بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه صنعتی اصفهان
دانشکده شیمی

ریزاستخراج مایع- مایع- مایع بر پایه فیبرهای توخالی ترکیب شده با دستگاه طیف‌سنج تحرک یونی با منبع یونیزاسیون الکترواسپری برای اندازه‌گیری داروهای پنتازوسین، تریمیپرامین و دزیپرامین

پایان نامه کارشناسی ارشد

حسین شرافتمند

استادراهنما
دکتر محمد سراجی
دکتر محمد تقی جعفری

اسفند ۱۳۸۸

دانشگاه صنعتی اصفهان
دانشکده شیمی

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته شیمی تجزیه آقای حسین شرافتمند

تحت عنوان

ریزاستخراج مایع- مایع- مایع بر پایه فیبرهای توخالی ترکیب شده با دستگاه طیف¬سنج تحرک یونی با منبع یونیزاسیون الکترواسپری برای اندازه گیری داروهای پنتازوسین، تریمیپرامین و دزیپرامین در نمونه‌های بیولوژیکی

در تاریخ ۱۳۸۸/۱۲/۱۰ توسط کمیته تخصصی زیر مورد بررسی و تصویب نهایی قرار گرفت.

۱- استاد راهنمای پایان نامه	دکتر محمد سراجی
۲- استاد راهنمای پایان نامه	دکتر محمد تقی جعفری
۳- استاد داور	دکتر علی اصغر انصافی
٤- استاد داور	دکتر تقی خیامیان

سرپرست تحصیلات تکمیلی دانشکده — دکتر بیژن نجفی

اکنون که در سایه لطف و عنایت پروردگار مهربانم توانستم مرحله دیگری از تحصیلاتم را با موفقیت به پایان رسانم به رسم ادب و سنت حسنه سپاس لازم می دانم از تمام کسانی که مرا در این مسیر یاری نمودند، تشکر و قدردانی نمایم:

با سپاس بی پایان از خانواده گرامی و عزیزم که همواره مشوق من بوده و در همه حال پایه دلگرمی ام در طول تحصیلاتم بودند به خصوص پدر و مادر عزیز و مهربانم

و با سپاس فراوان از استادان فرزانه ام:

اساتید راهنما، جناب آقای دکتر سراجی و جناب آقای دکتر جعفری

که دانایی شان، علم

کلامشان، روشنایی

و شاگردیشان افتخار را برایم به همراه داشت.

استادان گرانقدری که با راهنمایی های گرانقدرشان مرا در پیمودن راه یاری نمودند.

. از جناب آقای دکتر انصافی و جناب آقای دکتر خامیان که زحمت مطالعه، داوری و تصحیح این پایان نامه را تقبل نمودند، صمیمانه سپاسگزارم.

و از تمام استادان دانشکده شیمی دانشگاه صنعتی اصفهان که چگونه زیستن را از آنان آموختم.

از دوستان عزیزم در دانشکده شیمی، بخصوص آزمایشگاه تحقیقاتی شیمی تجزیه، کمال تشکر را دارم.

تشکر و قدردانی می نمایم از کلیه دوستانم در دانشگاه صنعتی اصفهان که هریک به نحوی مرا مورد لطف و عنایت خود قرار دادند که ذکر نام آنها در این مجال نمی گنجد.

حسین شرافتمند

اسفند ۱۳۸۸

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 شکل‌ها ..... هشت
فهرست جداول .....دوازده
فصل اول استخراج و آماده‌سازی نمونه .....چهارده
۱-۱- انتخاب و ارزیابی روش‌های جداسازی ۱
۱-۲- روشهای متداول استخراج ۲
۱-۲-۱- استخراج مایع -مایع(LLE) ۲
۱-۲-۲- کاربرد استخراج مایع- مایع ۲
۱-۳- ریزاستخراج فاز مایع (LPME) ۳
۱-۳-۱-تئوری HF-LPME ۷
۱-۳-۲-توسعه HF-LPME ۹
۱-۴- ریزاستخراج با قطره حلال ۱۱
۱-۴-۱- مروری بر روش‌های SDME ۱۱
۱-۴-۱-الف- ریزاستخراج با غوطه‌وری مستقیم ۱۲
۱-۴-۱-ب- ریزاستخراج در فضای بالای محلول ۱۴
۱-۴-۲- دورنمای SDME ۱۶
۱-۴-۳- مقایسه LPME با SPME و SDME ۱۶
۱-۵- ریز استخراج مایع- مایع پخشی (DLLME) ۱۶
۱-۶- اسپکترومتر تحرک یونی ۱۷
۱-۶-۱- تئوری و اصول دستگاهی اسپکترومتر تحرک یونی ۱۸
۱-۶-۲- منابع یونیزاسیون متداول در IMS ۲۰
۱-۶-۲-الف- یونیزاسیون الکترواسپری ۲۰
فصل دوم اهمیت و کاربردها ۲۱
۲-۱- پنتازوسین ۲۱
۲-۱-۱- فارما کوکینتیک- دینامیک، مکانیسم اثر ۲۲
۲-۱-۲- مصرف بر حسب اندیکاسیون ۲۲
۲-۱-۳- موارد منع مصرف و احتیاط ۲۲
۲-۱-۴- وابستگی و محرومیت ۲۳
۲-۱-۵- مسمومیت و درمان ۲۳
۲-۱-۶- مروری بر کارهای انجام شده پنتازوسین ۲۳
۲-۲- داروهای ضد افسردگی ۲۶
۲-۲-۱- تریمیپرامین ۲۶

