

## میکرواستخراج و اندازه‌گیری کوله کالسیفرول (ویتامین D<sub>3</sub>) در سیال‌های زیستی با یک روش سه فازی و به‌کارگیری فیبر توخالی و دو حلال آلی امتزاج‌ناپذیر

مریم رضیئی

استادیار شیمی تجزیه، دانشکده شیمی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

دریافت: تیر ۱۴۰۲ بازنگری: آبان ۱۴۰۳ پذیرش: آبان ۱۴۰۳



<https://doi.org/10.30495/JACR1.1403.1044857>

### چکیده

در این مطالعه، استخراج و اندازه‌گیری ویتامین D<sub>3</sub> در سیال‌های زیستی با روش میکرواستخراج مایع-مایع با فیبر توخالی انجام شد. بدین‌منظور از روش سه فازی و به‌کارگیری دو حلال آلی امتزاج‌ناپذیر در دیواره و درون فیبر استفاده شد. ویتامین از ۸ میلی‌لیتر محلول نمونه با لایه نازکی از یک حلال آلی (نرمال دودکان) که در منافذ فیبر قرار دارد، استخراج شد. سپس، در داخل فیبر که حاوی استونیتریل درمقیاس میکرولیتر بود، استخراج برگشتی انجام شد. عوامل موثر بر این روش بررسی و شرایط بهینه به‌دست آمد. در این شرایط عامل غنی‌سازی ۱۳۰، حدتشخیص ۰/۹ ng ml<sup>-1</sup> و نمودار واسنجی در گستره ۳ تا ۱۰۰۰ ng ml<sup>-1</sup> با R<sup>2</sup> برابر با ۰/۹۹۹ به‌دست آمد. برای بررسی دقت روش پیشنهادشده، تکرارپذیری در یک روز و تکثیرپذیری در چند روز انجام شد و انحراف معیار نسبی به ترتیب ۵/۴ و ۶/۱ به‌دست آمد. در ادامه برای اثبات توانمندی روش پیشنهادی، استخراج این ویتامین از سیال‌های زیستی انجام شد و با پژوهش‌های انجام‌شده مقایسه شد و نتیجه‌های قابل‌قبولی به‌دست آمد.

**واژه‌های کلیدی:** ویتامین D<sub>3</sub>، سوانگاری مایع با کارایی بالا، فیبر توخالی، سیال‌های زیستی، پیش‌تغلیظ.

### مقدمه

نارسایی کلیه است [۲]. بنابراین، واپایش مقدار آن در سیال‌های زیستی مهم است. آماده‌سازی این سیال‌ها، برای حذف عامل‌های تداخل‌کننده برای اندازه‌گیری این ویتامین، پیش از سنجش بسیار مهم است [۳]. در سال‌های اخیر، روش‌های متفاوتی برای استخراج و اندازه‌گیری این ویتامین از سیال‌های زیستی گزارش شده است [۴ تا ۷]. یکی از این روش‌ها، استفاده

ویتامین D<sub>3</sub>، ویتامین محلول در چربی است. استفاده از آن همراه با کلسیم برای حفظ توده استخوانی بدن است [۱]. کمبود آن موجب کاهش تراکم استخوانی و شکستگی می‌شود. افزایش آن در خون سبب افزایش کلسیم و رسوب آن در بافت‌های کلیه و شریان‌های خونی می‌شود که نتیجه آن افزایش فشار خون و

باشد. بنابراین، روش ارائه‌شده، مکمل مناسبی برای روش سه فازی است. چون ضخامت لایه انتشار بین دو حلال آلی بسیار کمتر از حلال آبی-آلی است، سرعت نفوذ و بازدهی استخراج با به‌کارگیری دو حلال آلی، در فیبر بیشتر است [۱۶ تا ۱۸]. در این پژوهش، برای استخراج و پیش‌تغلیظ ویتامین، فیبر توخالی به‌کاربرده شد. روش دو فاز و سه فاز با حلال‌های گوناگون آلی که شرایط این استخراج را دارند، به‌کاربرده شد. روش سه فاز و عامل غنی‌سازی بالاتری را نتیجه داد. شرایط بهینه در روش سه فاز و بررسی شد و در شرایط بهینه به‌دست‌آمده استخراج و پیش‌تغلیظ این ویتامین از سیال‌های زیستی انجام و با روش‌های انجام‌شده مقایسه شد.

