

سید

A highly stylized, black calligraphic flourish. It begins with a small, elegant script character 'سید' (Said) at the top. Below it, the design flows into a series of thick, sweeping curves and loops. The central part features a complex, symmetrical pattern of overlapping, pointed shapes that resemble stylized leaves or petals. The entire piece concludes at the bottom with two solid black diamond shapes, one slightly offset from the other, creating a sharp, geometric end to the flourish.



دانشکده شیمی

پایان نامه کارشناسی ارشد شیمی تجزیه

کاربرد میکرواستخراج مایع-مایع پخشی متوالی برای پیش تغلیظ سیتالوپرام و سرتالین

همراه با کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا

نگارنده:

بهاره عربخانی

استاد راهنما:

دکتر ناصر گودرزی

استاد مشاور:

دکتر قدمعلی باقریان دهقی

شهریور ۱۳۹۶

تقدیم به:

خدایی که آفرید

جهان را، انسان را، عقل را، علم را، معرفت را، عشق را

و به کسانی که عشقشان را در وجودم دمید

ماحصل آموخته هایم را تقدیم می کنم به آنان که مهر آسمانی شان آرام بخش آلام زمینی ام است

به استوارترین تکیه گاهم، دستان پر مهر پدرم

به سبزترین نگاه زندگیم، چشمان سبز مادرم

که هرچه آموختم در مکتب عشق شما آموختم و هرچه بگو شتم قطره ای از دریای بی کران مهربانان را سپاس توانم بگویم.

امروز، سستی ام به امید شماست و فردا کلید باغ به شتم رضای شما

برادر و خواهرم، آنان که کوشش مرا ستودند و از موفقیت های من لذت برده اند.

به استادان فرزانه و فریخته ای که در راه کسب علم و معرفت مریاری نمودند، به آنان که در راه کسب دانش راهنمایم بودند.

به آنان که نفس خیرشان و دعای روح پرورشان بدرقه می راهم بود.

## شکر و قدردانی:

سپاس و ستایش خدای راجل و جلالت که آثار قدرت او بر چهره روز روشن، تابان است و انوار حکمت او در دل شب تار،

دانشان. آفریدگاری که خویشتن را به ما شناساند و درهای علم را بر ما گشود و عمری و فرصتی عطا فرمود تا بدان، بنده ضعیف خویش را در

طریق علم و معرفت بیازماید. و خدای راسبی ساکرم که از روی کرم پدر و مادری فداکار نصیم ساخته تا در سایه درخت پر بار وجودشان

بیایم و از ریشه آنها شاخ و برگ گیرم و از سایه وجودشان در راه کسب علم و دانش تلاش نمایم. والدینی که بودند تاج افتخاری

است بر سرم و نشان دلیلی است بر بودنم چرا که این دو وجود پس از پروردگاریه هستی ام بوده اند و تم را گرفتند و راه رفتن را در

این وادی زندگی پر از فراز و نشیب آموختند. آموزگاری که برایم زندگی؛ بودن و انسان بودن را معنا کردند و همواره بر کوتاهی و درستی

من، قلم عفو کشیده و کریمانه از کنار غفلت بایم گذشته اند و در تمام عرصه های زندگی یار و یاور بی چشم داشت برای من بوده اند.

به مصداق «من لم یشکر المخلوق لم یشکر الخالق» بسی شایسته است از استاد فرهیخته و فرزانه جناب آقای دکتر ناصر کوردزی

که در کمال سعه صدر، با حسن خلق و فروتنی، از بیچ کلمی در این عرصه بر من دریغ نمودند و زحمت راهنمایی این رساله را بر عهده گرفتند؛

از استاد صبور و باتقوا، جناب آقای دکتر قدوسی باقریان و هقی، که زحمت مشاوره این رساله را متقبل شدند؛ و از اساتید فرزانه و

دلغوز؛ جناب آقای دکتر منصور عرب چم جنجلی و دکتر مهدی میرزایی که زحمت داوری این رساله را متقبل شدند؛ کمال تشکر و

قدردانی را دارم باشد که این خردترین، نحشی از زحمات آنان را سپاس گوید.

همچنین از کارکنان محترم دانشکده شیمی که بهکاری های صمیمانه ای را با اینجانب داشته اند تشکر می نمایم.

در پایان از هم کلاسی ها و دوستان خوبم که در مراحل انجام این تحقیق کمک و همراه بنده بودند نهایت سپاسگزاری را داشته و برای همه این

عزیزان آرزوی سلامتی و سعادت می نمایم.

بارالها به ما توفیق تلاش در سنگنت، صبر در نومی، رفتن بی همراه، جهاد بی سلاح، کار بی پاداش، فداکاری در سکوت، دین بی دنیا،

مذهب بی عوام، عظمت بی نام، خدمت بی نان، ایمان بی ریا، خوبی، بی نمود، که تمنای بی خامی، مناعت بی غرور و دوست

داشتن بی آنکه دوستت بدانند، رعایت فرما.

## تعهدنامه

اینجانب بهاره عربخانی دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته شیمی تجزیه دانشکده شیمی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه کاربرد میکرواستخراج مایع-مایع پخشی متوالی برای پیش تغلیظ سیتالوپرام و سرترالین همراه با کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا تحت راهنمایی دکتر ناصر گودرزی و مشاوره دکتر قدمعلی باقریان دهقی متعهد می شوم :

- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است .
- در استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است .
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است .
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد و مقالات مستخرج با نام «دانشگاه صنعتی شاهرود» و یا « Shahrood University of Technology » به چاپ خواهد رسید.
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه ، در مواردی که از موجود زنده ( یا بافت‌های آن‌ها ) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است .
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری ، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است .

امضای دانشجو

تاریخ

### مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج ، کتاب ، برنامه های رایانه ای ، نرم افزار ها و تجهیزات ساخته شده است ) متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد . این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود .
- استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی باشد.

## چکیده

در این مطالعه، یک روش ساده و کارآمد برای بهبود پاکسازی و کاربرد روش میکرواستخراج مایع-مایع پخشی در ماتریس‌های پیچیده معرفی شده است. بدین منظور دو روش میکرواستخراج ترکیب شده و روش میکرواستخراج مایع-مایع پخشی متوالی برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری هم‌زمان مقادیر کم سیتالوپرام و سرتالین با استفاده از کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا ارائه شده است. در روش میکرواستخراج مایع-مایع به کمک هوا آنالیت‌ها به فاز پذیرنده برمی‌گردند، به منظور به دست آوردن بهترین کارایی استخراج تاثیر پارامترهای مختلف از جمله غلظت فاز دهنده و پذیرنده، نوع حلال استخراج و تعداد مکش سرنگ مورد بررسی قرار گرفت. این روش محدوده خطی مناسبی در ۰/۱۰-۷/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و حد تشخیص ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر برای سیتالوپرام و ۰/۰۰۲ برای سرتالین ارائه داد و فاکتور پیش‌تغلیظ ۹۹/۱ برای سیتالوپرام و ۱۰۰/۰ برای سرتالین به دست آمد.

کلمات کلیدی: سیتالوپرام، سرتالین، میکرواستخراج مایع-مایع پخشی متوالی، فاکتور پیش

تغلیظ

مقالات مستخرج از این پایان نامه که در همایش‌ها ارائه شده است:

\* بیست و چهارمین سمینار شیمی تجزیه ایران، دانشگاه شهید مدنی تبریز، شهریور ماه ۱۳۹۶.



## فهرست مطالب

۱	فصل اول: مقدمه.....
۲	۱-۱ داروهای ضد افسردگی.....
۳	۲-۱ اهمیت اندازه گیری مهارکننده‌های بازجذب سروتونین (SSRIs).....
۳	۱-۲-۱ سیتالوپرام.....
۴	۲-۲-۱ سرتالین.....
۵	۳-۱ روش‌های مختلف اندازه گیری مهارکننده‌های بازجذب سروتونین.....
۶	۴-۱ مروری بر کارهای انجام شده بر روی سیتالوپرام و سرتالین.....
۱۱	۲ فصل دوم: تئوری.....
۱۲	۱-۲ مقدمه‌ای بر کروماتوگرافی.....
۱۳	۱-۲-۱ کروماتوگرافی مایع بر اساس انواع فاز ساکن:.....
۱۳	۱-۲-۱-۱ کروماتوگرافی تقسیمی.....
۱۴	۲-۲-۱ کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC).....
۱۵	۲-۲ مقدمه‌ای بر روش‌های آماده‌سازی نمونه.....
۱۶	۱-۲-۲ اهداف عمومی روش‌های آماده‌سازی.....
۱۶	۲-۲-۲ روش‌های آماده‌سازی نمونه.....
۱۸	۳-۲-۲ روش‌های میکرواستخراج.....
۱۹	۱-۳-۲-۲ روش‌های میکرواستخراج با فاز مایع.....
۲۸	۲-۳-۲-۲ عوامل موثر بر بازده میکرواستخراج مایع-مایع پخشی.....
۳۰	۳-۳-۲-۲ روابط حاکم بر میکرواستخراج مایع-مایع پخشی.....
۳۱	۴-۳-۲-۲ سازگاری روش DLLME با تکنیک‌های دستگاهی.....
۳۵	۳-۲ روش‌های عاری از حلال پخش کننده در میکرواستخراج با حلال.....
۴۱	۳ فصل سوم: تجربی.....
۴۲	۱-۳ مقدمه.....
۴۳	۲-۳ مواد شیمیایی مورد استفاده.....
۴۴	۳-۳ محلول‌های مورد استفاده و طرز تهیه‌ی آن‌ها.....
۴۵	۴-۳ دستگاه‌ها و وسایل مورد استفاده.....
۴۶	۵-۳ ثبت طیف جذبی آنالیت‌ها و انتخاب بهترین طول موج.....

۴۸	۱-۵-۳ شرایط کروماتوگرافی و تهیه فاز متحرک
۵۰	۶-۳ رسم منحنی کالیبراسیون مستقیم سیتالوپرام و سرتالین
۵۲	۷-۳ روش کار در بهینه‌سازی پارامترهای مؤثر بر اندازه‌گیری سیتالوپرام و سرتالین
۵۴	۸-۳ بررسی و بهینه‌سازی پارامترهای مؤثر بر استخراج سیتالوپرام و سرتالین به روش مایع - مایع پخشی متوالی
۵۵	۱-۸-۳ بررسی pH محلول نمونه و فاز پذیرنده
۵۸	۲-۸-۳ نوع اسید تنظیم‌کننده pH محلول در مرحله دوم استخراج
۶۰	۳-۸-۳ حجم حلال استخراج برگشتی
۶۲	۴-۸-۳ نوع حلال استخراج‌کننده
۶۶	۵-۸-۳ حجم حلال استخراج‌کننده
۶۸	۶-۸-۳ بهینه‌سازی قدرت یونی محلول (اثر نمک)
۷۱	۷-۸-۳ تعداد سیکل مکش و تخلیه بوسیله سرنگ پس از افزودن حلال آلی
۷۲	۸-۸-۳ تعداد سیکل مکش و تخلیه بوسیله سرنگ پس از افزودن اسید به حلال آلی
۷۴	۹-۸-۳ بهینه‌سازی زمان سانتریفیوژ
۷۶	۱۰-۸-۳ بهینه‌سازی سرعت چرخش سانتریفیوژ
۷۹	۱۱-۸-۳ نتایج حاصل از بهینه‌سازی یک متغیر در زمان
۸۱	۹-۳ رسم منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ
۸۳	۱۰-۳ بررسی اثر گونه‌های مزاحم
۸۵	۱۱-۳ ارقام شایستگی اندازه‌گیری سیتالوپرام و سرتالین
۸۶	۱-۱۱-۳ دقت و صحت روش
۸۸	۱۲-۳ فاکتور پیش تغلیظ
۸۸	۱۳-۳ اندازه‌گیری سیتالوپرام و سرتالین در نمونه‌های حقیقی
۸۸	۱-۱۳-۳ اندازه‌گیری داروها در نمونه قرص
۹۰	۲-۱۳-۳ اندازه‌گیری داروها در نمونه پلاسما
۹۳	۳-۱۳-۳ اندازه‌گیری داروها در نمونه آب شهر شاهرود
۹۷	۴ فصل چهارم
۹۸	۱-۴ ارقام شایستگی روش
۹۸	۲-۴ مقایسه روش پیشنهادی با برخی روش‌های موجود
۱۰۰	۳-۴ نتیجه‌گیری

## فهرست شکل ها

- شکل (۱-۱) ساختار شیمیایی داروی سیتالوپرام [۹] ..... ۴
- شکل (۲-۱) ساختار شیمیایی داروی سرتالین [۱۰] ..... ۵
- شکل (۱-۲) تقسیم بندی انواع روشهای میکرواستخراج فاز مایع ..... ۲۲
- شکل (۲-۲) میکرواستخراج مایع-مایع پخشی [۴۵] ..... ۲۵
- شکل (۳-۲) ظرف نمونه طراحی شده برای استخراج با حلال‌های با چگالی کمتر از آب [۴۹] ..... ۲۷
- شکل (۴-۲) سیستم استخراجی برپایه قطره که توسط ماء و کانت ول توسعه یافته [۶۱] ..... ۳۴
- شکل (۵-۲) میکرواستخراج مایع-مایع-مایع [۶۲] ..... ۳۵
- شکل (۶-۲) میکرواستخراج مایع-مایع به کمک هوا [۶۵] ..... ۳۹
- شکل (۱-۳) طرح شماتیک روش مورد استفاده ..... ۴۳
- شکل (۲-۳) طیف جذبی سیتالوپرام و سرتالین، در ناحیه ۲۰۰-۴۰۰ نانومتر، شرایط آزمایش: غلظت سیتالوپرام (CIT) و سرتالین (SER) (۱۰/۰ میلی گرم بر میلی لیتر)، در محلول HCl (با غلظت ۰/۳۰ مولار) ..... ۴۷
- شکل (۳-۳) طیف جذبی سیتالوپرام و سرتالین، در ناحیه ۲۰۰-۴۰۰ نانومتر شرایط آزمایش: غلظت سیتالوپرام (CIT) و سرتالین (SER) (۱۰/۰ میلی گرم بر میلی لیتر)، در فاز متحرک (ترکیب بافر فسفاتی با pH برابر با ۵/۵ و استونیتریل به نسبت ۱:۱) ..... ۴۷
- شکل (۴-۳) کروماتوگرام محلول ۱۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر داروهای سیتالوپرام (CIT) و سرتالین (SER) در هیدروکلریک اسید ۰/۳۰ مولار، فاز متحرک (ترکیب بافر فسفاتی با pH برابر با ۵/۵ و استونیتریل به نسبت ۱:۱) سرعت جریان فاز متحرک ۱/۰ میلی لیتر در دقیقه، در دمای محیط، ستون C<sub>18</sub> (۴/۶×۱۵۰) میلی متر با اندازه ذرات ۵ میکرومتر) ..... ۴۹
- شکل (۵-۳) منحنی کالیبراسیون مستقیم سیتالوپرام. غلظت‌های مختلفی از آنالیت در حلال ۰/۳ مولار HCl، (بافر فسفاتی با pH ۵/۵ : استونیتریل با نسبت ۱:۱ به عنوان فاز متحرک) سرعت جریان ۱/۰ میلی لیتر بر دقیقه و طول موج ۲۳۸ نانومتر ..... ۵۱
- شکل (۶-۳) منحنی کالیبراسیون مستقیم سرتالین. غلظت‌های مختلفی از آنالیت در حلال ۰/۳ مولار HCl، بافر فسفاتی با pH ۵/۵ استونیتریل با نسبت ۱:۱ به عنوان فاز متحرک، سرعت جریان ۱/۰ میلی لیتر بر دقیقه و طول موج ۲۰۸ نانومتر ..... ۵۲
- شکل (۷-۳) تاثیر غلظت محلول بازی، شرایط عمل: مقدار نمونه ۱۰/۰ میلی لیتر (حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر آنالیت‌ها)،

تعداد سیکل مکش اولیه ۷ مرتبه و مکش ثانویه ۲۱ مرتبه، مرتبه، حلال استخراج کننده ۲۰۰ میکرولیتر دی کلرومتان، اسید مصرفی ۱۰۰ میکرولیتر هیدروکلریک اسید ۰/۳ مولار، ۵ دقیقه سانتریفیوژ با سرعت ۳۰۰۰ rpm در هر دو مرحله ۵۷.....

شکل (۸-۳) تاثیر غلظت محلول اسیدی، شرایط عمل: مقدار نمونه ۱۰/۰ میلی لیتر (حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر آنالیت‌ها)، غلظت سدیم هیدروکسید ۰/۵۰ مولار، تعداد سیکل مکش اولیه ۷ و مکش ثانویه ۲۱ مرتبه، حلال استخراج کننده ۲۰۰ میکرولیتر دی کلرو متان، حجم اسید مصرفی ۱۰۰ میکرولیتر هیدروکلریک اسید، ۵ دقیقه سانتریفیوژ با سرعت ۳۰۰۰ rpm در هر دو مرحله ۵۸.....

شکل (۹-۳) طیف جذبی سرتالین، در ناحیه ۴۰۰-۲۰۰ نانومتر شرایط آزمایش: غلظت سرتالین (SER) (۱۰/۰) میلی گرم بر میلی لیتر، در محلول HNO<sub>3</sub> با غلظت ۰/۳۰ مولار..... ۵۹.....

شکل (۱۰-۳) طیف جذبی سیتالوپرام، در ناحیه ۴۰۰-۲۰۰ نانومتر شرایط آزمایش: غلظت سیتالوپرام (CIT) (۱۰/۰) میلی گرم بر میلی لیتر، در محلول HNO<sub>3</sub> با غلظت ۰/۳۰ مولار..... ۵۹.....

شکل (۱۱-۳) تاثیر نوع اسید مصرفی، شرایط عمل: مقدار نمونه ۱۰/۰ میلی لیتر (حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر آنالیت‌ها)، غلظت سدیم هیدروکسید ۰/۵۰ مولار، تعداد سیکل مکش اولیه ۷ و مکش ثانویه ۲۱ مرتبه، حلال استخراج کننده ۲۰۰ میکرولیتر دی کلرومتان، حجم اسید مصرفی ۱۰۰ میکرولیتر با غلظت ۰/۳۰ مولار، ۵ دقیقه سانتریفیوژ با سرعت rpm ۳۰۰۰ در هر دو مرحله..... ۶۰.....

شکل (۱۲-۳) تاثیر حجم اسید مصرفی، شرایط عمل: مقدار نمونه ۱۰/۰ میلی لیتر (حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر آنالیت‌ها)، غلظت سدیم هیدروکسید ۰/۵۰ مولار، تعداد سیکل مکش اولیه ۷ و مکش ثانویه ۲۱ مرتبه، حلال استخراج کننده ۲۰۰ میکرولیتر دی کلرومتان، اسید با غلظت ۰/۳۰ مولار، ۵ دقیقه سانتریفیوژ با سرعت rpm ۳۰۰۰ در هر دو مرحله..... ۶۲.....

شکل (۱۳-۳) کروماتوگرام تاثیر نوع حلال آلی، شرایط عمل: مقدار نمونه ۱۰/۰ میلی لیتر (حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر آنالیت‌ها)، تعداد سیکل مکش اولیه ۷ و مکش ثانویه ۲۱ مرتبه، حلال استخراج کننده ۲۰۰ میکرولیتر تتراکلریدکربن، اسید مصرفی ۱۰۰ میکرولیتر هیدرو کلریک اسید ۰/۳۰ مولار، ۵ دقیقه سانتریفیوژ با سرعت rpm ۳۰۰۰ در هر دو مرحله، سرتالین (SER) در ۲۰۸ نانومتر و سیتالوپرام (CIT) در ۲۳۸ نانومتر، فاز متحرک (ترکیب بافر فسفات) با pH برابر با ۵/۵، استونیتریل با نسبت ۱:۱) سرعت جریان فاز متحرک ۱/۰۰ میلی لیتر در دقیقه، در دمای محیط، ستون C<sub>18</sub> (۴/۶×۱۵۰) میلی متر با اندازه ذرات ۵ میکرومتر)..... ۶۳.....

شکل (۱۴-۳) کروماتوگرام تاثیر نوع حلال آلی، شرایط عمل: مقدار نمونه ۱۰/۰ میلی لیتر (حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر آنالیت‌ها)، غلظت سدیم هیدروکسید ۰/۵۰ مولار، تعداد سیکل مکش اولیه ۷ و مکش ثانویه ۲۱ مرتبه، حلال استخراج کننده ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم، اسید مصرفی ۱۰۰ میکرولیتر هیدروکلریک اسید ۰/۳۰ مولار ، ۵ دقیقه سانتریفیوژ با سرعت rpm ۳۰۰۰ در هر دو مرحله، سرتالین (SER) در ۲۰۸ نانومتر و سیتالوپرام (CIT) در ۲۳۸ نانومتر، فاز متحرک (ترکیب بافر فسفات) با pH برابر با ۵/۵، استونیتریل با نسبت ۱:۱) سرعت جریان فاز متحرک ۱/۰۰ میلی لیتر در دقیقه، در دمای محیط، ستون C<sub>18</sub> (۴/۶×۱۵۰) میلی متر با اندازه ذرات ۵ میکرومتر)..... ۶۴.....

شکل (۱۵-۳) کروماتوگرام تاثیر نوع حلال آلی، شرایط عمل: مقدار نمونه ۱۰/۰ میلی لیتر (حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر آنالیت‌ها)، غلظت سدیم هیدروکسید ۰/۵۰ مولار، تعداد سیکل مکش اولیه ۷ و مکش ثانویه ۲۱ مرتبه، حلال استخراج کننده ۲۰۰ میکرولیتر کلروبنزن، اسید مصرفی ۱۰۰ میکرولیتر هیدرو کلریک اسید ۰/۳۰ مولار ، ۵ دقیقه سانتریفیوژ با سرعت rpm ۳۰۰۰ در هر دو مرحله، سرتالین (SER) در ۲۰۸ نانومتر و سیتالوپرام (CIT) در ۲۳۸ نانومتر،

فاز متحرک (ترکیب بافر فسفاتی با pH برابر با ۵/۵، استونیتریل با نسبت ۱:۱) سرعت جریان فاز متحرک ۱/۰۰ میلی‌لیتر در دقیقه، در دمای محیط، ستون C<sub>18</sub> (۴/۶×۱۵۰) میلی‌متر با اندازه ذرات ۵ میکرومتر)..... ۶۴

شکل (۱۶-۳) کروماتوگرام تاثیر نوع حلال آلی، شرایط عمل: مقدار نمونه ۱۰/۰ میلی‌لیتر (حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر آنالیت‌ها)، غلظت سدیم هیدروکسید ۰/۵۰ مولار، تعداد سیکل مکش اولیه ۷ و مکش ثانویه ۲۱ مرتبه، حلال استخراج‌کننده ۲۰۰ میکرولیتر ۱ و ۲ دی کلرومتان، اسید مصرفی ۱۰۰ میکرولیتر هیدروکلریک اسید ۰/۳۰ مولار، ۵ دقیقه سانتریفیوژ با سرعت ۳۰۰۰rpm در هر دو مرحله، سترالین (SER) در ۲۰۸ نانومتر و سیتالوپرام (CIT) در ۲۳۸ نانومتر، فاز متحرک (ترکیب بافر فسفاتی با pH برابر با ۵/۵، استونیتریل با نسبت ۱:۱) سرعت جریان فاز متحرک ۱/۰۰ میلی‌لیتر در دقیقه، در دمای محیط، ستون C<sub>18</sub> (۴/۶×۱۵۰) میلی‌متر با اندازه ذرات ۵ میکرومتر)..... ۶۵

شکل (۱۷-۳) تاثیر نوع حلال آلی، شرایط عمل: مقدار نمونه ۱۰/۰ میلی‌لیتر (حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر آنالیت‌ها)، غلظت سدیم هیدروکسید ۰/۵۰ مولار، تعداد سیکل مکش اولیه ۷ و مکش ثانویه ۲۱ مرتبه، حجم حلال استخراج‌کننده ۲۰۰ میکرولیتر، اسید مصرفی ۱۰۰ میکرولیتر هیدروکلریک اسید ۰/۳۰ مولار، ۵ دقیقه سانتریفیوژ با سرعت ۳۰۰۰ rpm در هر دو مرحله..... ۶۶

شکل (۱۸-۳) تاثیر حجم حلال آلی، شرایط عمل: مقدار نمونه ۱۰/۰ میلی‌لیتر (حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر آنالیت‌ها)، غلظت سدیم هیدروکسید ۰/۵۰ مولار، تعداد سیکل مکش اولیه ۷ و مکش ثانویه ۲۱ مرتبه، حلال استخراج‌کننده دی کلرومتان، اسید مصرفی ۱۰۰ میکرولیتر هیدروکلریک اسید ۰/۳۰ مولار، ۵ دقیقه سانتریفیوژ با سرعت ۳۰۰۰rpm در هر دو مرحله..... ۶۷

شکل (۱۹-۳) تاثیر قدرت یونی، شرایط عمل: مقدار نمونه ۱۰/۰ میلی‌لیتر (حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر آنالیت‌ها)، غلظت سدیم هیدروکسید ۰/۵۰ مولار، حلال استخراج‌کننده ۲۰۰ میکرولیتر دی کلرومتان، اسید مصرفی ۱۰۰ میکرولیتر هیدروکلریک اسید با غلظت ۰/۳۰ مولار، تعداد مکش سرنگ در مرحله اول ۷ و در مرحله دوم ۲۱ مرتبه، ۵ دقیقه سانتریفیوژ با سرعت ۳۰۰۰rpm در هر دو مرحله..... ۶۹

شکل (۲۰-۳) تاثیر نوع اسید مصرفی، شرایط عمل: مقدار نمونه ۱۰/۰ میلی‌لیتر (حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر آنالیت‌ها)، غلظت سدیم هیدروکسید ۰/۵۰ مولار، تعداد سیکل مکش اولیه ۷ و مکش ثانویه ۲۱ مرتبه، حلال استخراج‌کننده ۲۰۰ میکرولیتر دی کلرومتان، حجم اسید مصرفی ۱۰۰ میکرولیتر با غلظت یون هیدروژن ۰/۳۰ مولار، ۵٪ نمک KNO<sub>3</sub>، ۵ دقیقه سانتریفیوژ با سرعت ۳۰۰۰rpm در هر دو مرحله..... ۷۰

شکل (۲۱-۳) تاثیر تعداد مکش سرنگ، شرایط عمل: مقدار نمونه ۱۰/۰ میلی‌لیتر (حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر آنالیت‌ها)، غلظت سدیم هیدروکسید ۰/۵۰ مولار، ۵٪ نمک KNO<sub>3</sub>، حلال استخراج‌کننده ۲۰۰ میکرولیتر دی کلرومتان، اسید مصرفی ۱۰۰ میکرولیتر هیدروکلریک اسید با غلظت ۰/۳۰ مولار، تعداد مکش سرنگ در مرحله دوم ۲۱ مرتبه، ۵ دقیقه سانتریفیوژ با سرعت ۳۰۰۰rpm در هر دو مرحله..... ۷۲

شکل (۲۲-۳) تاثیر تعداد مکش سرنگ، شرایط عمل: مقدار نمونه ۱۰/۰ میلی‌لیتر (حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر آنالیت‌ها)، غلظت سدیم هیدروکسید ۰/۵۰ مولار، ۵٪ نمک KNO<sub>3</sub>، حلال استخراج‌کننده ۲۰۰ میکرولیتر دی کلرومتان، اسید مصرفی ۱۰۰ میکرولیتر هیدروکلریک اسید ۰/۳۰ مولار، تعداد مکش سرنگ در مرحله اول ۸ مرتبه، ۵ دقیقه سانتریفیوژ با سرعت ۳۰۰۰rpm در هر دو مرحله..... ۷۴

شکل (۲۳-۳) تاثیر میزان زمان سانتریفیوژ در مرحله اول، شرایط عمل: مقدار نمونه ۱۰/۰ میلی‌لیتر (حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر آنالیت‌ها)، غلظت سدیم هیدروکسید ۰/۵۰ مولار، ۵٪ نمک KNO<sub>3</sub>، حلال استخراج‌کننده ۲۰۰ میکرولیتر دی

کلرومتان، اسید مصرفی ۱۰۰ میکرولیتر هیدروکلریک اسید ۰/۳۰ مولار، تعداد مکش سرنگ در مرحله اول ۸ مرتبه و مرحله دوم ۲۲ مرتبه، ۵ دقیقه سانتریفیوژ در مرحله دوم در هر دو مرحله با سرعت ثابت ۳۰۰۰rpm..... ۷۵

شکل (۳-۲۴) تاثیر زمان سانتریفیوژ در مرحله دوم، شرایط عمل: مقدار نمونه ۱۰/۰ میلی لیتر (حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر آنالیت‌ها)، غلظت سدیم هیدروکسید ۰/۵۰ مولار، ۵٪ نمک  $KNO_3$ ، حلال استخراج کننده ۲۰۰ میکرولیتر دی کلرومتان، اسید مصرفی ۱۰۰ میکرولیتر هیدروکلریک اسید ۰/۳۰ مولار، تعداد مکش سرنگ در مرحله اول ۸ مرتبه و مرحله دوم ۲۲ مرتبه، ۷ دقیقه سانتریفیوژ در مرحله اول با سرعت ۳۴۰۰ rpm و مرحله دوم با سرعت ثابت ۳۰۰۰rpm ..... ۷۶

شکل (۳-۲۵) تاثیر تعداد دورهای چرخش سانتریفیوژ در دقیقه در مرحله اول، شرایط عمل: مقدار نمونه ۱۰/۰ میلی لیتر (حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر آنالیت‌ها)، غلظت سدیم هیدروکسید ۰/۵۰ مولار، ۵٪ نمک  $KNO_3$ ، حلال استخراج کننده ۲۰۰ میکرولیتر دی کلرومتان، اسید مصرفی ۱۰۰ میکرولیتر هیدروکلریک اسید ۰/۳۰ مولار، تعداد مکش سرنگ در مرحله اول ۸ مرتبه و در مرحله دوم ۲۲ مرتبه، ۵ دقیقه سانتریفیوژ در مرحله دوم با سرعت ثابت ۳۰۰۰rpm ..... ۷۸

شکل (۳-۲۶) تاثیر تعداد دورهای چرخش سانتریفیوژ در دقیقه در مرحله دوم، شرایط عمل: مقدار نمونه ۱۰/۰ میلی لیتر (حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر آنالیت‌ها)، غلظت سدیم هیدروکسید ۰/۵۰ مولار، ۵٪ نمک  $KNO_3$ ، حلال استخراج کننده ۲۰۰ میکرولیتر دی کلرومتان، اسید مصرفی ۱۰۰ میکرولیتر هیدروکلریک اسید ۰/۳۰ مولار، تعداد مکش سرنگ در مرحله اول ۸ مرتبه و در مرحله دوم ۲۲ مرتبه، ۷ دقیقه سانتریفیوژ در مرحله اول با سرعت ثابت ۳۴۰۰ rpm و ۶ دقیقه سانتریفیوژ در مرحله دوم..... ۷۹

شکل (۳-۲۷) کروماتوگرام استخراج محلول ۱/۰ میلی گرم بر لیتر داروها در شرایط بهینه: مقدار نمونه ۱۰/۰ میلی لیتر (حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر آنالیت‌ها)، غلظت سدیم هیدروکسید ۰/۵۰ مولار، ۵٪ نمک  $KNO_3$ ، حلال استخراج کننده ۲۰۰ میکرولیتر دی کلرومتان، اسید مصرفی ۱۰۰ میکرولیتر هیدروکلریک اسید ۰/۳۰ مولار، تعداد مکش اولیه هشت مرتبه، ۷ دقیقه سانتریفیوژ با سرعت ۳۴۰۰rpm در مرحله اول و تعداد مکش ثانویه ۲۲ مرتبه، ۶ دقیقه سانتریفیوژ با سرعت ۳۰۰۰rpm در مرحله دوم، سرتالین (SER) در ۲۰۸ نانومتر و سیتالوپرام (CIT) در ۲۳۸ نانومتر، فاز متحرک (ترکیب بافر فسفاتی با pH برابر با ۵/۵، استونیتریل با نسبت ۱:۱) سرعت جریان فاز متحرک ۱/۰۰ میلی لیتر در دقیقه، در دمای محیط، ستون  $C_{18}$  (۴/۶×۱۵۰) میلی متر با اندازه ذرات ۵ میکرومتر)..... ۸۱

شکل (۳-۲۸) منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ سیتالوپرام..... ۸۲

شکل (۳-۲۹) منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ سرتالین..... ۸۳

شکل (۳-۳۰) کروماتوگرام نمونه پلاسما فاقد آنالیت، شرایط: پنج میلی لیتر پلاسما، ۲/۵۰ میلی لیتر از محلول نمک ۲۰٪ پتاسیم نترات، ۰/۵۰ میلی لیتر محلول سود ۵/۵۰ مولار، رساندن به حجم ۱۰/۰ میلی لیتر، انجام استخراج در شرایط بهینه. فاز متحرک (ترکیب استونیتریل و بافر فسفاتی با pH برابر با ۵/۵ به نسبت ۱:۱) سرعت جریان فاز متحرک ۱/۰۰ میلی لیتر در دقیقه، در دمای محیط، ستون  $C_{18}$  (۴/۶×۱۵۰) میلی متر با اندازه ذرات ۵ میکرومتر)..... ۹۲

شکل (۳-۳۱) کروماتوگرام نمونه پلاسما پس از افزودن آنالیت. شرایط: پنج میلی لیتر پلاسما، ۲/۵۰ میلی لیتر از محلول نمک ۲۰٪ پتاسیم نترات، ۰/۵۰ میلی لیتر محلول سود ۵/۵۰ مولار، یک میلی لیتر از هر کدام از داروها با غلظت ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر، سیتالوپرام (CIT) در ۲۳۸ نانومتر و سرتالین (SER) در ۲۰۸ نانومتر، انجام استخراج در شرایط بهینه. فاز متحرک (ترکیب استونیتریل و بافر فسفاتی با pH برابر با ۵/۵ به نسبت ۱:۱) سرعت جریان فاز متحرک ۱/۰۰

میلی لیتر در دقیقه، در دمای محیط، ستون  $C_{18}$  ( $4/6 \times 150$ ) میلی متر با اندازه ذرات ۵ میکرومتر)..... ۹۳

شکل (۳-۳۲) کروماتوگرام نمونه آب شهر فاقد آنالیت، شرایط: پنج میلی لیتر آب شهر،  $2/50$  میلی لیتر از محلول نمک ۲۰٪ پتاسیم نیترات،  $0/50$  میلی لیتر محلول سود  $5/50$  مولار، رساندن به حجم  $10/0$  میلی لیتر، انجام استخراج در شرایط بهینه. فاز متحرک (ترکیب استونیتریل و بافر فسفاتی با pH برابر با ۵/۵ به نسبت ۱:۱) سرعت جریان فاز متحرک  $1/00$  میلی لیتر در دقیقه، در دمای محیط، ستون  $C_{18}$  ( $4/6 \times 150$ ) میلی متر با اندازه ذرات ۵ میکرومتر)..... ۹۵

شکل (۳-۳۳) کروماتوگرام نمونه آب شهر پس از افزودن آنالیت. شرایط: پنج میلی لیتر آب شهر،  $2/50$  میلی لیتر از محلول نمک ۲۰٪ پتاسیم نیترات،  $0/50$  میلی لیتر محلول سود  $5/50$  مولار، یک میلی لیتر از هر کدام از داروها با غلظت  $10/0$  میلی گرم بر لیتر، سیتالوپرام (CIT) در ۲۳۸ نانومتر و سرترالین (SER) در ۲۰۸ نانومتر، انجام استخراج در شرایط بهینه. فاز متحرک (ترکیب استونیتریل و بافر فسفاتی با pH برابر با ۵/۵ به نسبت ۱:۱) سرعت جریان فاز متحرک  $1/00$  میلی لیتر در دقیقه، در دمای محیط، ستون  $C_{18}$  ( $4/6 \times 150$ ) میلی متر با اندازه ذرات ۵ میکرومتر)..... ۹۵

## فهرست جدول ها

جدول (۱-۳) مواد شیمیایی مورد استفاده.....	۴۴
جدول (۲-۳) سیگنالهای مستقیم به دست آمده برای داروی سیتالوپرام با غلظتهای متفاوت.....	۵۰
جدول (۳-۳) سیگنالهای مستقیم به دست آمده برای داروی سرترالین با غلظتهای متفاوت.....	۵۱
جدول (۴-۳) نتایج حاصل از کالیبراسیون مستقیم داروها.....	۵۲
جدول (۵-۳) نتایج حاصل از بررسی تغییر غلظت NaOH.....	۵۶
جدول (۶-۳) نتایج حاصل از بررسی تغییر غلظت HCl.....	۵۷
جدول (۷-۳) نتایج حاصل از بررسی تغییر نوع اسید.....	۶۰
جدول (۸-۳) نتایج حاصل از بررسی تغییر حجم اسید.....	۶۱
جدول (۹-۳) نتایج حاصل از بررسی نوع حلال آلی.....	۶۵
جدول (۱۰-۳) نتایج حاصل از بررسی تغییر حجم حلال آلی.....	۶۷
جدول (۱۱-۳) نتایج حاصل از افزودن درصدهای مختلف از نمک $KNO_3$ .....	۶۹
جدول (۱۲-۳) نتایج حاصل از بررسی نوع اسید در حضور ۵٪ از نمک $KNO_3$ .....	۷۰
جدول (۱۳-۳) نتایج حاصل از بررسی تغییر تعداد سیکل مکش.....	۷۲
جدول (۱۴-۳) نتایج حاصل از بررسی تغییر تعداد سیکل مکش در مرحله دوم.....	۷۳
جدول (۱۵-۳) نتایج حاصل از تغییر زمان سانتریفیوژ در مرحله اول.....	۷۵
جدول (۱۶-۳) نتایج حاصل از تغییر زمان سانتریفیوژ در مرحله دوم.....	۷۶

- جدول (۱۷-۳) نتایج حاصل از تغییر سرعت چرخش سانتریفیوژ در مرحله اول..... ۷۷
- جدول (۱۸-۳) نتایج حاصل از تغییر سرعت چرخش سانتریفیوژ..... ۷۸
- جدول (۱۹-۳) نتایج حاصل از بهینه‌سازی یک متغیر در زمان..... ۸۰
- جدول (۲۰-۳) نتایج حاصل از کالیبراسیون پیش‌تغلیظ سیتالوپرام و سرتالین..... ۸۲
- جدول (۲۱-۳) نتایج حاصل از کالیبراسیون پیش‌تغلیظ مخلوط داروها..... ۸۳
- جدول (۲۲-۳) نتایج حاصل از بررسی اثر گونه‌های مزاحم در پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری سرتالین با غلظت ۱/۰ میلی گرم بر لیتر..... ۸۵
- جدول (۲۳-۳) نتایج حاصل از بررسی اثر گونه‌های مزاحم در پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری سیتالوپرام با غلظت ۱/۰ میلی گرم بر لیتر..... ۸۵
- جدول (۲۴-۳) حد تشخیص روش..... ۸۶
- جدول (۲۵-۳) بررسی دقت و صحت در شرایط منحنی کالیبراسیون سیتالوپرام و سرتالین..... ۸۷
- جدول (۲۶-۳) نتایج حاصل از اندازه‌گیری سیتالوپرام و سرتالین در نمونه‌های قرص..... ۹۰
- جدول (۲۷-۳) نتایج حاصل از پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری سرتالین در نمونه پلاسما..... ۹۱
- جدول (۲۸-۳) نتایج حاصل از پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری سیتالوپرام در نمونه پلاسما..... ۹۲
- جدول (۲۹-۳) نتایج حاصل از پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری سرتالین در نمونه آب شهر..... ۹۴
- جدول (۳۰-۳) نتایج حاصل از پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری سیتالوپرام در نمونه آب شهر..... ۹۴
- جدول (۱-۴) مقایسه روش پیشنهادی با برخی از روش‌های گزارش شده برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری سیتالوپرام و سرتالین..... ۹۹



# فصل اول:

## مقدمه

## ۱-۱ داروهای ضد افسردگی

امروزه بیماری افسردگی یکی از بیماری‌های رایج در میان اقشار مختلف مردم است. در بیماری افسردگی واکنش‌ها غیرطبیعی بوده و انسان در برابر ناملایمات و شکست‌ها بیش از حد افسرده می‌شود. علل ابتلا به این بیماری وراثت، تغییرات شیمیایی مغز، از دست دادن والدین در کودکی، حوادث ناخوشایند زندگی، بیماری‌های جسمی مختلف و استفاده از بعضی داروها می‌باشد. بهترین راه درمان این بیماری تاکنون، دارودرمانی می‌باشد. داروهای ضد افسردگی در موارد اندکی می‌توانند باعث بروز عوارض جانبی ناخوشایندی شوند که در برخی موارد تا پایان عمر فرد باقی می‌ماند. در حالی که داروهای ضد افسردگی جدید دارای عوارض جانبی کمتری هستند، اما در موارد زیادی باعث مسمومیت جدی می‌شوند. در مواردی مصرف بیش از حد داروهای ضد افسردگی موجب مرگ افراد می‌شود، به همین خاطر مقدار مصرف آن در پزشکی قانونی مورد بررسی قرار می‌گیرد [۱].