۲-۲-۱- فارماکوکینتیک- دینامیک، مکانیسم اثر ۲۶
۲-۲-۳- مصرف برحسب اندیکاسیون ۲۷
۲-۲-۳-الف- افسردگی درد مزمن ۲۷
۲-۲-۳-ب- بی خوابی ۲۷
۲-۲-۴- مسمومیت و درمان ۲۸
۲-۲-۵- دزیپرامین ۲۸
۲-۲-۵-الف- فارماکوکینتیک- دینامیک، مکانیسم اثر ۲۸
۲-۲-۵-ب- مصرف بر حسب اندیکاسیون ۲۸
۲-۳- مروری بر کارهای انجام شده برای داروهای ضد افسردگی ۲۹
۲-۳-۱- روش های اسپکترومتری ۲۹
۲-۳-۲- روشهای الکتروشیمیایی ۲۹
۲-۳-۳- کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا ۳۰
۲-۳-۴- کروماتوگرافی گازی ۳۱
۲-۳-۵- الکتروفورز ۳۲
فصل سوم بخش تجربی ۳۳
۳-۱- دستگاه‌ها و وسایل مورد نیاز ۳۳
۳-۲- اجزای مختلف به کار رفته در سیستم IMS ۳۴
۳-۲-۱- منابع تغذیه ۳۵
۳-۲-۲- منبع یونیزاسیون الکترواسپری ۳۵
۳-۲-۳- ناحیه حلال‌زدایی ۳۷
۳-۲-۴- شبکه الکتریکی و دستگاه مولد پالس ۳۷
۳-۲-۵- ناحیه رانش ۳۷
۳-۲-۶- شبکه محافظ ۳۷
۳-۲-۷- آشکارساز ۳۸
۳-۲-۸- تقویتکننده سیگنال ۳۸
۳-۲-۹- مبدل آنالوگ به دیجیتال ۳۸
۳-۲-۱۰- مخزن گاز نیتروژن ۳۸
۳-۲- ۱۱- نحوه‌ی محاسبه پاسخ دستگاه IMS ۳۸
۳-۳- مواد شیمیایی و محلولهای مورد نیاز ۳۹
۳-۴- روش کلی استخراج ۳۹
۳-۵- تهیه محلول‌های استاندارد پنتازوسین ۴۰
۳-۵-۱- محلول‌سازی مرحله بهینه‌سازی ۴۰
۳-۶- بهینه‌سازی شرایط استخراج ۴۰

۳-۶-۱- بررسی حلال ۴۰
۳-۶-۲- اثر pH محلول نمونه ۴۰
۳-۶-۳- اثراسیدیته محلول پذیرنده ۴۰
۳-۶-۴- اثر سرعت همزدن محلول نمونه ۴۱
۳-۶-۵- اثر افزایش نمک ۴۱
۳-۶-۶- اثر دمای استخراج ۴۱
۳-۶-۷- اثر زمان بر استخراج ۴۱
۳-۷- ارقام شایستگی روش ۴۲
۳-۷-۱- فاکتور غنی‌سازی ۴۲
۳-۷-۲- دقت روش ۴۲
۳-۷-۳- بررسی خطی بودن و حد تشخیص روش ۴۲
۳-۷-۴-آماده‌سازی نمونه‌های حقیقی ۴۲
۳-۸- تهیه محلول‌های استاندارد ضد افسردگی ۴۳
۳-۸-۱- محلول‌سازی مرحله بهینه‌سازی ۴۳
۳-۹- بهینه‌سازی شرایط استخراج ۴۳
۳-۹-۱- بررسی حلال ۴۳
۳-۹-۲- اثر قلیائیت فاز آبی ۴۳
۳-۹-۳- اثر اسیدیته محلول پذیرنده ۴۳
۳-۹-۴- اثر سرعت همزدن محلول نمونه ۴۴
۳-۹-۵- اثر افزایش نمک ۴۴
۳-۹-۶- اثر دمای استخراج ۴۴
۳-۹-۷- اثر زمان بر استخراج ۴۴
۳-۱۰- ارقام شایستگی روش ۴۵
۳-۱۰-۱- فاکتور غنی‌سازی ۴۵
۳-۱۰-۲- دقت روش ۴۵
۳-۱۰-۳- بررسی خطی‌بودن و حد تشخیص روش ۴۵
۳-۱۰-۴-آماده‌سازی نمونه‌های حقیقی ۴۵
فصل چهارم بحث و نتیجه‌گیری ۴۶
۴-۱- بررسی رفتار طیف تحرک یونی پنتازوسین ۴۶
۴-۲- بررسی شرایط موثر بر استخراج ۴۷
۴-۲-۱- بررسی حلال ۴۸
۴-۲-۲- اثر pH فاز دهنده ۴۹
۴-۲-۳-اثر اسیدته فاز پذیرنده ۴۹

۴-۲-۴-اثر سرعت همزدن نمونه ۵۰
۴-۲-۵-اثر غلظت نمک نمونه بر راندمان استخراج ۵۱
۴-۲-۶-اثر دمای محلول نمونه بر راندمان استخراج ۵۲
۴-۲-۷-اثر زمان بر راندمان استخراج ۵۳
۴-۳-ارقام شایستگی روش ۵۴
۴-۳-۱- فاکتور غنی‌سازی ۵۴
۴-۳-۲- دقت روش ۵۴
۴-۳-۳-اثر خطی بودن روش ۵۵
۴-۳-۴- حد تشخیص روش ۵۵
۴-۳-۵ - آنالیز نمونه حقیقی ۵۵
۴-۴- مقایسه خصوصیات و ارقام شایستگی روش ارائه شده با روش‌های موجود ۵۷
۴-۵- بررسی رفتار طیف تحرک یونی دزیپرامین و تریمیپرامین ۵۸
۴-۶- بررسی شرایط موثر بر استخراج ۶۰
۴-۶-۱- بررسی حلال ۶۰
۴-۶-۲-اثر قلیائیت فاز دهنده ۶۱
۴-۶-۳-اثر اسیدته فاز پذیرنده ۶۲
۴-۶-۴-اثر سرعت همزدن نمونه ۶۲
۴-۶-۵-اثر افزایش نمک ۶۳
۴-۶-۶-اثر دمای محلول نمونه بر راندمان استخراج ۶۴
۴-۶-۷-اثر زمان بر راندمان استخراج ۶۴
۴-۷-ارقام شایستگی روش ۶۵
۴-۷-۱- فاکتور غنی‌سازی ۶۵
۴-۷-۲- دقت روش ۶۵
۴-۷-۳-اثر خطی بودن روش ۶۶
۴-۷-۴- حد تشخیص روش ۶۶
۴-۷-۵ - آنالیز نمونه حقیقی ۶۷
۴-۸- مقایسه خصوصیات و ارقام شایستگی روش ارائه شده با روش‌های موجود ۶۸
۴-۹ - نتیجه گیری نهایی ۷۰

