجه‌گیری ۳۶
مقدمه ۳۶
۴-۱- بررسی شرایط مؤثر بر ریزاستخراج فاز مایع با فیبر توخالی ۳۸
۴-۱-۱- بررسی اثر نوع حلال آلی ۳۸
۴-۱-۲- بررسی اثر pH وغلظت سدیم هیدروکسید در محلول نمونه ۴۰
۴-۱-۳- بررسی اثر نوع اسید در محلول پذیرنده ۴۲
۴-۱-۴- بررسی اثر غلظت استیک اسید در محلول پذیرنده ۴۳
۴-۱-۵- بررسی اثر سرعت همزدن محلول نمونه ۴۴
۴-۱-۶- بررسی اثر افزایش نمک ۴۶

۴-۱-۷- بررسی اثر زمان استخراج ۴۷
۴-۱-۸- بررسی اثر دمای محلول نمونه ۴۸
۴-۱-۹- بررسی اثر pH درمحلول نمونه حقیقی ۵۰
۴-۲- ارقام شایستگی روش ریزاستخراج مایع با فیبر توخالی ۵۳
۴-۲-۱- دقت روش ۵۳
۴-۲-۲- فاکتور غنی‌سازی ۵۴
۴-۲-۳- بررسی محدوده خطی ۵۴
۴-۲-۴- حد تشخیص روش ۵۵
۴-۲-۵- آنالیز نمونه حقیقی ۵۸
۴-۳- نتیجه‌گیری نهایی ۶۵
مراجع ۵۷

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱- قیف جداکننده برای LLE ۴
شکل ۱-۲- مراحل استخراج با فاز جامد. ۷
شکل ۱-۳- شمایی از سرنگ SPME. ۹
شکل ۱-۴- سیستم به کار رفته توسط لیو و داسگوپتا برای استخراج قطره در قطره..... ۱۰
شکل ۱-۵- (الف) طرح ریزاستخراج در فضای بالای محلول (ب) ریزاستخراج به روش غوطه‌وری مستقیم..... ۱۱
شکل ۱-۶- شمای کلی ریزاستخراج فاز مایع با فیبر توخالی. ۱۲
شکل ۱-۷- شمای ریزاستخراج فاز مایع با انتقال‌گر فاز..... ۱۳
شکل ۱-۸-طرحی از ریز استخراجHF-LPME سه فازی. ۱۴
شکل ۲-۱- تصویر ظاهری گیاه پروانش و جوانه‌های جانبی آن. ۲۰
شکل ۲-۲- ساختار مولکولی برخی از آلکالوئیدهای موجود در گیاه پروانش. ۲۱
شکل ۳-۱- نحوه اتصال فیبر توخالی به انتهای یک سرنگ الف) آرایش میله‌ای ب) U شکل. ۳۱
شکل ۴-۱- طیف UV مربوط به دو ترکیب ۱) وین‌کریستین ۲) وین‌بلاستین..... ۳۷
شکل ۴-۲- کروماتوگرام مربوط به محلول استاندارد ترکیبات مورد آنالیز با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر..... ۳۷
شکل ۴-۳- بررسی اثر نوع حلال آلی بر راندمان استخراج..... ۳۹
شکل ۴-۴- بررسی اثر pH محلول نمونه بر راندمان استخراج. ۴۱
شکل ۴-۵- بررسی اثرغلظت سدیم هیدروکسید بر راندمان استخراج..... ۴۲
شکل ۴-۶- بررسی اثر نوع اسید در محلول پذیرنده بر راندمان استخراج. ۴۳
شکل ۴-۷- بررسی اثر غلظت استیک اسید در محلول پذیرنده بر راندمان استخراج..... ۴۴
شکل ۴-۸- بررسی اثر سرعت همزدن محلول نمونه در محلول نمونه بر راندمان استخراج..... ۴۵
شکل ۴-۹- بررسی اثر افزایش نمک بر راندمان استخراج..... ۴۷
شکل ۴-۱۰- بررسی اثر زمان استخراج بر راندمان استخراج. ۴۸
شکل ۴-۱۱- بررسی اثر دمای محلول نمونه بر راندمان استخراج ۴۹
شکل ۴-۱۲- بررسی اثر pH محلول نمونه حقیقی بر راندمان استخراج..... ۵۱
شکل۴-۱۳-کروماتوگرام ترکیبات مورد نظر در نمونه حقیقی گیاه درpH= ۴ . ۱) وین‌کریستین ۲) وین‌بلاستین..... ۵۱
شکل۴-۱۴-کروماتوگرام ترکیبات مورد نظر در نمونه حقیقی گیاه درpH= ۶ . ۱) وین‌کریستین ۲) وین‌بلاستین..... ۵۲
شکل٤-۱۵-کروماتوگرام ترکیبات مورد نظر در نمونه حقیقی گیاه در pH= ۸ . ۱) وین‌کریستین ۲) وین‌بلاستین..... ۵۲
شکل۴-۱۶-کروماتوگرام ترکیبات مورد نظر در نمونه حقیقی گیاه در pH= ۱۰ . ۱) وین‌کریستین ۲) وین‌بلاستین..... ۵۳
شکل ۴-۱۷- منحنی کالیبراسیون وین‌کریستین درغلظت ۰/۰۰۵ مولار سدیم هیدروکسید ۵۶
شکل ۴-۱۸- منحنی کالیبراسیون وین‌بلاستین درغلظت ۰/۰۰۵ مولار سدیم هیدروکسید ۵۷
شکل ۴-۱۹- منحنی کالیبراسیون وین‌کریستین درpH=۶ ..... ۵۷

