

به فلاح

خداوند

بخشنده مهر فلاح



دانشکده علوم پایه - گروه شیمی

پایان نامه

جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد

رشته شیمی - گرایش تجزیه

عنوان:

توسعه روش SBSE/HPLC-UV برای تعیین فنوتیازین ها در سرم

خون با استفاده از روش های طراحی آزمایش

استاد راهنما:

سرکار خانم دکتر زهرا طالب پور

استاد مشاور:

سرکار خانم دکتر نوشین ادیب

دانشجو:

۱۳۸۹ / ۳ / ۲۴

شقایق باژدان زاده

کتابخانه مرکزی
شعبه کتابخانه

مهر ۱۳۸۸

۱۳۲۶۸۱



بسمه تعالی
صورتجلسه دفاعیه ارشد

شماره:
تاریخ:

به موجب نامه شماره ۱۷۶۹۹/ت مورخ ۱۳۸۵/۷/۱۸ جلسه دفاع از پایان نامه خانم سپاسان پازمان زاده
دانشجوی رشته ارشد تربیتی دانشکده علوم پایه شماره دانشجویی ۸۵۱۴۶۹ در روز یکشنبه
مورخ ۱۳۸۵/۷/۱۸ تحت عنوان تاثیر آموزش مبتنی بر مدل SBSE / HPLC برای تعیین غلظت آرسین در آب
استفاده از روش های طیفی در اتاق برگزار گردید.

ابتدا خانم سپاسان پازمان زاده گزارشی از کار پژوهشی خود را ارائه کردند و سپس به سئوالات اعضای حاضر در جلسه پاسخ دادند. در پایان هیأت داوران رساله دانشجو را با نمره ۱۹/۸ و امتیاز عالی مورد قبول قرار ندادند/ دادند.

هیأت داوران:

طالب پور
ارباب
سپاسان پازمان زاده

- ۱- استاد راهنمای خانم دکتر زهرا طالب پور
- ۲- استاد مشاور خانم دکتر ترشین ارباب
- ۳- داور اول آقای دکتر حبیب باقری
- ۴- داور دومی خانم دکتر زهرا پازمان زاده