فهرست شکل‌ها

عنوان ..... صفحه
شکل ۱-۱- تصویری میکروسکوپی از سطح مقطع یک غشاء پلیمری متخلخل [۷]..... ۳
شکل ۱-۲- نحوه قرارگیری فازها در دو حالت سه‌فازی(a) و دو فازی(b) با استفاده از غشاءهای فیبری توخالی [۸]. ۴
شکل ۱-۳- سیستم اولیه استفاده شده توسط پدرسون- جرگارد و راسموسن [۷]..... ۵
شکل ۱-۴- ریز استخراج HF-LPME سه فازی [۱۱]. ۵
شکل ۱-۵- طرحی ازریز استخراج HF-LPME سه فازی به روش پویا [۱۲]..... ۶
شکل ۱-۶- مدل ارائه شده در استخراج سه‌فازی آمین‌ها از نمونه آبی با تشکیل جفت یون [۶]..... ۶
شکل ۱-۷- نحوه اتصال غشاء فیبری توخالی به انتهای یک سرنگ در آرایش میله ای [۱۳]..... ۷
شکل ۱-۸- ریز استخراج میله حلال [۱۵]. ۹
شکل ۱-۹- طرحی از فیبر در لوله [۱۷] ۱۰
شکل ۱-۱۰- سیستم به کار رفته توسط لیو و داسگوپتا برای استخراج قطره در قطره [۳۴]..... ۱۲
شکل ۱-۱۱- طرح اولیه به کار رفته توسط جانت و کنت ول در ریزاستخراج به کمک قطره حلال [۲۰]..... ۱۳
شکل ۱-۱۲- طرحی از ریزاستخراج با غوطه‌وری مستقیم قطره [۲۱]..... ۱۳
شکل ۱-۱۳- طرح از ریزاستخراج در فضای بالای محلول[۲۱]..... ۱۴
شکل ۱-۱۴ - طرح به کار رفته توسط سراجی برای HS-SDME پویای نیمه‌خودکار [۴۰]. ۱۵
شکل ۱-۱۵- شمایی از روش ریز استخراج مایع-مایع پخشی [۴۸]..... ۱۷
شکل ۲-۱- ساختار شیمیایی پنتازوسین. ۲۲
شکل ۲-۲- ساختار شیمیایی تریمیپرامین. ۲۶
شکل ۲-۳- ساختار شیمیایی دزیپرامین ۲۸
شکل۳-۱- شمایی از دستگاه IMS بکار رفته در این پژوهش[۱۰۳]. ۳۴
شکل ۴-۱- طیف تحرک یونی مربوط به حلال الکترواسپری، محلول پنتازوسین(۵. µg/mL)..... ۴۷
شکل ۴-۲- بررسی اثر حلال بر راندمان استخراج پنتازوسین. ۴۸
شکل ۴-۳- بررسی اثر pH فاز دهنده بر راندمان استخراج پنتازوسین..... ۴۹
شکل ۴-۴- بررسی اثر اسیدته فاز پذیرنده بر راندمان استخراج پنتازوسین..... ۵۰
شکل ۴-۶- بررسی اثر غلظت نمک بر راندمان استخراج پنتازوسین. ۵۲
شکل ۴-۷- اثر دمای محلول بر راندمان استخراج پنتازوسین..... ۵۳
شکل ۴-۸- اثر زمان بر استخراج راندمان پنتازوسین. ۵۳
شکل ۴-۹- نمودار درجه‌بندی پنتازوسین ۵۵
شکل ۴-۱۰- طیف تحرک یونی نمونه استخراج شده حاوی ppb ۵۰ پنتازوسین اضافه شده به ادرار در مقایسه با شاهد. ۵۶
شکل ۴-۱۱- طیف تحرک یونی نمونه استخراج شده حاوی ppb ۵۰ پنتازوسین اضافه شده به پلاسما در مقایسه با شاهد ۵۷
شکل۴-۱۲- طیف تحرک یونی مربوط به حلال الکترواسپری، محلول µg/mL ۵ تریمیپرامین و دزیپرامین..... ۵۹
شکل ۴-۱۳- بررسی اثر تغییر pH محلول شویش بر راندمان جداسازی ضد افسردگی‌ها در HPLC. [۱۱۶]. ۶۰
شکل ۴-۱۴- بررسی اثر حلال بر راندمان استخراج ضد افسردگی‌ها. ۶۰

شکل ۴-۱۵- بررسی اثر قلیائیت فاز دهنده بر راندمان استخراج داروهای ضد افسردگی..... ۶۱
شکل ۴-۱۶- بررسی اثر اسیدته فاز پذیرنده بر راندمان استخراج ضد افسردگی-ها..... ۶۲
شکل ۴-۱۷- بررسی سرعت همزن بر راندمان استخراج ضد افسردگی‌ها..... ۶۳
شکل ۴-۱۸- بررسی اثر غلظت نمک بر راندمان استخراج ضد افسردگی‌ها..... ۶۳
شکل ۴-۱۹- اثر دمای محلول بر راندمان استخراج ضد افسردگی‌ها..... ۶۴
شکل ۴-۲۰- اثر زمان بر راندمان استخراج ضد افسردگی‌ها. ۶۵
شکل ۴-۲۱- نمودار درجه‌بندی تریمیپرامین. ۶۶
شکل ۴-۲۲- نمودار درجه‌بندی دزیپرامین..... ۶۶
شکل ۴-۲۳- طیف تحرک یونی نمونه استخراج شده حاوی ۵۰ ppb تریمیپرامین و دزیپرامین در ادرار در مقایسه شاهد .۶۷
شکل ۴-۲۴- طیف تحرک یونی نمونه استخراج شده حاوی ۵۰ppb تریمیپرامین و دزیپرامین در پلاسما درمقایسه با شاهد۶۸