افسردگی باعث بی‌خوابی، بی‌اشتهایی فقدان انرژی و از دست دادن علاقه و لذت از فعالیت‌های معمول می‌شود. این بیماری با احساس افسردگی و بی‌ارزش بودن شناخته می‌شود. البته این تغییر خلق به سمت افسردگی، براساس مقایسه وضعیت بیمار با حالت طبیعی عنوان می‌شود. در برخی موارد به ویژه در سالمندان اختلال افسردگی شدید یک بیماری جدی است، که با خطر وقوع مرگ و میر و حتی خودکشی در مبتلایان همراه است [۲]. علایم افسردگی در این بیماری باعث اختلال در عملکرد طبیعی فرد شده، هرچند که علت افسردگی مشخص نیست و محققان هنوز به بررسی تغییرات بیوشیمیایی مغز انسان در مبتلایان به این بیماری مشغول هستند. برهم خوردن تعادل انتقال سروتونین، می‌تواند یکی از عوامل افسردگی باشد [۳].

## ۱-۲ اهمیت اندازه گیری مهارکننده‌های بازجذب سروتونین (SSRIs)<sup>۱</sup>

مهارکننده‌های بازجذب سروتونین، دسته‌ای از داروهای ضد افسردگی هستند که در درمان افسردگی و برخی از انواع اختلالات اضطرابی و شخصیتی کاربرد دارند. این داروها میزان سروتونین برون‌سلولی را افزایش داده و این کار را از طریق جلوگیری از جذب سریع سروتونین در گیرنده‌های عصبی پیش‌سیناپسی انجام می‌دهند [۴]. سروتونین در شکاف سیناپسی بالا رفته و سروتونین بیشتری در اختیار گیرنده‌های پس‌سیناپسی قرار می‌گیرد. همچنین SSRIs بر انتقال دهنده‌های نوراپینفرین و دوپامین هم موثر هستند [۵]. از طرفی مصرف این خانواده دارویی ممکن است غلظت داروهای چون وارفارین<sup>۲</sup>، ترکیبات ضد آریتمی<sup>۳</sup>، بتابلاکرها<sup>۴</sup> مانند پروپرانول، ضد افسردگی‌های سه‌حلقه‌ای مانند آمی‌تریپتیلین<sup>۵</sup>، بنزودیازپین‌ها<sup>۶</sup> از جمله آلپرازولام<sup>۷</sup> و دیازپام<sup>۸</sup>، را افزایش داده و منجر به مسمومیت شوند [۶]. بنابراین اندازه گیری همزمان SSRIs با این ترکیبات دارای اهمیت بوده که از جمله SSRIs مورد مطالعه در این پژوهش، سرتالین<sup>۹</sup> و سیتالوپرام<sup>۱۰</sup> می‌باشد.

### ۱-۲-۱ سیتالوپرام

یکی دیگر از داروهای ضد افسردگی سیتالوپرام است و نام شیمیایی آن نیز ۱- [۳]-(دی متیل آمینو) پروپیل]-۱-(۴-فلوروفنیل)-۱،۳-دی هیدرو ایزوبنزوفوران-۵-کربونیتریل با نام تجاری سلکسا<sup>۱۱</sup> و سیپرامیل<sup>۱۲</sup> که ساختار آن در شکل (۱-۱) نشان داده شده است. سیتالوپرام در سال

<sup>1</sup> Selective serotonin reuptake inhibitor

<sup>2</sup> Warfarin

<sup>3</sup> Antiarrhythmi

<sup>4</sup> Beta blockers

<sup>5</sup> Amitriptyline

<sup>6</sup> Benzodiazepines

<sup>7</sup> Alprazolam

<sup>8</sup> Diazepam

<sup>9</sup> Sertraline

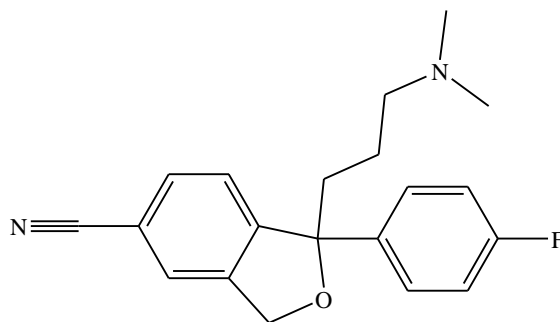
<sup>10</sup> Citalopram

<sup>11</sup> Celexa

<sup>12</sup> Ciperamil

۱۹۸۹ توسط شرکت دانمارکی لاندبک<sup>۱</sup> ساخته شد و با پایان مدت حق انحصاری تولید آن در سال ۲۰۰۳ کمپانی‌های دیگر داروسازی نیز ساخت آن را آغاز کرده اند [۷]. این دارو یک داروی ضد افسردگی از گروه مهارکننده‌های بازجذب سروتونین می‌باشد که برای درمان اختلالات خلقی و درمان اختلالات افسردگی شدید به کار برده می‌شود [۸]. مصرف همزمان سیتالوپرام با داروهای دیگر احتمال مرگ و میر را افزایش داده و در گزارش‌های پزشکی قانونی، حضور داروهای SSRI به تنهایی یا همراه با الکل بررسی می‌شوند [۳].

این دارو بیشتر در دوز درمانی ۲۰ تا ۶۰ میلی‌گرم در روز به خوبی تحمل می‌شود و عارضه چندانی ندارد. با این حال مرگ ناشی از مصرف ۸۴۰ تا ۱۹۶۰ میلی‌گرم از این دارو گزارش شده است [۹].



شکل (۱-۱) ساختار شیمیایی داروی سیتالوپرام [۹]

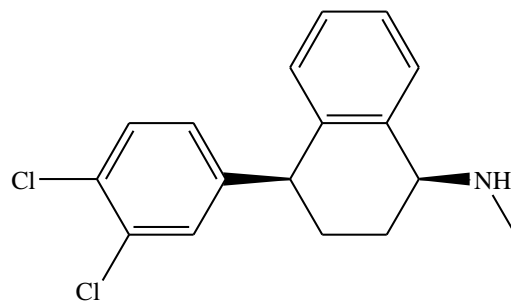
## ۱-۲-۲ سرتالین

سرتالین، (S۴،S۱)-۴-(۳،۴-دی کروفنیل)-ان-متیل-۱،۲،۳،۴-تتراهیدرونیفتالن-۱-آمین با نام زولفت<sup>۲</sup> که ساختار آن در شکل (۲-۱) نشان داده شده است، یک داروی ضد افسردگی از گروه مهارکننده‌های بازجذب سروتونین است که استفاده از آن برای درمان افسردگی، اختلال وسواسی جبری، اختلال هراس، فوبیای اجتماعی، اختلال خلقی پیش از قاعدگی و اختلال پس از سانحه

<sup>۱</sup> Landbk

<sup>۲</sup> Zoloft

پذیرفته شده است. مکانیسم عمل سرتالین از طریق جلوگیری از جذب مجدد سروتونین توسط گیرنده‌های عصبی پس سیناپسی و بالا بردن غلظت سروتونین در دستگاه عصبی مرکزی است. سرتالین همچنین به میزان کمی از جذب مجدد دوپامین جلوگیری می‌کند. نیمه عمر این دارو بین ۱۳ تا ۴۵ ساعت و در زنان حدود ۱/۵ برابر بیشتر از مردان است. غلظت آن در پلاسماي خون پس از ۴ تا ۶ ساعت به حداکثر می‌رسد [۱۰].



شکل (۲-۱) ساختار شیمیایی داروی سرتالین [۱۰]

### ۳-۱ روش‌های مختلف اندازه‌گیری مهارکننده‌های باز جذب سروتونین

تا کنون روش‌های مختلفی مانند روش‌های الکتروشیمیایی [۱۱]، الکتروفورز موین [۱۲]، کروماتوگرافی گازی- طیف سنج جرمی [۱۳]، میکرواستخراج فاز جامد- کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا [۱۴]، کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا [۱۵]، کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا با طیف‌سنج جرمی دوگانه [۱۶]، میکرواستخراج فاز جامد- کروماتوگرافی گازی- طیف سنج جرمی [۱۷]، کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا - فاز معکوس [۱۸]، برای اندازه‌گیری به صورت تک و یا مخلوط سیتالوپرام و سرتالین استفاده شده است. امروزه روش‌های مختلفی برای اندازه‌گیری مقادیر بسیار

<sup>1</sup> Capillary electrophoresis

<sup>2</sup> Gas chromatography-mass spectrometry

<sup>3</sup> Solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography

<sup>4</sup> High-performance liquid chromatography

<sup>5</sup> Gas chromatography-mass spectrometry

<sup>6</sup> Solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry

<sup>7</sup> Reversed Phase High performance liquid chromatography

کم این داروها گزارش شده است که در زیر خلاصه‌ای از کارهای انجام شده برای اندازه‌گیری این داروها آورده شده است.

## ۴-۱ مروری بر کارهای انجام شده بر روی سیتالوپرام و سرتالین

در سال ۲۰۰۱ جی. مک<sup>۱</sup> و همکارانش، یک روش برای اندازه‌گیری سریع سیتالوپرام در پلاسمای خونی را بوسیله روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا توسعه داده‌اند. دتکتور فلئورسان در طول موج برانگیختگی ۲۳۶ نانومتر و طول موج نشری ۳۰۶ نانومتر تنظیم گردید. حد اندازه‌گیری ۰/۹۶ نانوگرم بر میلی‌لیتر با استفاده از یک میلی‌لیتر از پلاسما به دست آمد. همچنین در این مطالعه انحراف استاندارد نسبی کمتر از ۷ درصد گزارش شد [۱۹].

در سال ۲۰۰۵ منگ<sup>۲</sup> و همکارانش به اندازه‌گیری همزمان سیتالوپرام و دسیتیل سیتالوپرام با کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا با دتکتور فلئورسان پس از استخراج فاز مایع پرداختند که گستره خطی این روش ۱۲-۱۶۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر برای سیتالوپرام و ۶-۸۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر برای دسیتیل سیتالوپرام گزارش شد. همچنین حد اندازه‌گیری ۱۲ و ۶ نانو میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ترتیب برای سیتالوپرام و دسیتیل سیتالوپرام به دست آمد [۲۰].

در سال ۲۰۰۷ ساتانا<sup>۳</sup> و همکارانش به کمک اسپکتروفلوریمتر میزان سیتالوپرام را در نمونه‌ی قرص اندازه‌گیری کردند که محدوده خطی در این روش بین  $M \times 10^{-7}$  -  $5/0 \times 10^{-6}$  و حد تشخیص آن  $M \times 10^{-9}$  گزارش شده است [۲۱].

در سال ۲۰۰۷ کائو<sup>۴</sup> و همکارانش به تعیین سیتالوپرام در پلاسمای انسان به کمک

---

<sup>1</sup> J. Meck

<sup>2</sup> Qing.H. Mang

<sup>3</sup> Satana

<sup>4</sup> Cao XQ

کروماتوگرافی مایع-طیف سنجی جرمی دوگانه پرداختند، رنج خطی به دست آمده در محدوده غلظت ۰/۱۰-۱۰۰ میکروگرم بر لیتر، و حد تشخیص اندازه گیری شده ۰/۱۰ میکروگرم بر لیتر و انحراف استاندارد نسبی روزانه و بین روزی آن کمتر از ۵/۲٪ بود. دقت اندازه گیری با این روش در سه غلظت ۰/۲۵، ۸/۰۰ و ۹۰/۰ میکروگرم بر لیتر از سیتالوپرام در محدوده ۴/۷٪-۱/۳٪ بوده است [۲۲].

در سال ۲۰۱۰ والاش<sup>۱</sup> و همکارانش به کمک کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا به اندازه گیری سرتالین در حضور محصولات تخریب شده ی آن پرداختند که محدوده غلظت خطی این روش ۱-۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر با حد تشخیص ۰/۰۹ میکروگرم بر میلی لیتر و حد تعیین کمی ۰/۲۷ میکروگرم بر میلی لیتر بود. و دارای میانگین بازدهی  $100/17 \pm 0/62$  برای سرتالین در فرم خالص  $0/68 \pm$   $100/14$ ،  $0/77 \pm 0/29$  و  $0/67 \pm 0/06$  به ترتیب برای قرص سسرین<sup>۲</sup>، سرلیفت<sup>۳</sup> و سیرتو<sup>۴</sup> بود [۲۳].

در سال ۲۰۱۲ نژادعلی<sup>۵</sup> و همکارانش به کمک میکرواستخراج فاز جامد از فیبر فولادی پوشش داده شده با پلی پیرول برای اندازه گیری سیتالوپرام در نمونه سرم خون به کمک UV-Vis پرداختند، که بازیابی این روش ۸۴٪ با دقت ۱۰/۲٪ و حد تشخیص ۰/۰۴۶ میکروگرم بر میلی لیتر و محدوده ی خطی دینامیکی ۰/۰۴۶-۲/۰ گزارش شده است [۲۴].

در سال ۲۰۱۲ ساگریستا<sup>۶</sup> و همکارانش دو روش استخراجی گزینشی برای اندازه گیری مهارکننده های باز جذب سرتونین در فاضلاب بوسیله ی میکرواستخراج فاز مایع به کمک هالوفیبر انجام دادند، که حد تشخیص یکی از روش ها در محدوده ی ۰/۰۱-۰/۰۱۲ میکروگرم بر گرم و انحراف

<sup>1</sup> Walsh

<sup>2</sup> Sesarine

<sup>3</sup> serlift

<sup>4</sup> sirto

<sup>5</sup> Nezhadali

<sup>6</sup> Sagrista

استاندارد نسبی ۱۲-۳٪ است و برای روش دوم حد تشخیص برای همه‌ی ترکیبات ۶ نانوگرم بر گرم و انحراف استاندارد نسبی ۱۲-۸٪ گزارش شده است [۲۵].

در سال ۲۰۱۲ رومانا<sup>۱</sup> و همکارانش، یک روش سریع توسط کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا با اسپکتروسکوپی جرمی برای اندازه‌گیری همزمان سرتالین، سیتالوپرام و همچنین داروهای دیگر ضد افسردگی معرفی نمودند. گستره خطی برای سرتالین و سیتالوپرام ۰/۵-۰/۰۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و همچنین درصد بازیابی بالای ۸۷/۱ درصد برای این گستره از داده‌ها گزارش شده است [۲۶].

در سال ۲۰۱۵ اصغری نژاد و همکارانش، از کامپوزیت نانو ذرات مغناطیسی پلی‌پیرول به عنوان یک جاذب کارآمد در استخراج میکرو - فاز جامد - پخشی داروهای ضد افسردگی سیتالوپرام و سرتالین در نمونه‌های بیولوژیکی استفاده کردند. که ناحیه غلظت خطی این روش ۸۰۰-۱ میکروگرم بر لیتر و حد تشخیص ۱/۰-۰/۲ میکروگرم بر لیتر برای سیتالوپرام و ۰/۷-۰/۳ میکروگرم بر لیتر برای سرتالین و درصد بازیابی استخراج و انحراف استاندارد نسبی که برای پنج اندازه‌گیری در ناحیه‌ی، ۹۹/۴-۹۳/۴، ۸/۴-۸/۰ برای سیتالوپرام و ۹۸/۴-۹۴/۰، ۹/۲-۴/۳ برای سرتالین، گزارش شده است [۲۷].

در سال ۲۰۱۶ ویسکوف<sup>۲</sup> و همکارانش به اندازه‌گیری انتخابی سیتالوپرام و دسیتیل سیتالوپرام در پلاسما و شیر انسان به کمک کروماتوگرافی مایع با طیف سنج جرمی دوگانه مجهز به منبع یونیزاسیون الکترواسپری پرداختند که این روش دارای اعتبار کامل در هر دو مایعات بیولوژیکی در محدوده غلظت بالای ۱۰۰-۰/۱ نانوگرم بر میلی‌لیتر برای S-(+) و R-(-) و سیتالوپرام و محدوده غلظت ۱۰۰-۰/۳ نانوگرم بر میلی‌لیتر S-(+) و R-(-) دسیتیل سیتالوپرام بود و این روش دارای

---

<sup>1</sup> Rumana

<sup>2</sup> Weisskopf



تکرارپذیری (۰/۹-۱۵/۹٪) و ۰/۹-۸/۴٪) و دقت متوسط (۱/۳-۱۷/۸٪) و ۰/۹-۹/۶٪) در پلاسما و شیر انسان بود [۲۸].

در سال ۲۰۱۶ فارسی‌مدان و همکارانش، برای اندازه‌گیری سه داروی ضد اضطراب سیتالوپرام و سرتالین و دیازپام در سرم و نمونه ادرار از روش میکرواستخراج مایع-مایع به کمک انرژی فراصوت<sup>۱</sup> بر اساس انجماد و شناورسازی قطره‌ی آلی از کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا استفاده کردند. حد کمی این روش ۱/۳ و ۲/۷ و ۱/۲ نانوگرم بر میلی‌لیتر به ترتیب برای سیتالوپرام، دیازپام و سرتالین گزارش شده است، و فاکتور بازیابی استخراج تمام داروها ۹۲/۹ درصد و انحراف استاندارد نسبی قابل قبول بود [۱۵].

در سال ۲۰۱۶ قادی<sup>۲</sup> و همکارانش با ساخت یک سنسور حساس الکتروشیمیایی برای الکترو-اکسیداسیون و اندازه‌گیری سیتالوپرام بر پایه‌ی نانو ذرات اکسید روی و نانو لوله‌های کربنی چند دیواره پرداختند. حد تشخیص و محدوده خطی این روش به ترتیب ۰/۰۰۵ و ۰/۱۲-۱/۵۴ میکرومول بر لیتر سیتالوپرام بود [۱۱].

در سال ۲۰۱۷ زئوجوان<sup>۳</sup> و همکارانش از روش میکرواستخراج مایع-مایع به کمک انرژی فراصوت توسط حلال با چگالی کم برای اندازه‌گیری هم‌زمان دوازده داروی ضدافسردگی از جمله سیتالوپرام و سرتالین و دو داروی ضدروان‌پریشی دیگر در نمونه کامل خون به وسیله کروماتوگرافی گازی-اسپکتروسکوپی جرمی پرداختند که این روش دارای ضریب تعیین بزرگتر از ۰/۹۹۱ در محدوده غلظت ۱۵-۱۵۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر برای سیتالوپرام، و ۵-۵۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر برای سرتالین بود. دقت درون‌روزی و بین‌روزی کمتر از ۱۰٪ و صحت در درون‌روز و بین‌روز به ترتیب در محدوده

<sup>1</sup> Ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction

<sup>2</sup> Ghaedi

<sup>3</sup> Xiujuan

۱۲/۷٪ تا ۷/۹٪ و ۱۳/۹- تا ۱۱/۸٪ گزارش شده است. در این روش بازده استخراج بیشتر آنالیت‌ها بیش از ۶۰٪ بود [۱۳].

در سال ۲۰۱۷ مونی<sup>۱</sup> و همکارانش به اندازه‌گیری سیتالوپرام و سرتالین در پلاسما به وسیله‌ی پیپت یک بار مصرف و استخراج با فاز C18-BSA همراه با کروماتوگرافی مایع-اسپکتروسکوپی جرمی دوگانه پرداختند که در این روش محدوده خطی از کمترین حد کمی (۰/۵-۲۰/۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر) تا بالاترین حد کمی (۳۲/۵-۱۰/۵۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر)، دقت درون و بین روشی با ضریب تغییرات کمتر از ۱۵٪ گزارش شده است [۲۹].

با توجه به اهمیت و کاربردهای داروهای آرامبخش سیتالوپرام و سرتالین و نقش آن‌ها بر سلامتی انسان و به دلیل سو مصرف این داروها روشی ساده و حساس و گزینش پذیر برای پیش‌تخلیظ و اندازه‌گیری مقادیر کم از این داروها ارائه شد. در این پژوهش از روش میکرواستخراج مایع-مایع متوالی به کمک هوا، و آنالیز به وسیله‌ی کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا با آشکارساز UV برای پیش‌تخلیظ، جداسازی و اندازه‌گیری همزمان مقادیر کم داروهای سیتالوپرام و سرتالین در نمونه‌های بیولوژیکی استفاده شده است.

---

<sup>۱</sup> Mônia

فصل دوم:

تئوری

## ۲-۱ مقدمه‌ای بر کروماتوگرافی

بسیاری از روش‌های جداسازی براساس انتقال یک یا چند نمونه از یک فاز به فاز دیگر استوار بوده و این عمل تا مرحله تعادل یا نزدیک به آن ادامه می‌یابد. کروماتوگرافی، یکی از روش‌های جداسازی تجزیه‌ای است که در آن اجزای یک مخلوط بین دو فاز توزیع می‌شود که یکی از فازها ثابت بوده و می‌تواند به صورت جامد یا مایع باشد و فاز ساکن نامیده می‌شود. فاز دیگر ممکن است گاز یا مایع باشد که از روی فاز ساکن عبور کرده و اصطلاحاً فاز متحرک نامیده می‌شود. کروماتوگرافی مایع، روشی است که در آن جداسازی اجزای مخلوط براساس اختلاف در تمایل اجزاء مختلف برای توزیع بین فاز متحرک مایع و فاز ساکن صورت می‌گیرد.

کروماتوگرافی به عنوان بهترین روش جداسازی گونه‌های شیمیایی با ساختار بسیار نزدیک به یکدیگر، رشد یافته است. این روش را می‌توان برای شناسایی کیفی و اندازه‌گیری کمی گونه‌های جداسازی شده به کار برد. کروماتوگرافی بخشی از رشد سریع خود را در طول چهار دهه گذشته مدیون سرعت، سادگی و دامنه کاربرد وسیع خود به عنوان یک وسیله جداسازی است.

تقسیم بندی روش‌های کروماتوگرافی از لحاظ نحوه تماس فاز ساکن و متحرک به صورت زیر می‌باشد [۳۰]:

- کروماتوگرافی ستونی<sup>۱</sup>: فاز ساکن در یک ستون نگه داشته شده و فاز متحرک از داخل آن در اثر نیروی جاذبه یا یک نیروی خارجی (پمپ) حرکت می‌کند.
- کروماتوگرافی صفحه‌ای یا مسطح: مثل کروماتوگرافی کاغذی، فاز ساکن روی یک صفحه قرار گرفته و فاز متحرک از طریق نیروی موئینه از روی فاز ساکن عبور داده می‌شود.

یک دسته بندی اساسی‌تر روش‌های کروماتوگرافی بر پایه‌ی انواع فازهای متحرک و ساکن و

---

<sup>1</sup> Column chromatography

انواع تعادل‌های درگیر در انتقال مواد حل شده بین فازها بنا شده است. این طبقه بندی شامل سه گروه عمومی کروماتوگرافی مایع، کروماتوگرافی گازی و کروماتوگرافی سیال فوق بحرانی می‌باشد. همچنین قابل ذکر است که فقط کروماتوگرافی مایع می‌تواند هم در ستون‌ها و هم در سطوح مسطح انجام شود؛ از طرف دیگر کروماتوگرافی گازی و کروماتوگرافی سیال فوق بحرانی به روش‌های ستونی محدود می‌شوند.

## ۲-۱-۱ کروماتوگرافی مایع بر اساس انواع فاز ساکن:

۱. کروماتوگرافی مایع-مایع یا کروماتوگرافی تقسیمی<sup>۱</sup>

۲. کروماتوگرافی مایع-جامد یا کروماتوگرافی جذب سطحی<sup>۲</sup>

۳. کروماتوگرافی تعویض یونی<sup>۳</sup>

۴. کروماتوگرافی ژل تراوا یا طرد اندازه‌ای<sup>۴</sup>

### ۲-۱-۱-۱ کروماتوگرافی تقسیمی

کروماتوگرافی تقسیمی از گزینش‌پذیری بی‌نظیری برخوردار است و علت این امر می‌تواند به گستره وسیع فاز ساکن مربوط شود. بر اساس خاصیت قطبیت نسبی فاز متحرک و فاز ساکن، کروماتوگرافی تقسیمی به دو دسته‌ی کروماتوگرافی با فاز نرمال<sup>۵</sup> (NPC) و کروماتوگرافی فاز معکوس (RPC)<sup>۶</sup> تقسیم می‌شود. در NPC، ذرات نگهدارنده با فاز ساکن قطبی پوشش داده شده و فاز متحرک غیرقطبی می‌باشد. NPC برای جداسازی نمونه‌هایی با قطبیت بالا و محلول در آب استفاده می‌شود. در RPC، فاز ساکن غیرقطبی و فاز متحرک قطبی است و این روش نیز برای جداسازی نمونه‌هایی با

---

<sup>1</sup>Partition chromatography

<sup>2</sup>Adsorption chromatography

<sup>3</sup> Ion exchange chromatography

<sup>4</sup> Gel permeation or Size exclusion chromatography

<sup>5</sup> Normal phase chromatography

<sup>6</sup> Reverse phase chromatography

حلالیت کم در آب به کار می‌روند [۳۱].

## ۲-۱-۲ کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)<sup>۱</sup>

وقتی که اندازه ذرات پر کننده ستون در LC به ۱۰ میکرومتر یا کمتر می‌رسد، به خاطر افزایش تعداد برهم‌کنش‌های فاز ثابت با نمونه و نهایتاً افزایش تعداد تعادلات توزیع، راندمان جداسازی افزایش زیادی خواهد یافت در این حالت روش LC را کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا یا HPLC می‌نامند. HPLC برای تجزیه کمی و کیفی مواد دارویی، شیمیایی، غذایی، صنایع سنگین (پلیمرها)، بیوشیمی (تجزیه پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک و...) و بکار می‌رود. بطور ساده جریانی از یک حلال (به نام فاز متحرک) از درون یک ستون پر شده (به نام فاز ساکن) عبور می‌کند و نمونه مورد آزمایش به قسمت بالای دستگاه، تزریق شده و وارد ستون می‌شود. اجزا نمونه بر اساس ماهیت شیمیایی، با فاصله زمانی متفاوتی از ستون عبور کرده و سپس بوسیله آشکارساز شناسایی می‌شوند و نتایج به صورت پیک‌هایی به ثبت می‌رسند. به طور معمول، جداسازی‌ها و تجزیه‌هایی که با دیگر روش‌های کروماتوگرافی سخت یا غیر ممکن است، با این روش به سادگی انجام می‌شود [۳۲].

اجزای دستگاه HPLC شامل موارد زیر است:

الف) پمپ: وسیله‌ای که است فاز متحرک را به طور تکرار پذیر و یکنواخت با سرعت جریان ثابت در ستون به حرکت در می‌آورد.

ب) مخازن حلال: که در آن‌ها فاز متحرک و حلال‌های شستشو دهنده ریخته شده است و مجهز به میکرو فیلتر جهت ممانعت از ورود ذرات ریز احتمالی موجود در فاز متحرک است.

ج) سیستم تزریق نمونه: برای به دست آوردن حداکثر کارایی در کروماتوگرافی، نمونه باید به صورت

---

<sup>1</sup> High performance liquid chromatography

نوار بسیار باریک از سر ستون وارد آن شود. سیستم تزریق نمونه، به همین منظور طراحی شده است، در این سیستم یک حلقه<sup>۱</sup> تزریق نمونه، در نظر گرفته شده است که می‌توان حجم نمونه تزریقی به ستون را توسط آن کنترل کرد.

د) ستون: به منزله قلب یک دستگاه کروماتوگرافی بوده و عمل جداسازی ترکیبات مختلف در آن انجام می‌شود. جنس ستون معمولاً از استیل زنگ نزن به طول ۵۰-۵ سانتی متر و قطر داخلی ۹-۳ میلی‌لیتر می‌باشد. درون ستون از فاز ساکن که بر روی ترکیبی به نام نگهدارنده<sup>۲</sup> با قطر ۳-۳۰ میکرومتر اتصال داده شده، پر شده است.

ه) آشکارساز: وظیفه آن تولید علامتی متناسب با غلظت نمونه‌های جداسازی شده می‌باشد. در HPLC از آشکارسازهای مختلفی نظیر آشکارسازهای UV، هدایت الکتریکی، ضریب شکست، فلئوورسانس، الکتروشیمیایی و طیف سنج جرمی استفاده می‌شود.

ز) ثبات: علامت مربوط به نمونه شسته شده توسط پردازشگرها به فرم مناسب تبدیل شده تا توسط ثبات، ثبت گردد.

## ۲-۲ مقدمه‌ای بر روش‌های آماده‌سازی نمونه

تجزیه بسیاری از نمونه‌ها بدون آماده‌سازی آن به‌علت پیچیده بودن بافت، حجم محدود نمونه و غلظت پایین ترکیبات مورد بررسی بسیار مشکل است. بنابراین انجام یک مرحله پیش‌تغلیظ و همچنین استخراج ترکیبات مورد نظر از بافت نمونه ضروری است. با وجود پیشرفت‌های زیادی که در زمینه تکنیک‌های اندازه‌گیری صورت گرفته است، هنوز در بسیاری از موارد امکان اندازه‌گیری مستقیم نمونه وجود ندارد، که این امر ناشی از پیچیدگی بافت نمونه و نیز غلظت پایین آنالیت است.

---

<sup>1</sup> Loop

<sup>2</sup> Support

بنابراین انجام یک مرحله جداسازی و پیش تغلیظ قبل از اندازه گیری مقادیر کم آنالیت ضروری به نظر می‌رسد [۳۳].

## ۲-۲-۱ اهداف عمومی روش‌های آماده‌سازی

- ❖ تغلیظ نمونه به‌منظور اندازه گیری مقادیر کم آنالیت
- ❖ حذف مزاحمت‌های موجود در نمونه در مراحل جداسازی و شناسایی آنالیت و در نتیجه افزایش گزینش‌پذیری
- ❖ فراهم کردن یک روش تکرارپذیر و کارآمد که مستقل از تغییرات بافت نمونه باشد [۳۳].

## ۲-۲-۲ روش‌های آماده‌سازی نمونه

آنالیز ماده موثر دارویی برای درمان‌های بالینی، نظارت بر درمان و ایجاد یک پروتکل درمانی که مورد استفاده در پزشکی قانونی برای تعیین علت مرگ و اهداف سم شناسی و تعیین مقدار مواد مخدر و یا دوپینگ بسیار قابل توجه است. در سال‌های اخیر توجه به توسعه روش‌های جدید آماده‌سازی نمونه برای تعیین مقدار انواع آنالیت در بافت‌های مختلف با حساسیت و گزینش‌پذیری بالا، افزایش یافته است. آنالیز نمونه‌های پیچیده و شناسایی آنالیت یا سنجش کمی با حد تشخیص پایین دو مشکل اصلی شیمی تجزیه می‌باشد [۳۴].

اکثر روش‌های نمونه‌برداری و آماده‌سازی نمونه نظیر سوکسله و غیره بر اساس فن‌آوری‌های قرن نوزدهم پایه‌گذاری شده‌اند. اغلب این روش‌ها وقت‌گیر بوده و به دلیل درگیر شدن در مراحل چندگانه خطر از دست رفتن بخشی از نمونه در آن‌ها زیاد است. همچنین در این روش‌ها از حلال‌های آلی در حجم‌های بالا استفاده می‌شود. این ویژگی‌ها به همراه مشکل عدم امکان خودکار شدن و ارائه مستقیم به دستگاه‌های جدید تجزیه‌ای، آن‌ها را با مشکل مواجه ساخته است. از سوی دیگر مصرف



بالای حلال‌های آلی علاوه بر این که از نظر اقتصادی مقرون به صرفه نمی‌باشند به دلیل خطراتی که سلامت آزمایشگر را تهدید می‌کند و همچنین اثرات سوء آن‌ها بر محیط‌زیست یکی دیگر از معضلات جدی روش‌های کلاسیک آماده‌سازی نمونه است [۳۵].

روش‌های آماده‌سازی رایج که شامل استخراج مایع-مایع<sup>۱</sup> و استخراج با فاز جامد<sup>۲</sup> می‌باشند هم زمان‌های بالا و هم حجم حلال زیادی را مصرف می‌کنند. به سبب این معایب، روش‌های میکرواستخراج به دلیل کاربرد آسان، سرعت، ارزانی و سازگاری با محیط‌زیست به سرعت توسعه یافته‌اند. امروزه نیز تحقیقات گسترده‌ای به منظور دستیابی به روش‌هایی با صحت و دقت بالا به همراه حد کمی قابل قبول صورت می‌گیرد. استخراج مایع-مایع، استخراج فاز جامد و استخراج نقطه ابری<sup>۳</sup> از اولین روش‌های استخراج هستند، که برای جداسازی یک گونه از محلول، مورد استفاده قرار گرفتند. استخراج مایع-مایع (LLE) و استخراج فاز جامد (SPE) با استفاده از چندین جاذب مختلف بر تکنیک‌های سنتی آماده‌سازی نمونه برای استخراج داروها از بافت‌های بیولوژیکی و زیست محیطی ترجیح داده می‌شوند [۳۴]. روش استخراج مایع-مایع معایبی از قبیل طولانی بودن زمان استخراج و مصرف زیاد حلال‌های سمی داشته و اجرای آن مستلزم انجام مراحل متعددی است که احتمال از دست دادن مقادیری از نمونه را زیاد می‌کند. امروزه توجه محققین بر روش‌هایی معطوف است که با محیط‌زیست سازگار بوده و با کاهش مصرف حلال آلی همراه باشند. استخراج فاز جامد (SPE) به عنوان مکمل یا حتی جانشین استخراج مایع-مایع گسترش یافته‌است و یکی از روش‌هایی است که در حوزه‌های مختلفی از شیمی از قبیل آنالیز نمونه‌های زیست محیطی، دارویی، غذایی، بالینی و شیمی صنعتی استفاده می‌شود. استخراج فاز جامد نسبت به استخراج مایع-مایع مزایای زیادی داشته که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به مصرف کم‌تر حلال‌های مضر، اتوماتیک شدن آسان و کاهش مراحل استخراج اشاره

---

<sup>1</sup> Liquid- liquid extraction

<sup>2</sup> Solid phase extraction

<sup>3</sup> Cloud point extraction

نمود. در استخراج فاز جامد مصرف حلال بسیار کم تر از استخراج مایع-مایع بوده و در حد میلی لیتر می باشد.