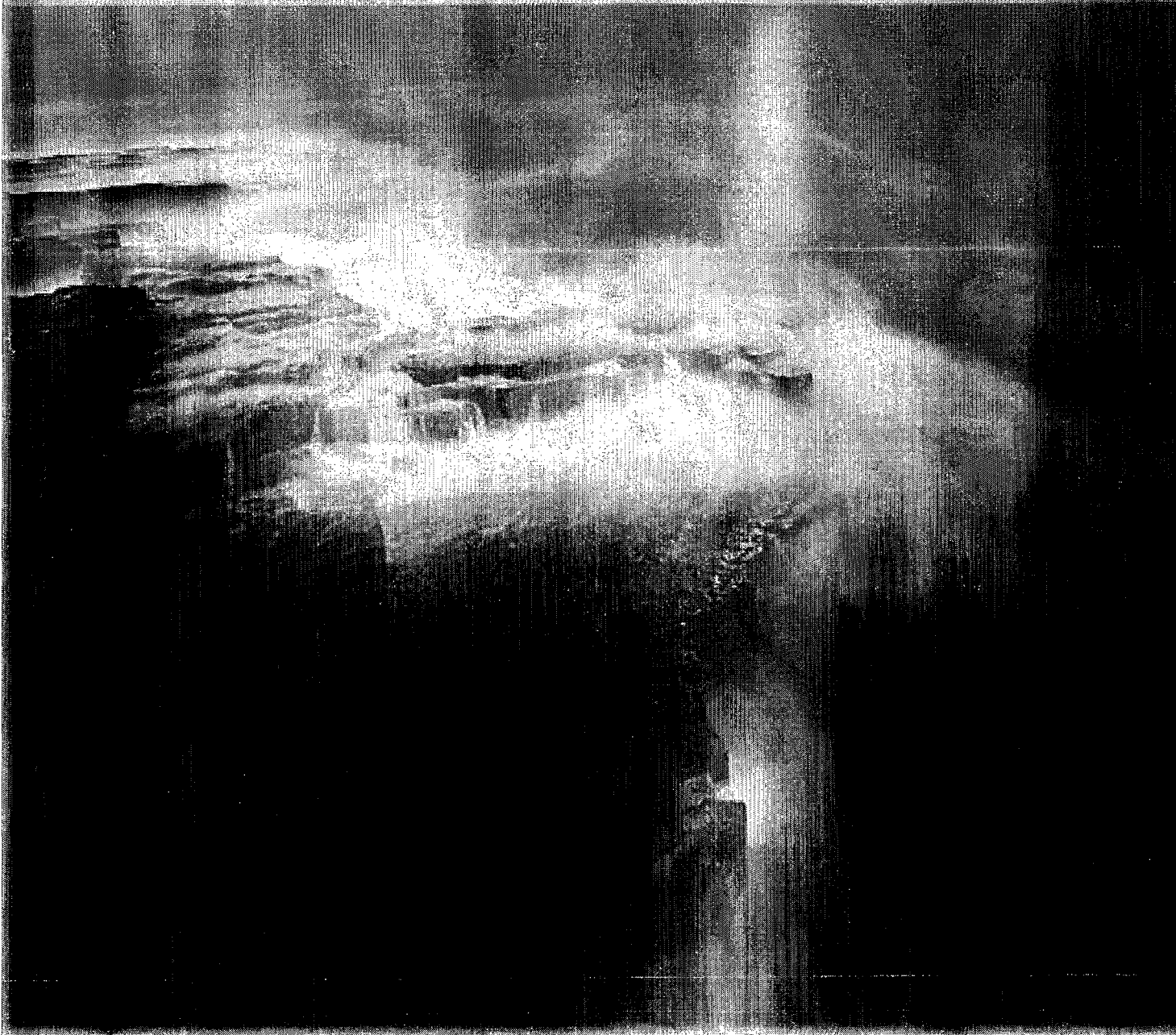
نام و نام خانوادگی مدیر گروه مریم پور زاده امضاء سپاسان پازمان زاده

نام و نام خانوادگی رئیس دانشکده علوم پایه امضاء
یا نماینده دانشکده در شورای تحصیلات تکمیلی دانشگاه دکتر رضا شایب داریانی

طالب پور
۱۳۸۵/۷/۱۸

سایه آفرینگار بر

برک نغمه‌های بی‌گناه و دلت‌لازم ..



برای آزادی

و پیشکش به یادواره آزادی

بدر

ماور

و در اورانج

به ریح اوست و (مخزن) بر نحو و طبع می و لغت از سرکار خانم
و کتر زمره طالب بود (اسما و رقصای گزین) به پاسی از سخنان می و ریح و در
نوع و در این نوع به یادماند فکر و درود می بخشد و به ناکروی (بنا) در سر
نما و در راه می رسید بر نحو می نامی

از سرکار خانم و کتر فوئین (اوست) (اسما و رقصای گزین) از یادماند
برای لطف هینگی شاه صمیمانه بر سرکار

همچنین از اسما و گزین، سرکار خانم و کتر زمره (آرا) و جناب آقای و کتر
حسب باقری برای و (نوی) و (آرا) فقط نظرات (از سرکار خانم بر سرکار)

و در نهایت از و (اسما) هینگی (مهرگاه) (مخزن) (اسما و رقصای گزین)
رویا تولدی، فاطمه ملا علی، محمود فیروزان، (اسما و رقصای گزین) (اسما و رقصای گزین)
(اسما و رقصای گزین) (اسما و رقصای گزین) (اسما و رقصای گزین) (اسما و رقصای گزین)
فاطمه و کتر می بخشد

چکیده

مشتقات فنوتیازینی اغلب در درمان بیماری‌های روانی مانند اسکیزوفرنی به کار می‌روند. به دلیل محدوده غلظتی درمانی کوچک، معمولا این داروها با زمینه‌های سم‌شناسی قانونی مواجه‌اند. روش‌های تجزیه‌ای ذکر شده در متون که برای آنالیز این داروها در سیالات بیولوژیک به کار می‌روند، معمولا دارای روش‌های آماده‌سازی قدیمی هستند که مشکل و زمان‌بر بوده و به مقادیر زیادی حلال آلی نیازمند است. اخیرا روش استخراج جذبی با میله چرخان (SBSE)، برای تغلیظ آنالیت‌های آلی از سیالات بیولوژیک توسعه یافته است. در اکثر پژوهش‌های انجام شده به منظور بهینه‌سازی با SBSE از روش‌های یک فاکتور در یک زمان استفاده شده است که بسیار زمان‌بر بوده و ممکن است منجر به نتایج نادرست گردد.