فهرست جداول

عنوان ..... صفحه
جدول ۳-۱- شرایط اعمالی دستگاه IMS جهت آنالیز داروی پنتازوسین ۳۵
جدول ۴-۱- مقدار زمان رانش و تحرک کاهش یافته گونه پنتازوسین حاصل از دستگاه ESI-IMS ۴۷
جدول ۴-۲- داده‌های مربوط به بررسی تأثیر حلال بر راندمان استخراج پنتازوسین. ۴۸
جدول ۴-۳ –داده‌های مربوط به اثر pH فاز دهنده بر راندمان استخراج پنتازوسین ۴۹
جدول ۴-۴- داده‌های مربوط به اثر اسیدته فاز پذیرنده بر راندمان استخراج پنتازوسین. ۵۰
جدول ۴-۵- داده‌های مربوط به اثرسرعت همزدن نمونه بر راندمان استخراج پنتازوسین. ۵۱
جدول ۴- ۶- داده‌های مربوط به اثر غلظت نمک بر راندمان استخراج پنتازوسین. ۵۱
جدول ۴- ۷- داده‌های مربوط به اثر دمای محلول بر راندمان استخراج پنتازوسین. ۵۲
جدول ۴- ۸- داده‌های مربوط به اثر زمان بر راندمان پنتازوسین. ۵۴
جدول ۴-۹- غنی‌سازی، انحراف استاندارد نسبی، حد تشخیص. ۵۴
جدول ۴-۱۰- مربع ضریب همبستگی، معادله خطوط نمودار درجه‌بندی و دامنه خطی‌بودن ۵۵
جدول ۴-۱۱- معادله خط، ضریب همبستگی، فاکتور غنی‌سازی، درصد بازیابی در ادرار حاوی پنتازوسین اضافه شده.... ۵۶
جدول ۴-۱۲- معادله خط، ضریب همبستگی، فاکتور غنی‌سازی، درصد بازیابی در پلاسما حاوی پنتازوسین اضافه شده .۵۶
جدول ۴-۱۳- مقایسه ویژگی‌های تجربه‌ای روش نسبت به روش‌های ارائه شده دیگر ۵۸
جدول ۴-۱۴- مقدار زمان رانش و تحرک کاهش یافته گونه‌های حاصل از دستگاه ESI-IMS ۵۹
جدول ۴-۱۵- داده‌های مربوط به بررسی تأثیر حلال بر راندمان استخراج. ۶۰
جدول ۴-۱۶- داده‌های مربوط به اثر قلیائیت فاز دهنده بر راندمان استخراج. ۶۱
جدول ۴-۱۷- داده‌های مربوط به اثر اسیدته فاز پذیرنده بر راندمان استخراج. ۶۲
جدول ۴-۱۸- داده‌های مربوط به اثرسرعت همزدن نمونه بر راندمان استخراج ۶۲
جدول ۴- ۱۹- داده‌های مربوط به اثر غلظت نمک بر راندمان استخراج ۶۳
جدول ۴- ۲۰- داده‌های مربوط به اثر دمای محلول بر راندمان استخراج. ۶۴
جدول ۴- ۲۱- داده‌های مربوط به اثر زمان استخراج بر راندمان استخراج. ۶۵
جدول ۴-۲۲- فاکتور غنی‌سازی، انحراف استاندارد نسبی، حد تشخیص. ۶۵
جدول ۴-۲۳- مربع ضریب همبستگی، معادله خطوط نمودار درجه‌بندی و دامنه خطی بودن ۶۶
جدول ۴-۲۴- معادله خط، ضریب همبستگی، فاکتور غنی‌سازی، درصد بازیابی در ادرار حاوی پنتازوسین اضافه شده.... ۶۷
جدول ۴-۲۵- معادله خط، ضریب همبستگی، فاکتور غنی‌سازی، درصد بازیابی در پلاسما حاوی پنتازوسین اضافه شده .۶۷
جدول ۴-۲۶- مقایسه ویژگی‌های تجربه‌ای روش نسبت به روش‌های ارائه شده دیگر ۶۹

چکیده

دراین پایان نامه، برای اولین بار از ترکیب روش ریزاستخراج مایع- مایع- مایع با فیبرهای توخالی و آنالیز به کمک دستگاه طیف سنج تحرک یونی (IMS) ،به منظور پیش تغلیظ و اندازه‌گیری آنالیت‌های دارویی در نمونه‌های بیولوژیکی شامل پلاسما و ادرار استفاده گردید. در تکنیک ریزاستخراج مایع- مایع- مایع با فیبرهای توخالی، فاز آلی در منافذ فیبر توخالی متخلخل پلی پروپیلنی به طول ۱/۳ سانتی‌متر به حالت اشباع در آمده و حجم داخلی فیبر توخالی توسط محلول استیک اسید (۰/۵۰ مولار) به عنوان محلول پذیرنده توسط سوزن سرنگ پرشده و سپس برای استخراج آنالیت از ۳ میلی لیتر نمونه‌ی آبی با pH بازی بکار گرفته شد. پارامترهای مؤثر بر استخراج سه فازی شامل نوع حلال، pH محلول نمونه،اسیدیته محلول پذیرنده، سرعت همزدن محلول نمونه، مقدار نمک، دمای استخراج و زمان استخراج مورد مطالعه قرار گرفتند. بهترین راندمان استخراج برای فیبر توخالی به طول ۱/۳ سانتی متر آغشته شده به حلال اکتانول، pH=۹/۰ برای محلول نمونه بدون اضافه کردن NaCl ، محلول پذیرنده ۰/۵۰ مولار نسبت به محلول اسید استیک، سرعت همزدن ۹۰۰ دور در دقیقه، زمان استخراج ۲۵ دقیقه در دمای محیط به دست آمد. گونه مورد آنالیز به طور کمی از محلول نمونه با فاکتور تغلیظ ۱۰۴ به داخل فاز پذیرنده استخراج گردید. از آن جا که هزینه فیبر نسبتا پایین است، برای هر بار استخراج از فیبر تازه استفاده گردید. در این روش حدتشخیص و دقت به ترتیب ۲/۰ میکروگرم بر لیترو٪ ۵/۵ به دست آمد.