شکل ۴-۲۰- منحنی کالیبراسیون وین‌بلاستین در pH=۶ ..... ۵۸
شکل ۴-۲۱- کروماتوگرام نمونه برگ گیاه پروانش بدون افزایش استاندارد (شاهد)..... ۶۰
شکل ۴-۲۲- کروماتوگرام نمونه برگ گیاه پروانش حاوی داروهای ضد سرطان با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر لیتر..... ۶۱
شکل ۴-۲۳- کروماتوگرام نمونه برگ گیاه پروانش حاوی داروهای ضد سرطان با غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر لیتر..... ۶۱
شکل ۴-۲۴- کروماتوگرام نمونه برگ گیاه پروانش حاوی داروهای ضد سرطان با غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر لیتر..... ۶۲
شکل ۴-۲۵- کروماتوگرام نمونه ساقه گیاه پروانش بدون افزایش استاندارد (شاهد) ۶۲
شکل ۴-۲۶- کروماتوگرام نمونه ساقه گیاه پروانش حاوی داروهای ضد سرطان با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر لیتر..... ۶۳
شکل ۴-۲۷- کروماتوگرام نمونه ساقه گیاه پروانش حاوی داروهای ضد سرطان با غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر لیتر..... ۶۳
شکل ۴-۲۸- کروماتوگرام نمونه ساقه گیاه پروانش حاوی داروهای ضد سرطان با غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر لیتر..... ۶۴

فهرست جدول‌ها

عنوان **صفحه**

جدول ۲-۱- داده‌های مربوط به داروهای مطالعه شده در این تحقیق. ۲۳

جدول ۴-۱- زمان بازداری ترکیبات مورد آنالیز ۳۷

جدول ۴-۲- بررسی اثر نوع حلال آلی بر راندمان استخراج. ۳۹

جدول ۴-۳- بررسی اثر pH محلول نمونه بر راندمان استخراج. ۴۰

جدول ۴-۴- بررسی اثر غلظت سدیم هیدروکسید بر راندمان استخراج. ۴۱

جدول ۴-۵- بررسی اثر نوع اسید در محلول پذیرنده بر راندمان استخراج. ۴۲

جدول ۴-۶- بررسی اثر غلظت استیک اسید در محلول پذیرنده بر راندمان استخراج. ۴۴

جدول ۴-۶- بررسی اثر سرعت همزدن محلول نمونه بر راندمان استخراج. ۴۵

جدول ۴-۸- بررسی اثر افزایش نمک بر راندمان استخراج. ۴۶

جدول ۴-۹- بررسی اثر زمان استخراج بر راندمان استخراج. ۴۸

جدول ۴-۱۰- بررسی اثر دمای محلول نمونه بر راندمان استخراج ۴۹

جدول ۴-۱۱- بررسی اثر pH محلول نمونه حقیقی بر راندمان استخراج ۵۰

جدول ۴-۱۲- فاکتور غنی‌سازی، درصد انحراف استاندارد نسبی در یک روز و حد تشخیص روش در غلظت ۰/۰۰۵ مولار سدیم هیدروکسید.. ۵۵

جدول ۴-۱۳- فاکتور غنی‌سازی، درصد انحراف استاندارد نسبی در یک روز و حد تشخیص روش در PH=۶. ۵۵

جدول ۴-۱۴- مربع ضریب همبستگی، معادله خطوط نمودار کالیبراسیون و محدوده خطی روش در غلظت ۰/۰۰۵ مولار سدیم هیدروکسید.. ۵۶

جدول ۴-۱۵- مربع ضریب همبستگی، معادله خطوط نمودار کالیبراسیون و محدوده خطی روش در PH=۶.. ۵۶

جدول ۴-۱۶- درصد انحراف استاندارد نسبی، معادله خط، مربع ضریب همبستگی، مقدار و غلظت داروها برای افزایش استاندارد در نمونه برگ گیاه پروانش. ۵۹

جدول ۴-۱۷- درصد انحراف استاندارد نسبی، معادله خط و مربع ضریب همبستگی، مقدار و غلظت داروها برای افزایش استاندارد در نمونه ساقه گیاه پروانش. ۶۰

جدول ۴-۱۸- مقایسه ویژگی‌های تجزیه‌ای روش با روش‌های ارائه شده دیگربرای داروی وین‌کریستین. ۶۵

جدول ۴-۱۹- مقایسه ویژگی‌های تجزیه‌ای روش با روش‌های ارائه شده دیگربرای داروی وین‌بلاستین. ۶۶

چکیده:

وین‌کریستین و وین‌بلاستین که از داروهای طبیعی ضد سرطان هستند، دو آلکالوئید از ۱۳۰ آلکالوئید ی هستند که در گیاه پروانش یافت می‌شوند.در هر حال تعداد بسیار کمی (در حدود ۱۱ مورد) از این تعداد زیاد آلکالوئیدهای موجود در این گیاه بررسی شده‌اند و نیز تعداد کمتری از این‌ها (در حدود ۸ مورد) به طور تجاری در دسترس هستند. در طی۳۰ سال گذشته روش‌های تجزیه‌ای متفاوتی برای جداسازی و اندازه‌گیری متابولیت‌های موجود در این گیاه توسعه داده شده است. در این پروژه روش ریز استخراج سه فازی مایع با استفاده از فیبر تو خالی برای استخراج این دو آلکالوئید از برگ و ساقه این گیاه به کار برده شد. سپس دو ترکیب استخراج شده توسط دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا و نیز استفاده از آشکارساز آرایه دیودی اندازه‌گیری شدند. برای بهینه‌سازی و افزایش هر چه بیشتر بازدهی استخراج، پارامترهای مهم و موثر بر راندمان استخراج از قبیل حلال آلی مورد استفاده، pH فاز دهنده، pH فاز پذیرنده، دمای استخراج، زمان استخراج وسرعت هم‌زدن محلول مطالعه و بهینه‌سازی گردیدند. ارقام شایستگی تجزیه‌ای تحت این شرایط بهینه، اندازه-گیری شدند. حد تشخیص در این روش در حد ۰/۷۲ تا ۱/۰۲ میکرو گرم بر لیتر برای وین‌کریستین و وین‌بلاستین به دست آمد. همچنین انحراف استاندارد نسبی محاسبه شده در این روش برای ۵ تکرار در یک روز برای دو داروی مورد مطالعه بین ۱/۴ تا ۳/۶ درصد محاسبه گردید. محدوده خطی این روش بین ۵ تا ۱۰۰۰ میکرو گرم بر لیتر برای هر دو ترکیب به دست آمد. این روش همچنین برای اندازه‌گیری مقادیر این دو دارو در نمونه حقیقی گیاه مورد استفاده قرار گرفت. برای این کار نمونه خشک گیاه توسط محلول اسیدی استخراج گردید و پس از فیلتر شدن و انجام استخراج تحت شرایط بهینه با روش ریز استخراج سه فازی مایع توسط فیبر تو خالی، ترکیبات استخراج شده به وسیله دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا همراه با آشکارساز آرایه دیودی اندازه‌گیری شدند. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که این روش یک روش کارآمد برای جداسازی، استخراج و اندازه‌گیری این داروهای ضد سرطان از گیاه پروانش می‌باشد.

کلمات کلیدی: ریزاستخراج فاز مایع با فیبر تو خالی، کروماتوگرافی مایع، وین‌کریستین، وین‌بلاستین، آلکالوئیدهای وینکا،گیاه پروانش.

فصل اول
سازی نمونه‌استخراج و آماده

مقدمه

امروزه با افزایش روزافزون انواع سرطان وتومور تلاش برای دست‌یابی به داروهای موثرتر و با عوارض جانبی کمتر بسیار مورد توجه قرار گرفته است. آلکالوئیدهای وینکا برای انواع مختلفی از بدخیمی‌های خونی و تومورهای جامد از قبیل ریه، بیضه و سرطان سینه استفاده می‌شوند. معمول‌ترین آلکالوییدهای وینکا شامل وین‌کریستین[۱] وین‌بلاستین[۲] و وینورلبین[۳] هستند. تهیه برخی از مواد موثرکه در صنایع دارویی اهمیت بسیاری دارند به طور مصنوعی امکان‌پذیر نیست و فقط به صورت طبیعی از گیاهان مورد نظر قابل استخراج هستند. این دسته از مواد یا به طور کلی ساختار شیمیایی ناشناخته‌ای دارند و یا به دلیل داشتن ساختمان شیمیایی بسیار پیچیده، تهیه آنها به صورت مصنوعی در صنایع داروسازی مشکل و مستلزم هزینه بسیار زیاد است. آلکالوئیدهای موجود در پروانش[۴] از این دسته می‌باشند. از آن جهت که در گیاه پروانش در حدود ۱۳۰ نوع آلکالوئید موجود می‌باشد و نیز این گیاه تنها منبع تهیه دو آلکالوئید وین‌کریستین و وین‌بلاستین است، در نتیجه به دلیل غلظت کم این داروها و مزاحمت‌های زیاد موجود در بافت[۵] نمونه های گیاهی لازم است قبل از آنالیز توسط دستگاه‌های تجزیه‌ای، رقیق‌سازی، پیش‌تغلیظ[۶] و پاکسازی[۷] روی نمونه‌های

1-Vincristine
2-Vinblastine
3-Vinorelbine
4-Periwinkle
5-Matrix
6-Preconcentration
7-Clean-up

حقیقی انجام شود. بدین منظور روشهای گوناگونی برای آماده‌سازی نمونه‌ها توسعه یافته‌اند که با توجه به پیچیدگی و ماهیت بافت نمونه، نوع گونه مورد آنالیز[1] و تکنیک دستگاهی مورد استفاده می‌توان آن‌ها را به کار برد.
قسمت عمده‌ای از زمان آنالیز صرف آماده‌سازی نمونه می‌شود، بنابراین ضرورت بهبود تکنیک‌های آماده‌سازی نمونه بیش از پیش احساس می‌شود. بررسی‌ها نشان می‌دهد که بیشترین زمان آنالیز صرف آماده‌سازی نمونه می‌شود، در حالی‌که مدت زمان بسیار کمتری عملاً صرف اندازه‌گیری اجزای نمونه می‌گردد. بقیه این زمان صرف آماده-سازی نمونه و بررسی اطلاعات گردآوری شده می‌شود [۱و۲و۳و٤و٥].