اهداف عمومی روش های آماده سازی به شرح زیر است:

- تغلیظ نمونه به منظور اندازه گیری مقادیر کم آنالیت
  - حذف مزاحمت های موجود در نمونه در مراحل جداسازی و شناسایی آنالیت و در نتیجه افزایش گزینش پذیری
  - در صورت لزوم تبدیل آنالیت به فرم مناسب تر برای تشخیص و جداسازی بهتر.
  - فراهم کردن یک روش تکرارپذیر و کارآمد که مستقل از تغییرات بافت نمونه باشد.
- در سال های اخیر، توجهات زیادی به توسعه فعالیت های سبز از قبیل جایگزینی حلال های سمی و مینیاتوری کردن روش های استخراج شده است که می تواند به طور قابل ملاحظه ای مصرف حلال های آلی سمی را کاهش دهد. بدین منظور روش های میکرواستخراج به عنوان جایگزین مناسب برای روش های استخراج سنتی توسعه یافتند [۳۳].

## ۲-۲-۳ روش های میکرواستخراج

تمایل به توسعه روش های استخراج موجب شد که در سال ۱۹۹۰ آرتور<sup>۱</sup> و پالیزین<sup>۲</sup>، میکرواستخراج فاز جامد<sup>۳</sup> [۳۶] را معرفی نمایند. هرچند میکرواستخراج فاز جامد، روشی بدون حلال، ساده و سریع است، ولی به فراگیری استخراج فاز جامد نبوده و محدوده کاربرد آن به علت مشکلات در استخراج ترکیبات آب دوست و غیرفرار کمتر است [۳۳]. معایب دیگر این روش هزینه بالا، شکستگی بودن فیبر و عمر کوتاه آن می باشد. به موازات توسعه میکرواستخراج فاز جامد، در سال

---

<sup>1</sup> Arthur

<sup>2</sup> Pawliszyn

<sup>3</sup> Solid- phase microextraction

۱۹۹۶ یک جایگزین مناسب و جدید برای SPE<sup>۱</sup>، به نام میکرواستخراج فاز مایع توسط جی‌نات و کانت ول<sup>۲</sup> [۳۷] و همچنین لیو و داسگوپتا<sup>۳</sup> [۳۸] ارائه گردید. اولین ایده پس از اودانسن<sup>۴</sup> در سال ۱۹۸۶ با کارهای توردانسن<sup>۵</sup> و همکاران و نیز در سال ۱۹۹۹ پدرسن بجرگارد<sup>۶</sup> و راسموسن<sup>۷</sup> توسعه پیدا کرد. آن‌ها با یک کار کم هزینه با استفاده از فیبرهای توخالی متخلخل یک بار مصرف از جنس پلی پروپیلن، میکرواستخراج فاز مایع بر پایه فیبرتوخالی<sup>۸</sup> (HF-LPME) را ابداع کردند [۳۴]. این روش‌ها به عنوان راهکاری برای رفع برخی از مشکلات روش میکرواستخراج فاز جامد معرفی گردیدند. اما مواردی از قبیل ناپایداری قطره حلال، تشکیل حباب‌های هوا در فیبر توخالی میکرواستخراج فاز مایع و طولانی بودن زمان استخراج از معایب این روش‌ها محسوب می‌شوند.

روش‌های میکرواستخراج به دو دسته کلی میکرواستخراج فاز جامد (SPME) و میکرواستخراج فاز مایع تقسیم (LPME)<sup>۹</sup> می‌شوند.

## ۲-۳-۱ روش‌های میکرواستخراج با فاز مایع

استخراج مایع-مایع (LLE) یک روش آماده سازی سنتی و فراگیر نمونه است که در بسیاری از روش‌های تجزیه‌ای استاندارد به کار می‌رود. اما عیب اصلی LLE معمولی، استفاده از مقادیر زیاد از حلال‌های آلی خالص، گران قیمت بودن آن، آلوده نمودن محیط زیست، وقت گیر بودن و چند مرحله‌ای بودن آن است. برای غلبه بر این مشکلات، برخی تکنیک‌ها نظیر اندازه گیری تزریق در جریان استخراج با حلال، استخراج با فاز جامد و میکرواستخراج با فاز جامد، توسعه داده شده‌اند. با این

<sup>1</sup> Solid- phase microextraction

<sup>2</sup> Jeannot and Cantwell

<sup>3</sup> Liu and Dasgupta

<sup>4</sup> Audunsson

<sup>5</sup> Thordarson

<sup>6</sup> Pedersen- Bjergaard

<sup>7</sup> Rasmussen

<sup>8</sup> Hollow fiber liquid phase microextraction

<sup>9</sup> Liquid – phase microextraction

حال، تحقیقات اخیر به سمت کوچک سازی روش LLE سنتی پیش رفته است. ایده اصلی این مساله، کاهش قابل ملاحظه در نسبت حجم حلال آلی به فاز آبی است که این امر منجر به ابداع روش های جدید میکرواستخراج با حلال شده است.

میکرواستخراج با حلال نیز همانند میکرواستخراج با فاز جامد یک روش فراگیر نیست و تمام آنالیت جهت تجزیه، استخراج و پیش تغلیظ نمی گردد. در این روش از یک حلال آلی غیر قابل امتزاج با فاز آبی حاوی نمونه استفاده می شود و حجم فاز آلی بسیار کمتر از فاز آبی است. همچنین گرایش آنالیت به انحلال در فاز استخراج کننده بسیار بیشتر از محلول نمونه است. درجه توزیع و نیز درصد آنالیت استخراج شده به دلیل ثابت بودن بافت نمونه و فاز استخراج کننده، ثابت خواهد بود و با نظر به اینکه توزیع، تابع غلظت آنالیت نیست بنابراین تعیین کمی نمونه از روی مقدار خالص استخراج شده قابل محاسبه است [۳۹، ۴۰].

از زمان ارائه اولیه روش میکرواستخراج فاز مایع تاکنون، شیوه های متفاوتی از آن به منظور بهبود عملکرد، ارائه شده است. میتوان انواع روشهای میکرواستخراج با فاز مایع را به سه دسته کلی زیر تقسیم نمود:

۱. میکرواستخراج قطره تنها<sup>۱</sup>

۲. میکرواستخراج فاز مایع با فیبر توخالی

۳. میکرواستخراج مایع-مایع پخشی<sup>۲</sup>

روش میکرواستخراج فاز مایع (LPME) ویژگی های منحصر به فردی مانند قابلیت پیش تغلیظ بالا، سادگی، هزینه پایین و خالص سازی نمونه را نشان می دهد. روش (LPME) تقریباً امکان ترکیب

---

<sup>1</sup> Single drop microextraction (SDME)

<sup>2</sup> Dispersive liquid liquid microextraction

با هر نوع تکنیک تجزیه‌ای را دارند. در این روش حجم فاز آلی حاوی آنالیت بسیار کمتر از حجم فاز آبی اولیه حاوی آنالیت است [۴۱].

تقسیم بندی انواع روش‌های میکرواستخراج فاز مایع در شکل (۲-۱) نشان داده شده است [۳۹].

از آغاز معرفی میکرواستخراج با حلال از سال ۱۹۹۵ این روش‌ها با رشد سریعی مورد توجه و پذیرش عمومی قرار گرفته‌اند این رشد سریع، به نوعی مدیون سادگی، سرعت، ارزانی و سازگاری با دسته زیادی از آنالیت‌ها و نمونه‌ها می‌باشند. در یک دسته‌بندی می‌توان این روش‌ها را در چند دسته کلی طبقه بندی کرد [۴۲].

۱. میکرواستخراج با حلال<sup>۱</sup>
۲. میکرواستخراج با استفاده از فیبر
۳. میکرواستخراج تک قطره
۴. میکرواستخراج فضای فوقانی تک قطره<sup>۲</sup>
۵. میکرواستخراج مایع-مایع و میکرواستخراج مایع-مایع-مایع<sup>۳</sup>
۶. استخراج نقطه ابری<sup>۴</sup>
۷. میکرواستخراج مایع-مایع پخشی<sup>۵</sup>

در این روش‌ها حلال به صورت مستقیم در معرض نمونه قرار می‌گیرد و این موضوع سبب شده آنالیت در یک رویارویی مستقیم وارد حلال استخراج کننده شود.

---

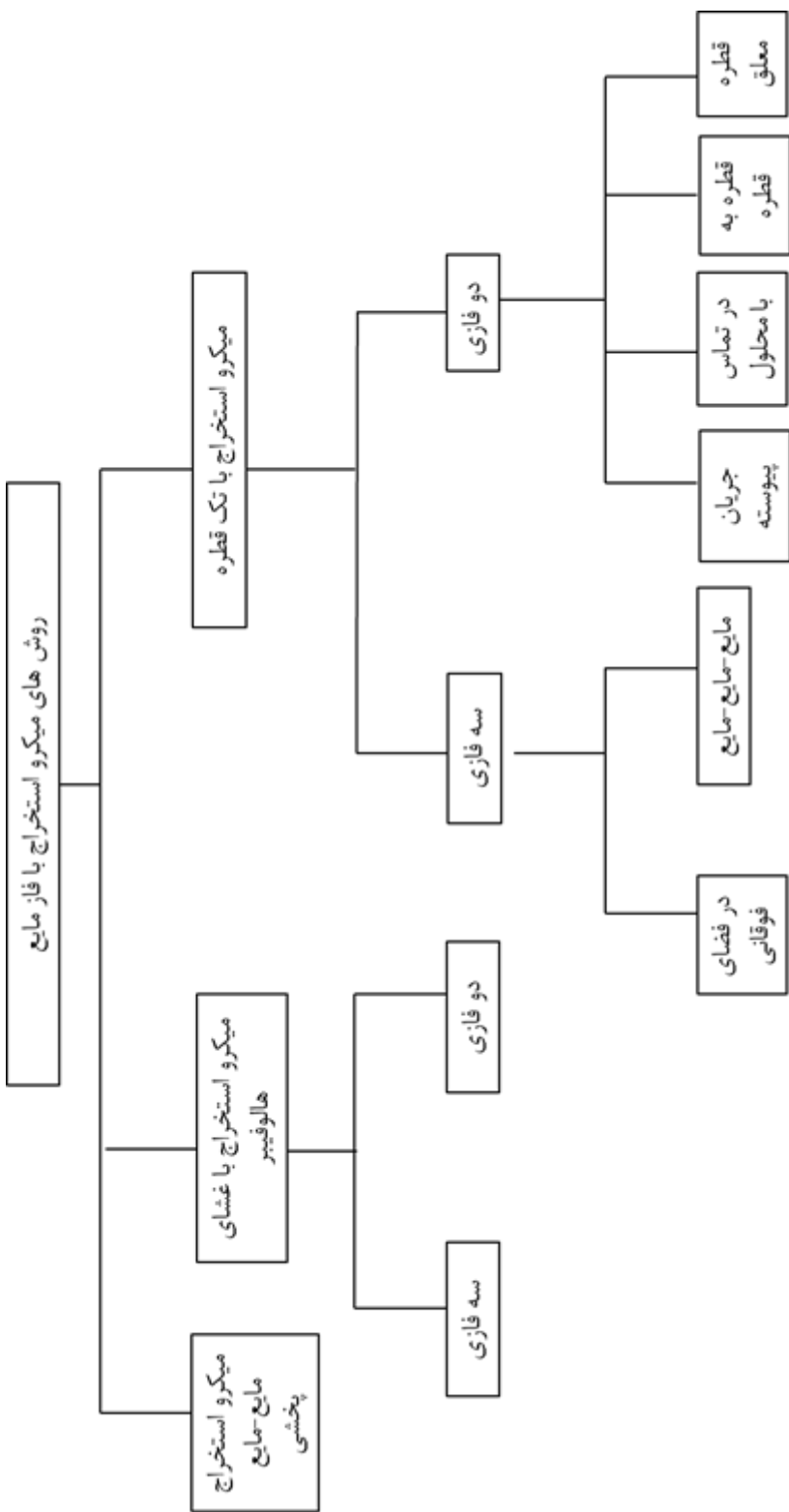
<sup>1</sup> Exposed solvent

<sup>2</sup> Head space single drop microextraction

<sup>3</sup> Liquid-Liquid microextraction & liquid-liquid microextraction

<sup>4</sup> Cloud point extraction

<sup>5</sup> Dispersive liquid-liquid microextraction



شکل (۱-۲) تقسیم بندی انواع روش های میکرواستخراج فاز مایع

با توجه به اینکه در این پژوهش از روش میکرواستخراج مایع-مایع پخشی جهت آماده سازی و پیش تغلیظ نمونه استفاده شده است، در این قسمت به بررسی این روش می پردازیم.

### ۱- میکرواستخراج مایع-مایع پخشی

استخراج مایع-مایع پخشی اولین بار توسط آقای رضایی و اسدی در سال ۲۰۰۶ ارائه شده است [۴۳]. یک روش ساده و سریع می باشد که در این روش سه بخش زیر مورد استفاده قرار می گیرد.

**حلال استخراج کننده:** دارای دانسیته ی بالایی است مانند تتراکلرومتان، کلروفرم، کربن دی سولفید نیتروبنزن، برموبنزن، ۱و۲دی کلروبنزن.

**حلال پخش کننده:** دارای حلالیت بالا در هر دو فاز استخراج کننده و فاز آبی می باشد مانند متانول، اتانول، استونیتریل.

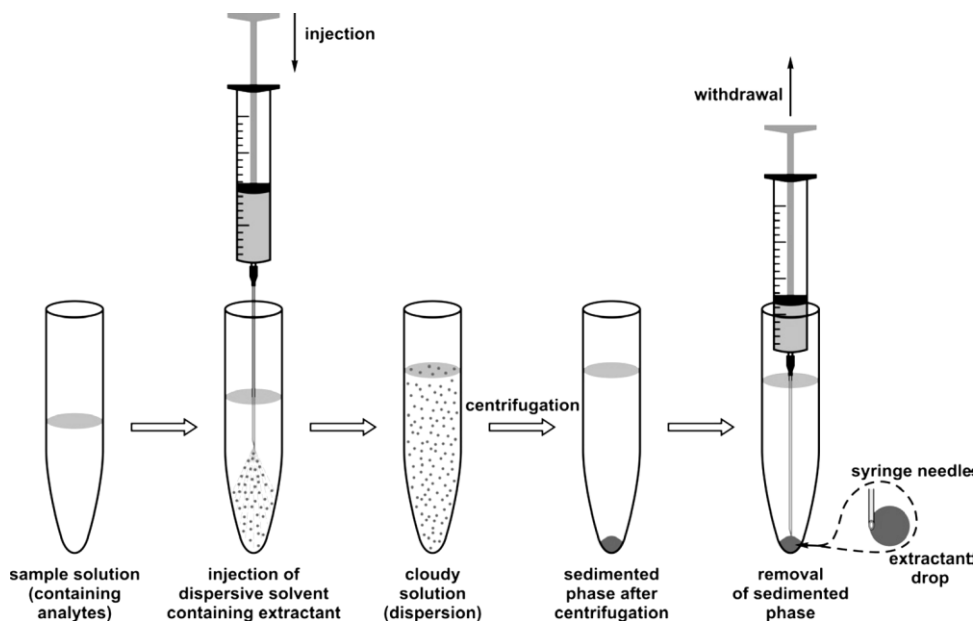
**فاز آبی (محلول نمونه):** هنگامی که فاز استخراج کننده و پخش کننده مخلوط می شوند و با سرعت در نمونه تزریق شوند یک آشفتگی ایجاد می شود که باعث ایجاد قطره های امولوسیونی ابر مانند می شود. ویژگی امولوسیون کننده می تواند روی اندازه قطره ها تأثیر داشته باشد. مایع پخشی نقشی برجسته در جداسازی فازها دارد. که به خاطر ناحیه ی حد واسط بزرگ منجر به اندازه ی خطی پخش انتقال جرم و افزایش سرعت واکنش می شود. آشفتگی که در فاز آبی تشکیل می شود منجر به پخش خوب استخراج کننده در نمونه ی آبی شده که با حلال پخش کننده تسهیل داده می شود. بعد از تشکیل نقطه ی ابری ناحیه ی سطح بین محلول جدا کننده و نمونه ی آبی بسیار بزرگ شده و بنابراین تعادل سریع به دست آمده و زمان جداسازی بسیار کوتاه می شود.

بر اثر پخش حلال آلی استخراج کننده در درون آب، سطح تماس مولکول های آب و حلال آلی به میزان بسیار زیادی در مقایسه با استخراج مایع-مایع معمولی افزایش می یابد. این امر باعث می شود

که زمان لازم برای به تعادل رسیدن گونه استخراج شونده (که یا ذاتا هیدروفوب است و یا به کمک فرایندهای کمپلکس کردن و یا مشتق سازی هیدروفوب شده است) بین آب و حلال آلی کاهش یابد و به حد چند ثانیه برسد. بطور کلی مراحل انجام میکرواستخراج مایع-مایع پخشی بدین شکل می باشد که ابتدا یک مخلوط همگن از حلال آلی پخش کننده و حلال آلی استخراج کننده با نسبت معینی تهیه می گردد. سپس مقدار مشخصی از این محلول به کمک یک سرنگ به سرعت به درون محلول آبی حاوی آنالیت تزریق می گردد. در نتیجه محلول کدر (ابری) می شود که این کدورت به دلیل پخش ذرات ریز حلال استخراج کننده درون محلول آبی می باشد. این مخلوط تا حد زیادی پایدار می باشد. سپس این مخلوط سانتریفیوژ می گردد و در نتیجه ذرات حلال استخراج کننده که دارای دانسیته بیشتری نسبت به آب می باشد ته نشین می گردد. سپس این فاز ته نشین شده که حاوی آنالیت نیز می باشد، جهت آنالیز با روش های دستگاهی مورد استفاده قرار می گیرد [۴۴].

مزیت میکرواستخراج مایع-مایع پخشی در سرعت بالای به تعادل رسیدن و در نتیجه زمان استخراج کوتاه است که این موضوع یک توسعه و مزیت اصلی در روش میکرواستخراج مایع-مایع پخشی است. مشکلات ناشی از افتادن قطره در این روش نیست ولی تعداد استخراج کننده ها محدود است، زیرا بایستی دانسیته ی استخراج کننده بزرگ تر از آب باشد و محلول اولیه را تشکیل دهد و به سهولت بتواند بعد از سانتریفیوژ جمع آوری شود با این حال تعداد کمی از حلال های آلی با این خصوصیت وجود دارد. علاوه بر این خصوصیت همچنین استخراج کننده بایستی حلالیت پایین در آب داشته باشد، شمایی از میکرواستخراج مایع-مایع پخشی در شکل (۲-۲) نمایش داده می شود [۴۵].





شکل (۲-۲) میکرواستخراج مایع-مایع پخشی [۴۵].

مزیت روش میکرواستخراج مایع-مایع پخشی عبارتند از:

- کار با این روش آسان است.
- زمان استخراج سریع می‌باشد.
- ارزان قیمت است.
- بازیابی در این روش بالا است.
- فاکتورهای غنی سازی بالایی به دست می‌آید.

در یک بررسی انجام شده مشخص شده که از میانه‌های سال ۲۰۱۰ تا میانه‌های سال ۲۰۱۲ میزان علاقه مندی برای کار در روش‌های استخراجی توسط محققین به صورتی بوده که بخش قابل توجهی از این تحقیقات بر استفاده از انواع مختلف میکرواستخراج مایع-مایع پخشی صورت پذیرفته است [۴۲].

نگاهی به ویژگی‌های روش میکرواستخراج مایع-مایع پخشی، پاسخی برای بیان علت این تمایلات است که باعث شده نزدیک به ۶۰٪ از تحقیقات در انواع میکرواستخراج مایع-مایع پخشی انجام پذیرد و در برخی مقالات مروری نیز این روش مورد توجه بوده است [۴۴، ۴۶، ۴۷].

همان‌طور که در بالا اشاره شد که بنیاد این روش، استخراج بر اساس پخش مناسب حلال استخراج کننده در نمونه آبی و بالا بردن سطح تماس بین آنالیت و استخراج کننده است، که برای انجام آن، حلال پخش کننده می‌تواند نقشی به سزا را ایفا کند و فرآیند با سرعت بالایی انجام می‌پذیرد. به منظور توسعه این روش در کارهای انجام شده سعی شده از حلال‌های کم چگال‌تر از آب و همچنین حلال‌های با سمیت کمتری چون مایعات یونی نیز استفاده شود [۴۸].

با حفظ این دیدگاه که برای استخراج بایستی سطح تماس بین آنالیت و حلال استخراج کننده به حداکثر برسد تلاش شده تا روش‌هایی که برپایه‌ی میکرواستخراج مایع-مایع پخشی که سه جز حلال استخراج کننده، نمونه آبی و حلال پخش کننده در آن‌ها حضور دارد معرفی شوند، با این تفاوت که در این روش‌ها نیرویی که عامل پخش کننده بوده، جای خود را به نیروهایی چون امواج فراصوت [۴۹] و یا نیرویی که در اثر چرخش مگنت و ایجاد گرداب تولید می‌شود داده‌اند [۵۰].

همان‌طور که در بالا اشاره شد این روش در ابتدا برای حلال‌های استخراج کننده با دانسیته بیشتر از آب ابداع شد و در آن از سه جز برای انجام عمل استخراج استفاده می‌شد. با گذشت زمان و انجام تحقیقات بیشتر در این زمینه، محققین برای رفع نارسایی‌هایی چون محدودیت کار با حلال‌های با دانسیته بیشتر از آب، و همچنین مشکل ناشی از به کارگیری حلال پخش کننده، که علاوه بر افزایش سمیت موجبات تغییر ضریب توزیع را نیز فراهم می‌ساخت اقداماتی را انجام و راهکارهایی را ارائه نمودند که از آن جمله می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

از آنجا که پس از سانتریفیوژ جمع آوری حلال استخراجی با دانسیته کمتر از آب سخت و همراه با خطا بود، در گزارشات خود به اقداماتی مانند طراحی ظرف مناسب که امکان جمع شدن مناسب حلال استخراج گر را پس از عمل استخراج در بالای ظرف فراهم می کرد اشاره کردند [۴۹]. (شکل (۳-۲) نمایی از یک نوع ظرف طراحی شده برای انجام استخراج با حلال های با چگالی کم تر از آب را نشان می دهد).



شکل (۳-۲) ظرف نمونه طراحی شده برای استخراج با حلال های با چگالی کمتر از آب [۴۹]

از دیگر رویکردهایی که برای رفع محدود بودن کار با حلال های با چگالی بیشتر از آب و ایجاد توانایی برای انجام استخراج حلال های کم چگال تر از آب گزارش شده، روش میکرواستخراج مایع - مایع پخشی بر پایه انجماد قطره آلی معلق است که در این روش سعی شده میکرو قطره تشکیل شده پس از فرآیند استخراج و سانتریفیوژ توسط کاهش دما به صورت جامد درآمده و به آسانی از روی محلول آبی جدا شده و به منظور آنالیز نهایی مورد استفاده قرار می گیرد [۵۱].

برای رفع مشکلات ناشی از مصرف حلال پخش کننده که در بالا به آن ها اشاراتی شد محققین تصمیم گرفتند تا راه ها و شرایط ابداع روش های استخراجی بدون مصرف حلال پخش کننده را بررسی کنند که نتیجه این تلاش ها منجر به ابداع روش هایی شد که در ۳-۲ بخش معرفی می شوند.

## ۲-۲-۳-۲ عوامل موثر بر بازده میکرواستخراج مایع-مایع پخشی

بازده استخراج آنالیت توسط <sup>۱</sup>DLLME به چند فاکتور از جمله pH، نوع و حجم حلال‌های استخراج و پخش‌کننده، زمان استخراج و قدرت یونی بستگی دارد.

**انتخاب حلال استخراج‌کننده:** انتخاب حلال استخراج مناسب، یک عامل مهم برای فرایند DLLME است. حلال استخراج باید خصوصیات مناسبی برای این روش داشته باشد، یکی اینکه باید چگالی بالاتری نسبت به آب داشته باشد تا امکان جدا کردن حلال استخراج از فاز آبی به وسیله سانتریفیوژ کردن امکان‌پذیر باشد. خصوصیات مهم دیگر حلال استخراج، قابلیت استخراج ترکیبات مورد نظر با انحلال کم در آب هستند. هیدروکربن‌های هالوژن‌دار مانند کلروبنزن، کلروفرم، کربن‌تتراکلرید و تتراکلرواتیلن به علت چگالی بالایشان از جمله ترکیباتی هستند که به عنوان حلال‌های استخراج از آن‌ها استفاده می‌شود.

**انتخاب حلال پخش‌کننده:** حلال پخش‌کننده باید هم حلال استخراج‌کننده را در خود حل کند و هم در آب به خوبی حل شود. به دلیل این خصوصیت حلال پخش‌کننده و عدم انحلال حلال استخراج‌کننده در نمونه آبی، موقع تزریق محلول همگن حلال پخش‌کننده و استخراج‌کننده به درون فاز آبی، حلال استخراج‌کننده بصورت ذرات بسیار ریز در فاز آبی تشکیل می‌گردد و محلول ابری (کدر) پایداری بوجود می‌آید. در چنین مواردی، سطح تماس بین حلال استخراج و فاز آبی به طور نامحدودی بزرگ شده و بنابراین سرعت استخراج افزایش می‌یابد. متانول، اتانول، استونیتریل و تتراهیدروفوران حلال‌های پخش‌کننده‌ای هستند که به طور معمول در این روش مورد استفاده قرار

---

<sup>۱</sup> Dispersive liquid-liquid microextraction

گرفته‌اند.

### **تأثیر حجم حلال استخراج کننده :** یکی از عوامل موثر بر فاکتور غنی‌سازی، حجم حلال

استخراج است که با افزایش آن، فاز آلی ته‌نشین شده بعد از سانتریفیوژ کردن افزایش یافته و در نتیجه غلظت آنالیت در فاز آلی کاهش می‌یابد، بنابراین فاکتور غنی‌سازی کاهش می‌یابد. این کار منجر به کاهش حساسیت اندازه‌گیری برای نمونه‌ها می‌شود. بنابراین حجم حلال استخراج باید به نحوی انتخاب شود که بتواند هم فاکتور غنی‌سازی بالا و هم حجم کافی برای استخراج کامل آنالیت را تامین کند.

### **تأثیر حجم حلال پخش کننده :** حجم حلال پخش کننده مستقیماً بر تشکیل محلول ابری،

درجه پخش حلال استخراج در فاز آبی و متعاقب آن بر بازده استخراج تأثیر می‌گذارد.

### **تأثیر pH:** تشکیل یک کمپلکس (وقتی که آنالیت، یک یون فلزی باشد) با خاصیت آبگریزی

کافی برای جداسازی یون‌های فلزی با میکرواستخراج مایع-مایع پخشی، یک شرط لازم محسوب می‌شود. میزان تشکیل و پایداری یک کمپلکس فلز-لیگاند و بنابراین استخراج آن، به طور قوی به pH وابسته است. بنابراین pH محلول آبی می‌تواند نقش مهمی را در تولید گونه‌های قابل استخراج از آنالیت‌های یونی قبل از استخراج با DLLME ایفا نماید. مقدار pH نیز به عامل کمپلکس کننده و ویژگی‌های یون‌های آنالیت بستگی دارد.

### **تأثیر زمان استخراج:** در DLLME، زمان استخراج به صورت فاصله زمانی از لحظه تزریق

مخلوط حلال‌های استخراج و پخش کننده و سانتریفیوژ کردن محلول تعریف می‌شود. آشکار است که زمان استخراج تأثیر کمی روی بازده استخراج در DLLME دارد. علت آن، این است که حلال استخراج می‌تواند بعد از تزریق مخلوط حلال‌های استخراج و پخش کننده و تشکیل محلول ابری به

خوبی پخش شود، در نتیجه آنالیت به طور سریع از فاز آبی به حلال استخراج منتقل و به سرعت تعادل برقرار می‌شود.

**تاثیر قدرت یونی:** انحلال‌پذیری آنالیت و حلال استخراج آلی در فاز آبی معمولاً با افزایش قدرت یونی کاهش می‌یابد که این حالت برای حصول فاکتور بازیابی بالا مطلوب است. اما همزمان حجم فاز آلی به دست آمده افزایش می‌یابد، در نتیجه غلظت آنالیت در فاز آلی و به تبع آن فاکتور غنی‌سازی کاهش می‌یابد. بنابراین می‌بایست شرایطی از نظر قدرت یونی محلول فراهم شود که پارامترهای ذکر شده در حالت مطلوبی به دست آیند [۵۲].

## ۲-۲-۳ روابط حاکم بر میکرواستخراج مایع-مایع پخشی

فاکتور پیش تغلیظ (غنی‌سازی)<sup>۱</sup> (EF) در این روش به صورت نسبت غلظت آنالیت در فاز ته‌نشین شده به غلظت آنالیت در نمونه است:

$$EF = \frac{C_{sed}}{C_0} \quad \text{رابطه (۱-۲)}$$

که در این رابطه  $C_{sed}$ ، غلظت آنالیت استخراج شده در فاز ته‌نشین شده و  $C_0$ ، غلظت اولیه آنالیت در نمونه می‌باشد. غلظت در فاز ته‌نشین شده ( $C_{sed}$ ) از منحنی کالیبراسیون مستقیم محلول استاندارد آنالیت در شرایط آزمایش به دست می‌آید. راندمان استخراج<sup>۲</sup> (ER) به صورت درصد کل آنالیت استخراج شده به درون فاز ته‌نشین شده است که از رابطه (۲-۲) یا (۳-۲) به دست می‌آید:

$$ER = \frac{n_{sed}}{n_0} \times 100 = \frac{C_{sed} \cdot V_{sed}}{C_0 \cdot V_{aq}} \times 100 \quad \text{رابطه (۲-۲)}$$

$$ER = \left[ \frac{V_{sed}}{V_{aq}} \right] EF \times 100 \quad \text{رابطه (۳-۲)}$$

که در این روابط  $n_{sed}$  تعداد مول‌های آنالیت در فاز ته‌نشین شده،  $n_0$  تعداد کل مول‌های آنالیت در

<sup>۱</sup> Enrichment factor

<sup>۲</sup> Extraction recovery

نمونه،  $V_{aq}$ ، حجم نمونه آبی بر حسب میلی لیتر،  $V_{Sed}$ ، حجم فاز ته نشین شده بر حسب میلی لیتر و  $EF$ ، فاکتور پیش تغلیظ می باشد.

اگر راندمان استخراج ۱۰۰٪ باشد، در آن صورت فاکتور پیش تغلیظ برابر نسبت حجم فاز آبی به حجم فاز ته نشین شده می باشد [۴۷].

## ۲-۳-۴ سازگاری روش DLLME با تکنیک های دستگاهی

در این روش به علت بافت بسیار ساده ایجاد شده برای نمونه، سازگاری مناسبی با اکثر روش های دستگاهی دارد. به عنوان مثال در روش هایی همچون کروماتوگرافی گازی [۵۳]، کروماتوگرافی مایع [۵۳]، اسپکتروفتومتری مرئی-فرابنفش [۵۴]، اسپکترومتری جذب اتمی شعله [۵۵] و اسپکترومتری جذب اتمی الکتروترمال [۵۶] می توان بطور مستقیم حلال آلی را جهت آنالیز به دستگاه وارد کرد. در مواردی همچون اسپکترومتری نشری پلاسمای جفت شده القایی که حلال های آلی هماهنگی مناسبی با پلازما ندارند، می توان این حجم کم را به راحتی در مدت زمانی کوتاه تبخیر کرد و سپس به کمک اسیدهای معدنی محیط مناسبی را جهت اندازه گیری نمونه فراهم کرد [۵۷]. بنابراین می توان این امیدواری را داشت که در آینده بتوان این روش را با سایر تکنیک های اندازه گیری مثل الکتروفورز، طیفسنجی جرمی و طیفسنجی جرمی جفت شده با پلاسمای نشر القایی جهت اندازه گیری مقادیر خیلی کم بسیاری از ترکیبات مورد استفاده قرار داد [۴۷، ۵۴].

### ▪ مقایسه روش میکرواستخراج مایع-مایع پخشی با روش های مشابه

میکرواستخراج مایع-مایع پخشی از جمله زیرگروه های استخراج مایع-مایع متداول می باشد. ولی تا حدود زیادی معایب روش استخراج مایع-مایع معمولی را برطرف می سازد.

اساس روش همانند استخراج مایع-مایع بر پایه تمایل نسبی آنالیت بین دو حلال غیرقابل

اختلاط با هم می‌باشد. ولی به علت افزایش سطح تماس بین دو حلال و کاهش حجم حلال آلی مصرفی، معایب این روش را ندارد. این روش دارای شباهت‌های چندی با برخی از روش‌های منتج شده از روش استخراج مایع-مایع مثل استخراج مایع-مایع همگن و استخراج نقطه ابری می‌باشد. در روش استخراج مایع-مایع همگن حلال استخراج‌کننده و آب به کمک یک ماده سوم، یک سیستم تعادلی همگن را فراهم می‌کنند که در نتیجه حلال استخراج‌کننده به طور یکنواخت در درون آب توزیع می‌گردد، به طوری که حدفاصل مشخصی برای آن‌ها قابل تشخیص نیست. سپس به کمک یک عامل خارجی مانند pH، تغییر دما، تغییر فشار و یا افزودن نمک، سیستم به حالت دو فازی تبدیل می‌شود. در ضمن دو فازی شدن سیستم، انتقال آنالیت بین آب و حلال آلی انجام می‌شود. ولی هر یک از این سیستم‌های دوفازی دارای معایبی می‌باشند. از جمله اینکه در مواردی که pH عامل دو فازی شدن است، در نوع آنالیت و پایداری آن با توجه به غلظت پروتون در محیط محدودیت ایجاد می‌گردد. در مواردی که تغییر دما باعث دو فازی شدن می‌گردد، تنها برای آنالیت‌های پایدار مناسب می‌باشند و در مواردی که از افزودن نمک استفاده می‌شود، غلظت‌های بالای نمک در محیط، استفاده از روش‌های دستگاهی جهت آنالیز نمونه را دچار مشکل می‌کند. بنابراین روش میکرواستخراج مایع-مایع پخشی در مقایسه با استخراج مایع-مایع همگن دارای محدودیت‌های کمتری می‌باشد. ولی از لحاظ فاکتور تغلیظ بالا، عدم نیاز به همزدن محلول، سرعت بالای استخراج و استفاده از حجم کم حلال آلی استخراج‌کننده، این دو روش دارای شباهت‌های زیادی می‌باشند [۵۸].

در مقایسه با تکنیک استخراج نقطه ابری نیز می‌توان برتری‌هایی را مشاهده کرد. به عنوان مثال نیاز به شرایط گرمایی خاص جهت ابری شدن محلول حاوی سورفکتانت، ثابت توزیع کوچک برای برخی گونه‌ها با آبگریزی کمتر و زمان آنالیز طولانی‌تر به علت مراحل گرم کردن و سرد کردن از معایب روش استخراج نقطه ابری می‌باشد. همچنین عدم سازگاری فاز غنی از سورفکتانت با تکنیک‌های آنالیز دستگاهی از جمله کروماتوگرافی گازی از این جمله است. از این‌رو در مقایسه با



روش استخراج نقطه ابری، تکنیک میکرواستخراج مایع-مایع پخشی تا حدود زیادی این معایب را برطرف می‌سازد. با این وجود تکنیک استخراج نقطه ابری به علت دارا بودن فاکتور تغلیظ بالا و استفاده از سورفاکتانت به جای حلال آلی به عنوان فاز استخراج‌کننده، جزء تکنیک‌های کارا و مناسب آماده‌سازی نمونه می‌باشد [۵۹]. البته لازم به ذکر است که با توجه به آزمایش‌هایی که تاکنون در مورد میکرواستخراج مایع-مایع پخشی انجام گرفته است، این تکنیک نیز دارای معایب چندی می‌باشد. از آن جمله نیاز به حجم بالای حلال پخش‌کننده (حدود ۰/۵ میلی‌لیتر حلال به ازای ۵ میلی‌لیتر نمونه آبی)، وابستگی حجم فاز ته‌نشینی به دمای محیط، محدودیت در انتخاب حلال‌های استخراج‌کننده به علت شرایط دانسیته و نقطه جوش و وابستگی پارامترهای مختلف جداسازی به یکدیگر را می‌توان ذکر کرد [۴۷، ۵۸]. و همچنین استفاده از حلال پخش‌کننده منجر به برخی معایب از جمله کاهش ضریب تقسیم برای استخراج آنالیت به حلال آلی و افزایش هزینه و آلودگی محیط زیست می‌شود. از این رو به سراغ روش‌های عاری از حلال پخش‌کننده باید رفت که در ادامه معرفی می‌شوند [۶۰].

### ▪ میکرواستخراج مایع-مایع-مایع

این روش نوعی روش میکرواستخراج می‌باشد که برای آنالیت‌هایی با قابلیت یون شدن به کار می‌رود. این روش توسط کانت ول و ماء<sup>۱</sup> در سال ۱۹۹۹ تحت عنوان میکرواستخراج حلال با استخراج برگشتی<sup>۲</sup> نام گرفته است، شکل (۲-۴) شمایی از این روش را نشان می‌دهد [۶۱].