در کار دوم ازتکنیک ریزاستخراج مایع- مایع- مایع با فیبرهای توخالی به کمک دستگاه طیف سنج تحرک یونی (IMS) برای آنالیز همزمان داروهای ضد افسردگی شامل دزیپرامین، تریمیپرامین به کار گرفته شد. بهترین راندمان استخراج با حلال دودکان، سدیم هیدروکسید ۰/۰۲۰ مولار برای محلول نمونه، محلول پذیرنده ۰/۱۰ مولار نسبت به محلول اسید استیک، سرعت همزدن ۸۶۰ دور در دقیقه، زمان استخراج ۲۰ دقیقه در دمای ۴۵°C و در محلولی با غلظت ۰/۰۵ گرم بر میلی لیتر از NaCl به دست آمد. حدتشخیص روش برای هر دو ترکیب ۱/۰۰ میکروگرم بر لیتر و دقت روش در محدوده بین ۵/۳-۵/۴ درصد بدست آمد. در نهایت تکنیک فوق برای اندازه‌گیری آنالیت‌ها در نمونه‌های پلاسما و ادرار با موفقیت انجام شد.

کلمات کلیدی

ریزاستخراج مایع- مایع- مایع، ریزاستخراج بر اساس فیبر توخالی، مواد مخدر، پنتازوسین، ضد افسردگی، دزیپرامین، تریمیپرامین، طیف سنج تحرک یونی.

فصل اول
استخراج و آماده‌سازی نمونه

مقدمه

آنالیز شامل سه فرآیند کلیدی شامل آماده‌سازی نمونه، آشکارسازی، مدیریت و تفسیر اطلاعات است [۱] طبق مطالعات انجام شده بیش از ٪۶۰ زمان آنالیز، صرف آماده‌سازی نمونه می‌گردد، در حالی که تنها حدود ٪۷ این زمان عملا صرف اندازه‌گیری اجزای نمونه می‌شود. زمان باقی مانده صرف جمع‌آوری نمونه و بررسی اطلاعات گردآوری شده می‌گردد [۲].

استخراج نمونه پیش از آنالیز تمام مراحل لازم برای آماده‌سازی نمونه اصلی برای اندازه‌گیری با روش مورد نظر را در بر می‌گیرد و پاکسازی نمونه، تغلیظ نمونه و تغییر در شکل فیزیکی نمونه را به عهده دارد. روش استخراج انتخاب شده تمام فرآیند آنالیز را تحت تأثیر قرار داده وانتخاب آن بستگی به شیمی گونه مورد آنالیز[1]، طبیعت بافت نمونه[2]، هدف آنالیز و حد تشخیص[3] دارد. اهمیت نسبی این فاکتورها بسته به تجهیزات و ملزومات اندازه‌گیری متفاوت است [۱].

۱-۱- انتخاب و ارزیابی روش‌های جداسازی

برای جداسازی کامل و مطمئن یک جزء از یک مخلوط، باید یک روش جداسازی کارآمد و گزینش‌پذیر را انتخاب کرد. این موضوع در جلوگیری از خطا، هدر رفتن هزینه، امکانات و زمان از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. بنابراین برای انتخاب یک روش جداسازی مناسب، روش سعی و خطا اجتناب‌ناپذیر است، مگر این که روش بر

1- Analyte
2- Matrix
3- Limit of Detection

اساس موارد مشابه موجود در نوشته‌های علمی انجام شود. برای اندازه‌گیری نمونه اصلی در یک مخلوط، از نظر علمی روشی مطلوب است که بتواند آن گونه را به طور کامل در محدوده خطای اندازه‌گیری روش، جداسازی کند. زمانی که جداسازی به منظور خالص‌سازی یک گونه باشد، فاکتور جداسازی اجزاء نامطلوب نسبت به جزء مطلوب اهمیت بیشتری در مقایسه با بازیافت جزء مطلوب پیدا می‌کند. پیش‌تغلیظ 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 گروه زیر دسته‌بندی می‌شوند.

الف) روش‌هایی که هدف از آنها آزادسازی گونه از بافت نمونه بیولوژیکی است و هیدرولیز با اسید، باز یا آنزیم می‌باشد.

ب) روش‌هایی همچون کریستالیزاسیون[1]، استخراج مایع- مایع[2] و استخراج با فاز جامد[3] شامل استخراج ترکیبات از درون محلول هستند.

ج) روش‌هایی برای ایجاد تغییر در حالت فیزیکی مایع شامل رقیق‌سازی، تبخیر ، انحلال، صاف‌کردن و غیره.

د) روش‌هایی برای افزایش گزینش‌پذیری و حساسیت آنالیز مثل انجام مشتق‌سازی قبل و بعد از ستون [۳]

۱-۲- روش‌های متداول استخراج

روش‌های استخراج گوناگونی برای آماده‌سازی نمونه قبل از جداسازی و اندازه‌گیری توسعه یافته اند. از جمله مهمترین این روش ها می‌توان به استخراج مایع - مایع، استخراج با فاز جامد و انواع روش های ریز استخراج که درسال‌های اخیر توسعه یافته اند، اشاره نمود. هدف اصلی این روش‌ها عموماً پیش تغلیظ و پاکسازی نمونه است. انتخاب روش بستگی به نوع بافت نمونه، اطلاعات مورد نیاز(کمی و کیفی)، حساسیت مورد نیاز و بودجه دارد.

۱-۲-۱- استخراج مایع-مایع(LLE)

استخراج با حلال اغلب شامل انتقال انتخابی یک ماده از یک فاز مایع به فاز مایع دیگر است. معمولا محلول آبی نمونه با یک حلال آلی امتزاج ناپذیر با آب استخراج می‌شود. عموما از قیف جداکننده برای آمیختن دو فاز و جدایش آنها استفاده می‌گردد.