در بخش اول این مطالعه، یک روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا با آشکارساز فرابنفش (HPLC-UV)، برای جداسازی فنوتیازین‌های انتخابی (کلرپرومازین و تری‌فلوپرازین)، توسعه یافت. جداسازی در یک ستون C₁₈ انجام شد. اثر اصلاح‌گرهای آلی برای بهبود شکل پیک بررسی شد و در نهایت فاز متحرک بهینه شده ترکیبی از متانول: بافر استات (M 0/1، pH 4/1) (۹۵:۵، v/v) حاوی ۰/۵٪ TEA، با سرعت جریان ۰/۸ mL min⁻¹ بود که امکان جداسازی هر دو ترکیب را با تفکیک قابل قبول در کمتر از ۱۰ min فراهم کرد.

در بخش دوم این مطالعه، بهینه‌سازی روش استخراج جذبی با میله چرخان توسط طراحی آزمایش، برای تعیین فنوتیازین‌های انتخابی در نمونه‌های سرم خون توسعه یافت. در مرحله استخراج، ۵ فاکتور حجم نمونه، زمان، دما، سرعت چرخش میله و pH توسط یک طراحی غربالگری (طراحی فاکتوریل جزئی ۱/۲^{۵-۱} با چهار نقطه مرکزی) و در ادامه یک طراحی باکس-بتکن مورد بررسی قرار گرفت و سطوح آن-ها بهینه شد. در مرحله غربالگری، سرعت چرخش تنها فاکتور بی‌معنا بود، لذا برای ادامه کار ثابت در نظر گرفته شد. حجم نمونه ۱ mL، زمان ۲۴ min، دمای ۳۱°C و pH برابر ۸/۱ به عنوان شرایط بهینه حاصل از طراحی باکس-بتکن به دست آمد. در مرحله واجذب سه فاکتور حجم حلال، زمان و دمای واجذب توسط طراحی باکس-بتکن (بدون غربالگری فاکتورها) مورد بررسی قرار گرفت. حجم حلال ۱۵۰ μL، زمان ۲۰ min و دمای ۵۰°C به عنوان شرایط بهینه حاصل شد.

پس از به دست آوردن شرایط بهینه، روش از نقطه‌نظر معیارهایی چون خطی بودن، تکرارپذیری، بازیافت و حد تشخیص اعتبارسنجی شد. نتایج نشان داد که روش در گستره بین حد کمی و ۵۰۰ ng mL⁻¹ خطی است. مقادیر حد تشخیص برای کلرپرومازین و تری‌فلوپرازین به ترتیب برابر ۰/۷ و ۱/۵ ng mL⁻¹ به دست آمد. ضریب تغییر دقت بین روز و درون روز روش، کمتر از ۱۰٪ گزارش شد و فاکتور غنی‌سازی حدود ۴۰۰ برای هر دو ترکیب حاصل شد. بر اساس این پارامترها می‌توان گفت روش SBSE/HPLC-UV روشی مناسب برای تعیین این دسته از داروها در مقادیر درمانی و سمی آن‌هاست.