### بخش تجربی

#### مواد شیمیایی و استانداردها

برای تهیه محلول استاندارد، پودر خالص ویتامین D<sub>3</sub> با خلوص بیشتر از ۹۷ درصد از شرکت مرک آلمان تهیه شد. محلول مادر به غلظت ۵۰۰ µg/ml و حجم ۵۰ میلی‌لیتر، با حل کردن مقدار مناسب پودر ویتامین D<sub>3</sub> در اتانول، تهیه و در یخچال نگهداری و روزانه محلول‌های استاندارد از آن تهیه شد. استونیتریل و متانول با درجه خلوص دستگاه سوانگاری مایع با عملکرد بالا، ۱- دودکانول، ۱-آندکانول، ۱-اکتانول، آندکان، نرمال دودکان، نرمال پنتادکان، نرمال هگزادکان، نرمال هگزان، اتیل استات و تولوئن از شرکت مرک خریداری شد. فیبرهای پلی‌پروپیلن با قطر داخلی ۶۰۰ میکرومتر و قطر منافذ ۰/۲ میکرومتر ساخت آلمان به‌کارگرفته شد.

#### دستگاه‌ها و تجهیزات

برای بهینه‌سازی شرایط استخراج و تعیین عامل‌های تجزیه‌ای و اندازه‌گیری ویتامین، دستگاه سوانگاری مایع با عملکرد بالا استفاده شد. این دستگاه مجهز به شیر محل تزریق خودکار و لوله حلقه‌ای ۲۰ میکرولیتری و آشکارساز فرابنفش

از فاز جامد جاذب است که زمان‌بر بوده و برای دستیابی به پیش‌تغلیظ بالا، حلال شوینده باید تبخیر شود [۸ تا ۱۰]. کاربرد استخراج مایع-مایع و استفاده از حجم بالای حلال‌های آلی گران و آلاینده محیط‌زیست است [۱۱]. در سال ۱۹۹۹، روش میکرواستخراج با فیبرهای متخلخل توخالی (LPME<sup>۱</sup>) ارائه شد [۱۲ و ۱۳]. این روش، به دوگروه دو فاز و سه فاز تقسیم می‌شود. در روش دو فاز حلال آلی به‌کاربرده‌شده در داخل فیبر و منافذ دیواره فیبر یکسان است. در روش سه فاز، حلال آلی با نیروهای موئینگی درون منافذ فیبر قرار می‌گیرد و لایه نازکی را درون دیواره فیبر تشکیل می‌دهد [۱۴]. فاز استخراجی آبی (در حد چند میکرولیتر) درون فیبر وارد می‌شود. وجود غشای آلی بین فازهای دهنده و گیرنده از مخلوط شدن فازها جلوگیری می‌کند، از طرفی فاز استخراجی به‌طورمستقیم در تماس با نمونه نیست. بنابراین، محلول نمونه می‌تواند در اثر هم‌زدن، همگن شود. در روش مذکور آنالیت از محلول آبی به داخل حلال آلی در دیواره فیبر استخراج و سپس، به محلول آبی داخل فیبر، استخراج برگشتی انجام می‌شود. آبی‌بودن فاز گیرنده موجب محدودیت در به‌کارگیری دستگاه برای اندازه‌گیری آنالیت می‌شود. برای رفع این محدودیت از نظر سازگاری با دستگاه‌های تجزیه‌ای و از طرف دیگر دستیابی به حد تشخیص‌های بهتر، روشی معرفی شده است که در آن می‌توان از دو حلال آلی امتزاج‌ناپذیر در روش سه فاز استفاده کرد [۱۵]. در این روش، یک حلال آلی (مانند نرمال دودکان) در منافذ دیواره فیبر قرار می‌گیرد و حلال آلی دیگر (مانند متانول یا استونیتریل) به‌عنوان فاز پذیرنده عمل و درون فیبر را پر می‌کند. حلال پرکننده غشاء، باید به گونه‌ای انتخاب شود که بتواند در منافذ فیبر باقی مانده و آنالیت به آن منتقل شود. از طرفی دو حلال به‌کار برده‌شده امتزاج‌ناپذیر و پایدار باشند و در زمان آزمایش تبخیر نشوند، افزون‌برآن، سازگار با دستگاه تجزیه‌ای