۱-۱- انتخاب و ارزیابی روش‌های جداسازی

برای جداسازی و اندازه‌گیری کامل یک گونه از یک مخلوط باید از یک روش کارآمد و گزینش‌پذیر استفاده نمود. این موضوع در جلوگیری از خطا و اشتباه، اتلاف وقت و هزینه از اهمیت بسیاری برخوردار است. آگاهی از خواص شیمیایی گونه و نیز بافتی که نمونه در آن حل شده در انتخاب روش بسیار موثر است. در نتیجه فاز استخراج-کننده نمونه را می‌توان با بررسی شرایط ذکر شده انتخاب نمود. زمانی‌که جداسازی برای خالص‌سازی یک گونه باشد، فاکتور جداسازی اجزاء نامطلوب نسبت به جزء مورد نیاز اهمیت بیشتری در مقایسه با بازیابی جزء مطلوب پیدا می‌کند. پیش تغلیظ 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 دسته زیر طبقه‌بندی می‌شوند:

۱) روش‌هایی که هدفشان آزاد سازی نمونه از بافت بیولوژیکی است که شامل هیدرولیز با اسید، باز یا آنزیم می‌باشد.
۲) روش‌هایی مانند کریستالیزاسیون[2]، استخراج مایع-مایع[3](LLE) و استخراج با فاز جامد[4](SPE) که شامل استخراج ترکیبات از درون محلول هستند.
۳) روش‌هایی برای آماده‌سازی مایع شامل رقیق‌سازی ،تبخیر، انحلال، صاف کردن و .....
۴) روش‌هایی برای افزایش گزینش‌پذیری و حساسیت آنالیز مانند انجام مشتق‌سازی قبل و بعد از ستون[۶].

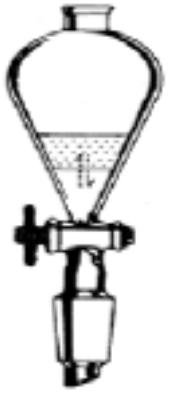
۱-۲- روش‌های متداول استخراج

روش‌های استخراج متفاوتی برای آماده‌سازی نمونه قبل از جداسازی و اندازه‌گیری توسعه یافته‌اند از جمله مهم‌ترین و پرکاربردترین این روش‌ها می‌توان استخراج مایع-مایع، استخراج با فاز جامد و انواع روش‌های ریز استخراج را که در سال‌های اخیر گسترش و توسعه یافته‌اند نام برد. هدف مهم و اصلی این روش‌ها غالباً پیش‌تغلیظ و پاک‌سازی نمونه است [۴].

1- Analyte
2- Crystallization
3- Liquid-Liquid Extraction
4- Solid Phase Extraction

۱-۲-۱- استخراج مایع- مایع

استخراج مایع-مایع روشی برای جداسازی آنالیت مورد نظر از گونه‌های مزاحم بافت نمونه توسط انتقال گزینش‌پذیر یک یا چند ترکیب از یک محلول مایع (غالباً آب) به یک محلول غیرقابل امتزاج با مایع قبلی(حلال آلی) می‌باشد.
غالباً استخراج مایع-مایع تجزیه‌ای توسط یک قیف جداکننده انجام می‌گیرد(شکل ۱-۱).
در ابتدای کار باید pH محلول نمونه طوری تنظیم شود که گونه مورد آنالیز به شکل مولکولی خود تبدیل شود، سپس این محلول باید چند مرتبه با حلال آلی غیر قابل امتزاج با آب مخلوط گشته و به شدت تکان داده شود تا یک امولسیون موقتی تشکیل گردد. برای اینکه انتقال جرم مواد حل‌شده مورد نظر بین دو فاز تشکیل‌شده سریع‌تر انجام گیرد، باید مساحت سطح تماس بین این دو فاز به قدر کافی زیاد باشد. در نهایت امولسیون ایجاد شده باید شکسته شود و دو مایع به گونه‌ای با هم مخلوط شوند که دو فاز مایع به‌هم پیوسته و در ارتباط باهم اما غیر قابل امتزاج تشکیل دهند. اما گاهی اوقات امولسیون‌ها خیلی آهسته یا به‌طور ناقص می‌شکنند که این یک مشکل عملی در استخراج مایع-مایع می‌باشد.



شکل ۱-۱- قیف جداکننده برای LLE [۷].

هنگامی‌که امولسیون به طور کامل شکسته شد، به وسیله باز کردن شیر قیف جداکننده مایع پایینی که چگالی بیشتری دارد تخلیه می‌گردد. در پایان مواد آبدوست بافت نمونه تمایل به ماندن در فاز آبی دارند ولی مواد وترکیبات آبگریز به فاز آلی منتقل می‌شوند. می‌توان توسط تبخیر، فاز آلی جمع آوری شده را تغلیظ نمود . اگر آنالیز شیمیایی ماده حل‌شده به طور مستقیم در مایع آلی قابل انجام نباشد و یا اگر گونه‌های مزاحم نیز به فاز آلی منتقل شوند، باید استخراج برگشتی انجام گیرد [۷و۴].