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه

۲	۱- مقدمه.....
۲	۱-۱- فنوتیازین‌ها.....
۲	۱-۱-۱- تاریخچه.....
۵	۲-۱-۱- مکانیزم عمل.....
۷	۳-۱-۱- خواص شیمیایی فنوتیازین‌ها.....
۹	۲-۱- روش‌های تجزیه‌ای تعیین فنوتیازین‌ها.....
۱۲	۱-۲-۱- تزریق مستقیم نمونه‌های بیولوژیک خام بدون آماده‌سازی (روش‌های غیر استخراجی).....
۱۳	۲-۲-۱- روش‌های استخراج فنوتیازین‌ها از نمونه‌های بیولوژیک.....
۱۳	۱-۲-۲-۱- استخراج مایع- مایع (LLE).....
۱۴	۲-۲-۲-۱- استخراج فاز جامد (SPE).....
۱۵	۳-۲-۲-۱- ریز استخراج فاز جامد SPME و ریز استخراج فاز مایع LPME.....
۱۹	۳-۱- استخراج جذبی بر روی میله چرخان (SBSE).....
۱۹	۱-۳-۱- تاریخچه.....
۲۱	۲-۳-۱- کاربردهای SBSE.....
۲۳	۳-۳-۱- انواع پوشش‌های استفاده شده در میله چرخان.....
۲۵	۴-۳-۱- اصول تئوری.....
۲۶	۵-۳-۱- فرایند استخراج.....
۲۸	۶-۳-۱- فاکتورهای موثر بر SBSE.....

۳۰	۴-۱ روش‌های طراحی آزمایش
۳۰	۱-۴-۱ تاریخچه
۳۱	۲-۴-۱ بهینه‌سازی و تعیین شرایط تجربی در ریز استخراج به وسیله طراحی آزمایش
۳۲	۱-۲-۴-۱ تعریف مساله و انتخاب متغیرها و پاسخ‌های مناسب به وسیله مطالعات غربالگری
۳۴	۲-۲-۴-۱ روش‌های بهینه‌سازی فاکتورهای موثر
۳۴	۱-۲-۲-۴-۱ طراحی فاکتوریال کامل سه-سطحی
۳۴	۲-۲-۲-۴-۱ طراحی‌های دوهرت
۳۵	۳-۲-۲-۴-۱ طراحی مختلط مرکزی
۳۵	۴-۲-۲-۴-۱ طراحی‌های باکس-بنکن
۳۸	۳-۲-۴-۱ برازش مدل ریاضی
۳۹	۴-۲-۴-۱ ارزیابی مدل و تخمین اثرات
۴۲	۵-۲-۴-۱ پیدا کردن نقاط بهینه

فصل دوم: بخش تجربی

۴۵	۱-۲ مواد مصرفی
۴۶	۲-۲ دستگاه‌ها
۴۶	۱-۲-۲ کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)
۴۶	۲-۲-۲ سایر موارد
۴۷	۳-۲ توسعه روش HPLC برای جداسازی و اندازه‌گیری فنوتیازین‌های انتخابی
۴۸	۴-۲ استخراج CPZ و TFP از سرم خون با روش SBSE
۴۸	۱-۴-۲ آماده‌سازی اولیه میله چرخان
۴۸	۲-۴-۲ بررسی‌های اولیه فرایند استخراج
۴۸	۱-۲-۴-۲ مرحله جذب
۴۹	۲-۲-۴-۲ مرحله واجذب
۴۹	۳-۴-۲ فاکتورهای متغیر در فرایند استخراج با میله چرخان
	۴-۴-۲ بررسی فاکتورهای موثر بر مرحله جذب فرایند استخراج با استفاده از روش‌های طراحی آزمایش
۵۱	
۵۱.۱/۲	۱-۴-۴-۲ غربالگری فاکتورهای موثر بر مرحله جذب توسط طراحی فاکتوریال جزئی
	۲-۴-۴-۲ بهینه‌سازی سطوح فاکتورهای موثر در مرحله جذب توسط طراحی باکس-بنکن
۵۴	
۵۶	۵-۴-۲ بهینه‌سازی فاکتورهای موثر بر مرحله واجذب مایع توسط طراحی باکس-بنکن

۵۷	۵-۲ اعتبارسنجی روش
۵۷	۱-۵-۲ رسم منحنی کالیبراسیون.....
۵۹	۲-۵-۲ بررسی دقت و صحت روش.....
۵۹	۳-۵-۲ بررسی اثر حافظه‌ای.....
۵۹	۴-۵-۲ بررسی اثر مزاحمت‌ها.....