میکرواستخراج مایع-مایع-مایع نوعی از استخراج بوده که بر پایه‌ی استخراج آنالیت از نمونه‌ی آبی به لایه‌ی آلی، و سپس انتقال به میکروقطره‌ی آبی (به سبب همرفت مستقیمی که در نتیجه‌ی هم زدن فاز آبی نمونه حاصل شده) صورت می‌پذیرد، که این موضوع موجب اثر غیر مستقیم همرفت در

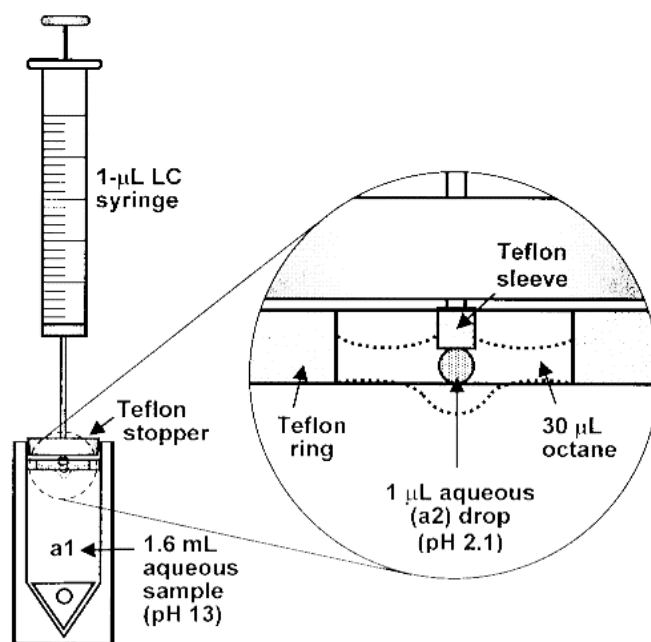
---

<sup>1</sup> Cantwell & ma

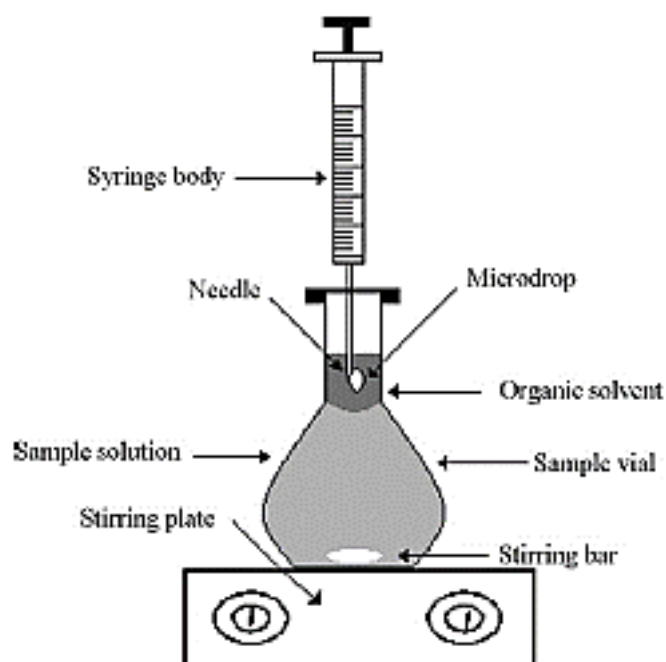
<sup>2</sup> back extraction

دو فاز می‌شود. شکل (۲-۵) شمایی از این روش را نشان می‌دهد.

جهت حصول آنالیت خنثی اولیه و قابل استخراج از نمونه‌ی آبی به لایه‌ی آلی و سپس به داخل میکروقطره‌ی آبی بایستی pH تنظیم شود، که در نهایت آنالیت یونی به میکروقطره استخراج شده و عملاً پیش تغلیظ رخ می‌دهد و در شرایط دیگر استفاده از دو نوع مختلف ترکیب که یکی به محلول نمونه و دیگری به قطره‌ی آبی اضافه می‌شود، وجود دارد. در این شرایط تشکیل کمپلکس خنثی اجازه می‌دهد که آنالیت از فاز آبی استخراج شود، میکروقطره در این حال باید حاوی عامل کیلیت‌کننده قوی باشد به نحوی که قابلیت تشکیل کمپلکس قوی با آنالیت را داشته باشد و در نهایت استخراج به میکروقطره رخ می‌دهد [۶۲].



شکل (۲-۴) سیستم استخراجی برپایه قطره که توسط ماء و کانت ول توسعه یافته [۶۱]



شکل (۵-۲) میکرواستخراج مایع-مایع-مایع [۶۲]

## ۳-۲ روش‌های عاری از حلال پخش کننده<sup>۱</sup> در میکرواستخراج با حلال

سه دسته روش جدید استخراجی بر پایه میکرواستخراج مایع-مایع پخشی که در آن‌ها از حلال

پخش کننده استفاده نمی‌شود عبارتند از:

- میکرواستخراج مایع-مایع گردابی<sup>۲</sup>
- میکرواستخراج امولسیون با کمک امواج فراصوت<sup>۳</sup>
- میکرواستخراج مایع-مایع با کمک هوا<sup>۴</sup>

### ➤ میکرواستخراج مایع-مایع گردابی

در این روش استخراجی برای پخش حلال استخراج کننده از پخش کننده گردابی<sup>۵</sup> و گرداب

<sup>1</sup> Free disperser methods

<sup>2</sup> Vortex assisted liquid – liquid microextraction

<sup>3</sup> Ultrasound assisted emulsification microextraction

<sup>4</sup> Air assisted liquid – liquid microextraction

<sup>5</sup> Vortex agitator

تشکیل شده سود می‌بریم. روش کار بسیار آسان است و پس از چند دقیقه قطرات ریز حاصل می‌شوند. در این روش یک محیط امولسیون متوسط شکل می‌گیرد که شرایط را برای کار با برخی ترکیبات که توانایی تحمل محیط‌ها و انرژی‌های شدید (انرژی مورد استفاده برای ایجاد محیط امولسیونی) را ندارند فراهم می‌سازد [۵۱].

پس از ایجاد محیط امولسیونی و گسترش سطح تماس، انتقال آنالیت به درون حلال استخراج کننده تسهیل می‌شود، پس از این مرحله نوبت به جدایی فاز می‌رسد که بدین منظور از سانتریفوژ استفاده می‌شود. پس از جدایی دو فاز، حلال استخراجی حاوی آنالیت برای انجام تجزیه نهایی مورد استفاده قرار می‌گیرد [۵۰].

### ➤ میکرواستخراج امولسیونی با کمک امواج فراصوت

روشی کارآ و منحصر به فرد که در آن برای پخش کردن حلال استخراجی و بالا بردن سطح تماس امواج مکانیکی فراصوت استفاده می‌شود. برای پی بردن به مکانیسم عمل و این که چگونه این امواج می‌توانند موجبات پخش حلال را فراهم کنند، در ابتدا اندکی با این امواج آشنا می‌شویم. شاید تا نام امواج فراصوت می‌شنویم صوت‌های مخصوص حیوانات که مولد این امواج بوده در ذهن ما تداعی می‌شود و یا این که به کاربرد آن در تصویربرداری جنینی که با نام سونوگرافی آن را می‌شناسیم فکر می‌کنیم، و یا موارد گوناگون دیگری که با این امواج سروکار دارد. اما ممکن است در مورد چیستی و چگونگی عمل آن برای ایفای نقش‌های فراوانش اطلاعات کمتری داشته باشیم.

این امواج همان‌طور که از نامشان برمی‌آید در واقع از جنس امواج صوتی قابل شنوایی برای انسان‌ها هستند با این تفاوت که گوش انسان این قابلیت را دارد که امواج صوتی در محدوده ۲۰Hz تا ۲۰KHz را بشنود. در حالی که این امواج محدوده فرکانسی بالای ۲۰KHz را به خود اختصاص می‌دهند. امواج صوتی برخلاف امواج الکترومغناطیس، امواجی مکانیکی هستند که برای انتقال نیاز به

یک محیط مادی دارند و نمی‌توانند در محیط خلا منتشر شوند، با توجه به این نکته می‌توان حدس زد که عبور امواج فراصوت از محیط، با کار مکانیکی همراه است.

در جریان انتشار، این امواج را می‌توان به دو قسمت تقسیم کرد، قسمتی که با اعمال فشار موجب فشرده سازی حجم می‌شود و دیگری قسمتی از موج است که با کاهش فشار سبب افزایش حجم در محیطی که در آن موج در حال انتشار است خواهد شد [۶۳].

با این حال زمان مورد نیاز در این روش بسیار طولانی تر از میکرواستخراج مایع-مایع پخشی است که نشان دهنده بهره کم انتقال جرم بین فاز آلی و فاز آبی می‌باشد و ضمن این که در حین اولتراسونیک ممکن است آنالیت تحت شرایط خاص تخریب شود.

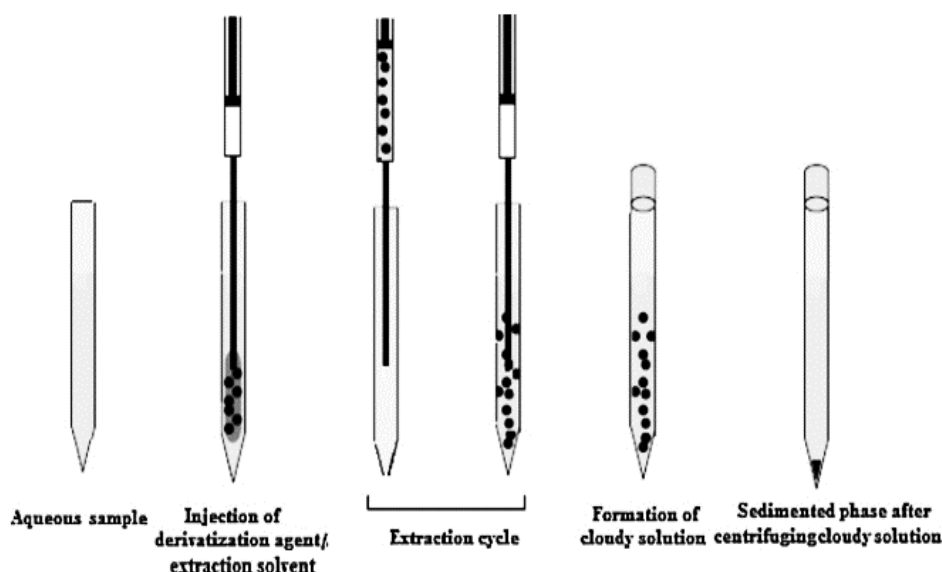
#### ➤ میکرواستخراج مایع-مایع با کمک هوا

این روش اولین بار توسط فرج زاده و همکارانش ابداع شد [۶۴]. روشی ساده، ارزان و با کارایی بالا که می‌تواند بدون نیاز به بکارگیری ابزار خاصی فرآیند استخراج را بدون مصرف حلال پخش کننده انجام دهد. همان طور که اشاره شد، حذف حلال پخش کننده علاوه بر کاهش سمیت شرایط را برای بهبود ضریب توزیع فراهم می‌آورد، چرا که مصرف حلال پخش کننده می‌تواند با بالابردن قدرت چربی دوستی آب انتقال آنالیت از آب به حلال آلی را تحت الشعاع قرار داده و این امر را تضعیف می‌سازد.

اگر بخواهیم از این روش جهت استخراج آنالیت از نمونه‌های آبی استفاده کنیم کافیست حلال استخراج کننده را درون نمونه آبی که در یک لوله قرار دارد (مثلاً لوله ته مخروطی) وارد نموده و بعد از آن با استفاده از یک سرنگ مناسب، مخلوط نمونه و حلال استخراجی را با کشیدن پیستون سرنگ وارد سازیم، سپس مخلوط داخل سرنگ را با سرعت زیاد دوباره وارد لوله نموده و در نتیجه مقداری از حلال استخراج کننده به صورت قطرات ریز درآمده و در داخل نمونه آبی پخش می‌شود.

برای تولید بیشتر قطرات ریز که به معنای بالابردن هرچه بیشتر سطح تماس بین آنالیت و حلال استخراج کننده است، فرآیند بالا را ادامه می‌دهیم، تا جایی که بیشترین قطرات ریز به وجود آید. با انجام این کار یک محیط امولسیون به وجود می‌آید و محلول ابری شکل حاصل می‌شود. در این شرایط، قطرات ریز در داخل نمونه به خوبی پخش شده و خود را به آنالیت می‌رسانند و فضای مناسبی برای انتقال آنالیت از نمونه آبی به داخل حلال استخراجی فراهم می‌شود. پس از تشکیل امولسیون، بایستی شیوه ای اتخاذ شود تا دوباره قطرات دوباره به یکدیگر نزدیک شده و تشکیل فازی بدهند که قابل جدا کردن از آب باشد. یک روش مناسب سانتریفیوژ کردن است. شکل (۲-۶) شمایی از چگونگی انجام این روش را نشان می‌دهد. از مزایای این روش می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

۱. روشی ساده و سریع است.
۲. برای اجرای روش به تجهیزات ساده، ارزان و قابل دسترسی نیاز داریم.
۳. نسبت به روش‌هایی که در آن‌ها از حلال پخش کننده استفاده می‌شود از سمیت کمتری برخوردار است و ضریب توزیع بهتری دارد.
۴. فاکتور تغلیظ و بازیابی مناسبی دارد.
۵. میزان مصرف حلال در آن بسیار کم است [۶۵].



شکل (۲-۶) میکرواستخراج مایع-مایع به کمک هوا [۶۵]

برای روش استخراج برگشتی در مرحله اول با تنظیم کردن pH محلول نمونه آبی (فاز اهداکننده) آنالیت‌ها به فاز آلی استخراج می‌شوند و در مرحله دوم این آنالیت‌ها به آسانی با استخراج برگشتی به فاز پذیرنده با pH معین و مخالف با مرحله اول باز می‌گردند. در مرحله اول امکان استخراج آنالیت و بسیاری از مزاحمت‌ها به فاز آلی وجود دارد اما در مرحله دوم که فاز آلی از فاز دهنده جدا می‌شود و در معرض یک فاز پذیرنده با pH مخالف با فاز دهنده قرار می‌گیرد آنالیت‌ها یونیزه شده در حالی که این امکان برای بسیاری از مزاحمت‌ها وجود ندارد. گام دوم ساده و سریع است و در مدت زمان کوتاهی به کمک استخراج برگشتی انجام می‌شود. بنابراین این مرحله به خوبی می‌تواند باعث از بین بردن مشکل تزریق حلال آلی به دستگاه آنالیز نهایی شود [۶۶].





فصل سوم:

تجربی

### ۳-۱ مقدمه

مهارکننده‌های بازجذب سروتونین، دسته‌ای از داروهای ضد افسردگی هستند که در درمان افسردگی و برخی از انواع اختلالات اضطرابی و شخصیتی کاربرد دارند. این داروها میزان سروتونین برون‌سلولی را افزایش داده و این کار را از طریق جلوگیری بازجذب سریع سروتونین در گیرنده‌های عصبی پیش‌سیناپسی انجام می‌دهند از طرفی مصرف این خانواده دارویی ممکن است غلظت داروهای چون وارفارین<sup>۱</sup>، ترکیبات ضد آریتمی<sup>۲</sup>، بتابلاکرها<sup>۳</sup> مانند پروپرانول، ضد افسردگی‌های سه‌حلقه‌ای مانند آمی‌تریپتیلین<sup>۴</sup>، بنزودیازپین‌ها<sup>۵</sup>، را افزایش داده و منجر به مسمومیت شوند [۶]. بنابراین اندازه‌گیری همزمان سیتالوپرام و سرتالین و نیز تأثیر متقابل آن‌ها در حضور هم در بدن و ارائه یک روش ساده و حساس برای استخراج و اندازه‌گیری این داروها در نمونه‌های بیولوژیکی ضروری به نظر می‌رسد. در این پروژه از روش میکرواستخراج مایع-مایع متوالی به کمک دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، برای اندازه‌گیری مقادیر کم این داروها در نمونه‌های بیولوژیکی به کار گرفته شد. در این روش که بر پایه‌ی استخراج آنالیت از نمونه‌ی آبی به لایه‌ی آلی، و سپس انتقال به میکروقطره‌ی آبی صورت می‌پذیرد، جهت حصول آنالیت خنثی اولیه و قابل استخراج از نمونه‌ی آبی به لایه‌ی آلی و سپس به داخل میکروقطره‌ی آبی بایستی pH تنظیم شود، که در نهایت آنالیت یونی به میکروقطره استخراج شده و عمل پیش‌تغلیظ رخ می‌دهد که روشی ساده، ارزان و با کارایی بالا است که می‌تواند بدون نیاز به بکارگیری ابزار خاصی فرآیند استخراج را بدون مصرف حلال پخش‌کننده انجام دهد. در شکل (۳-۱) نمایش شماتیک این روش نشان داده شده‌است.

---

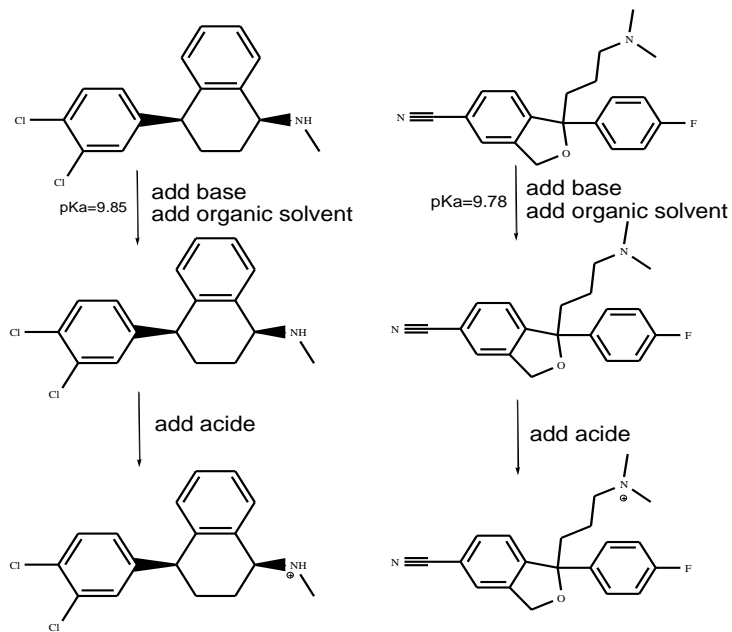
<sup>1</sup> Warfarin

<sup>2</sup> Antiarrhythmi

<sup>3</sup> Beta blockers

<sup>4</sup> Amitriptyline

<sup>5</sup> Bezodiazepines



شکل (۱-۳) طرح شماتیک روش مورد استفاده

## ۲-۳ مواد شیمیایی مورد استفاده

مواد شیمیایی مورد استفاده به همراه شرکت سازنده در جدول (۱-۳) آمده است. کلیه مواد

مورد استفاده در این پروژه دارای خلوص تجزیه‌ای و داروهای سیتالوپرام و سرتالین دارای خلوص

دارویی می‌باشند.

جدول (۳-۱) مواد شیمیایی مورد استفاده

نام ماده شیمیایی	فرمول	شرکت سازنده
متانول	CH <sub>3</sub> OH	داکسان <sup>۱</sup>
استونیتریل	CH <sub>2</sub> N <sub>3</sub>	داکسان
پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	مرک <sup>۲</sup>
دی سدیم دی‌هیدروژن فسفات	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	مرک
سدیم هیدروکسید	NaOH	مرک
هیدروکلریک اسید	HCl	مرک
سدیم کلرید	NaCl	مرک
پتاسیم نیترات	KNO <sub>3</sub>	مرک
تتراکلرید کربن	CCl <sub>4</sub>	مرک
کلروبنزن	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Cl	مرک
پتاسیم هیدروژن فتالات (KHP)	C <sub>8</sub> H <sub>5</sub> KO <sub>4</sub>	مرک
دی کلرومتان	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	مرک
داروی سیتالوپرام	C <sub>20</sub> H <sub>21</sub> FN <sub>2</sub> O	شرکت داروسازی نوکام
داروی سرتالین	C <sub>17</sub> H <sub>17</sub> Cl <sub>2</sub> N	شرکت داروسازی نوکام

### ۳-۳ محلول‌های مورد استفاده و طرز تهیهی آنها

در تهیه تمام محلول‌ها از آب دو بار تقطیر و مواد شیمیایی با خلوص تجزیه ای استفاده شد. و حلال‌های فاز متحرک با درجه خلوص HPLC استفاده شدند.

برای تهیه محلول ۲۰۰ ppm هریک از داروها (محلول مادر) مقدار ۰/۰۰۱۰ گرم از ماده جامد سیتالوپرام و سرتالین ، به صورت جداگانه توزین و به ترتیب با آب و متانول به حجم ۵/۰ میلی لیتر رسانده شدند. محلول‌های مادر پس از تهیه درون یخچال و در تاریکی نگهداری شدند. محلول‌های

<sup>1</sup> Duksan

<sup>2</sup> Merck

رقیق تر به وسیله رقیق سازی این محلولها با آب دو بار تقطیر تهیه شدند.

محلول NaOH با غلظت ۲/۰ مولار تهیه شد با محلول پتاسیم هیدروژن فتالات در حضور شناساگر فنل فتالین غلظت آن استاندارد شد. و سپس محلولهای با غلظت ۰/۸۰-۰/۱۰ مولار آن به کمک قیق سازی با آب مقطر دوبار تقطیر تهیه شدند.

محلول ۲/۰ مولار HCl، H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> و H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> هریک جداگانه از محلول غلیظ آن تهیه و پس از استاندارد کردن آن با محلول سدیم هیدروکسید استاندارد شده، محلولهای با غلظت ۰/۸۰-۰/۱۰ مولار آنها به کمک رقیق سازی با آب مقطر دوبار تقطیر تهیه شدند.

### ۳-۴ دستگاهها و وسایل مورد استفاده

در این پروژه برای جداسازی و آنالیز نمونهها از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا ساخت شرکت اجیلنت<sup>۱</sup> مدل ۱۱۰۰، مجهز به گاز زدا<sup>۲</sup>ی مدل G1374A، حلقه نمونه گذاری ۵/۰۰ میکرولیتر، آشکارساز فرابنفش چند طول موجی (MWD)<sup>۳</sup> مدل 1365B، پمپ کوات<sup>۴</sup> مدل G1311A استفاده شد. ستون مورد استفاده از نوع ستون C<sub>18</sub> ساخت شرکت اجیلنت (۴/۶×۱۵۰ میلی متر با اندازه ذرات ۵ میکرومتر) بود. همچنین برای ثبت دادههای طیفی، یک رایانه مجهز به برنامه نرم افزاری اجیلنت ChemStation به کار گرفته شد. برای برداشتن حجمهای مشخصی از حلال و انتقال و تزریق آن به محلول از یک میکروسرنگ ۱۰۰ میکرولیتری ساخت کشور چین و برای تزریق فاز پذیرنده به دستگاه کروماتوگرافی از یک سرنگ اجیلنت ۵۰/۰ میکرولیتری استفاده شد. برای تنظیم pH محلول بافری فاز متحرک، از pH متر دیجیتالی ساخت شرکت متراهم مدل ۵۷۸۰<sup>۵</sup> مجهز به الکتروود ترکیبی شیشه‌ای-

---

<sup>1</sup> Agilent

<sup>2</sup> Degasser

<sup>3</sup> Multi wave length detector

<sup>4</sup> Quat pump

<sup>5</sup> Metrohm 780

کالومل (۳/۰ مولار پتاسیم کلرید) استفاده شد. برای سانتریفیوژ کردن محلول‌ها از دستگاه سانتریفیوژ ساخت شرکت بنیامین طب استفاده شد. برای یکنواخت ساختن و گاز زدایی از مخلوط فاز متحرک، اولتراسونیک بندلین الکترونیک<sup>۱</sup> مدل DT 510 H مورد استفاده قرار گرفت.

برای توزین مواد شیمیایی از ترازوی تجزیه‌ای با دقت ۰/۱ میلی‌گرم سارتریوس<sup>۲</sup> A200S ساخت شرکت آلمان استفاده شد. همچنین برای برداشتن حجم معینی از حلال از میکروپیپت‌های ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکرولیتری با حجم قابل تنظیم ساخت شرکت اپندورف<sup>۳</sup> (مدل Research 100) استفاده گردید.

### ۳-۵ ثبت طیف جذبی آنالیت‌ها و انتخاب بهترین طول موج

برای تعیین طول موج‌های دارای جذب ماکزیم داروهای سیتالوپرام و سرتالین، طیف جذبی محلول‌های این داروها ثبت گردید. برای این منظور محلول‌های ۱۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر سیتالوپرام و سرتالین به صورت جداگانه در فاز متحرک مورد استفاده (ترکیب بافر فسفاتی با pH برابر با ۵/۵ با غلظت ۰/۰۶ مولار و استونیتریل به نسبت ۱:۱) تهیه گردید و بار دیگر محلول ۱۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر این داروها در هیدروکلریک اسید ۰/۳۰ مولار تهیه شد و پس از یکنواخت کردن محلول، مقداری از آن به داخل سل اسپکتروفتومتر منتقل و طیف جذبی آن‌ها به طور جداگانه نسبت به شاهد فازمتحرک (ترکیب بافر فسفاتی با pH برابر با ۵/۵ و استونیتریل به نسبت ۱:۱) و هیدروکلریک اسید ۰/۳۰ مولار در ناحیه ۲۰۰-۴۰۰ نانومتر، ثبت شد. با توجه به طیف جذبی این داروها که در شکل (۲-۳) و شکل (۳-۳) نشان داده شده است، ماکزیم جذب اندازه‌گیری شده در طول موج ۲۳۸، ۲۰۸ نانومتر به ترتیب برای سیتالوپرام و سرتالین به دست آمد. همان‌طور که در شکل (۲-۳) مشاهده می‌شود شدت

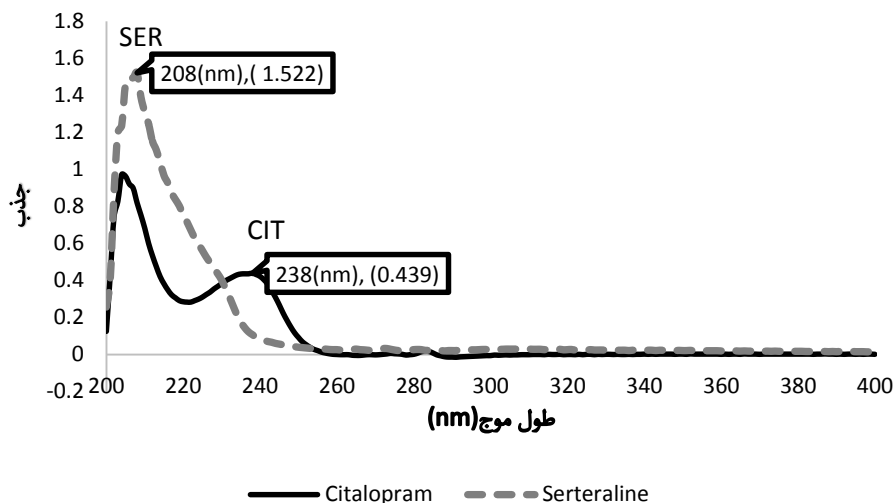
---

<sup>1</sup> Bandelin electronic

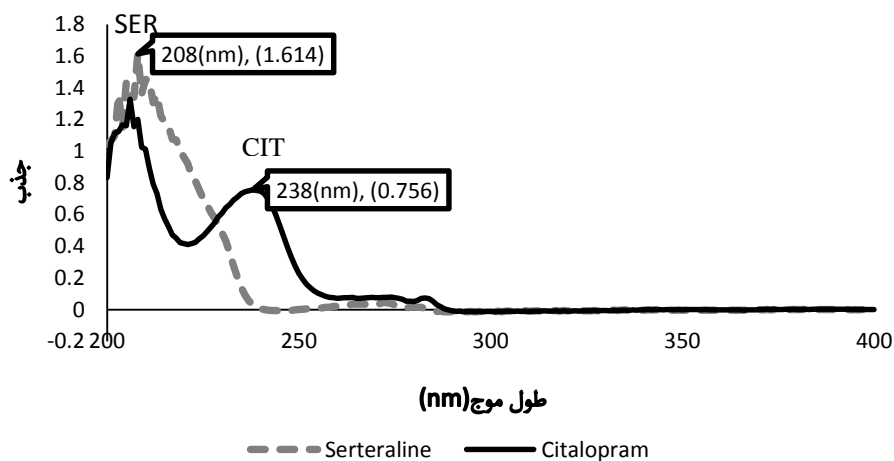
<sup>2</sup> Sartorius

<sup>3</sup> Eppendorf

جذب داروی سیتالوپرام در محیط اسیدی کمتر است و این امر می‌تواند به این علت باشد که در محیط اسیدی جفت الکترون‌های آزاد آن پروتونه شده و تعداد انتقالات  $\pi \rightarrow n^*$  کاهش یافته است.



شکل (۲-۳) طیف جذبی سیتالوپرام و سرتالین، در ناحیه ۲۰۰-۴۰۰ نانومتر، شرایط آزمایش: غلظت سیتالوپرام (CIT) و سرتالین (SER) (۱۰/۰ میلی گرم بر میلی لیتر)، در محلول HCl (با غلظت ۰/۳۰ مولار)

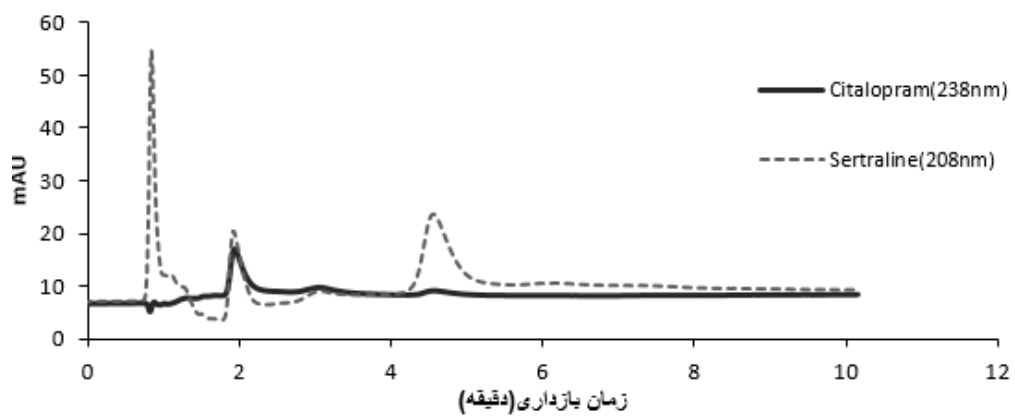
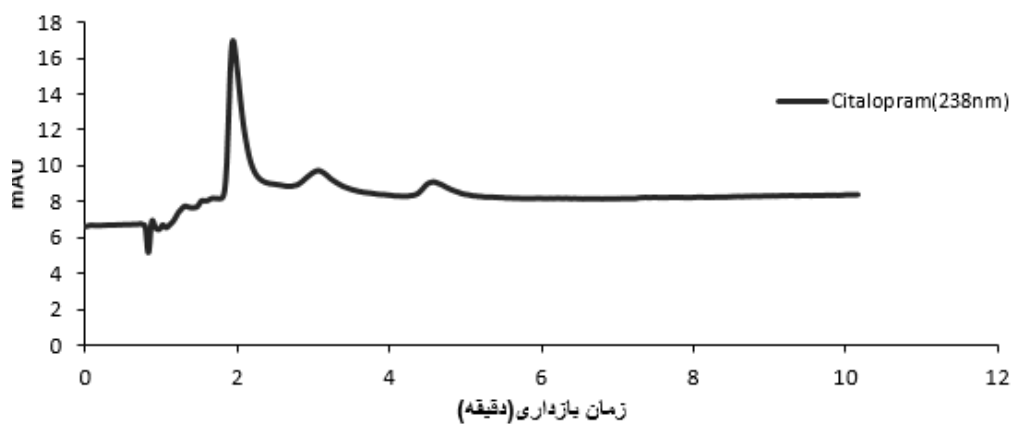
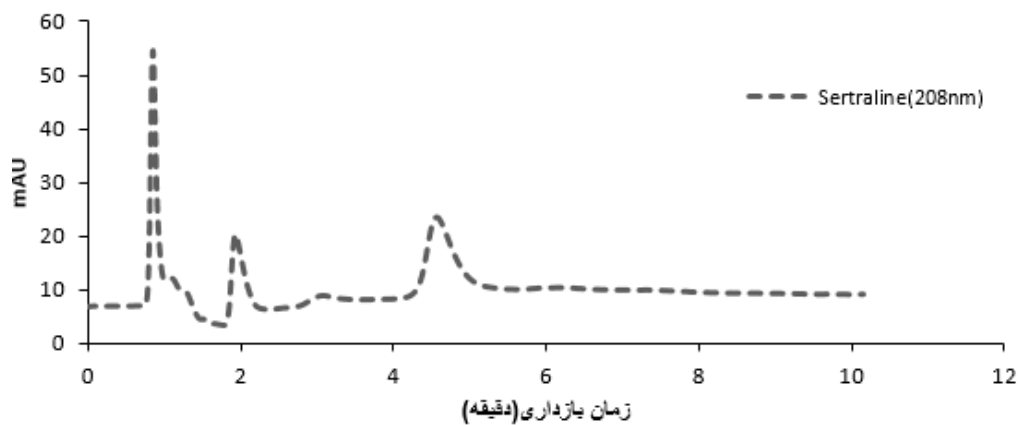


شکل (۳-۳) طیف جذبی سیتالوپرام و سرتالین، در ناحیه ۲۰۰-۴۰۰ نانومتر شرایط آزمایش: غلظت سیتالوپرام (CIT) و سرتالین (SER) (۱۰/۰ میلی گرم بر میلی لیتر)، در فاز متحرک (ترکیب بافر فسفاتی با pH برابر با ۵/۵ و استونیتریل به نسبت ۱:۱)

### ۳-۵-۱ شرایط کروماتوگرافی و تهیه فاز متحرک

جهت تهیه فاز متحرک، برای اندازه‌گیری همزمان سیتالوپرام و سرتالین، ترکیب بافر فسفاتی با pH برابر با ۵/۵، (با غلظت ۰/۰۶ مولار) : استونیتریل، با نسبت ۱: ۱، در نظر گرفته شد [۱۵]. فاز متحرک ابتدا به منظور همگن‌سازی و گاز زدایی آن در حمام اولتراسونیک قرار داده شد. پس از آن نیز با قرار دادن در مخازن فاز متحرک دستگاه کروماتوگرافی، در هر لحظه برای ورود به ستون، توسط میکروفیلتر صاف و هوازدایی شد و از گاز زدای دستگاه عبور و عاری از حباب و گاز شد. پاسخ کروماتوگرافی با توجه به ماکزیمم شدت جذب برای دو دارو، در طول موج ۲۰۸ برای سرتالین و ۲۳۸ برای سیتالوپرام ثبت گردید. کلیه آزمایش‌ها در دمای اتاق و با سرعت جریان فاز متحرک ۱/۰ میلی‌لیتر بر دقیقه انجام گردید. قبل از تزریق نمونه به داخل ستون، اجازه داده شد تا فاز متحرک برای مدت زمان حدود نیم ساعت با سرعت جریان ۱/۰ میلی‌لیتر بر دقیقه از داخل ستون عبور کرده تا ستون به حالت تعادل برسد. کروماتوگرام مربوط به محلول ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر سرتالین و سیتالوپرام و مخلوط آن‌ها با غلظت ۱۰/۰ میلی گرم در شکل (۳-۴) آورده شده است که با توجه به کروماتوگرام به دست آمده، زمان بازداری برای سیتالوپرام ۲/۳ دقیقه و برای سرتالین ۴/۶ دقیقه است.





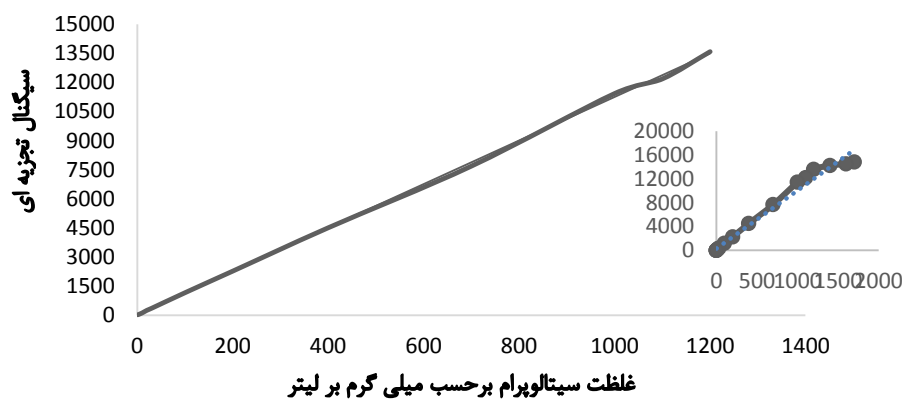
شکل (۳-۴) کروماتوگرام محلول ۱۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر داروهای سیتالوپرام (CIT) و سرترالین (SER) در هیدروکلریک اسید ۰/۳۰ مولار، فاز متحرک (ترکیب بافر فسفاتی با pH برابر با ۵/۵ و استونیتریل به نسبت ۱:۱) سرعت جریان فاز متحرک ۱/۰ میلی لیتر در دقیقه، در دمای محیط، ستون C<sub>18</sub> (۴/۶×۱۵۰ میلی متر با اندازه ذرات ۵ میکرومتر)

### ۳-۶ رسم منحنی کالیبراسیون مستقیم سیتالوپرام و سرتالین

برای به دست آوردن محدوده خطی نمونه‌های استاندارد، محلول‌های ۲۰۰۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر هر یک از داروها جداگانه تهیه و سپس محلول هریک از داروها با غلظت‌های کمتر جداگانه در هیدروکلریک اسید با غلظت ۰/۳۰ مولار تهیه شد، و ۵/۰ میکرولیتر از محلول حاوی غلظت‌های مختلف هر دارو به دستگاه HPLC تزریق و کروماتوگرام حاصل ثبت گردید. سپس سطح زیر پیک برای هر دارو به عنوان سیگنال تجزیه‌ای در نظر گرفته شد. منحنی کالیبراسیون نیز از رسم تغییرات سیگنال سیتالوپرام و سرتالین بر حسب غلظت آن‌ها به دست آمد و با توجه به آن محدوده خطی برای هریک از داروها به دست آمد که نتایج آن در جدول (۳-۲) و شکل (۳-۵) برای سیتالوپرام و جدول (۳-۳) و شکل (۳-۶) برای سرتالین آورده شده است. نتایج حاصل در معادلات جدول (۳-۴) آمده است.