<sup>۱</sup>. Hollow fiber liquid phase microextraction (LPME)

گرفت و میکروسرنگ به گیره بسته شد. سپس، همزن مغناطیسی روشن شد. پس از گذشت زمان استخراج، فاز گیرنده با میکروسرنگ به دستگاه سوانگاری با عملکرد بالا تزریق شد.

### نتیجه‌ها و بحث

#### انتخاب حلال آلی برای غشاء و درون فیبر

حلال‌های آلی به کاربرده شده در غشاء و درون فیبر برای دستیابی به استخراج و پیش تغلیظ مناسب، بسیار مهم است. حلال آلی غشاء باید با آب امتزاج‌ناپذیر، دارای فراریت پایین و از نظر قطبیت، سازگار با فیبر باشد تا به آسانی در منافذ دیوار فیبر قرار گیرد. از طرفی گرانروی بالایی نداشته باشد تا انتقال جرم از فاز آبی به آن صورت گیرد. حلال آلی درون فیبر نیز، باید مناسب برای سوانگاری مایع با عملکرد بالا و با فاز آلی داخل غشاء امتزاج‌ناپذیر باشد (روش سه فازی). برپایه این مطالب، انتخاب حلال آلی با دو روش دوفازی و سه‌فازی به صورت یک حلال آلی در غشاء و درون فیبر (روش دو فازی) و دو حلال آلی در غشاء و درون فیبر (روش سه فازی)، انجام شد. با به کارگیری حلال‌های آلی، استخراج انجام و عامل غنی‌سازی در هر آزمایش محاسبه شد (جدول ۱). عددهای به دست آمده نشان داد که روش سه فازی عامل غنی‌سازی ۱ بالاتری را نتیجه می‌دهد. حلال‌های آلی به کاربرده شده در روش دو فازی، عامل غنی‌سازی پایین‌تری را نتیجه داد و برای دستگاه سوانگاری نیز مناسب نبود و مشکلاتی را برای ستون دستگاه پیش آورد. بنابراین، روش سه فازی برای استخراج و پیش تغلیظ در نظر گرفته شد.

مرئی (تنظیم شده در طول موج ۲۶۴ نانومتر) و یک پمپ رفت و برگشتی به همراه ستون C<sub>18</sub> به طول ۱۵ سانتی‌متر و قطر ۴/۶ میلی‌متر با اندازه ذره‌های ۵ میکرومتر بود. پیش ستون C<sub>18</sub> نیز برای محافظت از ستون به کار گرفته شد. برای معلق نگه داشتن فیبر داخل محلول و تزریق محلول داخل فیبر، سرنگ هامیلتون ۲۵ میکرولیتری با سوزن سر تخت به قطر ۸۰۰ میکرومتر ساخت کمپانی هامیلتون آمریکا (مدل NR ۷۰۲) و سرنگ پزشکی به کار گرفته شد. برای برداشتن محلول‌ها، پیپت‌های ۲، ۵ و ۱۰ میلی‌لیتری و نمونه‌بردارهایی با حجم متغیر ۱۰ تا ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکرولیتری با سر پلاستیکی قابل تعویض یک‌بار مصرف به کاربرده شد. از متانول با سرعت شویش ۱ میلی‌لیتر در دقیقه به عنوان فاز متحرک استفاده شد. برای هم‌زدن محلول نمونه طی استخراج، دستگاه همزن مغناطیسی به کاربرده شد.