فصل سوم: نتایج و بحث

۳-۱ توسعه روش HPLC برای اندازه‌گیری همزمان CPZ و TFP ۶۲

۳-۱-۱ بررسی و بهینه‌سازی فاز متحرک ۶۲

۳-۲ استخراج CPZ و TFP از سرم خون با روش SBSE ۶۸

۳-۲-۱ بررسی‌های اولیه فرایند استخراج ۶۸

۳-۲-۲ فاکتورهای متغیر در فرایند استخراج با میله چرخان ۶۹

۳-۲-۲-۱ انتخاب حلال واجذب ۶۹

۳-۲-۲-۲ انتخاب روش واجذب ۷۱

۳-۲-۲-۳ اثر اصلاح‌گر ۷۲

۳-۲-۲-۴ اثر pH ۷۲

۳-۳ بررسی فاکتورهای موثر بر فرایند استخراج با استفاده از روش‌های طراحی آزمایش ۷۳

۳-۳-۱ بهینه‌سازی مرحله جذب ۷۳

۳-۳-۱-۱ طراحی غربالگری فاکتوریال جزئی ۱/۲ ۷۴

۳-۳-۲ بهینه‌سازی سطوح فاکتورهای موثر توسط طراحی باکس-بنکن ۷۷

۳-۳-۲ بهینه‌سازی فاکتورهای موثر بر مرحله واجذب توسط طراحی باکس-بنکن ۸۶

۳-۴ اعتبارسنجی روش SBSE برای آنالیز CPZ و TFP ۹۱

۳-۴-۱ رسم منحنی کالیبراسیون ۹۱

۳-۴-۲ دقت و صحت روش ۹۳

۳-۴-۳ بررسی اثر حافظه‌ای ۹۴

۹۵.....	۴-۴-۳ بررسی اثر مزاحمت‌ها.....
۹۸.....	نتیجه‌گیری.....
۹۹.....	مراجع.....

فهرست جداول

- جدول ۱-۱. تقسیم بندی شیمیایی داروهای ضد روان‌پریشی ۴
- جدول ۱-۲. ساختار، خواص شیمیایی و سطوح غلظتی درمانی و سمی برخی فنوتیازین‌های متداول ۷
- جدول ۱-۳. عمده‌ترین روش‌های منتشر شده در آنالیز داروهای ضد روان‌پریشی (فنوتیازین-ها) ۱۸
- جدول ۱-۴. کاربردهای SBSE در آنالیزهای بیولوژیکی، محیطی و غذایی ۲۲
- جدول ۱-۵. مقایسه کارایی BBD، CCD و DM ۳۷
- جدول ۱-۶. برخی کاربردهای BBD در شیمی تجزیه ۳۷
- جدول ۱-۲. سطوح انتخابی فاکتورها برای طراحی غربالگری فاکتوریال جزئی ۱/۲ ۵۲
- جدول ۲-۲. طراحی فاکتوریال جزئی نیمه با چهار تکرار در نقطه مرکزی ۵۳
- جدول ۲-۳. سطوح انتخابی فاکتورها برای طراحی باکس-بنکن مرحله جذب ۵۴
- جدول ۲-۴. طراحی باکس-بنکن برای ۴ فاکتور با ۱۲ تکرار در نقطه مرکزی ۵۵
- جدول ۲-۵. سطوح انتخابی فاکتورها در طراحی باکس-بنکن مرحله واجذب ۵۶
- جدول ۲-۶. طراحی باکس-بنکن برای سه فاکتور با ۸ تکرار در نقطه مرکزی ۵۷
- جدول ۳-۱. اثر pH بر سطح زیر پیک حاصل از استخراج هر یک از دو دارو از سرم و آب. ۷۳
- جدول ۳-۲. آنالیز واریانس نتایج حاصل از طراحی غربالگری برای CPZ ۷۵
- جدول ۳-۳. آنالیز واریانس نتایج حاصل از طراحی غربالگری برای TFP ۷۶