۱-۲-۲- تئوری استخراج مایع- مایع

با توجه به خواص ترکیبات وچگونگی بر هم کنش آن‌ها با هر یک از فازها و با این فرض که سیستم اشباع نشده است، هر گونه‌ای با یک نسبت ثابت و معین بین دو فاز توزیع می‌گردد. استخراج یک گونه حل‌شده توسط قانون توزیع نرنست که نمایان‌گرتوزیع یک گونه بین دو مایع غیر قابل امتزاج که با نسبت‌های یکسان در تعادل است،

توصیف می‌شود. در نتیجه برای گونه حل‌شده A که بین دو حلال آلی وآبی توزیع می‌شود ضریب توزیع با معادله زیر توصیف می‌شود:

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

که $[A]_a$ عبارت است ازغلظت تعادلی A درفاز آبی و$[A]_o$ عبارت است از غلظت تعادلی A در فاز آلی.
K_Dنیز ضریب توزیع است که از غلظت کل ماده حل‌شونده مستقل می‌باشد. البته لازم به ذکر است که در این حالت دما و فشار باید ثابت فرض شوند و گونه A باید در هر دو فاز به یک شکل موجود باشد. هنگامی‌که گونه حل‌شونده به میزان جزیی تفکیک شود و به اشکال مختلف مانند گونه خنثی، یون‌های آزاد و یا به شکل جفت‌یون با یون مخالف خود موجود باشد، آن‌گاه مقدار K_D نشان دهنده توزیع کلی گونه حل‌شده بین دو فاز نیست و در این حالت استخراج توسط کمیت نسبت توزیع D مورد نظر 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 آن 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:

$$X_n = A\left(\frac{V_{aq}}{2DV_{org} + V_{aq}}\right)^n \qquad (٤-۱)$$

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 [۸,٦-۱۰].

1-Extraction Percent

۱-۲-۳ کاربرد استخراج مایع-مایع

مهمترین و بیشترین 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 زمین‌شناسی، فلزشناسی، محصولات نفتی، مواد غذایی، بافت‌های گیاهی، جانوری و مایعات بدن را می‌توان نام برد. روش‌های استخراج برای گونه‌های آلی خالص، گزینش‌پذیری سیستم‌های شامل فلزات را ندارد، که به خاطر عدم وجود عامل کمپکس‌کننده و واکنش‌های استتار مناسب برای گونه‌های آلی می‌باشد. با این حال، گروهی از مواد نظیر هیدروکربن‌ها، اسیدها، چربی‌ها، موم‌ها و ... را می‌توان قبل از آنالیز به وسیله روش‌های دیگر، جداسازی نمود [۱۰].

روش استخراج مایع- مایع به دلیل ساده بودن و عدم نیاز به دستگاه‌های پیچیده و درنتیجه گران‌قیمت، کاربرد زیادی در پیش‌تغلیظ، استخراج و آنالیز نمونه‌های زیست‌محیطی دارد که با انتخاب حلال آلی مناسب و تنظیم pH، استخراج تمیز با گزینش‌پذیر را برای گونه مورد آنالیز به وجود آورد. البته این روش نیز مانند سایر روش‌های تجزیه‌ای معایبی دارد که از آن جمله می‌توان به 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 سمی،اغلب قابل‌اشتعال وگران‌قیمت اشاره نمود. گاهی اوقات تشکیل امولسیون نیز مشکل‌ساز است زیرا امکان دارد به راحتی برطرف نشود، خودکار کردن این روش نیز بسیار مشکل می‌باشد و دریک نگاه کلی زمان و هزینه آنالیزها بالاست [۶,۳]. با توسعه روش‌های جدید استخراج که با زمان کوتاهتر و مصرف کمتر حلال انجام می‌پذیرد، کاربرد استخراج مایع- مایع در کارهای تجزیه‌ای محدود گشته است.

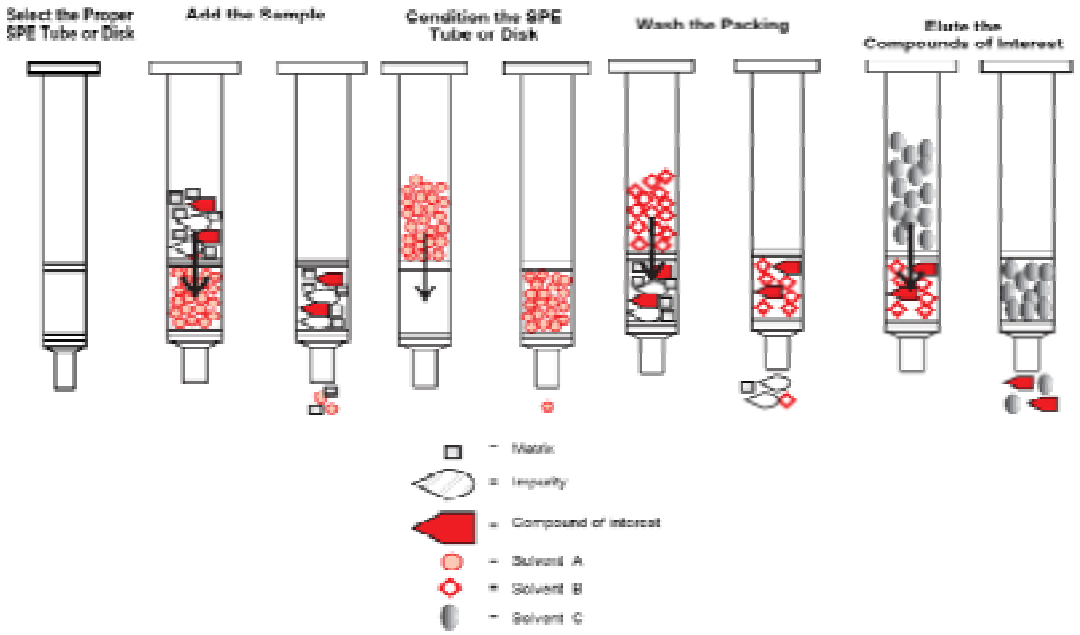
۱-۳- استخراج با فاز جامد (SPE)