#### مراحل روش میکرواستخراج

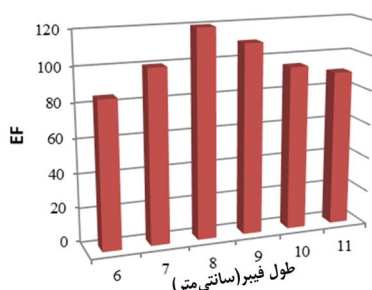
برای انجام استخراج، ظروفی با حجم ۱۵ میلی‌لیتر به کاربرده شد. همچنین، سرنگ سر تخت با حجم ۲۵ میکرولیتر، یک سوزن سرنگ پزشکی معمولی برای نگهداری فیبر طی استخراج به کار برده شد [۱۵]. ابتدا فیبر پلی‌پروپیلن به ابعاد ۸ سانتی‌متر بریده شد. آلودگی‌های احتمالی فیبر با قراردادن درون استون و انجام فراصوت به مدت ۲ دقیقه برطرف شد. سپس زمان داده شد، تا استون از سطح فیبر تبخیر شود. آهن‌ربای پوشش داده شده با ابعاد ۱۰ × ۲ mm درون ظرف استخراج با حجم ۱۵ میلی‌لیتر قرار داده شد و حجم لازم از محلول نمونه به ظرف استخراج منتقل و ظرف نمونه روی همزن مغناطیسی قرار داده شد. ۲۵ میکرولیتر از فاز گیرنده، درون سرنگ هامیلتون کشیده شد. سر سرنگ هامیلتون و سوزن یک سرنگ پزشکی از داخل دیواره سیلیکونی رد و فیبر به سوزن میکروسرنگ متصل و انتهای دیگر فیبر نیز به سوزن پزشکی متصل شد. فیبر به مدت چند ثانیه در محلول نرمال دودکان قرار داده شد تا منافذش با حلال آلی پر شود. پس از آن، فاز گیرنده به درون فیبر تزریق شد. این فیبر به شکل نیم‌دایره داخل محلول نمونه قرار

<sup>1</sup>. Enrichment factor (EF)

جدول ۱ حلال‌های آلی به‌کاربرده‌شده در فیبر و تاثیر آن بر عامل غنی‌سازی

| روش سه فازی |                       | روش دو فازی                  |    |
|-------------|-----------------------|------------------------------|----|
| EF          | حلال آلی در درون فیبر | حلال آلی در غشاء و درون فیبر | EF |
| ۸۸          | استونیتریل            | آندکان                       | ۱۵ |
| ۷۵          | متانول                | آندکان                       | ۳۸ |
| ۱۰۵         | استونیتریل            | دودکان                       | ۶۲ |
| ۹۸          | متانول                | دودکان                       | ۹  |
| ۴۸          | استونیتریل            | پنتادکان                     | ۲  |
| ۴۰          | متانول                | پنتادکان                     |    |
| ۳۱          | استونیتریل            | هگزادکان                     |    |
| ۲۸          | متانول                | هگزادکان                     |    |

طرف دیگر، مقدار جرم انتقال‌یافته به فاز گیرنده، مهم‌تر از غلظت آنالیت در فاز گیرنده است. افزون بر آن، تبخیر فاز گیرنده و انحلال آن هم باید در نظر گرفته شود. بنابراین، باید فاز گیرنده به اندازه‌ای بزرگ باشد که انتقال جرم را ممکن و اثر تبخیر و انحلال را پوشش دهد. در این پژوهش، اثر طول فیبر در گستره ۶ تا ۱۱ سانتی‌متر بر عامل غنی‌سازی، بررسی شد. نتیجه‌های آزمایش در شکل ۱ ترسیم شده است.