جدول (۳-۲) سیگنال‌های مستقیم به دست آمده برای داروی سیتالوپرام با غلظت‌های متفاوت

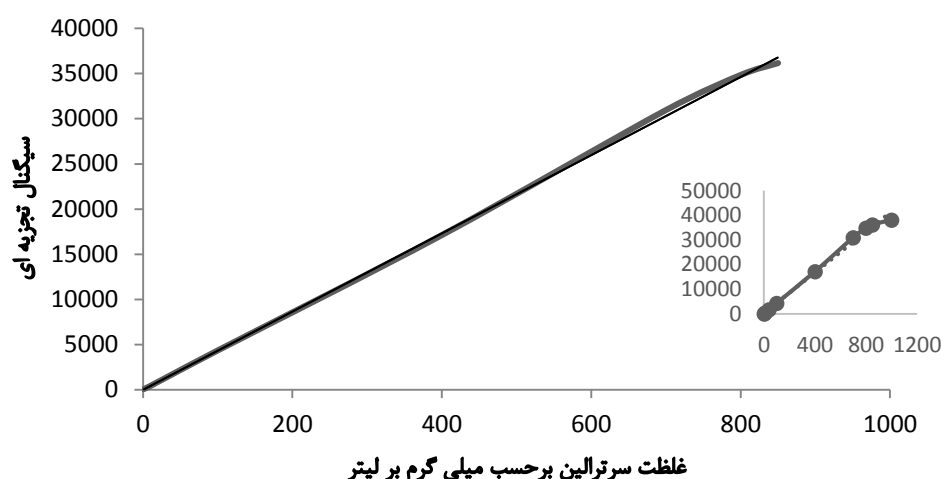
سیگنال تجزیه‌ای	غلظت سیتالوپرام (میلی‌گرم بر لیتر)
۳۶/۳	۱/۰
۱۳۱/۲	۱۰/۰
۲۶۷/۵	۲۰/۰
۳۷۳/۳	۳۰/۰
۱۱۷۵/۴	۱۰۰/۰
۲۲۸۸/۳	۲۰۰/۰
۴۵۲۱/۱	۴۰۰/۰
۷۶۹۹/۱	۷۰۰/۰
۱۱۴۳۸/۰	۱۰۰۰/۰
۱۲۱۹۳/۰	۱۱۰۰/۰
۱۳۵۹۵/۲	۱۲۰۰/۰
۱۴۲۶۵/۹	۱۴۰۰/۰
۱۴۵۲۱/۳	۱۶۰۰/۰
۱۴۸۲۵/۸	۱۷۰۰/۰



شکل (۳-۵) منحنی کالیبراسیون مستقیم سیتالوپرام. غلظت‌های مختلفی از آنالیت در حلال ۰/۳ مولار HCl، (بافر فسفاتی با pH ۵/۵ : استونیتریل با نسبت ۱:۱ به عنوان فاز متحرک) سرعت جریان ۱/۰ میلی‌لیتر بر دقیقه و طول موج ۲۳۸ نانومتر

جدول (۳-۳) سیگنال‌های مستقیم به دست آمده برای داروی سرتالین با غلظت‌های متفاوت

سیگنال (mAU)	غلظت سرتالین (میلی گرم بر لیتر)
۳۹/۵	۱/۰
۱۷۰/۵	۴/۰
۴۰۶/۸	۱۰/۰
۱۷۲۶/۹	۴۰/۰
۴۳۳۱/۴	۱۰۰/۰
۱۷۱۰۹/۰	۴۰۰/۰
۳۰۹۶۱/۰	۷۰۰/۰
۳۴۸۴۳/۰	۸۰۰/۰
۳۶۱۶۵/۰	۸۵۰/۰
۳۸۰۷۶/۰	۱۰۰۰/۰



شکل (۳-۶) منحنی کالیبراسیون مستقیم سرتالین. غلظت‌های مختلفی از آنالیت در حلال ۰/۳ مولار HCl، بافر فسفاتی با pH ۵/۵ استونیتریل با نسبت ۱:۱ به عنوان فاز متحرک، سرعت جریان ۱/۰ میلی لیتر بر دقیقه و طول موج ۲۰۸ نانومتر

جدول (۳-۴) نتایج حاصل از کالیبراسیون مستقیم داروها

طول موج (نانومتر)	ناحیه خطی (میلی گرم بر لیتر)	R <sup>2</sup>	معادله کالیبراسیون	نوع دارو
۲۳۸	۱/۰-۱۲۰۰/۰	۰/۹۹۹۶	$y=11/221x + 26/726$	سیتالوپرام
۲۰۸	۱/۰-۸۵۰/۰	۰/۹۹۹۵	$y=43/3x - 3/7422$	سرتالین

### ۳-۷ روش کار در بهینه‌سازی پارامترهای مؤثر بر اندازه گیری

#### سیتالوپرام و سرتالین

به منظور انجام استخراج با این روش مقدار ۱۰/۰ میلی لیتر از نمونه آبی که شامل یک میلی لیتر از محلول ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر هر کدام از داروها که pH آن با محلول NaOH با غلظت معین تنظیم شده را به داخل یک لوله ته مخروطی منتقل شد و مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از حلال استخراجی

دی کلرومتان نیز به لوله حاوی نمونه آبی توسط سرنگ شیشه‌ای تزریق شد. در این مرحله به‌وسیله سرنگ شیشه‌ای ۱ میلی‌لیتری محلول نمونه و حلال استخراج کننده را به داخل سرنگ وارد می‌سازیم و بعد از آن با پر کردن و خالی کردن سرنگ با فشردن سریع پیستون آن (که برای مکیدن مخلوط به انتها رسیده) مخلوط دوباره وارد لوله می‌شود. با این عمل یعنی انجام یک مرتبه‌ای این فرآیند مخلوط به مقدار کمی ابری شکل، می‌شود که نشان از شروع پخش شدن و تبدیل حلال استخراج کننده (دی کلرومتان) به قطرات ریز می‌باشد با تکرار این کار به تعداد ۷ بار یک محلول ابری شکل حاصل می‌شود که در واقع محیط امولسیون محلول فوق به مدت ۵ دقیقه و با سرعت ۳۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ گردیده و حلال استخراج کننده حاوی آنالیت در ته لوله جمع شد، سپس با استفاده از سرنگ شیشه‌ای فاز ته‌نشین شده از ته لوله جمع‌آوری شده و به یک لوله سانتریفیوژ دیگر منتقل شد و به آن ۱۰۰ میکرولیتر محلول HCl (حلال استخراج برگشتی) با غلظت مشخص اضافه شد، سپس به‌وسیله سرنگ ۱ میلی‌لیتری مخلوط نمونه‌ی آبی و حلال استخراج کننده را به داخل سرنگ وارد نموده و بعد از آن با فشردن سریع پیستون سرنگ (که برای مکیدن مخلوط به انتها رسیده) مخلوط دوباره وارد لوله می‌شود. با این عمل یعنی انجام یک مرتبه‌ای این فرآیند مخلوط به مقدار کمی ابری شکل، شد که نشان از شروع پخش شدن و تبدیل حلال استخراج کننده به قطرات ریز می‌باشد با تکرار این کار به تعداد ۲۱ بار یک محلول ابری شکل حاصل می‌شود که در واقع محیط امولسیون محلول فوق به مدت ۵ دقیقه و با سرعت ۳۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ گردیده و سپس محلول آبی (فاز بالایی) را به کمک سرنگ جدا کرده و به یک میکروتیوپ (ویال) منتقل و ۵ میکرولیتر از آن به دستگاه HPLC تزریق گردید. برای محلول شاهد نیز به طور مشابه عمل شد، با این تفاوت که محلول شاهد فاقد داروهای سیتالوپرام و سرتالین بود. اختلاف سیگنال محلول نمونه (سطح زیر منحنی دو آنالیت) و شاهد به عنوان سیگنال تجزیه‌ای مورد استفاده قرار گرفت.

برای به دست آوردن درصد بازیابی از روش کالیبراسیون مستقیم استفاده شد، به این صورت که بعد از تهیه غلظت‌های متفاوت هریک از داروها به صورت جداگانه در محلول هیدروکلریک اسید ۰/۳۰ مولار و تزریق آن‌ها به دستگاه HPLC و ثبت سیگنال هریک، منحنی کالیبراسیون از رسم سیگنال بر حسب غلظت بدست آمد که در شکل (۳-۵) برای سیتالوپرام و شکل (۳-۶) برای سرتالین و معادله کالیبراسیون برای هریک به دست آمد. سپس سیگنال داروها را پس از استخراج در معادله کالیبراسیون مربوطه قرار داده و غلظت داروی استخراج شده به دست آمد (C<sub>2</sub>). از رابطه (۳-۱) جهت به دست آوردن درصد بازیابی استفاده شد که در آن C<sub>1</sub> غلظت دارو قبل از استخراج، C<sub>2</sub> غلظت دارو پس از استخراج، V<sub>1</sub> حجم نمونه اولیه و V<sub>2</sub> حجم فاز پذیرنده نهایی می‌باشد.

$$R = \frac{C_2 V_2}{C_1 V_1} \times 100 \quad \text{رابطه (۳-۱)}$$

### ۳-۸ بررسی و بهینه سازی پارامترهای موثر بر استخراج سیتالوپرام و

#### سرتالین به روش مایع - مایع پخشی متوالی

به منظور به دست آوردن بهترین حساسیت، و در نتیجه بهترین حد تشخیص، در این پروژه عوامل مختلف موثر بر سیستم استخراج بهینه‌سازی شدند. ساده ترین روش بهینه‌سازی، روش یک متغیر در زمان است. در این روش همه عوامل تاثیر گذار بر سیستم استخراج مورد نظر به جز یکی از آن‌ها ثابت در نظر گرفته شده و تغییرات یک عامل روی پاسخ سیستم بررسی می‌شود و با انتخاب پاسخ بهینه در این حالت، بقیه عوامل به همین ترتیب بهینه شدند.

۱. بررسی pH فاز دهنده و فاز پذیرنده

۲. نوع اسید

۳. حجم اسید

۴. نوع حلال استخراج کننده
۵. حجم حلال استخراج کننده
۶. بررسی قدرت یونی محلول
۷. تعداد سیکل مکش و تخلیه توسط سرنگ در دو مرحله
۸. بررسی زمان سانتیفریوژ در مرحله اول
۹. بررسی تعداد دورهای چرخش سانتیفریوژ در مرحله اول
۱۰. بررسی زمان سانتیفریوژ در مرحله دوم
۱۱. بررسی تعداد دورهای چرخش سانتیفریوژ در مرحله دوم

### ۳-۸-۱ بررسی pH محلول نمونه و فاز پذیرنده

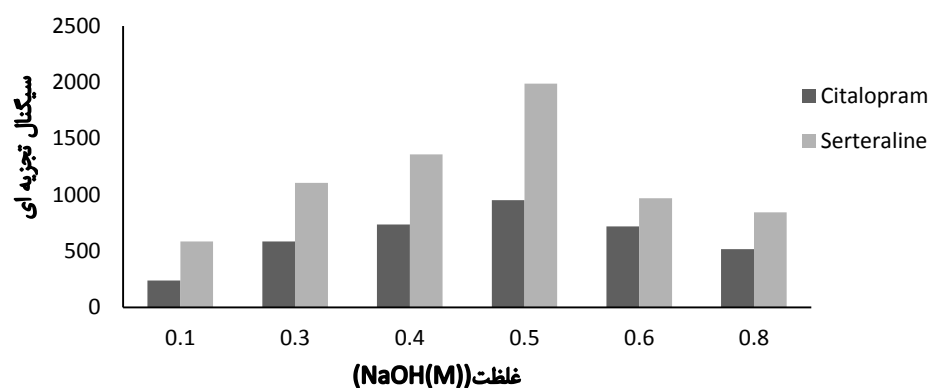
pH محلول یکی از مهم ترین پارامترهای موجود در روش های استخراج است، که در این روش، انتخاب pH محلول بستگی به ساختار شیمیایی آنالیت ها و نوع فاز استخراجی (آبی یا آلی) دارد. مقدار  $pK_a$  ، ۹/۷۸ و ۹/۸۵ به ترتیب برای سیتالوپرام و سرترالین می باشد [۶۷، ۶۸]. pH محلول اولیه با محلول سدیم هیدروکسید در محدوده غلظتی ۰/۸۰-۰/۱۰ مولار و pH محلول نهایی با هیدروکلریک اسید در محدوده غلظت ۰/۸۰-۰/۱۰ مولار مورد بررسی قرار گرفت. در  $pH \sim pK + 2$  آنالیت غالباً به صورت فرم مولکولی است که باعث می شود راحت تر به فاز آلی استخراج شود و بنابراین حلالیت آنالیت در فاز اهدا کننده کاهش می یابد و آنالیت به فاز آلی منتقل می شود [۶۷]. pH محلول نهایی باید به اندازه کافی اسیدی باشد تا آنالیت به فرم یونی تبدیل شود و از فاز آلی به آسانی به فاز آبی استخراج شود [۶۷]. بر این اساس استخراج مخلوط دو دارو در غلظت های مختلف سدیم هیدروکسید و هیدروکلریک اسید مورد بررسی قرار گرفت. در بررسی غلظت محلول بازی در فاز دهنده غلظت محلول اسیدی ۰/۳۰ مولار بود. سپس در غلظت بهینه سدیم هیدروکسید اثر غلظت محلول هیدروکلریک

اسید بررسی شد همان طور که در شکل (۷-۳) و شکل (۸-۳) مشاهده می شود محلول سود با غلظت ۰/۵۰ مولار برای فاز دهنده و ۰/۳۰ مولار هیدروکلریک اسید برای فاز پذیرنده نهایی انتخاب شدند. در غلظت های بالاتر از محلول هیدروکلریک اسید سطح زیر پیک و درصد بازیابی آنالیت ها کاهش می یابد می توان گفت که ضریب انتشار مولکول های آنالیت از فاز آلی به فاز آبی (پذیرنده) به دلیل افزایش ویسکوزیته فاز پذیرنده کاهش می یابد [۶۹]. از طرفی بالا رفتن غلظت اسید ممکن است منجر به بالا رفتن قدرت یونی فاز پذیرنده شود [۷۰].

جدول (۵-۳) نتایج حاصل از بررسی تغییر غلظت NaOH

سرترالین		سیتالوپرام		غلظت NaOH(M)
درصد بازیابی	سیگنال	درصد بازیابی	سیگنال	
۱۳/۶	۵۸۴/۳	۱۹/۰	۲۳۹/۴	۰/۱۰
۲۵/۶	۱۱۰۵/۲	۴۹/۹	۵۸۶/۵	۰/۳۰
۳۱/۴	۱۳۵۷/۸	۶۳/۱	۷۳۴/۸	۰/۴۰
۴۶/۰	۱۹۸۷/۷	۸۲/۴	۹۵۰/۹	۰/۵۰
۲۲/۵	۹۶۹/۵	۶۱/۸	۷۱۹/۷	۰/۶۰
۱۹/۶	۸۴۴/۱	۴۳/۶	۵۱۵/۷	۰/۸۰

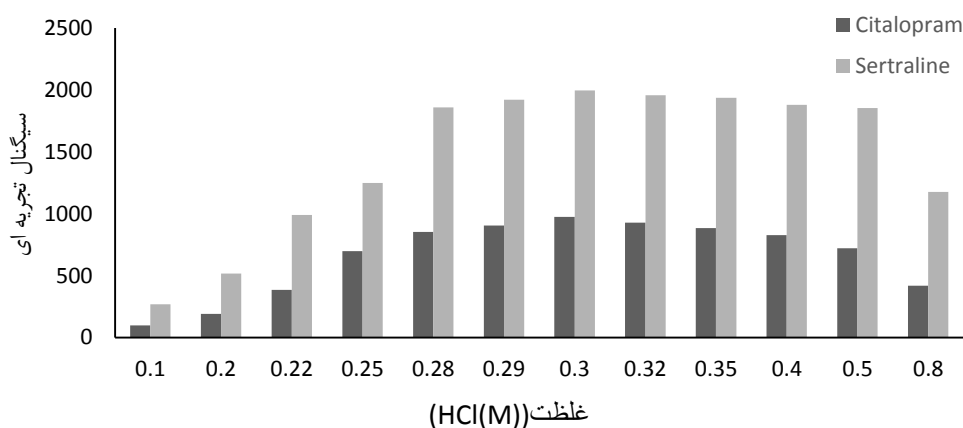




شکل (۷-۳) تاثیر غلظت محلول بازی، شرایط عمل: مقدار نمونه ۱۰/۰ میلی لیتر (حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر آنالیت‌ها)، تعداد سیکل مکش اولیه ۷ مرتبه و مکش ثانویه ۲۱ مرتبه، مرتبه، حلال استخراج کننده ۲۰۰ میکرولیتر دی کلرومتان، اسید مصرفی ۱۰۰ میکرولیتر هیدروکلریک اسید ۰/۳ مولار، ۵ دقیقه سانتریفیوژ با سرعت ۳۰۰۰ rpm در هر دو مرحله

جدول (۶-۳) نتایج حاصل از بررسی تغییر غلظت HCl

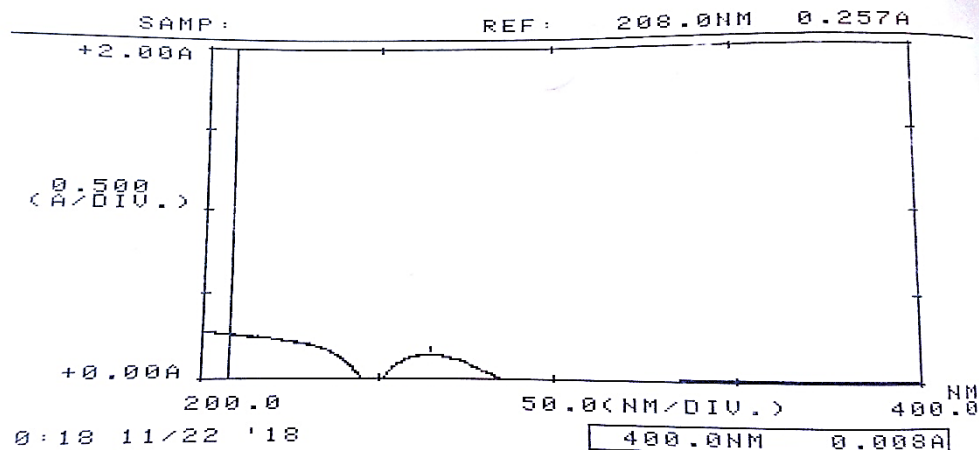
سرتالین		سیتالوپرام		غلظت HCl(M)
درصد بازیابی	سیگنال	درصد بازیابی	سیگنال	
۶/۳	۲۷۰/۰	۶/۳	۹۷/۷	۰/۱۰
۱۲/۱	۵۱۸/۴	۱۴/۸	۱۹۲/۴	۰/۲۰
۲۲/۹	۹۹۰/۱	۳۱/۹	۳۸۵/۲	۰/۲۲
۲۸/۹	۱۲۴۷/۸	۵۹/۷	۶۹۷/۲	۰/۲۵
۴۲/۹	۱۸۵۸/۰	۷۳/۷	۸۵۴/۳	۰/۲۸
۴۴/۴	۱۹۲۰/۱	۷۸/۳	۹۰۵/۷	۰/۲۹
۴۶/۲	۱۹۹۵/۶	۸۴/۴	۹۷۴/۷	۰/۳۰
۴۵/۳	۱۹۵۶/۱	۸۰/۵	۹۲۹/۶	۰/۳۲
۴۵/۸	۱۹۳۵/۰	۷۶/۳	۸۸۳/۵	۰/۳۵
۴۳/۵	۱۸۷۹/۳	۷۱/۳	۸۲۶/۹	۰/۴۰
۴۲/۹	۱۸۵۲/۲	۶۲/۰	۷۲۲/۱۲	۰/۵۰
۲۷/۳	۱۱۷۷/۴	۳۵/۰	۴۱۹/۸۱	۰/۸۰



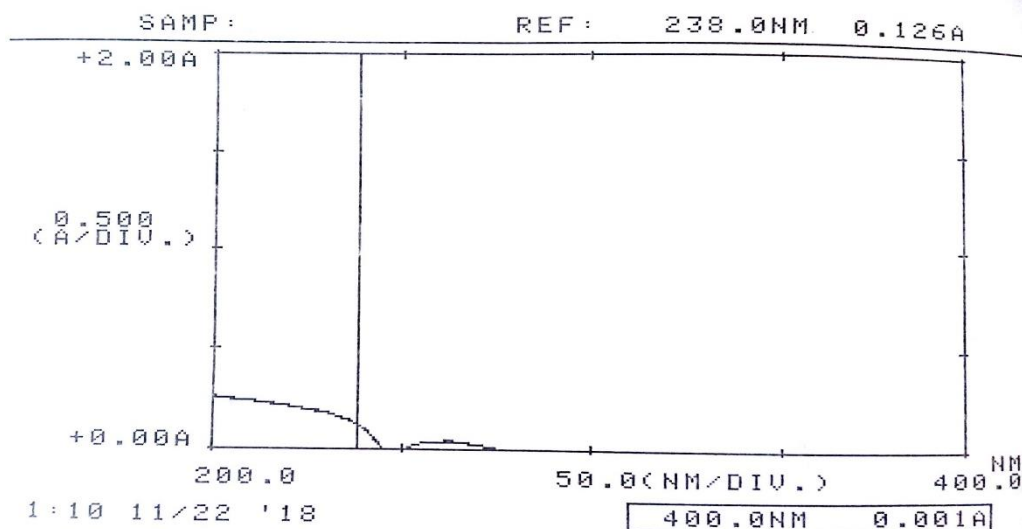
شکل (۸-۳) تاثیر غلظت محلول اسیدی، شرایط عمل: مقدار نمونه ۱۰/۰ میلی لیتر (حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر آنالیت‌ها)، غلظت سدیم هیدروکسید ۰/۵۰ مولار، تعداد سیکل مکش اولیه ۷ و مکش ثانویه ۲۱ مرتبه، حلال استخراج کننده ۲۰۰ میکرولیتر دی کلرو متان، حجم اسید مصرفی ۱۰۰ میکرولیتر هیدروکلریک اسید، ۵ دقیقه سانتریفیوژ با سرعت ۳۰۰۰ rpm در هر دو مرحله

### ۳-۸-۲ نوع اسید تنظیم کننده pH محلول در مرحله دوم استخراج

همان طور که گفته شد در مرحله دوم pH محلول باید به اندازه کافی اسیدی باشد تا آنالیت به فرم یونی تبدیل شود و از فاز آلی به فاز آبی منتقل گردد [۶۷] به همین منظور برای تنظیم pH در مرحله دوم و برگشت آنالیت به فاز آبی از اسیدهای HCl، H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>، H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> و HNO<sub>3</sub> با غلظت یون هیدروژن برابر با ۰/۳۰ مولار استفاده کردیم با توجه به شکل (۳-۹) شکل (۳-۱۰) گونه‌های مورد بررسی در محلول حاوی HNO<sub>3</sub> دارای طیف UV متفاوتی هستند و این احتمال وجود دارد که این گونه‌ها به فرم دیگری تبدیل شده باشند. بنابراین از این اسید برای ادامه کار استفاده نشد و سه اسید دیگر که سیگنال تجزیه ای هریک برابر با مساحت سطح زیر منحنی می‌باشد را مقایسه کردیم و همان طور که در شکل (۳-۱۱) و جدول (۳-۷) مشاهده می‌شود هیدروکلریک اسید با غلظت ۰/۳۰ مولار به عنوان اسید بهینه برای انتقال آنالیت از فاز آلی به فاز آبی انتخاب شد.



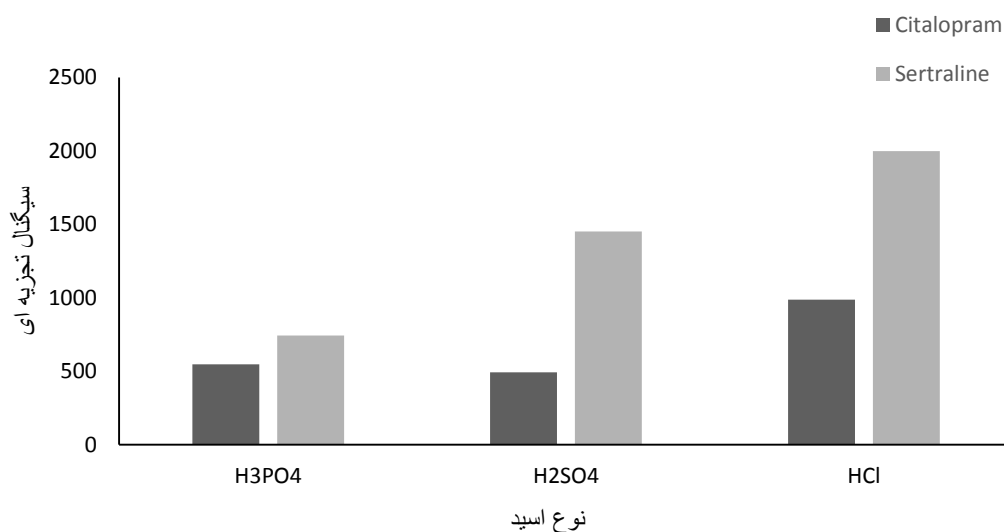
شکل (۹-۳) طیف جذبی سرتالین، در ناحیه ۲۰۰-۴۰۰ نانومتر شرایط آزمایش: غلظت سرتالین (SER) (۱۰/۰) میلی گرم بر میلی لیتر، در محلول  $HNO_3$  با غلظت ۰/۳۰ مولار



شکل (۱۰-۳) طیف جذبی سیتالوپرام، در ناحیه ۲۰۰-۴۰۰ نانومتر شرایط آزمایش: غلظت سیتالوپرام (CIT) (۱۰/۰) میلی گرم بر میلی لیتر، در محلول  $HNO_3$  با غلظت ۰/۳۰ مولار

جدول (۷-۳) نتایج حاصل از بررسی تغییر نوع اسید

سرترالین		سیتالوپرام		نوع اسید
درصد بازیابی	سیگنال (mAU)	درصد بازیابی	سیگنال (mAU)	
۴۶/۲	۱۹۹۷/۳	۸۵/۶	۹۸۷/۳	HCl
۳۳/۶	۱۴۵۰/۹	۴۱/۵	۴۹۱/۹	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
۱۷/۳	۷۴۳/۱	۴۶/۴	۵۴۷/۲	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>



شکل (۳-۱۱) تاثیر نوع اسید مصرفی، شرایط عمل: مقدار نمونه ۱۰/۰ میلی لیتر (حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر آنالیت‌ها)، غلظت سدیم هیدروکسید ۰/۵۰ مولار، تعداد سیکل مکش اولیه ۷ و مکش ثانویه ۲۱ مرتبه، حلال استخراج کننده ۲۰۰ میکرولیتر دی کلرومتان، حجم اسید مصرفی ۱۰۰ میکرولیتر با غلظت ۰/۳۰ مولار، ۵ دقیقه سانتریفیوژ با سرعت rpm ۳۰۰۰ در هر دو مرحله

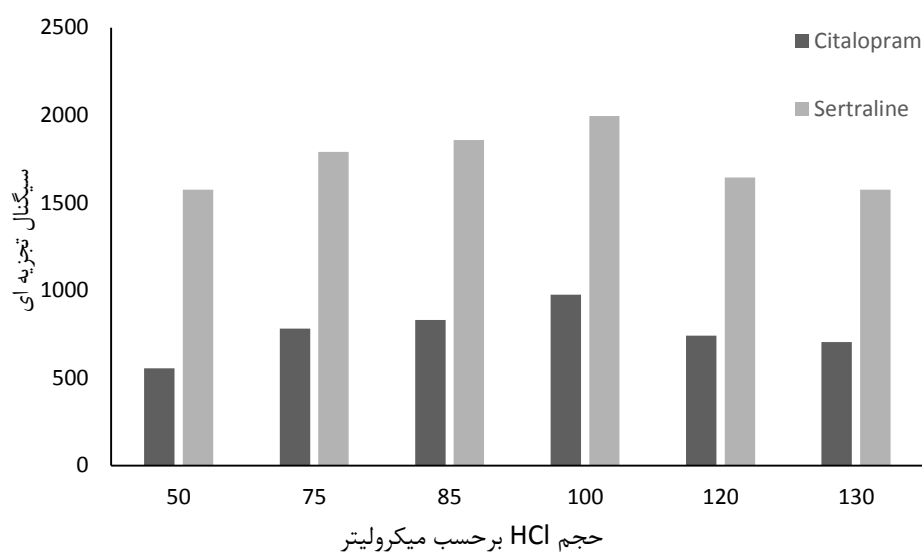
### ۳-۸-۳ حجم حلال استخراج برگشتی

برای بازگشت نمونه از فاز آلی به فاز آبی حجم های متفاوت ۱۳۰-۵۰ میکرولیتر از اسید هیدروکلریک اسید به حلال آلی حاوی آنالیت اضافه کرده و پس از چند بار مکش سرنگ محیط امولسیون حاصل می شود که با انجام مدت معینی سانتریفیوژ فاز آبی جدا شده و ۵ میکرولیتر از آن به دستگاه HPLC تزریق می شود. همان طور که در شکل (۳-۱۲) مشاهده می شود با افزایش حجم فاز

پذیرنده تا ۱۰۰ میکرولیتر سطح تماس بین حلال آلی و فاز پذیرنده زیاد می‌شود و در نتیجه مقدار بیشتری آنالیت به فاز پذیرنده استخراج می‌شود [۶۹] با افزایش حجم حلال استخراج برگشتی تا حدی که باعث افزایش استخراج نمونه نیز شود (حجم ۱۰۰ میکرولیتر)، سیگنال افزایش یافته و از این حجم به بعد که امکان افزایش میزان بهره استخراج وجود نداشته باشد، افزایش حجم باعث رقیق شدن آنالیت و در نتیجه کاهش سیگنال می‌شود از این رو ۱۰۰ میکرولیتر به عنوان حجم بهینه انتخاب شد.

جدول (۳-۸) نتایج حاصل از بررسی تغییر حجم اسید

سرتالین		سیتالوپرام		حجم اسید (میکرولیتر)
درصد باز یابی	سیگنال	درصد باز یابی	سیگنال	
۱۸/۲	۱۵۷۳/۸	۲۳/۵	۵۵۴/۱	۵۰
۳۱/۱	۱۷۸۹/۷	۵۰/۴	۷۸۱/۴	۷۵
۳۶/۵	۱۸۵۶/۹	۶۰/۹	۸۳۰/۶	۸۵
۴۶/۱	۱۹۹۴/۵	۸۴/۴	۹۷۴/۴	۱۰۰
۴۵/۷	۱۶۴۴/۳	۷۶/۵	۷۴۲/۱	۱۲۰
۴۷/۴	۱۵۷۴/۴	۷۸/۵	۷۰۴/۴	۱۳۰



شکل (۳-۱۲) تاثیر حجم اسید مصرفی، شرایط عمل: مقدار نمونه ۱۰/۰ میلی لیتر (حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر آنالیتها)، غلظت سدیم هیدروکسید ۰/۵۰ مولار، تعداد سیکل مکش اولیه ۷ و مکش ثانویه ۲۱ مرتبه، حلال استخراج کننده ۲۰۰ میکرولیتر دی کلرومتان، اسید با غلظت ۰/۳۰ مولار، ۵ دقیقه سانتریفیوژ با سرعت ۳۰۰۰rpm در هر دو مرحله

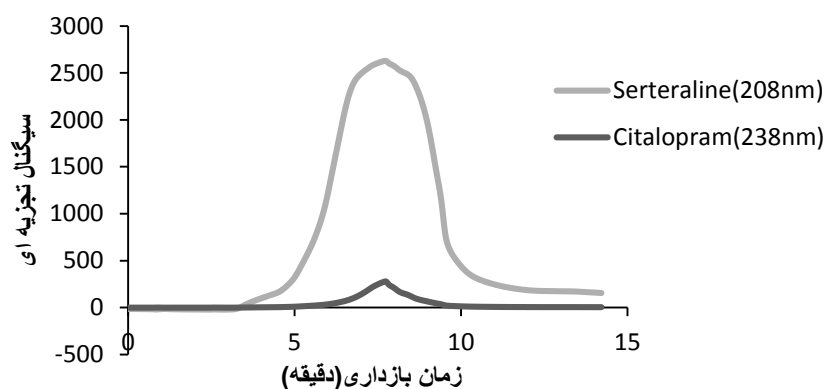
### ۳-۸-۴ نوع حلال استخراج کننده

یکی از پارامترهای موثر بر نتیجه‌ی میکرواستخراج، انتخاب نوع حلال استخراج کننده است، یک حلال زمانی می‌تواند برای انجام فرآیند استخراج مفید واقع شود که دارای شرایط زیر باشد:

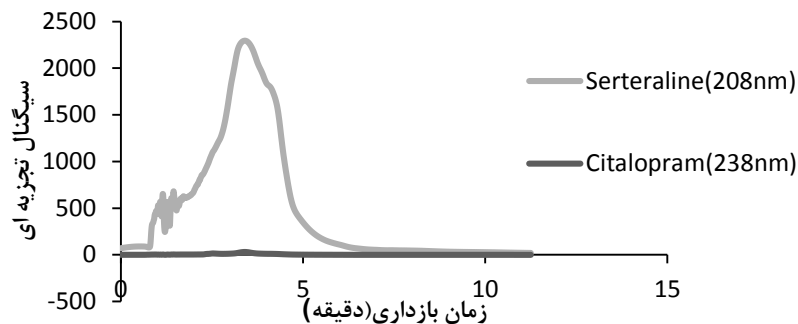
- غیر قابل امتزاج با آب باشد و انحلال آن در آب بسیار کم باشد.
  - در شرایط عمل روشی که در این پروژه انجام می‌شود، حلال استخراج کننده بایستی دانسیته بیشتری نسبت به آب داشته باشد.
  - حلال بایستی قابلیت استخراج مناسب آنالیت را داشته باشد.
  - حلال استخراج کننده باید با سیستم نهایی آنالیز سازگار باشد.
- با در نظر گرفتن این محدودیت‌ها چهار حلال تترا کلریدکربن، کلروفرم، کلروبنزن و ۱ و ۲ دی کلرومتان را به عنوان کاندیدهای حلال استخراج کننده مورد بررسی قرار دادیم. کروماتوگرام‌های آنها

در شکل (۳-۱۳) تا شکل (۳-۱۶) نشان داده شده است.

در این روش مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از حلال استخراج کننده به ۱۰/۰ میلی لیتر نمونه آبی افزوده شد پس از انجام مراحل استخراج بر اساس نتایج نشان داده شده در شکل (۳-۱۷) و جدول (۳-۹) نشان داده شده است. حلال بهینه ۱ و ۲ دی کلرومتان به عنوان موثرترین حلال استخراج با بالاترین بازده استخراج انتخاب شد. حلال کلرو بنزن و تترا کلرید کربن به دلیل هم پوشانی و تداخل پیک حلال با گونه های آنالیت شرایط لازم جهت استفاده در فرآیند استخراج را نداشته، به همین دلیل مورد استفاده قرار نگرفتند.