۱-۲-۲- کاربرد استخراج مایع- مایع

این تکنیک اغلب به منظور منزوی کردن یک گونه شیمیایی موردنظر و یا تغلیظ مقادیر ناچیز ترکیبات استفاده می‌شود. وسیع‌ترین کاربرد آن در اندازه‌گیری فلزات با مقادیر کم در مواد متنوع معدنی و آلی فلزی است. برای مثال، استخراج انتخابی و اندازه‌گیری طیف‌سنجی فلزات به صورت کمپلکس‌های رنگی در تجزیه نمونه‌های زمین‌شناسی، فلزشناسی و در محصولات نفتی، مواد غذایی، بافت‌های گیاهی، جانوری و مایعات بدن را می‌توان نام برد. شیوه‌های استخراج برای گونه‌های آلی خاص در مقایسه با سیستم‌های شامل فلزات، دارای گزینش‌پذیری کمتری است. این امر به علت فقدان عامل کمپکس‌کننده و واکنش‌های استتار مناسب، برای گونه‌های آلی می‌باشد. با

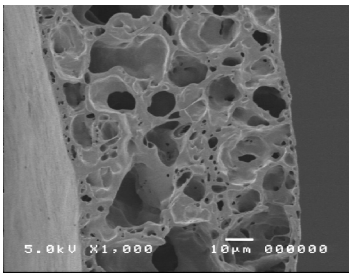
1- Crystalization
2- Liquid Liquid Extraction
3- Solid–Phase Extraction

این وجود، گروهی از ترکیبات نظیر هیدروکربن‌ها، اسیدها، چربی‌ها، موم‌ها و غیره اغلب می‌توانند قبل از تجزیه توسط سایر روش‌ها، جداسازی شوند [۴،۳].

استخراج مایع- مایع بدلیل سادگی و عدم نیاز به دستگاه‌های گران‌قیمت و پیچیده، کاربرد فراوانی در پیش‌تغلیظ، استخراج و آنالیزهای زیست‌محیطی دارد. البته، با وجود کاربردهای فراوان دارای معایبی نیز می‌باشد. بعضی مواقع تبخیر زیاد حلال و دور ریختن حلال‌های گران‌قیمت و اغلب قابل‌اشتعال، از معایب اساسی روش است. همچنین LLE شامل چندین مرحله آماده‌سازی و استخراج است که آلودگی و از دست رفتن نمونه در هر مرحله را به دنبال دارد. بعضی مواقع تشکیل امولسیون مسئله‌ساز است زیرا ممکن است به سادگی برطرف نشود. لوازم شیشه‌ای باید به دقت شسته و تمیز شوند. زیرا این خود باعث خطای زیادی می‌شود. خودکار کردن این روش نیز بسیار مشکل است. در مجموع زمان و هزینه آنالیزها بالاست [۵،۳]. با توسعه روش‌های جدید استخراج که با مصرف کمتر حلال و زمان کوتاه همراه است، کاربرد LLE در کارهای تجزیه‌ای محدود شده است. این روش‌ها شامل SPE و ریزاستخراج با فاز جامد[1] است که نسبت به LLE مزایای بسیاری دارند.

۱-۳- ریزاستخراج فاز مایع[2] (LPME)

در سال‌های اخیر و به موازات رشد روش‌های ریزاستخراج فاز جامد، روش‌های ریزاستخراج فاز مایع نیز توسعه فراوانی یافته است. روش‌های LPME به نسبت روش‌های SPME دارای مزایایی می‌باشند. اولین مزیت این روش‌ها سادگی آنها است؛ به این معنی که این روش‌ها معمولا نیاز به امکانات خاصی ندارند و در هر آزمایشگاهی با حداقل امکانات انجام‌پذیر هستند. از سوی دیگر این روش‌ها بر خلاف روش‌های SPME برای استخراج گونه‌های قطبی به خصوص از محیط‌های آبی مناسب‌تر هستند. روش‌های متعددی در زمینه LPME توسعه یافته‌اند، اما این روش‌ها را می‌توان از سه دیدگاه تعداد فازهای درگیر در استخراج، تحرک فازهای درگیر در استخراج و استفاده از غشاءهای فیبری توخالی[3] در فرایند استخراج دسته‌بندی نمود [۶]. در شکل(۱-۱) می‌توان تصویری میکروسکوپی از یک نمونه از این غشاءها که معمولا پلی‌پروپیلنی هستند را مشاهده کرد.

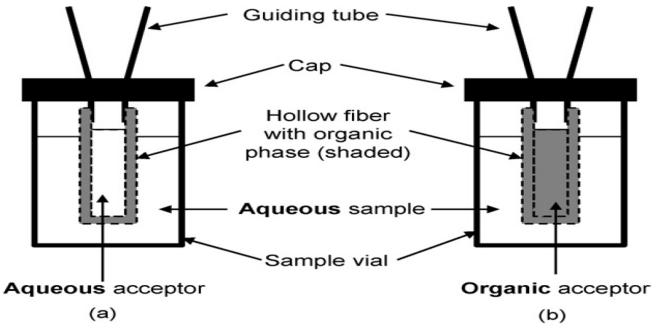


شکل ۱-۱- تصویری میکروسکوپی از سطح مقطع یک غشاء پلیمری متخلخل [۷].

از نظر تعداد فازهای درگیر در استخراج، روش‌های LPME می‌توانند به صورت دو فازی یا سه‌فازی انجام شوند. روش سه فازی بیشتر در استخراج ترکیبات با خاصیت اسیدی و بازی کاربرد دارد. در این روش دو فاز

1- Solid Phase Microextraction
2- Liquid Phase Microextraction
3- Hollow Fiber Membrane

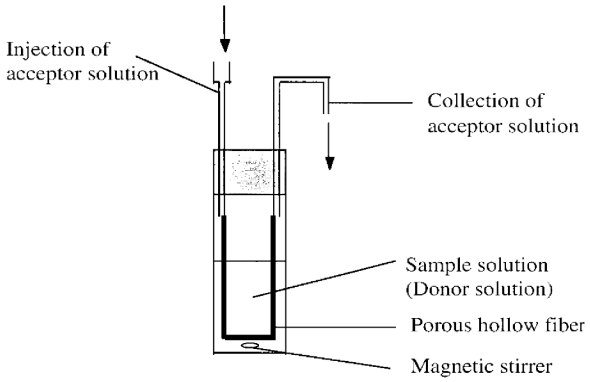
پذیرنده و گیرنده وجود دارد که عموما در فاز آبی بوده و از لحاظ pH کاملا معکوس یکدیگر هستند و یک فاز آلی بین این دو فاز وظیفه انتقال گونه‌ها را از فاز دهنده به فاز پذیرنده را بر عهده دارد. در سال‌های اخیر در برخی روش‌های LPME استفاده از غشاءهای فیبری توخالی نیز توسعه یافته است. این غشاءها بیشتر دارای جنبه حفاظت از فاز مایع به خصوص در نمونه‌های پیچیده هستند. در روش‌های سه‌فازی این غشاء عموما وظیفه نگهداری فاز آلی واسطه را بر عهده دارد که بین دو فاز دهنده و پذیرنده قرار می‌گیرد [۶]. شکل (۱-۲) نحوه قرارگیری فازهای استخراج کننده را در حالت‌های دو فازی و سه‌فازی نشان می‌دهد.