- جدول ۳-۴. آنالیز واریانس داده‌های به دست آمده از طراحی باکس- بنکن مرحله جذب استخراج CPZ ۸۰
- جدول ۳-۵. آنالیز واریانس داده‌های به دست آمده از طراحی باکس- بنکن مرحله جذب استخراج TFP ۸۱
- جدول ۳-۶. سطوح بهینه پیشنهادی حاصل از طراحی باکس- بنکن مرحله جذب استخراج CPZ و TFP ۸۶
- جدول ۳-۷. سطوح بهینه پیشنهادی حاصل از طراحی باکس- بنکن مرحله واجذب برای CPZ و TFP ۹۰
- جدول ۳-۸. نتایج ارزیابی روش SBSE برای استخراج CPZ و TFP ۹۳
- جدول ۳-۹. دقت و صحت روش SBSE/HPLC-UV به کار رفته برای استخراج دو ترکیب CPZ و TFP از سرم خون ۹۴
- جدول ۳-۱۰. زمان‌های بازداری داروهای بررسی شده به عنوان مزاحم در آنالیز دو ترکیب CPZ و TFP در سرم خون با استفاده از روش SBSE/HPLC-UV ۹۶

فهرست اشکال

- شکل ۱-۱. ساختار عمومی فنوتیازین‌ها..... ۵
- شکل ۲-۱. میله چرخان در SBSE ۲۱
- شکل ۳-۱. قرارگیری نقاط در طراحی باکس- بنکن..... ۳۶
- شکل ۴-۱. برخی نمودارهای سطح پاسخ به دست آمده از مدل نمایی در بهینه‌سازی دو متغیر
..... ۴۳
- شکل ۱-۳. کروماتوگرام‌های مربوط به بهینه‌سازی فاز متحرک..... ۶۴
- شکل ۲-۳. کروماتوگرام‌های حاصل از بررسی اثر TFA..... ۶۵
- شکل ۳-۳. کروماتوگرام‌های حاصل از بررسی اثر TEA..... ۶۶
- شکل ۴-۳. کروماتوگرام مربوط به تزریق محلول استاندارد $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ از CPZ و TFP در
ترکیب بهینه فاز متحرک..... ۶۷
- شکل ۵-۳. کروماتوگرام‌های حاصل از استخراج $1/5 \text{ mL}$ (الف) سرم شاهد و (ب) سرم حاوی
غلظت $0/5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ، که توسط 1 mL فاز متحرک واجذب شده است..... ۶۹
- شکل ۶-۳. کروماتوگرام‌های حاصل از بررسی نوع حلال واجذب (الف) فاز متحرک، (ب) متانول،
(ج) استونیتریل..... ۷۰
- شکل ۷-۳. کروماتوگرام‌های حاصل از بررسی روش واجذب، (الف) با هم‌زن مغناطیسی و (ب)
حمام اولتراسونیک..... ۷۱

- شکل ۳-۸. نمودارهای پارتو مربوط به طراحی غربالگری فاکتورهای موثر بر استخراج الف) CPZ و ب) TFP از سرم خون..... ۷۸
- شکل ۳-۹. نمودارهای سطح پاسخ از طراحی باکس- بنکن مرحله جذب برای سطح زیر پیک CPZ..... ۸۲
- شکل ۳-۱۰. نمودارهای سطح پاسخ از طراحی باکس- بنکن مرحله جذب برای سطح زیر پیک TFP..... ۸۳
- شکل ۳-۱۱. نمودارهای پارتو مربوط به طراحی باکس- بنکن برای بهینه‌سازی مرحله واجذب استخراج CPZ و TFP..... ۸۷
- شکل ۳-۱۲. نمودارهای سطح پاسخ حاصل از طراحی باکس- بنکن مرحله واجذب برای سطح زیر پیک CPZ با شرایط جذب بهینه شده..... ۸۸
- شکل ۳-۱۳. نمودارهای سطح پاسخ حاصل از طراحی باکس- بنکن مرحله واجذب برای سطح زیر پیک TFP با شرایط جذب بهینه شده..... ۸۹
- شکل ۳-۱۴. منحنی کالیبراسیون بر اساس سطح زیر پیک CPZ و TFP استخراج شده به روش SBSE..... ۹۲
- شکل ۳-۱۵. کروماتوگرام مربوط به CPZ و TFP پس از استخراج از نمونه سرم با غلظت 400 ng mL^{-1} ۹۵
- شکل ۳-۱۶. کروماتوگرام مربوط به اثر حافظه در میله چرخان در واجذب دوم پس از استخراج نمونه سرم با غلظت 400 ng mL^{-1} ۹۵
- شکل ۳-۱۷. کروماتوگرام حاصل از استخراج نمونه سرم اسپایک شده با پروپانولول، دیکلوفناک، رانیتیدین، دیازپام، کلوزاپین، TFP و CPZ با روش SBSE در شرایط بهینه..... ۹۷