شکل (۳-۱۳) کروماتوگرام تاثیر نوع حلال آلی، شرایط عمل: مقدار نمونه ۱۰/۰ میلی لیتر (حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر آنالیتها)، تعداد سیکل مکش اولیه ۷ و مکش ثانویه ۲۱ مرتبه، حلال استخراج کننده ۲۰۰ میکرولیتر تتراکلرید کربن، اسید مصرفی ۱۰۰ میکرولیتر هیدرو کلریک اسید ۰/۳۰ مولار، ۵ دقیقه سانتریفیوژ با سرعت ۳۰۰۰rpm در هر دو مرحله، سرتالین (SER) در ۲۰۸ نانومتر و سیتالوپرام (CIT) در ۲۳۸ نانومتر، فاز متحرک (ترکیب بافر فسفاتنی با pH برابر با ۵/۵، استونیتریل با نسبت ۱:۱) سرعت جریان فاز متحرک ۱/۰۰ میلی لیتر در دقیقه، در دمای محیط، ستون C<sub>18</sub> (۴/۶×۱۵۰ میلی متر با اندازه ذرات ۵ میکرومتر)

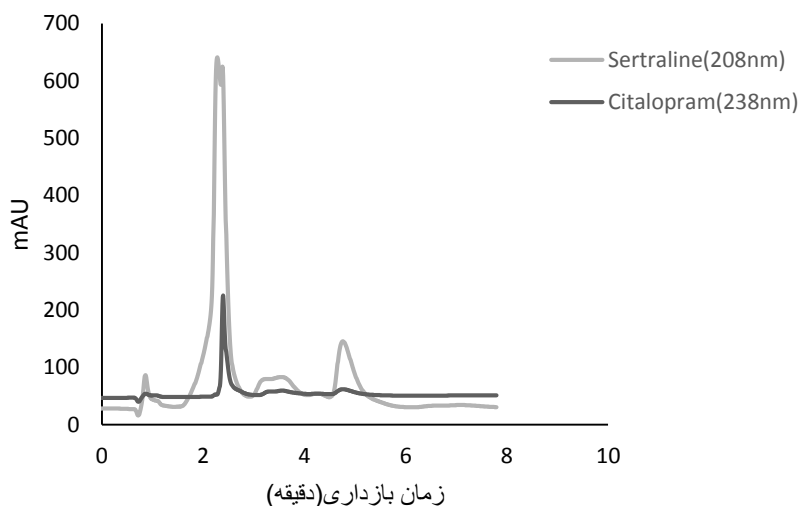


شکل (۳-۱۴) کروماتوگرام تاثیر نوع حلال آلی، شرایط عمل: مقدار نمونه ۱۰/۰ میلی لیتر (حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر آنالیت‌ها)، غلظت سدیم هیدروکسید ۰/۵۰ مولار، تعداد سیکل مکش اولیه ۷ و مکش ثانویه ۲۱ مرتبه، حلال استخراج کننده ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم، اسید مصرفی ۱۰۰ میکرولیتر هیدروکلریک اسید ۰/۳۰ مولار، ۵ دقیقه سانتریفیوژ با سرعت ۳۰۰۰ rpm در هر دو مرحله، سرتالین (SER) در ۲۰۸ نانومتر و سیتالوپرام (CIT) در ۲۳۸ نانومتر، فاز متحرک (ترکیب بافر فسفات با pH برابر با ۵/۵، استونیتریل با نسبت ۱:۱) سرعت جریان فاز متحرک ۱/۰۰ میلی لیتر در دقیقه، در دمای محیط، ستون C<sub>18</sub> (۴/۶×۱۵۰) میلی متر با اندازه ذرات ۵ میکرومتر)



شکل (۳-۱۵) کروماتوگرام تاثیر نوع حلال آلی، شرایط عمل: مقدار نمونه ۱۰/۰ میلی لیتر (حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر آنالیت‌ها)، غلظت سدیم هیدروکسید ۰/۵۰ مولار، تعداد سیکل مکش اولیه ۷ و مکش ثانویه ۲۱ مرتبه، حلال استخراج کننده ۲۰۰ میکرولیتر کلروبنزن، اسید مصرفی ۱۰۰ میکرولیتر هیدروکلریک اسید ۰/۳۰ مولار، ۵ دقیقه سانتریفیوژ با سرعت ۳۰۰۰ rpm در هر دو مرحله، سرتالین (SER) در ۲۰۸ نانومتر و سیتالوپرام (CIT) در ۲۳۸ نانومتر، فاز متحرک (ترکیب بافر فسفات با pH برابر با ۵/۵، استونیتریل با نسبت ۱:۱) سرعت جریان فاز متحرک ۱/۰۰ میلی لیتر در دقیقه، در دمای محیط، ستون C<sub>18</sub> (۴/۶×۱۵۰) میلی متر با اندازه ذرات ۵ میکرومتر)

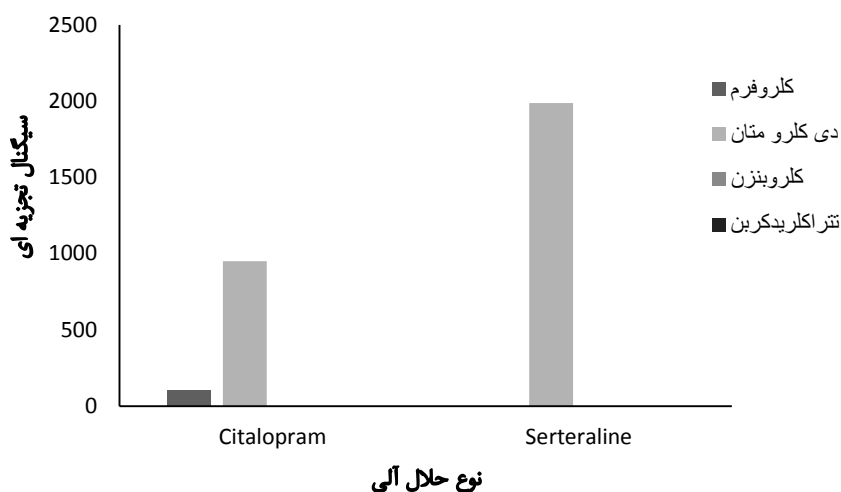




شکل (۳-۱۶) کروماتوگرام تاثیر نوع حلال آلی، شرایط عمل: مقدار نمونه ۱۰/۰ میلی لیتر (حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر آنالیت‌ها)، غلظت سدیم هیدروکسید ۰/۵۰ مولار، تعداد سیکل مکش اولیه ۷ و مکش ثانویه ۲۱ مرتبه، حلال استخراج کننده ۲۰۰ میکرولیتر ۱ و ۲ دی کلرومتان، اسید مصرفی ۱۰۰ میکرولیتر هیدرو کلریک اسید ۰/۳۰ مولار، ۵ دقیقه سانتیفریوژ با سرعت ۳۰۰۰ rpm در هر دو مرحله، سرتالین (SER) در ۲۰۸ نانومتر و سیتالوپرام (CIT) در ۲۳۸ نانومتر، فاز متحرک (ترکیب بافر فسفاتی با pH برابر با ۵/۵، استونیتریل با نسبت ۱:۱) سرعت جریان فاز متحرک ۱/۰۰ میلی لیتر در دقیقه، در دمای محیط، ستون C<sub>18</sub> (۴/۶×۱۵۰) میلی متر با اندازه ذرات ۵ میکرومتر)

جدول (۳-۹) نتایج حاصل از بررسی نوع حلال آلی

سرتالین		سیتالوپرام		نوع حلال آلی
درصد بازیابی	سیگنال	درصد بازیابی	سیگنال	
-	-	۷/۲	۱۰۷/۲۶	کلروفرم
۴۶/۰	۱۹۸۷/۷۱	۸۲/۴	۹۵۰/۹۹	دی کلرومتان



شکل (۳-۱۷) تاثیر نوع حلال آلی، شرایط عمل: مقدار نمونه ۱۰/۰ میلی لیتر (حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر آنالیت‌ها)، غلظت سدیم هیدروکسید ۰/۵۰ مولار، تعداد سیکل مکش اولیه ۷ و مکش ثانویه ۲۱ مرتبه، حجم حلال استخراج کننده ۲۰۰ میکرولیتر، اسید مصرفی ۱۰۰ میکرولیتر هیدروکلریک اسید ۰/۳۰ مولار، ۵ دقیقه سانتریفیوژ با سرعت ۳۰۰۰ rpm در هر دو مرحله

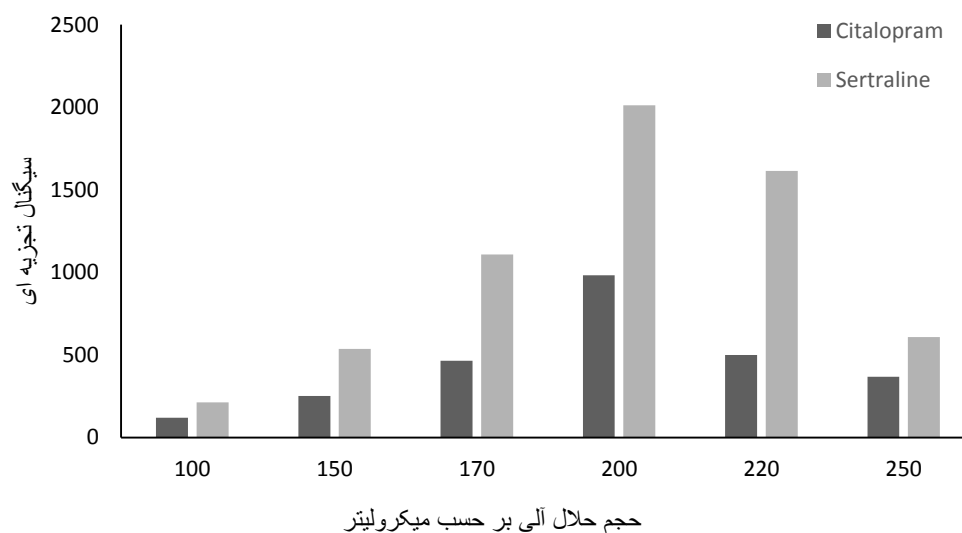
### ۳-۸-۵ حجم حلال استخراج کننده

حجم حلال استخراج کننده بر نتیجه‌ی استخراج و سیگنال‌های تجزیه‌ای و مخصوصاً بر فاکتور تغلیظ بسیار تاثیر خواهد گذاشت، از این رو بهینه سازی حجم حلال استخراجی که باید در مرحله اول به نمونه آبی اضافه شود ضرورت دارد. حجم حلال استخراج کننده باید به اندازه‌ای باشد که حجمی قابل برداشت از فاز آلی ته نشین شده حاصل شود تا خطای آزمایش کمتر شود و از طرفی برای رسیدن به فاکتور تغلیظ بالاتر و سمیت کمتر حلال‌ها بر روی محیط حجم حلال استخراج کننده نباید زیاد باشد. از این رو حجم‌های مختلف از حلال استخراجی بررسی شد و همان‌طور که در جدول (۳-۱۰) و شکل (۳-۱۸) مشاهده می‌شود با افزایش حجم حلال استخراجی تا حدی که باعث افزایش استخراج نمونه نیز شود (حجم ۲۰۰ میکرولیتر)، سیگنال افزایش یافته و از این حجم به بعد که امکان

افزایش میزان بهره استخراج وجود نداشته باشد، افزایش حجم باعث رقیق شدن آنالیت و در نتیجه کاهش سیگنال می‌شود از این رو ۲۰۰ میکرولیتر به عنوان حجم بهینه حلال آلی انتخاب شد.

جدول (۳-۱۰) نتایج حاصل از بررسی تغییر حجم حلال آلی

سرترالین		سیتالوپرام		حجم حلال آلی
درصد بازیابی	سیگنال	درصد بازیابی	سیگنال	
۵/۰	۲۱۳/۲	۸/۲	۱۱۸/۹	۱۰۰
۱۲/۵	۵۳۶/۶	۲۰/۰	۲۵۰/۸	۱۵۰
۲۵/۷	۱۱۰۹/۲	۳۹/۰	۴۶۴/۵	۱۷۵
۴۶/۵	۲۰۱۲/۱	۸۵/۱	۹۸۱/۴	۲۰۰
۳۷/۳	۱۶۱۳/۷	۴۲/۲	۵۰۰/۴	۲۲۰
۱۴/۱	۶۰۷/۸	۳۰/۴	۳۶۸/۴	۲۵۰



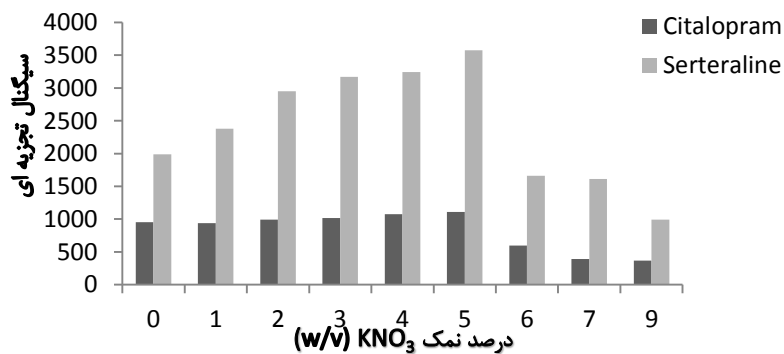
شکل (۳-۱۸) تاثیر حجم حلال آلی، شرایط عمل: مقدار نمونه ۱۰/۰ میلی‌لیتر (حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر آنالیت‌ها)، غلظت سدیم هیدروکسید ۰/۵۰ مولار، تعداد سیکل مکش اولیه ۷ و مکش ثانویه ۲۱ مرتبه، حلال استخراج‌کننده دی کلرومتان، اسید مصرفی ۱۰۰ میکرولیتر هیدروکلریک اسید ۰/۳۰ مولار، ۵ دقیقه سانتریفیوژ با سرعت ۳۰۰۰rpm در هر دو مرحله

### ۳-۸-۶ بهینه سازی قدرت یونی محلول (اثر نمک)

اثر نمک از فاکتورهایی است که به صورت عمومی در روش‌های استخراجی مورد بررسی قرار می‌گیرد. برای بررسی این اثر در پروژه حاضر بایستی مطالبی را در مورد چگونگی تاثیر قدرت یونی محلول بر فرآیند استخراج ذکر کرد، با افزایش مقدار نمک موجود در محیط، مولکول‌های آب بیشتری برای آب پوشی، نمک مصرف شده و در این صورت تمایل مولکول‌های آب برای حلال پوشی آنالیت کمتر شده و آنالیت راحت‌تر وارد فاز استخراج کننده می‌شود. اما از طرفی نیز با بالا رفتن قدرت یونی محلول، ویسکوزیته محلول بالا رفته حلال استخراج به خوبی در محلول نمونه پخش نمی‌شود. حال با در نظر گرفتن هدف از افزایش نمک و مطالب مذکور طبق روش ارائه شده در بخش ۳-۷ به بررسی اثر این پارامتر بر میزان استخراج مخلوط داروها پرداخته شد. در این بخش محدوده غلظتی (w/v) ۰-۹٪ از نمک پتاسیم نیترات جهت بررسی اثر قدرت یونی استفاده گردید. و همان طور که در جدول (۳-۱۱) و شکل (۳-۱۹) مشاهده می‌شود، با افزایش میزان نمک تا ۵ درصد سیگنال و درصد بازیابی افزایش و سپس کاهش می‌یابد. لذا در ادامه بررسی اثر پارامترها از ۰.۵٪ نمک  $KNO_3$  استفاده گردید.

جدول (۳-۱۱) نتایج حاصل از افزودن درصدهای مختلف از نمک  $KNO_3$

سرترالین		سیتالوپرام		درصد نمک افزوده شده
درصد بازبایی	سیگنال	درصد بازبایی	سیگنال	
۴۶/۰	۱۹۸۷/۷	۸۲/۴	۹۵۰/۹	%۰
۵۵/۰	۲۳۷۹/۴	۸۱/۲	۹۳۷/۶	%۱
۶۸/۲	۲۹۵۱/۱	۸۶/۲	۹۹۳/۶۷	%۲
۷۳/۳	۳۱۶۹/۲	۸۸/۲	۱۰۱۶/۱	%۳
۷۵/۰	۳۲۴۵/۴	۹۳/۶	۱۰۷۶/۹	%۴
۸۲/۷	۳۵۷۵/۶	۹۶/۴	۱۱۰۷/۹	%۵
۳۸/۴	۱۶۶۱/۲	۵۱/۰	۵۹۸/۸	%۶
۳۷/۳	۱۶۱۳/۵	۳۲/۵	۳۹۱/۱	%۷
۲۳/۰	۹۹۴/۱	۳۰/۵	۳۶۹/۴	%۹

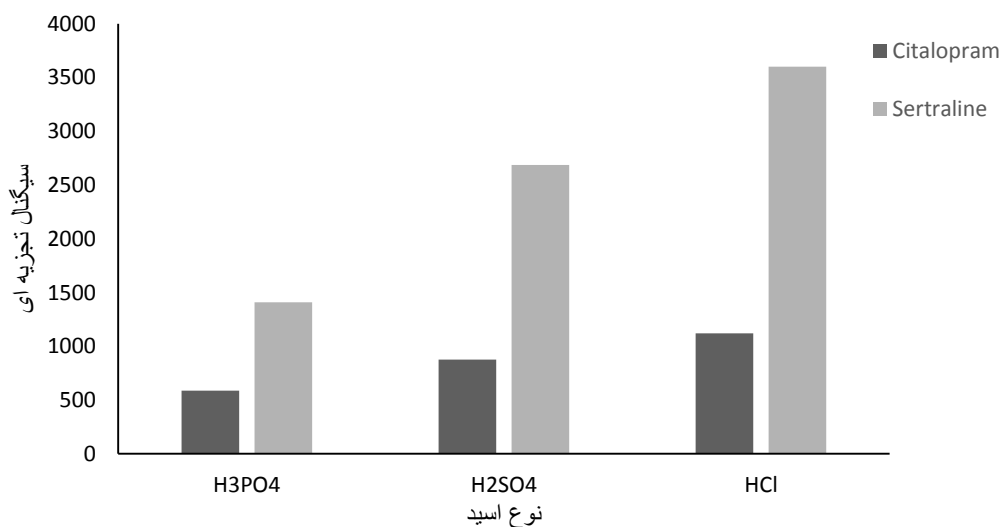


شکل (۳-۱۹) تاثیر قدرت یونی، شرایط عمل: مقدار نمونه ۱۰/۰ میلی لیتر (حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر آنالیت‌ها)، غلظت سدیم هیدروکسید ۰/۵۰ مولار، حلال استخراج کننده ۲۰۰ میکرولیتر دی کلرومتان، اسید مصرفی ۱۰۰ میکرولیتر هیدروکلریک اسید با غلظت ۰/۳۰ مولار، تعداد مکش سرنگ در مرحله اول ۷ و در مرحله دوم ۲۱ مرتبه، ۵ دقیقه سانتریفیوژ با سرعت ۳۰۰۰ rpm در هر دو مرحله

سپس به بررسی مجدد نوع اسید مصرفی که در بخش ۳-۸-۲ اشاره شد در حضور ۰.۵٪ نمک  $KNO_3$  پرداخته شد و همان طور که در جدول (۳-۱۲) و شکل (۳-۲۰) مشاهده می‌شود هیدروکلریک اسید با غلظت ۰/۳۰ مولار دارای بالاترین سیگنال و درصد بازیابی بود و به عنوان اسید بهینه انتخاب شد.

جدول (۳-۱۲) نتایج حاصل از بررسی نوع اسید در حضور ۰.۵٪ از نمک  $KNO_3$

سرتالین		سیتالوپرام		نوع اسید
درصد بازیابی	سیگنال	درصد بازیابی	سیگنال	
۸۳/۲	۳۶۰۱/۳	۹۷/۵	۱۱۲۰/۹	HCl
۶۲/۱	۲۶۸۷/۴	۷۵/۷	۸۷۶/۷	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
۳۲/۷	۱۴۱۰/۵	۵۰/۰	۵۸۸/۴	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>



شکل (۳-۲۰) تاثیر نوع اسید مصرفی، شرایط عمل: مقدار نمونه ۱۰/۰ میلی لیتر (حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر آنالیت‌ها)، غلظت سدیم هیدروکسید ۰/۵۰ مولار، تعداد سیکل مکش اولیه ۷ و مکش ثانویه ۲۱ مرتبه، حلال استخراج کننده ۲۰۰ میکرولیتر دی کلرومتان، حجم اسید مصرفی ۱۰۰ میکرولیتر با غلظت یون هیدروژن ۰/۳۰ مولار، ۰.۵٪ نمک  $KNO_3$ ، ۵دقیقه سانتریفیوژ با سرعت ۳۰۰۰rpm در هر دو مرحله

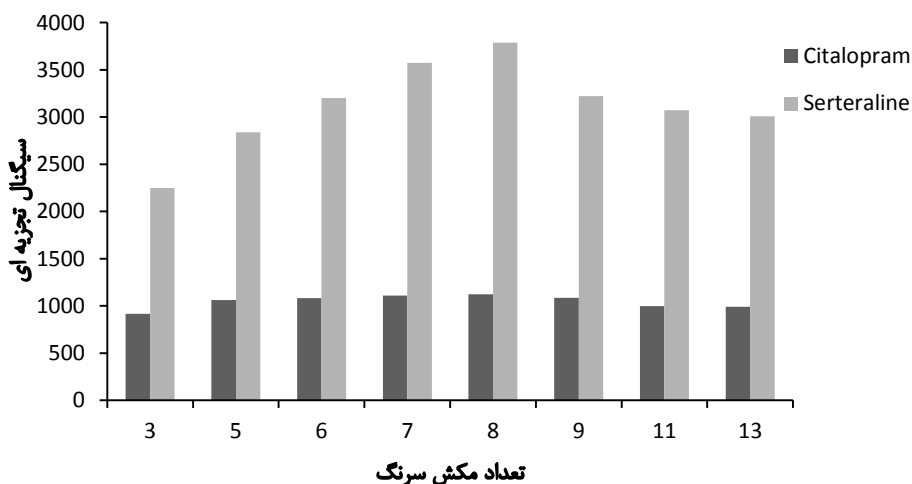
### ۳-۸-۷ تعداد سیکل مکش و تخلیه بوسیله سرنگ پس از افزودن حلال

#### آلی

این فاکتور اشاره به تعداد مکش و تخلیه مخلوط نمونه آبی و حلال آلی دارد که موجب پخش شدن حلال آلی در محلول نمونه آبی می شود. انجام این عمل سبب تبدیل حلال آلی به قطرات ریز شده و هم زمان با این عمل سطح تماس حلال با نمونه افزایش می یابد، بنابراین می توان پیش بینی نمود که با افزایش تعداد چرخه مکش درصد بازیابی افزایش می یابد و برای رسیدن به حالت تعادل بهینه سازی این فاکتور اهمیت دارد که در تعداد کم انجام سیکل، فرآیند تشکیل قطرات ریز و بالا رفتن سطح تماس به خوبی انجام نشده و در انجام بیش از تعداد بهینه سیکل احتمال حل شدن مقداری از حلال آلی در محلول آبی وجود دارد. و در تعداد مکش های بالاتر امکان جمع آوری کامل حلال وجود ندارد. لازم به ذکر است که این مرحله در مدت زمان کوتاه کمتر از یک دقیقه انجام می شود و هنگامی که تعداد سیکل مکش بیش از ده مرتبه باشد احتمال تبخیر حلال آلی وجود دارد [۷۲]. از این رو در روش میکرواستخراج مایع-مایع با کمک هوا این فاکتور به عنوان یک پارامتر مهم مورد بررسی قرار گرفت و همان طور که در جدول (۳-۱۰) و شکل (۳-۲۱) مشاهده می شود با افزایش تعداد سیکل مکش تا هشت مرتبه در صد بازیابی افزایش یافته و از آن پس با افزایش تعداد سیکل مکش بنا به دلیل احتمالی تبخیر حلال که گفته شد، درصد بازیابی آنالیت ها کاهش می یابد.

جدول (۳-۱۳) نتایج حاصل از بررسی تغییر تعداد سیکل مکش

سرترالین		سیتالوپرام		تعداد سیکل مکش سرنگ
درصد بازیابی	سیگنال	درصد بازیابی	سیگنال	
-	-	-	-	۰
۵۲/۰	۲۲۴۹/۲	۷۹/۳	۹۱۷/۰	۳
۶۵/۶	۲۸۳۸/۹	۹۲/۳	۱۰۶۲/۹	۵
۷۳/۹	۳۲۰۰/۱	۹۳/۹	۱۰۸۰/۵	۶
۸۲/۷	۳۵۷۵/۶	۹۶/۴	۱۱۰۷/۹	۷
۸۷/۶	۳۷۸۸/۱	۹۷/۶	۱۱۲۱/۵	۸
۷۴/۵	۳۲۲۲/۲	۹۴/۳	۱۰۸۴/۸	۹
۷۱/۰	۳۰۷۲/۷	۸۶/۴	۹۹۶/۷	۱۱
۶۹/۵	۳۰۰۶/۹	۸۵/۹	۹۹۰/۴	۱۳



شکل (۳-۲۱) تاثیر تعداد مکش سرنگ، شرایط عمل: مقدار نمونه ۱۰/۰ میلی لیتر (حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر آنالیت‌ها)، غلظت سدیم هیدروکسید ۰/۵۰ مولار، ۵٪ نمک  $KNO_3$ ، حلال استخراج کننده ۲۰۰ میکرولیتر دی کلرومتان، اسید مصرفی ۱۰۰ میکرولیتر هیدروکلریک اسید با غلظت ۰/۳۰ مولار، تعداد مکش سرنگ در مرحله دوم ۲۱ مرتبه، ۵ دقیقه سانتریفیوژ با سرعت ۳۰۰۰rpm در هر دو مرحله

### ۳-۸-۸ تعداد سیکل مکش و تخلیه بوسیله سرنگ پس از افزودن اسید به

#### حلال آلی

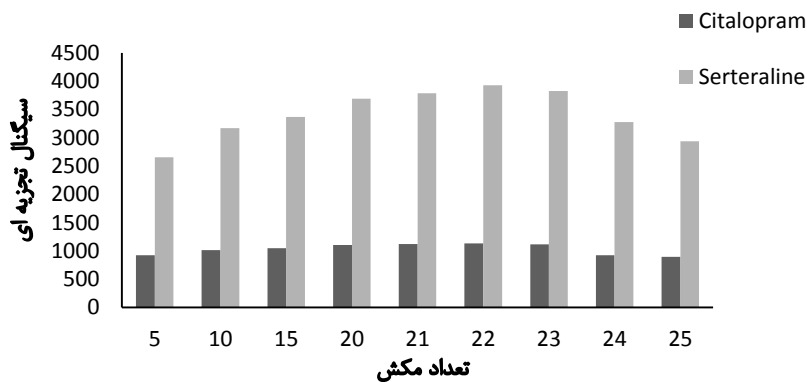
این فاکتور اشاره به تعداد مکش و تخلیه محلول اسیدی و حلال آلی دارد. بنا به دلایل یاد شده



در بخش ۳-۸-۷ بهینه سازی این فاکتور اهمیت دارد و به عنوان یک پارامتر مهم مورد بررسی قرار گرفت و همان طور که در شکل (۳-۲۲) و نتایج حاصل در جدول (۳-۱۴) مشاهده می شود با افزایش تعداد سیکل مکش تا ۲۲ مرتبه بر میزان درصد بازیابی افزوده می شود و از آن پس با افزودن تعداد سیکل مکش امکان جمع آوری کامل حلال استخراج برگشتی وجود ندارد.

جدول (۳-۱۴) نتایج حاصل از بررسی تغییر تعداد سیکل مکش در مرحله دوم

سرتالین		سیتالوپرام		تعداد سیکل مکش
درصد بازیابی	سیگنال	درصد بازیابی	سیگنال	
-	-	-	-	۰
۶۱/۴	۲۶۵۵/۹	۸۰/۱	۹۲۵/۳	۵
۷۳/۳	۳۱۷۱/۳	۸۹/۰	۱۰۱۴/۰	۱۰
۷۷/۹	۳۳۶۸/۹	۹۱/۳	۱۰۵۱/۱	۱۵
۸۵/۳	۳۶۹۱/۷	۹۶/۲	۱۱۰۶/۱	۲۰
۸۷/۶	۳۷۸۸/۱	۹۷/۶	۱۱۲۱/۵	۲۱
۹۰/۷	۳۹۲۵/۹	۹۸/۷	۱۱۳۴/۴	۲۲
۸۸/۵	۳۸۲۷/۷	۹۷/۲	۱۱۱۷/۲	۲۳
۷۵/۷	۳۲۷۶/۴	۷۹/۹	۹۲۳/۳	۲۴
۶۸/۰	۲۹۳۸/۵	۷۷/۴	۸۹۵/۲	۲۵



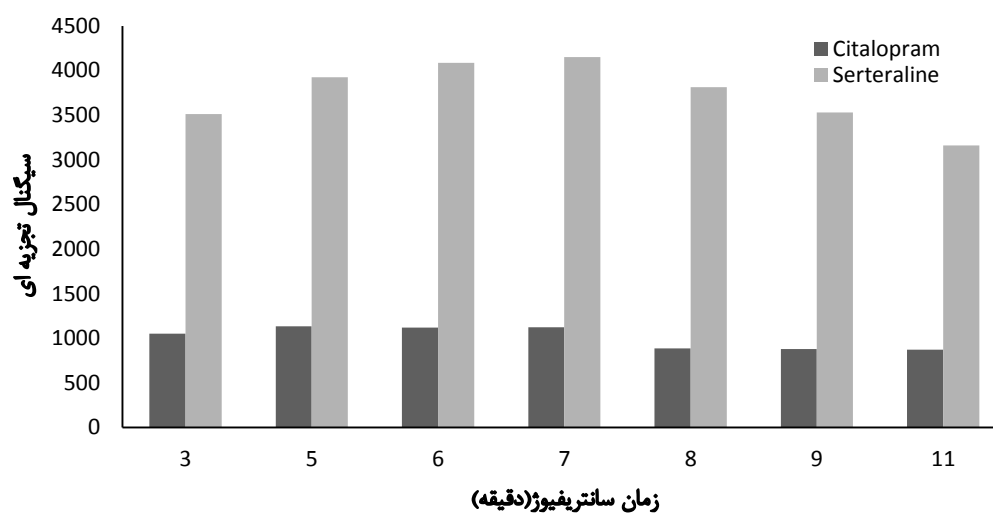
شکل (۳-۲۲) تاثیر تعداد مکش سرنگ، شرایط عمل: مقدار نمونه ۱۰/۰ میلی لیتر (حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر آنالیت‌ها)، غلظت سدیم هیدروکسید ۰/۵۰ مولار، ۵٪ نمک  $KNO_3$ ، حلال استخراج کننده ۲۰۰ میکرو لیتر دی کلرومتان، اسید مصرفی ۱۰۰ میکرو لیتر هیدروکلریک اسید ۰/۳۰ مولار، تعداد مکش سرنگ در مرحله اول ۸ مرتبه، ۵ دقیقه سانتریفیوژ با سرعت ۳۰۰۰ rpm در هر دو مرحله

### ۳-۸-۹ بهینه سازی زمان سانتریفیوژ

یکی دیگر از پارامترهای موثر بر بازده استخراج زمان سانتریفیوژ است. روش کار جهت انجام آزمایش مطابق روش ارائه شده در بخش (۳-۷) است به طوری که زمان سانتریفیوژ در هر دو مرحله در محدوده ۱۱-۳ دقیقه مورد بررسی قرار گرفت. سانتریفیوژ موجب شکستن محیط امولسیون و سرعت بخشیدن به جدایی فازها به منظور جداسازی محلول حاوی آنالیت استخراج شده می شود. نتایج حاصل در جدول (۳-۱۵) و شکل (۳-۲۳) نشان می دهد که بازده استخراج با افزایش زمان سانتریفیوژ تا ۷ دقیقه افزایش یافته و از آن پس کاهش می یابد. بنابراین ۷ دقیقه به عنوان زمان سانتریفیوژ در مرحله اول در نظر گرفته شد. در مرحله دوم به همین ترتیب عمل شد و با توجه به نتایج جدول (۳-۱۶) و شکل (۳-۲۴)، ۶ دقیقه به عنوان زمان بهینه سانتریفیوژ در مرحله دوم انتخاب شد.

جدول (۳-۱۵) نتایج حاصل از تغییر زمان سانتریفیوژ در مرحله اول

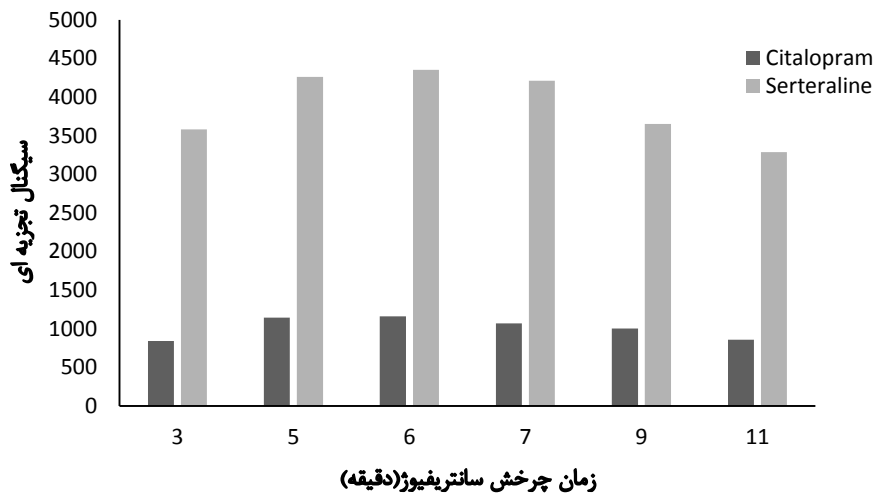
سرترالین		سیتالوپرام		زمان سانتریفیوژ
درصد بازیابی	سیگنال	درصد بازیابی	سیگنال	
۸۱/۲	۳۵۱۲/۵	۹۱/۴	۱۰۵۱/۹	۳
۹۰/۷	۳۹۲۵/۹	۹۸/۷	۱۱۳۴/۴	۵
۹۴/۵	۴۰۸۷/۱	۹۷/۳	۱۱۱۸/۸	۶
۹۶/۰	۴۱۵۰/۵	۹۷/۵	۱۱۲۰/۸	۷
۸۸/۲	۳۸۱۳/۹	۷۶/۵	۸۸۵/۳	۸
۸۱/۲	۳۵۲۹/۲	۷۵/۸	۸۷۷/۱	۹
۷۳/۱	۳۱۵۹/۹	۷۵/۳	۸۷۱/۹	۱۱



شکل (۳-۲۳) تاثیر میزان زمان سانتریفیوژ در مرحله اول، شرایط عمل: مقدار نمونه ۱۰/۰ میلی لیتر (حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر آنالیت‌ها)، غلظت سدیم هیدروکسید ۰/۵۰ مولار، ۵٪ نمک  $KNO_3$ ، حلال استخراج کننده ۲۰۰ میکرولیتر دی کلرومتان، اسید مصرفی ۱۰۰ میکرولیتر هیدروکلریک اسید ۰/۳۰ مولار، تعداد مکش سرنگ در مرحله اول ۸ مرتبه و مرحله دوم ۲۲ مرتبه، ۵ دقیقه سانتریفیوژ در مرحله دوم در هردو مرحله با سرعت ثابت ۳۰۰۰ rpm

جدول (۳-۱۶) نتایج حاصل از تغییر زمان سانتریفیوژ مرحله دوم

سرترالین		سیتالوپرام		زمان چرخش سانتریفیوژ (دقیقه)
درصد بازیابی	سیگنال	درصد بازیابی	سیگنال	
۸۲/۸	۳۵۸۲/۹	۷۲/۶	۸۴۱/۷	۳
۹۸/۵	۴۲۶۱/۶	۹۹/۶	۱۱۴۴/۷	۵
۱۰۰/۰	۴۳۵۴/۳	۱۰۰/۰	۱۱۶۲/۰	۶
۹۷/۳	۴۲۱۱/۷	۹۳/۱	۱۰۷۱/۹	۷
۸۴/۴	۳۶۵۰/۹	۸۷/۰	۱۰۰۲/۴	۹
۷۶/۰	۳۲۸۷/۷	۷۴/۲	۸۵۹/۹	۱۱



شکل (۳-۲۴) تاثیر زمان سانتریفیوژ در مرحله دوم، شرایط عمل: مقدار نمونه ۱۰/۰ میلی لیتر (حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر آنالیت‌ها)، غلظت سدیم هیدروکسید ۰/۵۰ مولار، ۵٪ نمک  $KNO_3$ ، حلال استخراج کننده ۲۰۰ میکرولیتر دی کلرومتان، اسید مصرفی ۱۰۰ میکرولیتر هیدروکلریک اسید ۰/۳۰ مولار، تعداد مکش سرنگ در مرحله اول ۸ مرتبه و مرحله دوم ۲۲ مرتبه، ۷ دقیقه سانتریفیوژ در مرحله اول با سرعت ۳۴۰۰ rpm و مرحله دوم با سرعت ثابت ۳۰۰۰ rpm

### ۳-۸-۱۰ بهینه سازی سرعت چرخش سانتریفیوژ

یکی دیگر از پارامترهای موثر دور چرخش سانتریفیوژ است که طبق روش ارائه شده در بخش

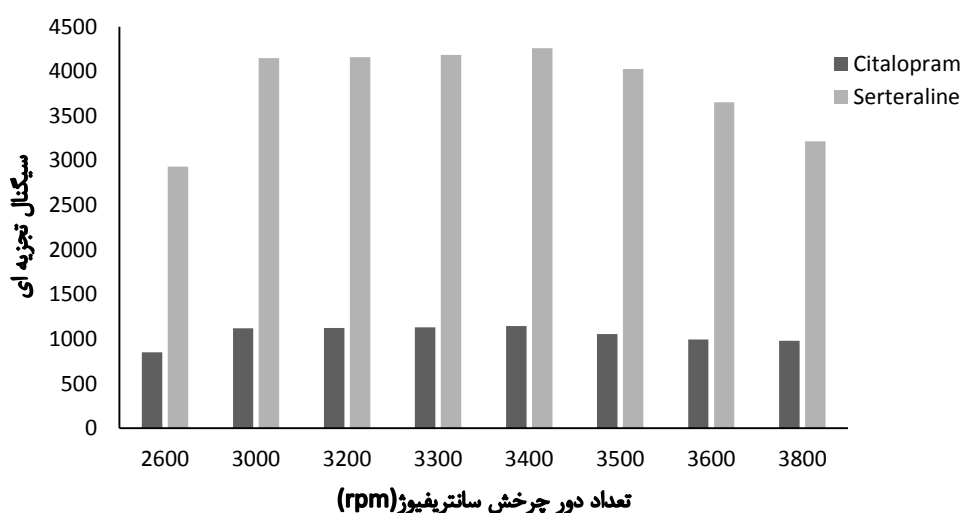
(۳-۷) دور چرخش سانتریفیوژ در هر دقیقه در مرحله اول در محدوده ۲۶۰۰-۳۸۰۰ و در مرحله دوم

۲۸۰۰-۳۶۰۰ بعد از بهینه کردن زمان سانتریفیوژ در هر مرحله مورد بررسی قرار گرفت که با توجه به

نتایج نشان داده شده در جدول (۱۷-۳) و شکل (۳-۲۵) تعداد ۳۴۰۰rpm به عنوان تعداد چرخش بهینه سانتریفیوژ در مرحله اول و با توجه به نتایج موجود در جدول (۳-۱۸) و شکل (۳-۲۶) تعداد ۳۰۰۰rpm به عنوان تعداد چرخش بهینه در مرحله دوم انتخاب شد در سرعت چرخش پایین تر امکان جدایی دو فاز به طور کامل وجود نداشت.