شکل ۱-۲- نحوه قرارگیری فازها در دو حالت سه‌فازی(a) و دو فازی(b) با استفاده از غشاءهای فیبری توخالی [۸].

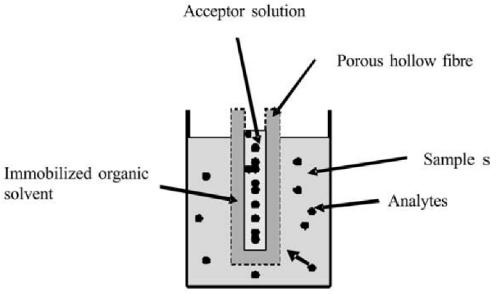
اولین بار استفاده از غشای پلی پروپیلنی توخالی به عنوان وسیله‌ی ریز استخراج توسط پدرسون[۱]- جرگارد[۲] و راسموسن[۳] در سال ۱۹۹۹ ارائه شد. در این تحقیق ازاصول ریزاستخراج مایع- مایع- مایع[۴] (سیستم سه فازی آبی- آلی-آبی) برای پیش تغلیظ خارج از خط متآمفتامین[۵] در پلاسما و ادرار انسان و به دنبال آن آنالیز با الکتروفورز موئینه[۶] استفاده شد. یک قطعه کوچک فیبر توخالی متخلخل پلی پروپیلنی با ۲۵ میکرولیتر محلول پذیرنده با pH معین (با توجه به ثابت تفکیک اسیدی یا بازی گونه های مورد استخراج تعیین می‌گردد) پرشده و حلال آلی به عنوان پرکننده حفرات غشای آب‌گریز به کار رفته (با غوطه ور ساختن فیبر در حلال آلی در مدت چند ثانیه) و در نهایت فیبر در محلول نمونه با pH معین و با حجم بزرگتری نسبت به محلول پذیرنده که با سرعت معینی همزده می‌شود قرار می‌گیرد. پدرسون- جرگارد از سوزن‌های سرنگ با قطر ۰/۸ میکرومتر را با عبور از سپتوم سیلیکونی که انتهای آن‌ها به قطعه پلی پروپیلنی ۸ سانتی متری متصل شده بود استفاده کردند. یکی از سوزن ها برای وارد کردن محلول پذیرنده به داخل فیبر و دیگری برای جمع آوری محلول پذیرنده پس از مدت زمان معین استخراج به کار گرفته شد شکل (۱-۳) [۹].

1- Bjergaard
2- Pedersen
3- Rasmussen
4- Liquid-Liquid-Liquid Microextraction
5- Methamphetamine
6- Capillary Zone Electrophoresis



شکل۱-۳- سیستم اولیه استفاده شده توسط پدرسون- جرگارد و راسموسن [۷].

آرایشU شکل که در بالا ارائه شد شرایط استخراج عالی را فراهم می‌کند. اما این شیوه برای انتقال محلول پذیرنده دشوار بوده و به سختی خودکار می‌گردد. این مشکل با استفاده از به کارگیری آرایش میله ای فیبر توسط اولین محققان [۹] و همچنین کرامر[1] و اندروز[2] [۱۰] حذف شد. در این کاربرد شکل (۱-۴) از یک میکروسرنگ به منظور تزریق و جمع آوری فاز پذیرنده به فیبری که به صورت میله‌ای در انتهای سرنگ بسته شده است، استفاده می-گردد. این پیکربندی با نمونه‌بردارهای خودکار پیشرفته سازگارتر است. انتهای فیبر در روش‌های ارائه شده با حرارت یا فشار مکانیکی بسته شده و پس از اتصال فیبر به انتهای سرنگ و تزریق حجم معین از فاز پذیرنده به داخل فیبر، فیبر را در زمان مشخص به داخل حلال آلی فرو برده و پس از شستن اضافی حلال با آب مقطر، فیبر را برای انجام استخراج در ظرف نمونه قرار می‌دهند.

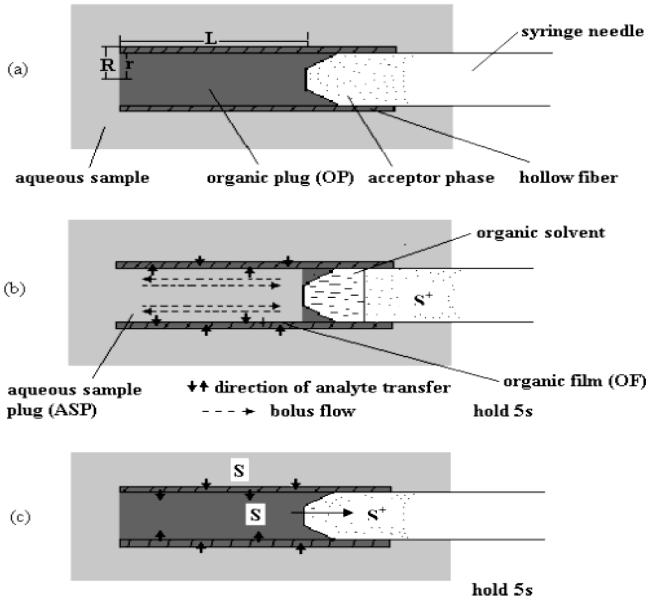


شکل ۱-۴- ریز استخراج HF-LPME سه فازی [۱۱].