مقدمه

۱- مقدمه

امروزه داروها نقش بسیار حیاتی در زندگی بشر ایفا می‌کنند و همین امر اهمیت اندازه‌گیری آن‌ها در بدن را نشان می‌دهد. اندازه‌گیری داروها، در زمینه‌های سم‌شناسی قانونی و کلینیکی و نیز مطالعات سینتیک دارویی در علم داروسازی دارای اهمیت ویژه‌ای است.

۱-۱ فنوتیازین‌ها^۱

۱-۱-۱ تاریخچه

در نیمه دوم قرن بیستم، گروهی از کندکننده‌های فعالیت ذهنی برای روش‌های درمانی روان‌پزشکی معرفی شدند که در کل آرام‌بخش‌ها^۲ نام گرفتند. معمولاً این گروه بر طبق این‌که استفاده اصلی آن‌ها برای درمان روان‌پریشی^۳ یا اختلالات عصبی^۴ است به دو دسته آرام

¹ Phenothiazines

² Tranquilizers

³ Psychosis

⁴ Neuroses

بخش‌های اصلی و فرعی^۱ تقسیم می‌شوند. این دو دسته به ترتیب با عبارات جدید داروهای ضد روان‌پریشی^۲ و ضد اضطراب^۳ به کار می‌روند [۱].

تاریخچه پیدایش و توسعه داروهای ضد روان‌پریشی روندی طولانی داشته است. در سال ۱۸۹۱ پائول اهرلیچ^۴ اثرات ضد مالاریایی آبی‌متیلن، یک ترکیب فنوتیازینی، را مشاهده کرد. بعد از آن فنوتیازین‌ها به خاطر خواص آنتی‌هیستامینی توسعه یافتند. در سال ۱۹۵۱ لبوریت و هوگوانارد^۵، کلرپرومازین^۶ (CPZ)، یک مشتق آلیفاتیک فنوتیازینی را به خاطر اثرات بیهوش‌کنندگی برای بیماران در طول عمل جراحی به کار بردند. کمی بعد از آن هامون^۷ و نیز دیلای^۸ استفاده از این روش درمان را برای بیماران روان‌پزشکی گسترش دادند و فعالیت ضد روان‌پریشی این ترکیبات را آشکار کردند. در بین سال‌های ۱۹۵۴ تا ۱۹۷۵ حدود ۱۵ داروی ضد روان‌پریشی در ایالات متحده آمریکا و حدود ۴۰ مورد در سراسر دنیا معرفی شد [۳].

بر اساس تقسیم‌بندی‌های موجود فنوتیازین‌ها به گروه داروهای ضد روان‌پریشی کلاسیک تعلق دارند. این داروها عمدتاً برای درمان بیماران مبتلا به اختلالات روانی شدید از جمله اسکیزوفرنی (که ۱/۵ درصد از جمعیت جهان به آن مبتلا هستند [۷]) تجویز می‌شود. علاوه بر این فنوتیازین‌ها دارای خواص دیگر کلینیکی شامل اثرات ضد تهوع و آنتی‌هیستامینی و نیز مسکن ضد درد می‌باشند [۲].

در درمان‌های بالینی روزمره از میان نسل اول داروهای ضد روان‌پریشی، CPZ و

¹ Major & minor tranquilizers

² Antipsychotic

³ Antianxiety

⁴ Paul Ehrlich

⁵ Laborit and Huguenaud

⁶ Chlorpromazine

⁷ Hamon

⁸ Delay