جدول (۱۷-۳) نتایج حاصل از تغییر سرعت چرخش سانتریفیوژ در مرحله اول

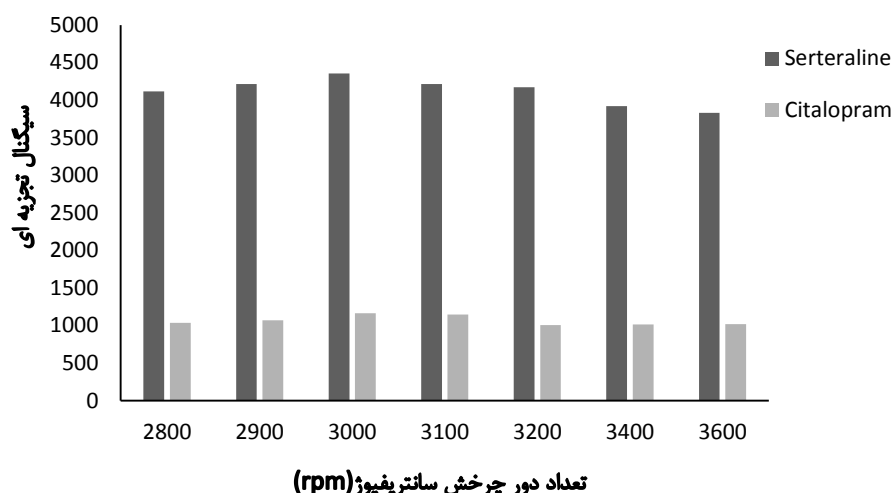
سرترین		سیتالوپرام		تعداد دورهای چرخش (rpm)
درصد بازیابی	سیگنال	درصد بازیابی	سیگنال	
۶۷/۸	۲۹۳۳/۵	۷۳/۴	۸۵۰/۷	۲۶۰۰
۹۵/۹	۴۱۵۰/۵	۹۷/۵	۱۱۲۰/۸	۳۰۰۰
۹۶/۱	۴۱۵۹/۸	۹۷/۸	۱۱۲۴/۳	۳۲۰۰
۹۶/۷	۴۱۸۳/۷	۹۸/۴	۱۱۳۱/۵	۳۳۰۰
۹۸/۵	۴۲۶۱/۶	۹۹/۶	۱۱۴۴/۷	۳۴۰۰
۹۳/۱	۴۰۲۵/۸	۹۱/۷	۱۰۵۵/۳	۳۵۰۰
۸۴/۴	۳۶۵۲/۴	۸۶/۴	۹۹۶/۲	۳۶۰۰
۷۴/۳	۳۲۱۴/۵	۸۴/۹	۹۷۹/۰	۳۸۰۰



شکل (۳-۲۵) تاثیر تعداد دورهای چرخش سانتریفیوژ در دقیقه در مرحله اول، شرایط عمل: مقدار نمونه ۱۰/۰ میلی لیتر (حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر آنالیتها)، غلظت سدیم هیدروکسید ۰/۵۰ مولار، ۰/۵٪ نمک  $KNO_3$ ، حلال استخراج کننده ۲۰۰ میکرولیتر دی کلرومتان، اسید مصرفی ۱۰۰ میکرولیتر هیدروکلریک اسید ۰/۳۰ مولار، تعداد مکش سرنگ در مرحله اول ۸ مرتبه و در مرحله دوم ۲۲ مرتبه، ۵ دقیقه سانتریفیوژ در مرحله دوم با سرعت ثابت ۳۰۰۰ rpm

جدول (۳-۱۸) نتایج حاصل از تغییر سرعت چرخش سانتریفیوژ

سرتالین		سیتالوپرام		تعداد دورهای سانتریفیوژ (rpm)
درصد بازیابی	سیگنال	درصد بازیابی	سیگنال	
۹۵/۲	۴۱۱۷/۴	۸۹/۸	۱۰۳۴/۵	۲۸۰۰
۹۷/۴	۴۲۱۳/۹	۹۳/۱	۱۰۷۱/۸	۲۹۰۰
۱۰۰/۰	۴۳۵۴/۳	۱۰۰/۰	۱۱۶۲/۰	۳۰۰۰
۹۷/۵	۴۲۱۶/۹	۹۹/۸	۱۱۴۶/۷	۳۱۰۰
۹۶/۴	۴۱۷۱/۲	۸۷/۲	۱۰۰۵/۲	۳۲۰۰
۹۰/۷	۳۹۲۲/۶	۸۷/۹	۱۰۱۳/۲	۳۴۰۰
۸۸/۶	۳۸۳۱/۱	۸۸/۴	۱۰۱۹/۰	۳۶۰۰



شکل (۳-۲۶) تاثیر تعداد دورهای چرخش سانتریفیوژ در دقیقه در مرحله دوم، شرایط عمل: مقدار نمونه ۱۰/۰ میلی‌لیتر (حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر آنالیت‌ها)، غلظت سدیم هیدروکسید ۰/۵۰ مولار، نمک  $KNO_3$ ، حلال استخراج‌کننده ۲۰۰ میکرولیتر دی‌کلرومتان، اسید مصرفی ۱۰۰ میکرولیتر هیدروکلریک اسید ۰/۳۰ مولار، تعداد مکش سرنگ در مرحله اول ۸ مرتبه و در مرحله دوم ۲۲ مرتبه، ۷ دقیقه سانتریفیوژ در مرحله اول با سرعت ثابت ۳۴۰۰ rpm و ۶ دقیقه سانتریفیوژ در مرحله دوم

### ۳-۸-۱۱ نتایج حاصل از بهینه‌سازی یک متغیر در زمان

نتایج به دست آمده در بررسی و بهینه‌سازی پارامترهای موثر بر روی میزان استخراج به روش

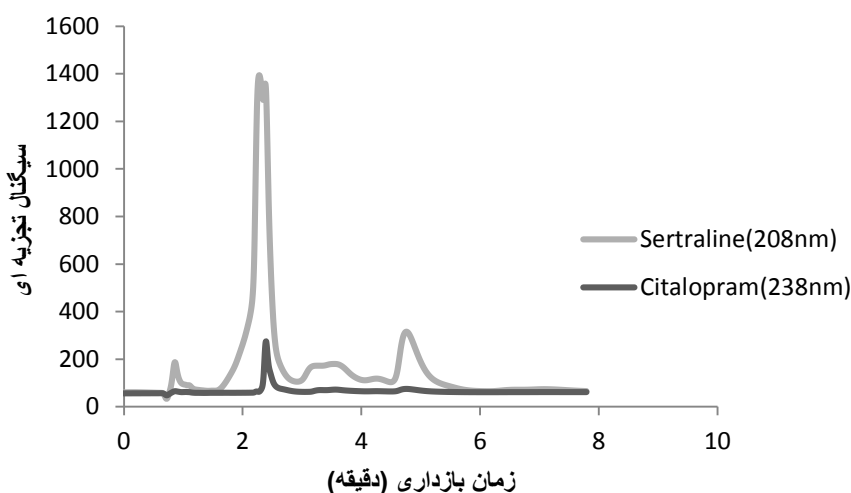
یک متغیر در زمان در جدول (۳-۱۹) و کروماتوگرام استخراج محلول ۱/۰ میلی‌گرم بر لیتر داروهای

مورد مطالعه در شکل (۳-۲۷) در شرایط بهینه در آورده شده است.

جدول (۳-۱۹) نتایج حاصل از بهینه‌سازی یک متغیر در زمان

مقدار بهینه	پارامتر
۰/۵۰ مولار سود	غلظت محلول بازی
۰/۳۰ مولار	غلظت محلول اسیدی
هیدروکلریک اسید	نوع اسید
۱۰۰	حجم اسید (میکرولیتتر)
دی کلرومتان	نوع حلال آلی
۲۰۰	حجم حلال آلی (میکرولیتتر)
۵/۰	قدرت یونی (درصد)
۷	زمان سانتریفیوژ اول (دقیقه)
۳۴۰۰	تعداد دور چرخش سانتریفیوژ مرحله اول (rpm)
۶	زمان سانتریفیوژ دوم (دقیقه)
۳۰۰۰	تعداد دور چرخش سانتریفیوژ مرحله دوم (rpm)





شکل (۳-۲۷) کروماتوگرام استخراج محلول ۱/۰ میلی گرم بر لیتر داروها در شرایط بهینه: مقدار نمونه ۱۰/۰ میلی لیتر (حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر آنالیت‌ها)، غلظت سدیم هیدروکسید ۰/۵۰ مولار، ۰/۵٪ نمک  $KNO_3$ ، حلال استخراج کننده ۲۰۰ میکرولیتر دی کلرومتان، اسید مصرفی ۱۰۰ میکرولیتر هیدروکلریک اسید ۰/۳۰ مولار، تعداد مکش اولیه هشت مرتبه، ۷ دقیقه سانتریفیوژ با سرعت ۳۴۰۰ rpm در مرحله اول و تعداد مکش ثانویه ۲۲ مرتبه، ۶ دقیقه سانتریفیوژ با سرعت ۳۰۰۰ rpm در مرحله دوم، سرتالین (SER) در ۲۰۸ نانومتر و سیتالوپرام (CIT) در ۲۳۸ نانومتر، فاز متحرک (ترکیب بافر فسفاتی با pH برابر با ۵/۵، استونیتریل با نسبت ۱:۱) سرعت جریان فاز متحرک ۱/۰۰ میلی لیتر در دقیقه، در دمای محیط، ستون  $C_{18}$  (۴/۶×۱۵۰ میلی متر با اندازه ذرات ۵ میکرومتر)

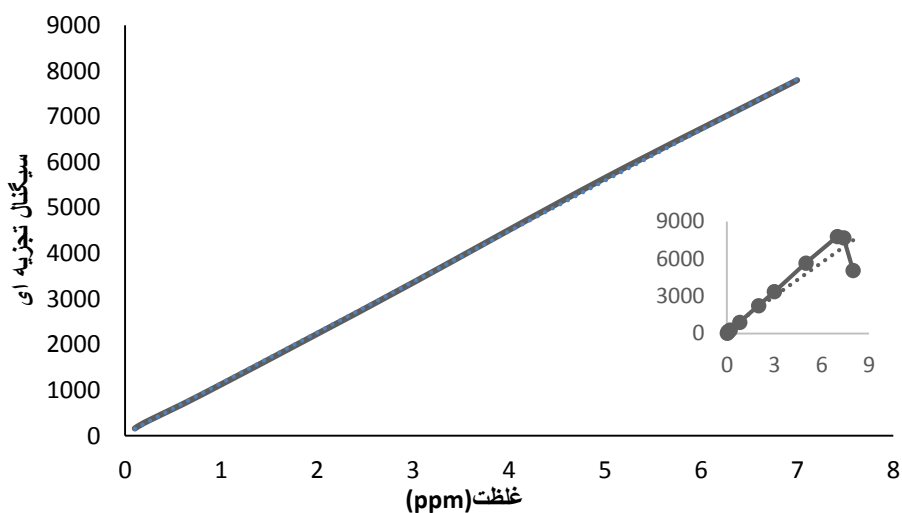
### ۳-۹ رسم منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ

پس از دستیابی به شرایط بهینه استخراج داروهای سیتالوپرام و سرتالین، منحنی کالیبراسیون این داروها در غلظت‌های مختلف به دست آمدند. بدین منظور محلول‌های ۱۰۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر سیتالوپرام و سرتالین به ترتیب در آب و متانول جداگانه تهیه شدند و مخلوط داروها با غلظت‌های ۰/۰۱ تا ۸/۰۰ میلی گرم بر لیتر طی چند مرحله رقیق سازی تهیه شدند و در شرایط بهینه که در جدول (۳-۱۹) آمده است عمل استخراج مطابق با روش ذکر شده در بخش (۳-۷) روی آن‌ها انجام شد. نتایج حاصل برای رسم منحنی‌های کالیبراسیون پیش تغلیظ در جدول (۳-۲۰) آورده شده است. شکل (۳-۲۸) و شکل (۳-۲۹) به ترتیب منحنی‌های کالیبراسیون برای سیتالوپرام و سرتالین را نشان می‌دهند. نتایج حاصل از این شکل‌ها در جدول (۳-۲۱) آورده شده است. در معادلات ارائه شده، Y

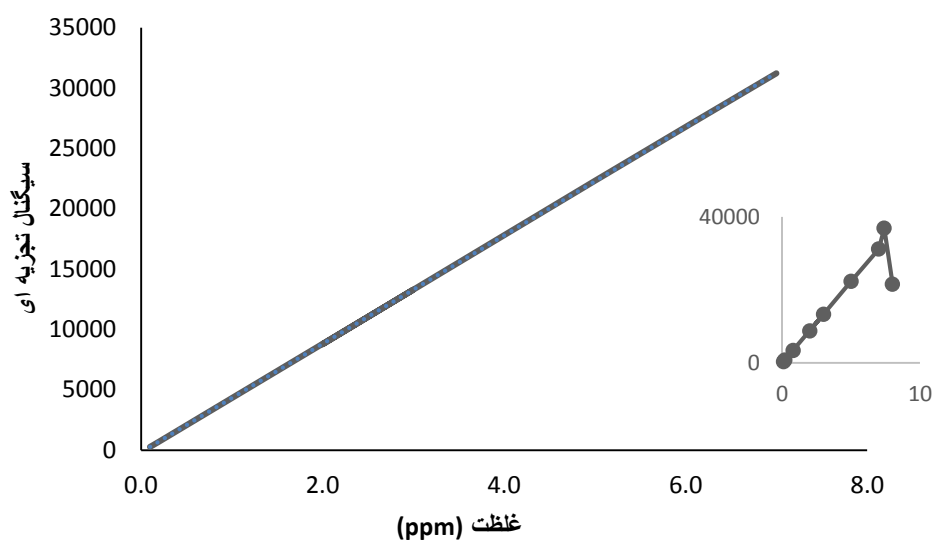
مساحت سطح زیر پیک (سیگنال تجزیه ای) برای هر دو دارو، X غلظت هر دارو بر حسب میلی گرم بر لیتر و  $R^2$  ضریب همبستگی است.

جدول (۳-۲۰) نتایج حاصل از کالیبراسیون پیش تغلیظ سیتالوپرام و سرتالین

سیگنال	غلظت سرتالین (میلی گرم بر لیتر)	سیگنال	غلظت سیتالوپرام (میلی گرم بر لیتر)
۲۸۳/۲	۰/۱	۱۵۸/۸	۰/۱
۷۱۷/۲	۰/۲	۲۸۵/۴	۰/۲
۳۴۱۷/۳	۰/۸	۹۰۷/۰	۰/۸
۱۳۲۹۵/۷	۲/۰	۲۲۳۳/۹	۲/۰
۸۷۷۳/۱	۳/۰	۳۳۵۸/۷	۳/۰
۲۲۳۰۴/۵	۵/۰	۵۶۵۳/۷	۵/۰
۳۱۲۰۶/۳	۷/۰	۷۷۹۶/۴	۷/۰
۳۶۹۰۸/۱	۷/۴	۷۶۸۷/۰	۷/۴
۲۱۵۸۰/۸	۸/۰	۵۰۶۷/۶	۸/۰



شکل (۳-۲۸) منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ سیتالوپرام



شکل (۳-۲۹) منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ سرتالین

جدول (۳-۲۱) نتایج حاصل از کالیبراسیون پیش تغلیظ مخلوط داروها

طول موج (نانومتر)	ناحیه خطی (میلی گرم بر لیتر)	R <sup>2</sup>	معادله کالیبراسیون	نوع دارو
۲۳۸	۰/۱-۷/۰	۰/۹۹۹۹	$Y=1111/6X+39/074$	سیتالوپرام
۲۰۸	۰/۱-۷/۰	۰/۹۹۹۹	$Y=4486/7X-173/22$	سرتالین

### ۱۰-۳ بررسی اثر گونه‌های مزاحم

برای بررسی قابلیت کاربرد روش میکرواستخراج مایع-مایع پخش‌متوالی، اندازه‌گیری سیتالوپرام و سرتالین در نمونه‌های حقیقی، اثر مزاحمت‌های احتمالی در پیش‌تغلیظ این داروها و اندازه‌گیری آن‌ها با استفاده از HPLC مورد استفاده قرار گرفت. روش کار در این بررسی به صورت زیر

بود:

ابتدا سیگنال محلول ۱/۰ میلی گرم بر لیتر داروهای سیتالوپرام و سرتالین تحت شرایط بهینه و در غیاب یون‌های مزاحم اندازه‌گیری شد. این کار ۳ بار تکرار شد و میانگین سیگنال‌ها و انحراف استاندارد آنها محاسبه شد. محدوده قابل قبول برای نوسان سیگنال تجزیه‌ای، با توجه به رابطه  $\bar{A} \pm 3S_A$  که در این رابطه  $\bar{A}$  میانگین و  $S_A$  انحراف استانداردهای سیگنال‌های تجزیه‌ای اندازه‌گیری شده به دست آمد. برای بررسی اثر مزاحمت احتمالی هر گونه با نسبت ۱۰۰۰ برابر وزنی-حجمی نسبت به سیتالوپرام و سرتالین به محلول اولیه اضافه شد. سپس عمل استخراج انجام گرفت و سیگنال تجزیه‌ای مربوط به هر دارو به دست آمد. اگر سیگنال تجزیه‌ای به دست آمده در حضور گونه مورد نظر در دامنه  $\bar{A} \pm 3S_A$  قرار گیرد به این معنا است که گونه مورد نظر با نسبت موجود مزاحم نیست. در غیر این صورت نسبت وزنی-حجمی گونه مزاحم آنقدر کاهش داده شد تا سیگنال تجزیه‌ای در دامنه  $\bar{A} \pm 3S_A$  قرار گیرد. نتایج حاصل این بررسی برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری سرتالین و سیتالوپرام به ترتیب در جدول (۳-۲۲) و جدول (۳-۲۳) نشان می‌دهد که گونه‌های مورد بررسی مزاحمتی برای استخراج و اندازه‌گیری داروهای مورد مطالعه ندارند و روش پیشنهادی یک روش گزینش پذیر می‌باشد. داروی کلرو دیازپوکساید که از گروه بنزودیازپین‌ها و جز داروهای افسردگی می‌باشد به علت داشتن  $pK_a$  اسیدی برابر با ۴/۶ [۷۳] در محیط بازی رسوب می‌دهد و مزاحمت آن رفع نشد و داروی آلپرازولام هم با  $pK_a$  اسیدی برابر با ۲/۸ [۷۴]، به همین علت در ۱۰ برابر نسبت وزنی-حجمی مزاحمتش رفع شد.

جدول (۲۲-۳) نتایج حاصل از بررسی اثر گونه‌های مزاحم در پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری سرتالین با غلظت ۱/۰ میلی گرم بر لیتر

نسبت غلظت گونه به غلظت سرتالین	گونه‌های مورد بررسی
۱۰۰۰	ساکارز، فروکتوز
۷۰۰	گلوکز
۵۰۰	متیونین، B <sub>3</sub>
۴۰۰	B <sub>6</sub> ، B <sub>1</sub>
۳۰۰	اوریک اسید، اوره، تیواوره
۱۰	آپرازولام

جدول (۲۳-۳) نتایج حاصل از بررسی اثر گونه‌های مزاحم در پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری سیتالوپرام با غلظت ۱/۰ میلی گرم بر لیتر

نسبت غلظت گونه به غلظت سیتالوپرام	گونه‌های مورد بررسی
۱۰۰۰	ساکارز، فروکتوز
۷۰۰	گلوکز
۵۰۰	B <sub>3</sub> ، متیونین
۴۰۰	B <sub>1</sub> ، B <sub>6</sub>
۳۰۰	اوریک اسید، اوره
۱۰۰	متیونین، تیواوره
۱۰	آپرازولام

### ۱۱-۳ ارقام شایستگی اندازه‌گیری سیتالوپرام و سرتالین

ارقام شایستگی روش، نظیر حد تشخیص (LOD)، گستره خطی (LR)، و دقت و صحت روش در استخراج سیتالوپرام و سرتالین، توسط روش TDLLME و اندازه‌گیری آن‌ها با HPLC-UV در این قسمت بررسی خواهد شد. حد تشخیص یک روش، حداقل غلظت یا وزنی از آنالیت است که می‌تواند با سطح اطمینان مشخص آشکارسازی شود. برای محاسبه حد تشخیص از رابطه (۲-۳)

استفاده خواهد شد.

$$LOD = \frac{KS_{bl}}{m}$$

رابطه (۲-۳)

$S_{bl}$  = انحراف استاندارد شاهد

$m$  = شیب منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ

$K$  = ضریب اطمینان

بر طبق استدلال کزیر، مقدار منطقی و قابل قبول برای این ضریب ثابت عدد  $k = 3/0$  است [۳۳].

با ۵ بار اندازه گیری تکراری روی محلول شاهد (فاقد سیتالوپرام و سرتالین) طبق شرایط بهینه، و پس از محاسبه انحراف استاندارد نمونه شاهد و مشخص بودن شیب منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ برای هریک از داروها، می توان با استفاده از رابطه (۲-۳)، مقدار حد تشخیص روش را برای سیتالوپرام و سرتالین به دست آورد که در جدول (۳-۲۴) آورده شده است.

جدول (۳-۲۴) حد تشخیص روش

حد تشخیص (میلی گرم بر لیتر)	انحراف استاندارد سیگنال شاهد ( $S_{bl}$ )	ترکیب
۰/۰۱	۲/۳	سیتالوپرام
۰/۰۰۲	۲/۷	سرتالین

### ۳-۱۱-۱ دقت و صحت روش

برای بررسی دقت و صحت روش، محلول‌هایی حاوی غلظت‌های متفاوتی از مخلوط سیتالوپرام و سرتالین در محدوده دامنه خطی منحنی کالیبراسیون انتخاب و در شرایط بهینه عمل استخراج بر روی آن‌ها انجام گرفت. برای هر یک از غلظت‌های انتخاب شده، ۴ بار اندازه‌گیری تکراری انجام گرفت

و با استفاده از سیگنال‌های تجزیه‌ای به دست آمده برای هر نمونه و معادله منحنی کالیبراسیون پیش‌تغلیظ، غلظت معادل با هر سیگنال تجزیه‌ای محاسبه شد، سپس انحراف استاندارد نسبی (RSD) برای هر غلظت طبق رابطه (۳-۳) محاسبه گردید.

$$\%RSD = \frac{S_c}{\bar{c}} \times 100 \quad \text{رابطه (۳-۳)}$$

در این رابطه  $S_c$ ، انحراف استاندارد غلظت و  $\bar{c}$ ، میانگین غلظت می‌باشد. نتایج حاصل در جدول (۳-۲۵) برای سیتالوپرام و سرتالین نشان داده شده است. با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان گفت که روش مذکور دارای دقت و صحت قابل قبولی می‌باشد. مقدار  $t$  بحرانی در سطح اطمینان ۹۵٪ برای ۴ اندازه‌گیری و ۳ درجه آزادی، ۳/۱۸ می‌باشد. مقدار  $t$  از رابطه (۴-۳) به دست می‌آید:

$$t = \frac{X - \mu}{S} \sqrt{n} \quad \text{رابطه (۴-۳)}$$

در این رابطه  $X$  مقدار غلظت اندازه‌گیری شده،  $\mu$  مقدار واقعی یا اولیه برای هر غلظت،  $S$  انحراف استاندارد مربوط به چهار اندازه‌گیری تکراری و  $n$  تعداد تکرارها می‌باشد.

جدول (۳-۲۵) بررسی دقت و صحت در شرایط منحنی کالیبراسیون سیتالوپرام و سرتالین

درصد بازایی	مقدار $t^*$	RSD% (n=4)	غلظت دارو اندازه‌گیری شده (میلی‌گرم بر لیتر) $\pm$ (انحراف استاندارد)	غلظت دارو موجود در محلول آبی (میلی‌گرم بر لیتر)	نوع دارو
۱۰۰/۰	۰/۰	۴/۰	۰/۵۰ $\pm$ ۰/۰۲	۰/۵۰	سیتالوپرام
۱۰۲/۰	۰/۸۰	۴/۹	۱/۰۲ $\pm$ ۰/۰۵	۱/۰	
۱۰۰/۰	۱/۰۰	۰/۷	۲/۹۹ $\pm$ ۰/۰۲	۳/۰	
۱۰۰/۰	۰/۰۰	۲/۰	۰/۵۰ $\pm$ ۰/۰۱	۰/۵۰	سرتالین
۱۰۰/۰	۰/۰۰	۱/۰	۱/۰۰ $\pm$ ۰/۰۱	۱/۰	
۹۹/۰	۱/۵۰	۱/۳	۲/۹۷ $\pm$ ۰/۰۴	۳/۰	

\* مقدار  $t$  بحرانی در سطح اطمینان ۹۵ درصد برای سه درجه آزادی برابر ۳/۱۸ می‌باشد.

### ۳-۱۲ فاکتور پیش تغلیظ<sup>۱</sup>

فاکتور پیش تغلیظ (PF)، به صورت نسبت شیب منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ بر شیب منحنی کالیبراسیون مستقیم تعریف می‌شود [۷۵] که در رابطه (۳-۵)،  $m_1$  شیب منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ و  $m_2$  شیب منحنی کالیبراسیون مستقیم است. که محاسبه شده است، مقدار فاکتور پیش تغلیظ برای سیتالوپرام و سرتالین، به ترتیب ۹۹/۱ و ۱۰۰/۰ به دست آمد.

$$PF = \frac{m_1}{m_2} \quad \text{رابطه (۳-۵)}$$

### ۳-۱۳ اندازه گیری سیتالوپرام و سرتالین در نمونه‌های حقیقی

برای بررسی کارایی روش پیشنهادی به منظور استفاده در نمونه‌های حقیقی با بافت‌های مختلف، این روش برای پیش تغلیظ، جداسازی و اندازه گیری سیتالوپرام و سرتالین در نمونه قرص تک داروها، پلاسما و آب شهر با اعمال شرایط بهینه به کار گرفته شد.

### ۳-۱۳-۱ اندازه گیری داروها در نمونه قرص

به منظور بررسی توانایی روش پیشنهادی برای استفاده در نمونه‌های حقیقی با بافت‌های مختلف، این روش برای پیش تغلیظ و اندازه گیری سیتالوپرام و سرتالین در قرص، آب شهر و سرم به کار برده شد. برای اندازه گیری آنالیت در نمونه قرص سیتالوپرام، پنج عدد قرص سیتالوپرام (هر قرص حاوی ۲۰/۰ میلی گرم ماده مؤثر است) توزین شد و پس از آنکه در هاون عقیق پودر و همگن گردید، یک چهارم آن معادل ۲۵/۰ میلی گرم ماده مؤثر سیتالوپرام است در بالن حجمی ۲۵/۰ میلی لیتری با متانول حل و به حجم رسانده شد. سپس ۱/۰ میلی لیتر از آن به بالن ۱۰/۰ میلی لیتری منتقل و با آب مقطر به حجم رسانده شد. از این محلول، ۲/۵ میلی لیتر به بالن ۵/۰ میلی لیتری منتقل و با آب مقطر

<sup>۱</sup> Preconcentration factor



به حجم رسانده شد. ۱/۰ میلی لیتر از این محلول را برداشته و در بالن ۱۰/۰ میلی لیتری با آب مقطر به حجم رسانده و سپس ۱/۰ میلی لیتر از این محلول را برداشته و در بالن ۱۰/۰ میلی لیتری به حجم رسانده شد. بنابراین در این مرحله محلول نمونه حاوی ۰/۵۰ میلی گرم بر لیتر از قرص سیتالوپرام خواهد بود. سپس به روش افزایش استاندارد مورد آنالیز قرار گرفت. عمل استخراج تحت شرایط بهینه انجام شد و نتیجه آن ثبت گردید. در مراحل بعدی ۱/۰ میلی لیتر از غلظت‌های ۵/۰، ۱۰/۰، ۱۵/۰ میلی گرم بر لیتر از محلول استاندارد دارو به ظرف نمونه حاوی ۰/۵۰ میلی گرم بر لیتر نمونه قرص سیتالوپرام افزوده و استخراج و آنالیز تحت شرایط بهینه انجام پذیرفت. هر اندازه‌گیری سه بار تکرار گردید. نتایج با استفاده از روش افزایش استاندارد به دست آمده است. نتایج نمونه قرص در جدول (۳-۲۶) نشان می‌دهد که درصد بازیابی برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری سیتالوپرام در نمونه قرص در گستره ۱۰۱/۲-۱۰۰/۱ می‌باشد.

برای اندازه‌گیری آنالیت در نمونه قرص سرترالین، دو عدد قرص سرترالین (هر قرص حاوی ۵۰/۰ میلی گرم ماده مؤثر است) توزین شد و پس از آنکه در هاون عقیق پودر و همگن گردید، یک چهارم آن معادل ۲۵/۰ میلی گرم ماده مؤثر سرترالین است در بالن حجمی ۲۵ میلی لیتری با متانول حل و به حجم رسانده شد. سپس ۱/۰ میلی لیتر از آن به بالن ۱۰/۰ میلی لیتری منتقل و با آب مقطر به حجم رسانده شد. از این محلول، ۲/۵ میلی لیتر به بالن ۵/۰ میلی لیتری منتقل و با آب مقطر به حجم رسانده شد. ۱/۰ میلی لیتر از این محلول را برداشته و در بالن ۱۰/۰ میلی لیتری با آب مقطر به حجم رسانده و سپس ۱/۰ میلی لیتر از این محلول را برداشته و در بالن ۱۰/۰ میلی لیتری به حجم رسانده شد. این محلول به روش افزایش استاندارد مورد آنالیز قرار گرفت. بنابراین در این مرحله محلول نمونه حاوی ۰/۵۰ میلی گرم بر لیتر از قرص سرترالین خواهد بود. برای بررسی کارایی روش در نمونه قرص سرترالین، مانند قرص سیتالوپرام عمل شد، که نتایج در جدول (۳-۲۶) آمده است.

با توجه به مقادیر  $t$  و  $RSD$ ، در جدول (۳-۲۶) استفاده از روش پیشنهادی در نمونه‌های

قرص‌های سیتالوپرام و سرتالین با دقت و صحت خوبی قابل استفاده می‌باشد.

جدول (۳-۲۶) نتایج حاصل از اندازه‌گیری سیتالوپرام و سرتالین در نمونه‌های قرص

میلی گرم دارو در یک قرص	RSD% (n=3)	درصد بازیابی	مقدار $t^*$	غلظت دارو اضافه شده (میلی گرم بر لیتر)	غلظت اندازه‌گیری شده (میلی گرم بر لیتر)	آنالیت
۱۹/۶	۲/۰	-	۱/۷۳	۰/۴۹±۰/۰۱	۰/۰	سیتالوپرام
	۲/۰	۱۰۱/۲	۰/۸۶	۰/۹۹±۰/۰۲	۰/۵۰	
	۱/۳	۱۰۰/۱	۰/۰۰	۱/۵±۰/۰۲	۱/۰	
۴۹/۰	۲/۰	-	۱/۷۳	۰/۴۹±۰/۰۱	۰/۰	سرتالین
	۱/۰	۱۰۰/۱	۰/۰۰	۱/۰±۰/۰۱	۰/۵۰	
	۰/۷	۹۸/۰	۱/۷۳	۱/۴۹±۰/۰۱	۱/۰	

\* مقدار  $t$  بحرانی در سطح اطمینان ۹۵ درصد برای دو درجه آزادی برابر ۴/۳۰ می‌باشد.

### ۳-۱۳-۲ اندازه‌گیری داروها در نمونه پلاسما

به ازاء هر ۴/۰۰ میلی لیتر پلاسما، ۱۰۰ میکرولیتر تری فلورواستیک اسید غلیظ (۱۲/۸۰ مولار) و ۱۰۰ میکرولیتر هیدروکلریدریک اسید غلیظ (۱۲ مولار) به لوله آزمایش اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید تا پروتئین‌ها رسوب کنند [۷۶]. از روش افزایش استاندارد برای بررسی کارایی روش برای اندازه‌گیری داروهای مورد مطالعه در نمونه پلاسما استفاده شد. به این ترتیب که پنج میلی لیتر پلاسما، ۲/۵۰ میلی لیتر از محلول نمک ۲۰/۰٪ پتاسیم نترات، ۰/۵۰ میلی لیتر محلول سود ۵/۵۰ مولار، یک میلی لیتر از هر کدام از داروها با غلظت ۵/۰، ۱۰/۰، ۲۰/۰ میلی گرم بر لیتر افزوده

شد و به حجم ۱۰/۰ میلی لیتر رسید. سپس استخراج تحت شرایط بهینه انجام شد و در نهایت ۵/۰ میکرولیتر از هر یک از نمونه‌های استخراج شده به صورت جداگانه به HPLC تزریق گردید و سیگنال تجزیه‌ای حاصل ثبت شد و با استفاده از کالیبراسیون تک نقطه در همان روز غلظت آن‌ها تعیین شد. هر آزمایش سه بار تکرار شد. نتایج حاصل برای سرتالین و سیتالوپرام به ترتیب در جدول (۳-۲۷) و جدول (۳-۲۸) گزارش شده است. کروماتوگرام حاصل از نمونه پلاسمای شاهد و کروماتوگرام پلاسمای پس از افزودن آنالیت به ترتیب در شکل (۳-۳۰) و شکل (۳-۳۱) آورده شده است.

جدول (۳-۲۷) نتایج حاصل از پیش تغلیظ و اندازه گیری سرتالین در نمونه پلاسمای

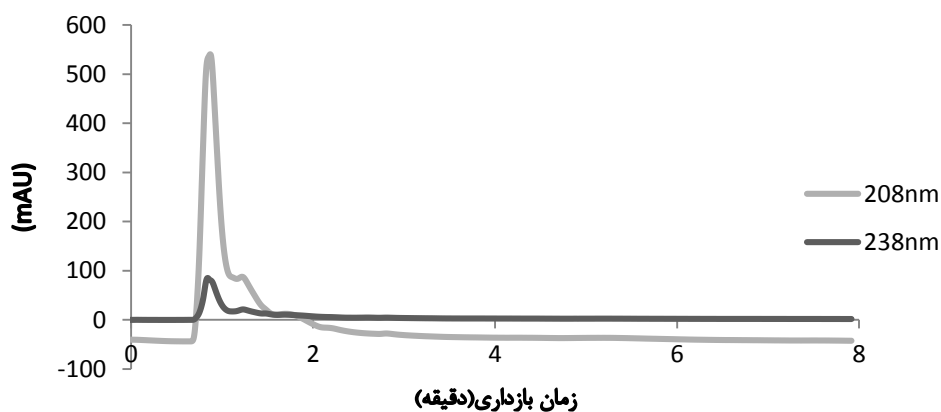
درصد بازیابی	مقدار t*	RSD% (n=3)	سرتالین اندازه گیری شده	غلظت دارو اضافه شده (میلی گرم بر لیتر)	
				سرتالین	سیتالوپرام
-	-	-	<LOD	۰/۰	۰/۰
۹۸/۰	۱/۷۳	۲/۰	۰/۴۹±۰/۰۱	۰/۵۰	۰/۵۰
۱۰۰/۰	۰/۰۰	۲/۰	۱/۰±۰/۰۲	۱/۰	۱/۰
۱۰۰/۵	۰/۸۶	۱/۰	۲/۰۱±۰/۰۲	۲/۰	۲/۰

\*مقدار t بحرانی در سطح اطمینان ۹۵ درصد برای دو درجه آزادی برابر ۴/۳۰ می باشد.