شکل ۱ اثر طول فیبر بر عامل غنی‌سازی محلول ویتامین

برپایه این شکل، برای عامل غنی‌سازی در گستره طول فیبر آزمایش‌شده، طول فیبر ۸ سانتی‌متر بالاترین عدد عامل غنی‌سازی را نتیجه داد.

#### بررسی اثر سرعت هم‌زدن محلول نمونه

در روش‌های استخراجی با فیبر، هم‌زدن محلول نمونه منجر به کاهش در ضخامت لایه نرست [۱۹] و تماس پیوسته محلول تازه نمونه با سطح استخراجی، موجب انتقال سریع‌تر آنالیت از فاز آبی به فاز آلی می‌شود. از طرف دیگر، افزایش سرعت هم‌زدن، موجب تشکیل حباب در سطح فیبر می‌شود که تکرارپذیری را کاهش می‌دهد [۲۰]. در این پژوهش، برای به‌دست‌آوردن سرعت بهینه، آزمایش‌هایی در گستره ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ دور بر دقیقه انجام شد. با توجه به زمان طولانی استخراج، ۳ استخراج با شرایط یکسان، هم‌زمان انجام شد.

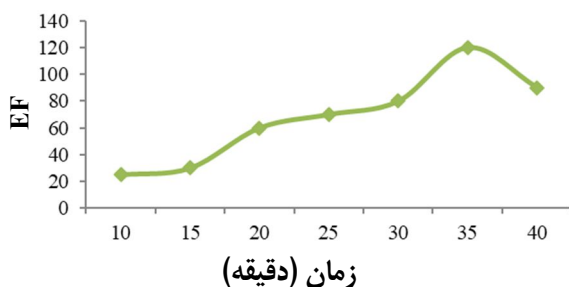
حلال‌های آلی که در روش سه فازی بررسی شدند، نتیجه‌های زیر را دادند:

آندکان، پنتادکان و هگزادکان به خوبی در دیواره فیبر قرار گرفتند و با متانول و استونیتریل امتزاج‌ناپذیر بودند و در طول زمان استخراج از دیواره فیبر نشت نکردند، ولی به علت گران‌روی بالا، انتقال آنالیت از فاز آبی به خوبی انجام نشد. بنابراین، عامل غنی‌سازی بالایی از آن‌ها به دست نیامد. با توجه به نتیجه‌ها، نرمال دودکان به عنوان حلال آلی برای غشای فیبر انتخاب شد. در ادامه دو حلال استونیتریل و متانول به عنوان فاز گیرنده بررسی شدند. هردو حلال، حلالیت بسیار کمی در دودکان داشتند و در طول مدت زمان استخراج به خوبی درون فیبر باقی ماندند. استونیتریل عامل غنی‌سازی بالاتری را نتیجه داد، پس از استونیتریل به عنوان فاز گیرنده استفاده شد.

#### بررسی اثر طول فیبر

طول در نظر گرفته‌شده فیبر، با مقدار حجم فاز گیرنده متناسب بود. در روش میکرواستخراجی، حجم فاز گیرنده کمتر موجب افزایش غلظت مقدار آنالیت جمع‌آوری‌شده در فاز گیرنده می‌شود و عامل غنی‌سازی بالاتری به دست می‌آید [۱۸]. از

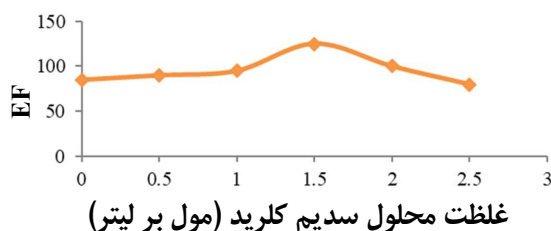
<sup>۱</sup>. Revolutions per minute (rpm)