استخراج با فاز جامد در سال ۱۹۷۰ برای حذف یا به حداقل رساندن مشکلات استخراج مایع-مایع معرفی شد. هر چند در گذشته از استخراج مایع-مایع برای حذف مزاحمت‌ها و تغلیظ گونه مورد آنالیز به طور عمده استفاده می‌شد، اما بازیابی اجزای نمونه به وسیله استخراج مایع-مایع به ندرت به طور کامل انجام می‌یافت و مستلزم کار زیادی بود. البته به کار گرفتن و نیز دفع ضایعات زیاد حلال به طبیعت و محیط زیست مشکلات روش مایع-مایع را افزایش می‌داد. امروزه با استفاده از روش استخراج با فاز جامد این مشکلات به حداقل رسیده است [۳].

۱-۳-۱- اصول استخراج با فاز جامد

این روش معمولاً در چهار مرحله انجام می‌شود. مرحله اول انتخاب و آماده‌سازی ستون جاذب است.در ابتدا ستون توسط یک حلال آلی با قدرت شویش بالا شسته می‌شود تا آمادگی لازم برای جذب گونه‌ها بر روی ستون فراهم گردد و ناخالصی‌های موجود در ستون برطرف شوند. بعد از آن ستون توسط یک حلال با قدرت شویش کم مانند آب شسته می‌شود، تا برای عبور نمونه‌ها آماده شود و نیزحلال آلی باقیمانده از روی ستون حذف گردد. در مرحله دوم نمونه از روی ستون عبور داده می‌شود. در این مرحله ترکیبات آلی بر روی ستون جذب می‌شوند. مرحله سوم

مرحله پاکسازی یا شستشو[1] نام دارد که درآن حذف گونه‌های مزاحم توسط عبور یک حلال آلی از روی ستون است به گونه‌ای که کمترین اثر را بر روی گونه‌های مورد نظر داشته باشد. مرحله چهارم، واجذب گونه‌های مورد نظر از روی ستون به وسیله عبور حجم کمی از یک حلال با قدرت شویش بالا است. این حلال گونه‌ها را از روی ستون شسته و برای آنالیز بعدی آماده می‌کند. این مرحله شویش[2] نامیده می‌شود شمایی از این روند درشکل ۱-۲ نشان داده شده است. بیشترین پیش‌تغلیظ موقعی اتفاق می‌افتد که مواد، بیشترین بازداری را با آب و کمترین بازداری را با حلال آلی واجذبی داشته باشند [۶]. جاذب های استفاده شده برای استخراج فاز جامد به سه شکل کلی دسته بندی می گردند که شامل دیسک ها[3]، کارتریج[4] ها و استوانه های سرنگ[5] می باشد [۱۱].



شکل ۱-۲- مراحل استخراج با فاز جامد [۱۱].

برای SPE، اکثر جاذب‌های مورد مطالعه، سیلیکاهای C_{18} و به مقدار کمتر C_8، کوپلیمرهای استایرن دی وینیل بنزن، جاذب‌های کربنی، جاذب‌های تبادل یون، جاذب‌های ایمونو[6]، جاذب‌هایی بر پایه کمپلکس‌های فلزی و پلیمرهای قالب ملکولی[7](MIP) می‌باشند [۱۲ و۱۳]. در سال‌های گذشته بسترهای پلیمری MIP با استخراج عالی و گزینش‌پذیری بسیار خوب برای اندازه‌گیری ترکیبات مختلف بیولوژیکی، طبیعی و زیست محیطی مورد استفاده قرار گرفته‌اند [۱۴-۱۷].

1-Washing
2-Elution
3-Disks
4- Cartridge
5-Syringe Barrel
6-Immono Sorbent
7-Molecullary Imprinted Polymer

در روش SPE مقدار مصرف حلال نسبت به LLE کاهش چشمگیری یافته و محدوده وسیعی از جاذب‌ها را در اختیار دارد. تغلیظ بالای نمونه، استخراج خالص و تمیز و خودکار شدن از مزایای دیگر این روش است. اما چون در این روش آنالیزها در چند مرحله انجام می‌شوند، در نتیجه این روش به سادگی روش LLE نمی‌باشد. برای عبور نمونه و حلال از روی ستون به یک جریان ثابت و تکرارپذیر نیاز است. به همین خاطر اغلب از پمپ HPLC برای این کار استفاده می‌گردد. هر چند در این روش مصرف حلال کم است، اما باز حلال‌ها سمی هستند.