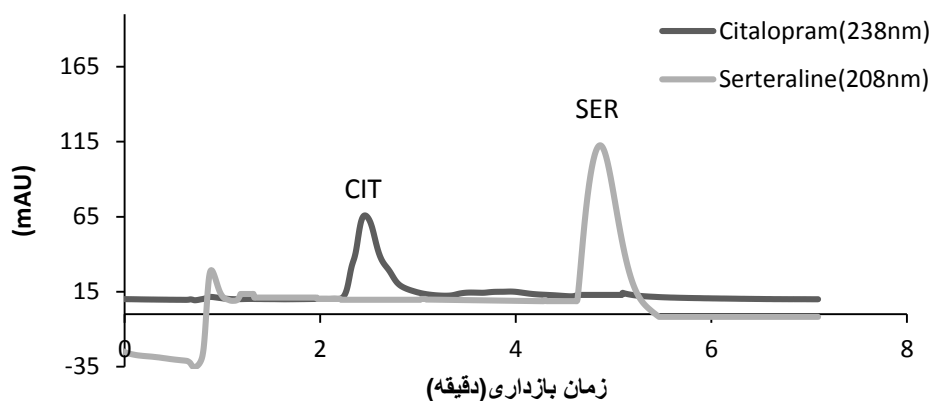
جدول (۳-۲۸) نتایج حاصل از پیش تغلیظ و اندازه گیری سیتالوپرام در نمونه پلاسما

درصد بازیابی	مقدار t*	RSD% (n=3)	سیتالوپرام اندازه گیری شده	غلظت دارو اضافه شده (میلی گرم بر لیتر	
				سرتالین	سسیتالوپرام
-	-	-	<LOD	۰	۰
۱۰۰/۰	۰/۰۰	۴/۰	۰/۵۰±۰/۰۲	۰/۵۰	۰/۵۰
۹۹/۰	۱/۷۳	۱/۰	۰/۹۹±۰/۰۱	۱/۰۰	۱/۰۰
۹۸/۵	۲/۶۰	۱/۰	۱/۹۷±۰/۰۲	۲/۰۰	۲/۰۰

\*مقدار t بحرانی در سطح اطمینان ۹۵ درصد برای دو درجه آزادی برابر ۴/۳۰ می باشد.



شکل (۳-۳۰) کروماتوگرام نمونه پلاسما فاقد آنالیت، شرایط: پنج میلی لیتر پلاسما، ۲/۵۰ میلی لیتر از محلول نمک ۰/۲۰٪ پتاسیم نیترات، ۰/۵۰ میلی لیتر محلول سود ۵/۵۰ مولار، رساندن به حجم ۱۰/۰ میلی لیتر، انجام استخراج در شرایط بهینه. فاز متحرک (ترکیب استونیتریل و بافر فسفاتی با pH برابر با ۵/۵ به نسبت ۱:۱) سرعت جریان فاز متحرک ۱/۰۰ میلی لیتر در دقیقه، در دمای محیط، ستون C18 (۴/۶×۱۵۰) میلی متر با اندازه ذرات ۵ میکرومتر)



شکل (۳-۳) کروماتوگرام نمونه پلاسما پس از افزودن آنالیت. شرایط: پنج میلی لیتر پلاسما، ۲/۵۰ میلی لیتر از محلول نمک ۲۰٪ پتاسیم نیترات، ۰/۵۰ میلی لیتر محلول سود ۵/۵۰ مولار، یک میلی لیتر از هرکدام از داروها با غلظت ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر، سیتالوپرام (CIT) در ۲۳۸ نانومتر و سرتالین (SER) در ۲۰۸ نانومتر، انجام استخراج در شرایط بهینه. فاز متحرک (ترکیب استونیتریل و بافر فسفات) با pH برابر با ۵/۵ (نسبت ۱:۱) سرعت جریان فاز متحرک ۱/۰۰ میلی لیتر در دقیقه، در دمای محیط، ستون C<sub>18</sub> (۴/۶×۱۵۰ میلی متر با اندازه ذرات ۵ میکرومتر)

### ۳-۱۳-۳ اندازه گیری داروها در نمونه آب شهر شاهرود

جهت بررسی کارایی روش در آب شهر شاهرود سه غلظت از داروهای مورد مطالعه انتخاب گردید. سپس در یک بالن ۱۰/۰ میلی لیتری، پنج میلی لیتر نمونه آب شهر، ۲/۵۰ میلی لیتر از محلول نمک ۲۰/۰ درصد پتاسیم نیترات، ۰/۵۰ میلی لیتر محلول سود ۵/۵۰ مولار، یک میلی لیتر از هرکدام از داروها با غلظت ۵/۰، ۱۰/۰، ۲۰/۰ میلی گرم بر لیتر افزوده شد و به حجم ۱۰/۰ میلی لیتر رسید و سپس استخراج تحت شرایط بهینه انجام شد و در نهایت ۵/۰ میکرولیتر از هر یک از نمونه‌های آب شهر استخراج شده به صورت جداگانه به HPLC تزریق گردید و سیگنال تجزیه‌ای حاصل ثبت شد و با استفاده از کالیبراسیون تک نقطه در همان روز غلظت آن‌ها تعیین شد. هر آزمایش سه بار تکرار شد. نتایج حاصل برای سرتالین و سیتالوپرام به ترتیب در جدول (۳-۲۹) و جدول (۳-۳۰) گزارش شده است. در شکل (۳-۳۲) و در شکل (۳-۳۳) کروماتوگرام حاصل از نمونه شاهد آب شهر و نمونه آب شهر حاوی آنالیت آمده است.

جدول (۳-۲۹) نتایج حاصل از پیش تغلیظ و اندازه گیری سرتالین در نمونه آب شهر

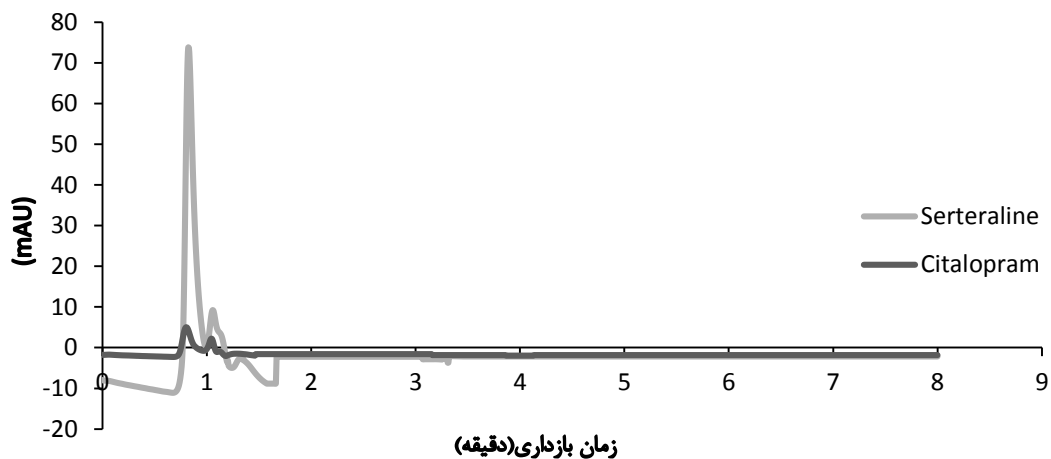
درصد بازیابی	مقدار* t	RSD% (n=3)	سرتالین اندازه گیری شده	غلظت دارو اضافه شده (میلی گرم بر لیتر)	
				سرتالین	سیتالوپرام
-	-	-	<LOD	۰/۰	۰/۰
۹۸/۰	۰/۸۶	۴/۱	۰/۴۹±۰/۰۲	۰/۵۰	۰/۵۰
۹۸/۰	۱/۷۳	۲/۰	۰/۹۸±۰/۰۲	۱/۰	۱/۰
۹۹/۰	۳/۴۶	۰/۵	۱/۹۸±۰/۰۱	۲/۰	۲/۰

\*مقدار t بحرانی در سطح اطمینان ۹۵ درصد برای دو درجه آزادی برابر ۴/۳۰ می باشد.

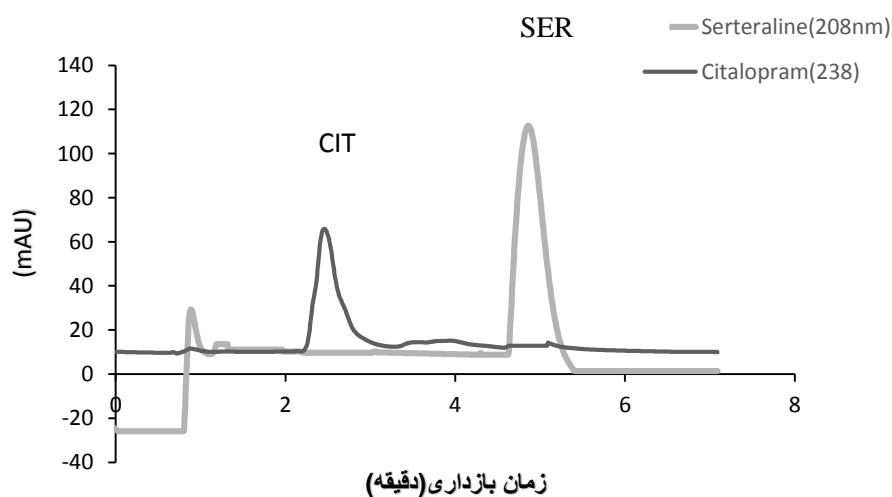
جدول (۳-۳۰) نتایج حاصل از پیش تغلیظ و اندازه گیری سیتالوپرام در نمونه آب شهر

درصد بازیابی	مقدار* t	RSD% (n=3)	سیتالوپرام اندازه گیری شده	غلظت دارو اضافه شده (میلی گرم بر لیتر)	
				سرتالین	سیتالوپرام
-	-	-	<LOD	۰/۰	۰/۰
۹۸/۰	۰/۸۶	۴/۱	۰/۴۹±۰/۰۲	۰/۵۰	۰/۵۰
۹۹/۰	۱/۷۳	۱/۰	۰/۹۹±۰/۰۱	۱/۰	۱/۰
۹۹/۰	۱/۷۳	۰/۵	۱/۹۹±۰/۰۱	۲/۰	۲/۰

\*مقدار t بحرانی در سطح اطمینان ۹۵ درصد برای دو درجه آزادی برابر ۴/۳۰ می باشد.



شکل (۳-۳۲) کروماتوگرام نمونه آب شهر فاقد آنالیت، شرایط: پنج میلی لیتر آب شهر، ۲/۵۰ میلی لیتر از محلول نمک ۰.۲٪ پتاسیم نیترات، ۰/۵۰ میلی لیتر محلول سود ۵/۵۰ مولار، رساندن به حجم ۱۰/۰ میلی لیتر، انجام استخراج در شرایط بهینه. فاز متحرک (ترکیب استونیتریل و بافر فسفاتی با pH برابر با ۵/۵ به نسبت ۱:۱) سرعت جریان فاز متحرک ۱/۰۰ میلی لیتر در دقیقه، در دمای محیط، ستون C<sub>18</sub> (۴/۶×۱۵۰ میلی متر با اندازه ذرات ۵ میکرومتر)



شکل (۳-۳۳) کروماتوگرام نمونه آب شهر پس از افزودن آنالیت. شرایط: پنج میلی لیتر آب شهر، ۲/۵۰ میلی لیتر از محلول نمک ۰.۲٪ پتاسیم نیترات، ۰/۵۰ میلی لیتر محلول سود ۵/۵۰ مولار، یک میلی لیتر از هر کدام از داروها با غلظت ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر، سیتالوپرام (CIT) در ۲۳۸ نانومتر و سرتالین (SER) در ۲۰۸ نانومتر، انجام استخراج در شرایط بهینه. فاز متحرک (ترکیب استونیتریل و بافر فسفاتی با pH برابر با ۵/۵ به نسبت ۱:۱) سرعت جریان فاز متحرک ۱/۰۰ میلی لیتر در دقیقه، در دمای محیط، ستون C<sub>18</sub> (۴/۶×۱۵۰ میلی متر با اندازه ذرات ۵ میکرومتر)

از مقایسه مقادیر  $t$  محاسبه شده با مقدار  $t$  بحرانی و نیز با توجه به درصدهای بازیابی برای هر غلظت، می‌توان نتیجه گرفت روش پیشنهادی دارای صحت خوبی برای پیش‌تغلیظ، جداسازی و اندازه‌گیری داروهای مورد مطالعه در نمونه‌های حقیقی می‌باشد. مقادیر RSD به دست آمده، دقت خوب روش را برای آنالیز نمونه‌های حقیقی نشان می‌دهد.



## فصل چہارم

بحث و نتیجہ گیری

در این تحقیق با استفاده از روش میکرواستخراج مایع-مایع پخشی متوالی به کمک HPLC مقادیر کم سیتالوپرام و سرتالین اندازه گیری شد.

## ۴-۱ ارقام شایستگی روش

بررسی‌ها نشان داد که در ناحیه خطی غلظت برای سیتالوپرام و سرتالین ۷/۰۰-۰/۱۰ میلی‌گرم بر لیتر می‌باشد. معادلات مربوط و مقادیر ضریب تعیین در جدول (۳-۲۱) آمده است. مطابق جدول (۳-۲۵) مقادیر انحراف معیار نسبی برای ۴ اندازه‌گیری تکراری در غلظت‌های ۰/۵، ۱/۰ و ۳/۰ میلی‌گرم بر لیتر به ترتیب برابر ۴/۰، ۴/۹ و ۰/۷ برای سیتالوپرام و برابر ۲/۰، ۱/۰ و ۱/۳ برای سرتالین می‌باشد که نشان‌دهنده دقت خوب روش است.

مقادیر درصد بازیابی نشان داده شده برای غلظت‌های ذکر شده در جدول (۳-۲۵) بیانگر صحت خوب روش است. مقدار حد تشخیص برای سیتالوپرام و سرتالین به ترتیب ۰/۰۱ و ۰/۰۰۲ میلی‌گرم بر لیتر و فاکتور پیش‌تغلیظ تحت شرایط بهینه به ترتیب ۹۹/۱ و ۱۰۰/۰ به دست آمد. بر اساس نتایج حاصل از اندازه‌گیری سیتالوپرام و سرتالین در نمونه‌های قرص، پلاسما و آب شهر در جدول (۳-۲۶) تا جدول (۳-۳۰) آمده است. این نتایج نشان می‌دهد که می‌توان روش پیشنهادی را با دقت و صحت خوبی در اندازه‌گیری سیتالوپرام و سرتالین در نمونه‌های حقیقی به کار گرفت.

## ۴-۲ مقایسه روش پیشنهادی با برخی روش‌های موجود

در جدول (۴-۱) فهرستی از برخی از روش‌های پیش‌تغلیظ به کار گرفته شده برای اندازه‌گیری سیتالوپرام و سرتالین آورده شده است. در این جدول پارامترهای مختلف، مانند حد تشخیص، دامنه خطی برای مقایسه آورده شده است. روش پیشنهادی نسبت به برخی از روش‌های گزارش شده بهتر است. مقایسه ارقام شایستگی گزارش شده برای این روش‌ها در اندازه‌گیری سیتالوپرام و سرتالین با

روش پیشنهادی نشان می‌دهد که روش ارائه شده در این پروژه نسبت به برخی از روش‌های گزارش شده دارای حد تشخیص پایین‌تر و دامنه خطی وسیع‌تر می‌باشد.

جدول (۱-۴) مقایسه روش پیشنهادی با برخی از روش‌های گزارش شده برای پیش تغلیط و اندازه گیری سیتالوپرام و سرتالین

ناحیه خطی (میلی گرم بر لیتر)		حد تشخیص (میلی گرم بر لیتر)		روش	مرجع
سرتالین	سیتالوپرام	سرتالین	سیتالوپرام		
۰/۱۰-۷/۰		۰/۰۰۲	۰/۰۱	روش پیشنهادی	
۰/۰۰۱۲-۴/۰	۰/۰۰۱۳-۵/۰	۰/۰۰۱۲	۰/۰۰۱۳	UA-SFOD-DLLME-HPLC-MWD	[۱۵]
	۰/۰۱۲-۱/۶۰	-		SPE/HPLC-FLD	[۲۰]
-	۰/۰۰۰۱۰-۰/۱۰۰	-	۱۰ <sup>-۴</sup> -۰/۱۰	LC-MS/MS	[۲۲]
۱-۲۰	-	۰/۰۹	-	HPLC	[۲۳]
-	۰/۰۴۶-۲/۰	-	۰/۰۴۶	UV-Vis	[۲۴]

## ۳-۴ نتیجه گیری

کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا یکی از روش‌های جداسازی و اندازه‌گیری با حساسیت بالاست، که کاربرد گسترده‌ای در علوم و صنعت دارد و برای جداسازی گونه‌های غیرفرار و یا ناپایدار در مقابل گرما به کار می‌رود.

امکان استفاده از روش میکرواستخراج فاز مایع به وسیله میکرواستخراج مایع - مایع پخشی متوالی برای جداسازی و پیش تغلیظ داروهای سیتالوپرام و سرتالین و اندازه‌گیری به وسیله HPLC برای اولین بار در این کار تحقیقاتی مورد بررسی قرار گرفته است.

از مزایای روش پیشنهادی می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

۱. مصرف کم حلال استخراج در حد چند میکرو لیتر از مزایای این روش می‌باشد.
۲. روشی ساده و سریع است.
۳. برای اجرای روش به تجهیزات ساده، ارزان و قابل دسترسی نیاز داریم.
۴. نسبت به روش‌هایی که در آن‌ها از حلال پخش کننده استفاده می‌شود از سمیت کمتری برخوردار است و ضریب توزیع بهتری دارد.
۵. فاکتور تغلیظ و بازیابی مناسبی دارد.
۶. دارای صحت بالا در آنالیز نمونه‌های حقیقی است.

## ۴-۴ آینده نگری

✓ کاربرد روش پیشنهادی در پیش تغلیظ و اندازه‌گیری سایر ترکیبات دارویی مانند داروهای کاهنده چربی خون (فنوفیبرات، کلوفیبرات و جم فیبروزیل) با ثابت تفکیک اسیدی

✓ کاربرد روش پیشنهادی در پیش تغلیظ و اندازه‌گیری آلاینده‌های زیست محیطی

مانند علف‌کش‌های خانواده تریازین با ثابت تفکیک اسیدی

✓ کاربرد سایر روش‌های پیش تغلیظ جهت اندازه‌گیری داروهای مورد مطالعه

- [1] H. Juan, Z. Zhiling, L. Huande, Simultaneous determination of fluoxetine, citalopram, paroxetine, venlafaxine in plasma by high performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry (HPLC–MS/ESI), **Journal of Chromatography B**, **820** (2005) 33-39.
- [2] P. Allard, L. Gram, K. Timdahl, K. Behnke, M. Hanson, J. Sjøgaard, Efficacy and tolerability of venlafaxine in geriatric outpatients with major depression: a double-blind, randomised 6-month comparative trial with citalopram, **International journal of geriatric psychiatry**, **19** (2004) 1123-1130.
- [3] M. Kingbäck, Genetic influence on enantiomeric drug disposition: Focus on venlafaxine and citalopram, in: Linköping University Electronic Press, **2011**.
- [4] D.H. Barlow, V.M. Durand, **Abnormal psychology: An integrative approach**, Nelson Education, **2011**.
- [5] S.H. Preskorn, C.Y. Stanga, J.P. Feighner, R. Ross, **Antidepressants: past, present and future**, Springer Science & Business Media, **2012**.
- [6] A.M. ADM, Antidepressant Drug Effects and Depression Severity, **JAMA**, **303** (2010) 47-53.
- [7] Food, D. Administration, FDA drug safety communication: abnormal heart rhythms associated with high doses of Celexa (citalopram hydrobromide), MedWatch <http://www.fda.gov>, (2011).
- [8] A. de Castro, M.d.M.R. Fernandez, M. Laloup, N. Samyn, G. De Boeck, M. Wood, V. Maes, M. López-Rivadulla, High-throughput on-line solid-phase extraction–liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the simultaneous analysis of 14 antidepressants and their metabolites in plasma, **Journal of Chromatography A**, **1160** (2007) 3-12.
- [9] H. Kirchherr, W. Kühn-Velten, Quantitative determination of forty-eight antidepressants and antipsychotics in human serum by HPLC tandem mass spectrometry: a multi-level, single-sample approach, **Journal of Chromatography B**, **843** (2006) 100-113.
- [10] C.L. De Vane, H.L. Liston, J.S. Markowitz, Clinical pharmacokinetics of sertraline, **Clinical pharmacokinetics**, **41** (2002) 1247-1266.
- [11] H. Ghaedi, A. Afkhami, T. Madrakian, F. Soltani-Felehgari, Construction of novel sensitive electrochemical sensor for electro-oxidation and determination of citalopram based on zinc oxide nanoparticles and multi-walled carbon nanotubes, **Materials Science and Engineering: C**, **59** (2016) 847-854.
- [12] T.G. Halvorsen, S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, Liquid-phase microextraction and capillary electrophoresis of citalopram, an antidepressant drug, **Journal of Chromatography A**, **909** (2001) 87-93.
- [13] X. Chen, S. Zheng, J. Le, Z. Qian, R. Zhang, Z. Hong, Y. Chai, Ultrasound-assisted low-density solvent dispersive liquid–liquid microextraction for the simultaneous determination of 12 new antidepressants and 2 antipsychotics in whole blood by gas chromatography–mass spectrometry, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, **142** (2017) 19-27.
- [14] N. Unceta, A. Gómez-Caballero, A. Sánchez, S. Millán, M.C. Sampedro, M.A. Goicolea, J. Sallés, R.J. Barrio, Simultaneous determination of citalopram, fluoxetine and their main metabolites in human urine samples by solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography, **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, **46** (2008) 763-770.
- [15] S. Farsimadan, N. Goudarzi, M.A. Chamjangali, G. Bagherian, Optimization of ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic droplets by experimental design methodologies for determination of three anti-anxiety drugs in human serum and urine samples by high performance liquid chromatography, **Microchemical Journal**, **128** (2016) 47-54.
- [16] I.D. de Souza, D.S. Domingues, M.E. Queiroz, Hybrid silica monolith for microextraction by packed sorbent to determine drugs from plasma samples by liquid chromatography–tandem mass spectrometry, **Talanta**, **140** (2015) 166-175.
- [17] J.P. Lamas, C. Salgado-Petinal, C. García-Jares, M. Llompert, R. Cela, M. Gómez, Solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry for the analysis of selective serotonin reuptake inhibitors in environmental water, **Journal of Chromatography A**, **1046** (2004) 241-247.
- [18] P. Dallet, L. Labat, M. Richard, M. Langlois, J. Dubost, A reversed-phase HPLC method development for the separation of new antidepressants, **Journal of liquid chromatography & related technologies**, **25** (2002) 101-111.
- [19] J. Macek, P. Ptáček, J. Klima, Rapid determination of citalopram in human plasma by high-performance liquid chromatography, **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, **755** (2001) 279-285.

- [20] Q.H. Meng, D. Gauthier, Simultaneous analysis of citalopram and desmethylcitalopram by liquid chromatography with fluorescence detection after solid-phase extraction, **Clinical biochemistry**, **38** (2005) 282-285.
- [21] T.S.H.ü.S. Yöntemle, Spectrofluorometric determination of citalopram HBr in tablets, **FABAD J. Pharm. Sci**, **32** (2007) 73-77.
- [22] X. Cao, X. Chen, Y. Zhang, D. Zhong, Determination of citalopram in human plasma with LC-MS/MS method and its bioequivalent evaluation, *Yao xue xue bao*= **Acta pharmaceutica Sinica**, **42** (2007) 450-454.
- [23] M. Walash, A. El-Brashy, N. El-Enany, M. Wahba, High Performance Liquid Chromatographic Determination of Sertraline in Presence of Its Degradation Product, **Analytical Letters**, **43** (2010) 1434-1447.
- [24] A. Nezhadali, G.A. Bonakdar, H. Nakhaei, Electrosynthesis of polypyrrole on steel fiber for solid-phase microextraction of citalopram in serum, **Analytical and bioanalytical chemistry**, **403** (2012) 593-600.
- [25] E. Sagristà, J.M. Cortés, E. Larsson, V. Salvadó, M. Hidalgo, J.Å. Jönsson, Comparison of two extraction methods for the determination of selective serotonin reuptake inhibitors in sewage sludge by hollow fiber liquid-phase microextraction, **Journal of separation science**, **35** (2012) 2460-2468.
- [26] R. Uřinová, H. Brozmannová, P. Šiřtík, P. Šilhán, I. Kacířová, K. Lemr, M. Grundmann, Liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for determination of five antidepressants and four atypical antipsychotics and their main metabolites in human serum, **Journal of Chromatography B**, **907** (2012) 101-107.
- [27] A.A. Asgharinezhad, S. Karami, H. Ebrahimzadeh, N. Shekari, N. Jalilian, Polypyrrole/magnetic nanoparticles composite as an efficient sorbent for dispersive micro-solid-phase extraction of antidepressant drugs from biological fluids, **International journal of pharmaceutics**, **494** (2015) 102-112.
- [28] E. Weisskopf, A. Panchaud, K.A. Nguyen, D. Grosjean, J.-M. Hascoët, C. Csajka, C.B. Eap, N. Ansermot, Stereoselective determination of citalopram and desmethylcitalopram in human plasma and breast milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry, **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, **131** (2016) 233-245.
- [29] M.A.L. Pinto, I.D. de Souza, M.E.C. Queiroz, Determination of drugs in plasma samples by disposable pipette extraction with C18-BSA phase and liquid chromatography–tandem mass spectrometry, **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, **139** (2017) 116-124.
- [30] J. Gopalakrishnan, G. Janarthanan, S. Gopalakrishnan, M.D. Timi, M.J. Narimbi, M.J. Wau, M.S. Puy, M.R. Nigo, M.L. Rubiang-Yalambing, M.S. Denano, DEPARTMENT OF APPLIED SCIENCES, Plant Biology, **5** 13.
- [31] D.A. Skoog, F.J. Holler, S.R. Crouch, Principles of instrumental analysis, Cengage learning, 2017.
- [32] D.C. Harris, Quantitative chemical analysis, Macmillan, 2010.
- [33] R.M. Smith, Before the injection—modern methods of sample preparation for separation techniques, **Journal of chromatography A**, **1000** (2003) 3-27.
- [34] M. Villar Navarro, M. Ramos Payán, R. Fernández-Torres, B. López, Hollow fiber liquid-phase microextraction and determination of nonsteroidal anti-inflammatories by capillary electrophoresis and sulfonamides by HPLC in human urine, **Biomedical Chromatography**, **27** (2013) 246-253.
- [35] M. Ma, S. Kang, Q. Zhao, B. Chen, S. Yao, Liquid-phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography for the determination of local anaesthetics in human urine, **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, **40** (2006) 128-135.
- [36] C.L. Arthur, J. Pawliszyn, Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers, **Analytical chemistry**, **62** (1990) 2145-2148.
- [37] J. Zhou, Q. Zhang, J.B. Sun, X.L. Sun, P. Zeng, Two-phase hollow fiber liquid phase microextraction based on magnetofluid for simultaneous determination of Echinacoside, Tubuloside B, Acteoside and Isoacteoside in rat plasma after oral administration of Cistanche salsa extract by high performance liquid chromatography, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, **94** (2014) 30-35.
- [38] H. Jiang, B. Hu, B. Chen, W. Zu, Hollow fiber liquid phase microextraction combined with graphite furnace atomic absorption spectrometry for the determination of methylmercury in human hair and sludge samples, **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, **63** (2008) 770-776.
- [39] E. Psillakis, N. Kalogerakis, Developments in liquid-phase microextraction, *TrAC Trends in*

**Analytical Chemistry, 22 (2003) 565-574.**

[40] T.S. Ho, J.L.E. Reubsæet, H.S. Anthonsen, S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, Liquid-phase microextraction based on carrier mediated transport combined with liquid chromatography–mass spectrometry: new concept for the determination of polar drugs in a single drop of human plasma, **Journal of Chromatography A, 1072 (2005) 29-36.**

[41] S. Dadfarnia, A.M.H. Shabani, Recent development in liquid phase microextraction for determination of trace level concentration of metals—A review, **Analytica Chimica Acta, 658 (2010) 107-119.**

[42] J.M. Kokosa, Advances in solvent-microextraction techniques, **TrAC Trends in Analytical Chemistry, 43 (2013) 2-13.**

[43] A. Bidari, M. Ganjali, P. Norouzi, Development and evaluation of a dispersive liquid-liquid microextraction based test method for quantitation of total anionic surfactants: advantages against reference methods, **Open Chemistry, 8 (2010) 702-708.**

[44] L. Kocúrová, I.S. Balogh, J. Šandrejová, V. Andruch, Recent advances in dispersive liquid–liquid microextraction using organic solvents lighter than water. A review, **Microchemical Journal, 102 (2012) 11-17.**

[45] F. Pena-Pereira, I. Lavilla, C. Bendicho, Miniaturized preconcentration methods based on liquid–liquid extraction and their application in inorganic ultratrace analysis and speciation: A review, **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, 64 (2009) 1-15.**

[46] A. Zgoła-Grześkowiak, T. Grześkowiak, Dispersive liquid-liquid microextraction, **TrAC Trends in Analytical Chemistry, 30 (2011) 1382-1399.**

[47] M. Rezaee, Y. Yamini, M. Faraji, Evolution of dispersive liquid–liquid microextraction method, **Journal of Chromatography A, 1217 (2010) 2342-2357.**

[48] Y. Liu, E. Zhao, W. Zhu, H. Gao, Z. Zhou, Determination of four heterocyclic insecticides by ionic liquid dispersive liquid–liquid microextraction in water samples, **Journal of Chromatography A, 1216 (2009) 885-891.**

[49] A. Saleh, Y. Yamini, M. Faraji, M. Rezaee, M. Ghambarian, Ultrasound-assisted emulsification microextraction method based on applying low density organic solvents followed by gas chromatography analysis for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples, **Journal of Chromatography A, 1216 (2009) 6673-6679.**

[50] E. Yiantzi, E. Psillakis, K. Tyrovola, N. Kalogerakis, Vortex-assisted liquid–liquid microextraction of octylphenol, nonylphenol and bisphenol-A, **Talanta, 80 (2010) 2057-2062.**

[51] H. Xu, Z. Ding, L. Lv, D. Song, Y.-Q. Feng, A novel dispersive liquid–liquid microextraction based on solidification of floating organic droplet method for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous samples, **Analytica Chimica Acta, 636 (2009) 28-33.**

[52] Z. Xiao-Huan, W. Qiu-Hua, M.-Y. ZHANG, X. Guo-Hong, W. Zhi, Developments of dispersive liquid-liquid microextraction technique, **Chinese Journal of Analytical Chemistry, 37 (2009) 161-168.**

[53] C.B. Ojeda, F.S. Rojas, Separation and preconcentration by dispersive liquid–liquid microextraction procedure: a review, **Chromatographia, 69 (2009) 1149-1159.**

[54] X. Wen, Q. Yang, Z. Yan, Q. Deng, Determination of cadmium and copper in water and food samples by dispersive liquid–liquid microextraction combined with UV–vis spectrophotometry, **Microchemical Journal, 97 (2011) 249-254.**

[55] T.A. Kokya, K. Farhadi, Optimization of dispersive liquid–liquid microextraction for the selective determination of trace amounts of palladium by flame atomic absorption spectroscopy, **Journal of hazardous materials, 169 (2009) 726-733.**

[56] M. Shamsipur, M. Ramezani, M. Sadeghi, Preconcentration and determination of ultra trace amounts of palladium in water samples by dispersive liquid-liquid microextraction and graphite furnace atomic absorption spectrometry, **Microchimica Acta, 166 (2009) 235-242.**

[57] H. Sereshti, V. Khojeh, S. Samadi, Optimization of dispersive liquid–liquid microextraction coupled with inductively coupled plasma-optical emission spectrometry with the aid of experimental design for simultaneous determination of heavy metals in natural waters, **Talanta, 83 (2011) 885-890.**

[58] A.N. Anthemidis, K.-I.G. Ioannou, Recent developments in homogeneous and dispersive liquid–liquid extraction for inorganic elements determination. A review, **Talanta, 80 (2009) 413-421.**

[59] I. Casero, D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, An acid-induced phase cloud point separation approach using anionic surfactants for the extraction and preconcentration of organic compounds, **Analytical Chemistry, 71 (1999) 4519-4526.**



- [60] A. Asghari, Z. Saffarzadeh, M. Bazregar, M. Rajabi, L. Boutorabi, Low-toxic air-agitated liquid-liquid microextraction using a solidifiable organic solvent followed by gas chromatography for analysis of amitriptyline and imipramine in human plasma and wastewater samples, **Microchemical Journal**, **130** (2017) 122-128.
- [61] M. Ma, F.F. Cantwell, Solvent microextraction with simultaneous back-extraction for sample cleanup and preconcentration: quantitative extraction, **Analytical Chemistry**, **70** (1998) 3912-3919.
- [62] Z. Fan, X. Liu, Determination of methylmercury and phenylmercury in water samples by liquid-liquid-liquid microextraction coupled with capillary electrophoresis, **Journal of Chromatography A**, **1180** (2008) 187-192.
- [63] T.J. Mason, J.P. Lorimer, Applied sonochemistry: the uses of power ultrasound in chemistry and processing, (2002).
- [64] M.A. Farajzadeh, M.R.A. Mogaddam, Air-assisted liquid-liquid microextraction method as a novel microextraction technique; Application in extraction and preconcentration of phthalate esters in aqueous sample followed by gas chromatography-flame ionization detection, **Analytica chimica acta**, **728** (2012) 31-38.
- [65] M.A. Farajzadeh, N. Nouri, Simultaneous derivatization and air-assisted liquid-liquid microextraction of some aliphatic amines in different aqueous samples followed by gas chromatography-flame ionization detection, **Analytica chimica acta**, **775** (2013) 50-57.
- [66] M. Bazregar, M. Rajabi, Y. Yamini, Z. Saffarzadeh, A. Asghari, Tandem dispersive liquid-liquid microextraction as an efficient method for determination of basic drugs in complicated matrices, **Journal of Chromatography A**, **1429** (2016) 13-21.
- [67] B. Fahimirad, A. Asghari, M. Bazregar, M. Rajabi, E. Fahimi, Application of tandem dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of doxepin, citalopram, and fluvoxamine in complicated samples, **Journal of separation science**, **39** (2016) 4828-4834.
- [68] A. Izadyar, D.R. Arachchige, H. Cornwell, J.C. Hershberger, Ion transfer stripping voltammetry for the detection of nanomolar levels of fluoxetine, citalopram, and sertraline in tap and river water samples, **Sensors and Actuators B: Chemical**, **223** (2016) 226-233.
- [69] H. Ebrahimzadeh, Y. Yamini, K.M. Ara, F. Kamarei, F. Khalighi-Sigaroodi, Determination of azithromycin in biological samples by LLLME combined with LC, **Chromatographia**, **72** (2010) 731-735.
- [70] M. Saraji, M.K. Boroujeni, A.A.H. Bidgoli, Comparison of dispersive liquid-liquid microextraction and hollow fiber liquid-liquid-liquid microextraction for the determination of fentanyl, alfentanil, and sufentanil in water and biological fluids by high-performance liquid chromatography, **Analytical and bioanalytical chemistry**, **400** (2011) 2149.
- [71] H. Bagheri, F. Khalilian, E. Babanezhad, A. Es-haghi, M.-R. Rouini, Modified solvent microextraction with back extraction combined with liquid chromatography-fluorescence detection for the determination of citalopram in human plasma, **Analytica chimica acta**, **610** (2008) 211-216.
- [72] M.A. Farajzadeh, M.R.A. Mogaddam, A.A. Aghdam, Comparison of air-agitated liquid-liquid microextraction technique and conventional dispersive liquid-liquid micro-extraction for determination of triazole pesticides in aqueous samples by gas chromatography with flame ionization detection, **Journal of Chromatography A**, **1300** (2013) 70-78.
- [73] J. Barrett, W.F. Smyth, I. Davidson, An examination of acid-base equilibria of 1, 4-benzodiazepines by spectrophotometry, **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, **25** (1973) 387-393.
- [74] C. Oo, R. Kuhn, N. Desai, C. Wright, P. McNamara, Pharmacokinetics in lactating women: prediction of alprazolam transfer into milk, **British journal of clinical pharmacology**, **40** (1995) 231-236.
- [75] M.A. Farajzadeh, M. Bahram, J.Å. Jönsson, Dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography-diode array detection as an efficient and sensitive technique for determination of antioxidants, **Analytica chimica acta**, **591** (2007) 69-79.
- [76] A.A. Asgharinezhad, H. Ebrahimzadeh, F. Mirbabaei, N. Mollazadeh, N. Shekari, Dispersive micro-solid-phase extraction of benzodiazepines from biological fluids based on polyaniline/magnetic nanoparticles composite, **Analytica chimica acta**, **844** (2014) 80-89.

## Abstract

In the present study, a simple and efficient approach is introduced for the improvement of the clean-up and applicability of the dispersive liquid–liquid microextraction method in complicated matrices. For this purpose, two dispersive microextraction methods were combined and the tandem dispersive liquid-liquid microextraction method for preconcentration and simultaneous determination of trace amount of Citalopram and Sertraline by High Performance liquid chromatography was provided. In the air-agitated liquid–liquid microextraction method, analytes were simply back-extracted into acceptor phase, To obtain the best extraction efficiency, the effect of different parameters such as the concentration of donor and acceptor phase, type of extraction solvent and number of suction syringe were investigated. This method provided a good linearity in the range of 0.10–7.00 mgL<sup>-1</sup> and detection limits of detection 0.01 mgL<sup>-1</sup> for Citalopram and 0.002 mgL<sup>-1</sup> for Sertraline and preconcentration factor of 99.1 for Citalopram and 100.0 for Sertraline were achieved.

**Keywords:** Citalopram, Sertraline, tandem dispersive liquid-liquid microextraction, preconcentration factor



**Shahrood University of Technology**

**Faculty of Chemistry**

**M.Sc. Thesis in Analytical Chemistry**

**Application of Tandem dispersive liquid–liquid  
microextraction for preconcentration of Citalopram  
and Sertraline combined with high-performance liquid  
chromatography**

**By: Bahare Arabkhani**

Supervisor:

**Dr. Nasser Goudarzi**

Advisor:

**Dr. Ghadamali BagherianDehaghi**

September 2017