بدون نیاز به بستن انتهای فیبر می‌توان از یک پمپ سرنگ قابل برنامه‌ریزی که پیستون میکروسرنگ به طور خودکار حرکت می‌کند برای تنظیم سیستم استخراج پویای سه فازی استفاده کرد. تکنیک اولین بار توسط هو[3] و لی[4] به منظور استخراج آنیلین ها به کار گرفته شد. فاز پذیرنده با حجم ۵ میکرولیتر به داخل سرنگ کشیده شده، پس از آماده‌سازی فیبر توسط حلال آلی سرنگ به پمپ متصل می‌گردد. پیستون با سرعت ۰/۵ میکرولیتر بر ثانیه ، ۲

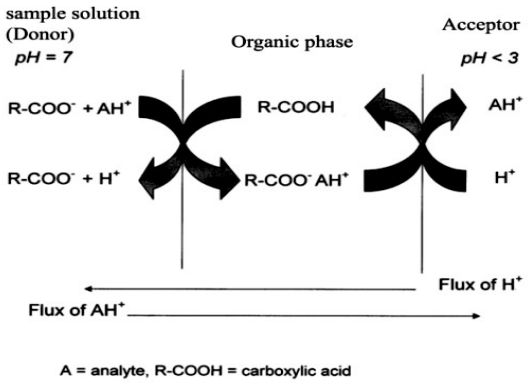
1- Cramer
2- Andrews
3- Hu
4- Lee

میکرولیتر از نمونه آبی را به داخل فیبر روانه ساخته و پس از زمان تعویق ۵ ثانیه به منظور انتقال جرم موثر، با فشرده شدن پیستون با همان سرعت، فیبر از نمونه خالی می‌گردد. پس از همان زمان تعویق، پیستون کشیده شده و سیکل بالا تکرار می‌گردد شکل (۱-۵) . RSD گزارش شده کم تر از ۴ ٪ بود که حاکی از تکرارپذیری بالای روش پویا می-باشد [۱۲].



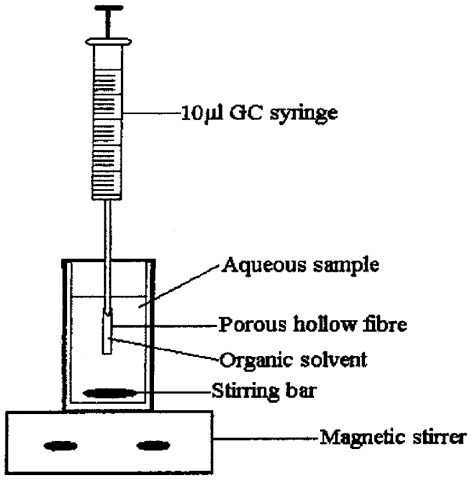
شکل ۱-۵- طرحی ازریز استخراج HF-LPME سه فازی به روش پویا [۱۲].

از آن‌جا که مواد یونی اصولا تحت شرایط تغییر pH استخراج می‌گردد در رابطه با ترکیبات با حلالیت پایین در فاز پذیرنده، از آن جا که این ترکیبات در حلال آلی به دام می‌افتند به نظر می‌رسد HF-LPME کاراتر بوده و در استخراج ترکیباتی که حلالیت بالایی در فاز دهنده دارند LPME سه فازی غیرمؤثر است. در مورد بیشتر آنالیت‌های قطبی با به کاربردن ترفندی همچون افزایش معرف‌های جفت یون یا میانجی به نمونه یا حلال آلی می‌توان در حل مشکل کمک کرد [۶]. در شکل (۱-۶) می‌توان مدل ارائه شده برای این فرایند را مشاهده کرد.



شکل ۱-۶- مدل ارائه شده در استخراج سه‌فازی آمین‌ها از نمونه آبی با تشکیل جفت یون [۶].

سیستم دو فازی LPME اولین بار برای تغلیظ دیازپام[1] و پرازپام[2] و به دنبال آن آنالیز گونه‌های استخراج شده با جداسازی کروماتوگرافی گازی با آشکارساز نیتروژن و فسفر به کار گرفته شد [۱۳]. گروه لی در دانشگاه سنگاپور از سوزن میکروسرنگ ده میکرومتری GC که فیبر توخالی پلی پروپیلنی با طول ۱/۳ سانتی متر در انتهای آن ثابت شده بود و به عنوان ریزاستخراج توسط فیبر توخالی حمایت شده با فاز آلی[3] توسعه دادند. سرنگ حاوی محتوی ۳ میکرولیتر از حلال آلی تولوئن با دقت به داخل فیبر تزریق گردیده و پس از استخراج علف کش‌های تری آزینی[4] از فاز نمونه‌های آبی یا نیمه جامد به داخل فاز آلی موجود در غشای پلی پروپیلنی، در مدت زمان استخراج معین حلال آلی به داخل سرنگ کشیده شده و آنالیز با GC انجام گردید [۱۴]. در مواردی که قطر بیرونی سوزن میکروسرنگ به طور محکم با قطر داخلی فیبر توخالی جفت نمی‌شود به ویژه در سرعت‌های بالای هم زدن فیبر از سرنگ جدا می گردد. یان[5] و وو[6] از میکروسرنگ دو سر استفاده کرد. HS-HF-LPME به عنوان تکنیک استخراج گونه های فرار مختلف گزارش شده است. به این صورت که سیستم فیبر متصل به سرنگ در فضای بالایی نمونه محتوی گونه فرار قرار می‌گیرد [۱۵]. در شکل (۱-۷) می‌توان نحوه اتصال یک غشاء فیبری توخالی را به یک سرنگ مشاهده کرد.



شکل ۱-۷- نحوه اتصال غشاء فیبری توخالی به انتهای یک سرنگ در آرایش میله ای [۱۳].

۱-۳-۱-تئوری HF-LPME

در تئوری ارائه شده توسط اولین محققان[۷] فرآیند LLLME شامل یک سری فرآیند استخراج برگشت پذیر است. در مرحله اول آنالیت از محلول نمونه (محلول دهنده) به داخل فاز آلی موجود در حفرات فیبر توخالی استخراج شده و در مرحله دوم آنالیت ها به فاز آبی موجود در فیبر توخالی استخراج می‌گردند. برای مثال در استخراج گونه i فرایند استخراج به صورت معادله‌ی زیر نشان داده می‌شود:

$$i_{a1} \leftrightarrow i_o \leftrightarrow i_{a2} \qquad (۱-۱)$$

1- Diazepam
2- Prazepam
3- HF-LPME
4- Triazines
5- Yan
6- Wu