۱-۴- روش‌های ریزاستخراج

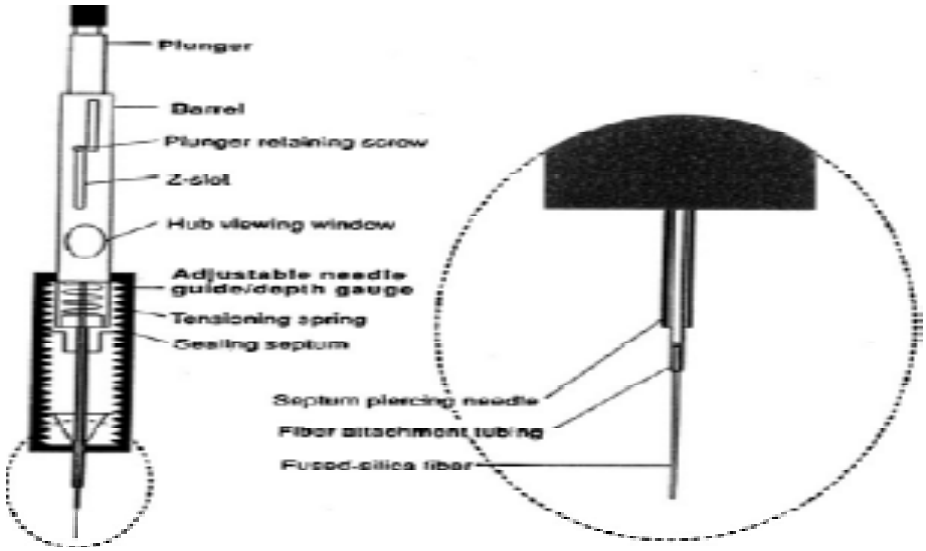
در سال‌های اخیر با توسعه روش‌های ریزاستخراج با فاز جامد SPME و ریزاستخراج با مایع[1] LPME استفاده از روش‌های SPE و LLE به مقدارقابل توجهی کاهش یافته است. روش SPME به سرعت در دهه ۱۹۹۰ گسترش یافت. هم اکنون روش ریز استخراج با حلال به عنوان جایگزینی برای SPME در چندسال اخیر مورد توجه زیادی قرار گرفته است.

۱-۴-۱- ریزاستخراج با فاز جامد

این روش در سال ۱۹۹۰ توسط پاولیشن و همکارانش توسعه پیدا کرد. در این روش استخراج و آنالیز توسط یک فیبر انجام می‌گیرد و استخراج نیاز به حلال ندارد [۱۸]. ساختار SPME یک فیبر سیلیکاتی گداخته شده است که با پلیمرهای مختلف پوشیده شده است و داخل سوزن سرنگ قرار می‌گیرد. با فشردن پیستون سرنگ، فیبر در تماس با نمونه قرار می‌گیرد و استخراج از محلول نمونه به داخل پوشش فیبر انجام می‌گیرد. البته روش SPME قادر به استخراج کامل گونه‌های درون محلول نیست، بلکه تنها تعادلی بین غلظت گونه‌های درون نمونه و فیبر به وجود می‌آورد. پس از جذب گونه‌های داخل نمونه بر روی فیبر توسط پیستون فیبر را به درون سوزن سرنگ کشیده و سپس سرنگ از داخل نمونه خارج می‌گردد و در نهایت برای واجذب کردن گونه‌ها آن را به کروماتوگرافی گازی یا مایع تزریق می‌کنند. البته اتصال SPME به GCو HPLC توسعه یافته ودر SPME-HPLC واجذب گونه‌ها توسط برنامه‌ریزی حلال انجام می‌شود [۴و۱۹و۲۰]. شمایی از سرنگ SPME در شکل ۱-۳ نشان داده شده است.

ریزاستخراج با فاز جامد به دو روش کلی انجام می‌گیرد. در روش اول فیبر در داخل نمونه غوطه‌ور می‌گردد و استخراج انجام می‌شود. در روش دوم فیبر در قسمت بالای محلول قرار می‌گیرد و برای استخراج گونه‌هایی که دارای فشار بخار بالایی هستند و غلظت نسبتاً زیادی را در قسمت فوقانی محلول ایجاد می‌کنند، به کار می‌روند. مزیت روش دوم این است که اثر بافت حذف می‌شود اما در روش اول میزان بازیابی بیشتر است زیرا غلظت گونه‌ها در محلول بیشتر است [۱۸].

1-Liquid Phase Microextraction

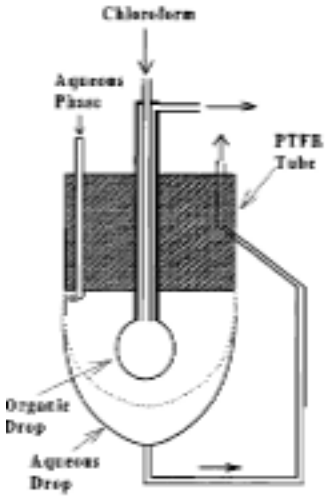


شکل ۱-۳- شمایی از سرنگ SPME [۲۱].

۱-۴-۲- ریزاستخراج فاز مایع (LPME)

در سال‌های گذشته کوشش‌هایی برای به کار بردن استخراج مایع- مایع، با حجم کم حلال آلی انجام شده است، که در این سال‌ها همراه با رشد روش‌های ریزاستخراج فاز جامد، روش‌های ریزاستخراج فاز مایع نیز گسترش فراوانی یافته است. البته روش‌های ریزاستخراج فاز مایع نسبت به روش‌های ریزاستخراج فاز جامد از مزایایی برخوردار است. اولین مزیت این روش‌ها سادگی آنها است، زیرا این روش‌ها معمولاً نیاز به امکانات خاصی ندارند. از طرف دیگر بر خلاف روش‌های ریزاستخراج فاز جامد این روش‌ها برای استخراج گونه‌های قطبی مناسب‌تر می‌باشند و محدوده وسیع‌تری از ترکیبات را با این روش می‌توان استخراج نمود [۲۳,۲۲]. در سال ۱۹۹٦ لیو و داسگوپتا[1] [۲٤] استخراج سدیم دودسیل‌سولفات را به وسیله یک سیستم قطره در قطره را گزارش کردند. در این گزارش یک میکروقطره ۱/۳ میکرولیتری حلال آلی غیرقابل‌امتزاج با آب، در داخل یک قطره آبی شناور بزرگ غوطه‌ور شده بود شمایی ازاین مطلب در شکل ۱-٤ آورده شده است. در همان موقع جانت و کنت‌ول[2] [۲۵] با یک قطره ۸ میکرولیتری ۱- اکتانول که از انتهای یک میله تفلونی در داخل محلول نمونه آبی در حال به‌هم خوردن آویزان بود، عمل استخراج را انجام دادند. پس از استخراج در مدت زمان معین، میله تفلونی از محلول آبی بیرون آورده و حلال آلی را برای آنالیز با یک میکروسرنگ به سیستم کروماتوگرافی گازی تزریق نمودند. استفاده از ابزارهای مجزا برای مراحل استخراج و تزریق نمونه مشکل این روش بود. برای رفع این مشکل جانت و کنت‌ول[۲٦] از یک میکروسرنگ برای نگه‌داشتن قطره حلال آلی به جای میله تفلونی، استفاده کردند. ابتدا یک میکرولیتر حلال آلی به داخل سرنگ کشیده شد و سپس سوزن میکروسرنگ پس از عبور از سپتوم ظرف نمونه به داخل محلول آبی وارد و قطره حلال آلی از سر سوزن سرنگ در داخل محلول متحرک آویزان شد. این روش با عنوان ریزاستخراج با قطره حلال[3] (SDME) معرفی شد.

1 - Liu and Dasgupta
2 - Jeannot and Cantwell
3 - Single Drop Microextraction



شکل ۱-۴- سیستم به کار رفته توسط لیو و داسگوپتا برای استخراج قطره در قطره [۲۴].

ریزاستخراج با قطره حلال روشی ساده، ارزان، سریع و با مصرف بسیار کم حلال است. عدم استفاده از دستگاه‌های پیچیده باعث توجه زیاد به این روش در سال‌های اخیر شده است. این روش گزینش‌پذیری بیشتری برای ترکیبات مختلف نسبت به ریزاستخراج فاز جامد دارد زیرا در ریزاستخراج با قطره حلال امکان استفاده از گستره وسیعی از حلال‌ها از غیرقطبی تا قطبی وجود دارد، در نتیجه می‌توان همه ترکیبات را به راحتی استخراج و اندازه گیری نمود. ریزاستخراج با قطره حلال به دو روش غوطه‌وری مستقیم[۱] (DI-SDME) و ریزاستخراج فضای فوقانی محلول[۲] (HS-SDME) انجام می‌شود. شمایی از این دو روش در شکل ۱-۵ نشان داده شده است. از نظر تعداد فازهای شرکت کننده در استخراج، روش‌های ریزاستخراج فاز مایع می‌توانند به حالت دوفازی یا سه‌فازی انجام شوند. اگر استخراج بین حجم کمی از حلال آلی غیرقابل‌امتزاج با آب و محلول آبی شامل گونه‌های مورد نظر انجام شود، این روش را ریزاستخراج مایع دوفازی می‌نامند. در صورتی‌که گونه‌ها دوباره به داخل فاز سوم (محلول آبی) استخراج شوند به این روش ریزاستخراج مایع سه‌فازی می‌گویند.که روش سه‌فازی اغلب در استخراج ترکیبات با خواص اسیدی و بازی کاربرد دارد [۲۸و۲۹]. پایدار نبودن قطره آویزان و امکان حل شدن قطره در حین استخراج از مهمترین معایب این روش و توسعه روش‌های دیگر است.

۱-۵- ریزاستخراج فاز مایع با فیبر توخالی (HF-LPME)

در توسعه روش‌های ریزاستخراج مایع- مایع، پدرسون-جرگارد[۳] و راسموسن[۴] روشی بر پایه فیبرهای توخالی در سال ۱۹۹۹ ارائه دادند. شکل ۱-۶ شمای کلی از ریزاستخراج فاز مایع با فیبر توخالی را نشان می‌دهد.

1 - Direct Immersion Single Drop Microextraction
2 - Head Space Single Drop Microextraction
3 - Pedersen-Bjergaard
4 - Rasmussen