شکل ۳ اثر زمان استخراج بر عامل غنی‌سازی محلول ویتامین

#### بررسی اثر افزایش نمک

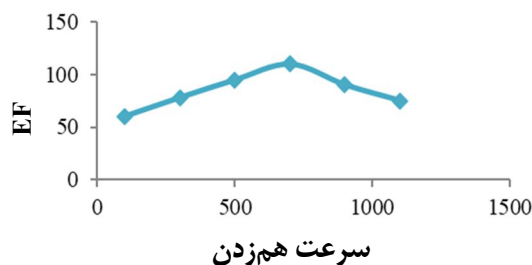
در روش‌های میکرواستخراج با فیبر، بسته به طبیعت آنالیت، با افزایش نمک، عامل غنی‌سازی افزایش یا کاهش می‌یابد [۲۲]. در پاره‌ای از گزارش‌ها افزایش نمک، نتیجه مثبت [۲۳ تا ۲۵] و در پاره‌ای گزارش‌ها افزایش نمک نتیجه منفی داشته است [۲۶ و ۲۷]. افزایش نمک موجب افزایش ضخامت لایه انتشار بین محلول نمونه و لایه آلی جداره فیبر می‌شود و بدین ترتیب سرعت انتقال جرم پایین می‌آید. از طرف دیگر، با افزایش نمک، حل شدن آنالیت در فاز آبی کاهش، و حل شدن آنالیت در فاز آلی افزایش می‌یابد. در این پژوهش، محلول نمونه بدون نمک و افزایش نمک تا غلظت ۲/۵ مولار بررسی شد، نتیجه‌ها در شکل ۴ آمده است.



شکل ۴ اثر غلظت سدیم کلرید بر عامل غنی‌سازی محلول ویتامین

برپایه شکل ۴، افزایش نمک تا غلظت ۱/۵ مولار، به دلیل کاهش حلالیت آنالیت در فاز آبی، موجب افزایش عامل غنی‌سازی شد. با افزایش بیشتر غلظت نمک، گرانروی محلول افزایش و انتقال آنالیت کاهش یافت که موجب کاهش عامل

تغییرهای سرعت هم‌زدن بر عامل غنی‌سازی در شکل ۲ نشان داده شده است.



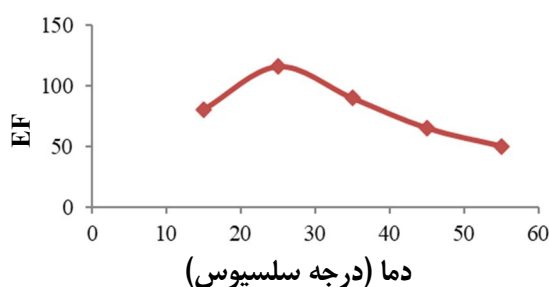
شکل ۲ اثر سرعت هم‌زدن محلول بر عامل غنی‌سازی محلول ویتامین

با توجه به نتیجه‌ها، سرعت ۷۰۰ دور بر دقیقه عامل غنی‌سازی بالاتری را نتیجه داد.

#### بررسی اثر زمان استخراج

روش‌های میکرواستخراج، زمانی را برای رسیدن به تعادل نیاز دارد. در روش سه فازی دوسری تعادل وجود دارد. تعادل اول، زمان لازم برای استخراج بین محلول آبی و غشاء آلی و تعادل دوم، زمان لازم برای استخراج برگشتی است. به علت ازدست‌رفتن حلال آلی داخل فیبر بر اثر تبخیر و حل شدن در محلول آبی در زمان‌های طولانی، بازدهی استخراج کاهش می‌یابد [۲۱]. بنابراین، در این پژوهش، زمان مناسب برای رسیدن به تعادل و از طرف دیگر ازدست‌دادن حلال آلی بررسی شد. زمان استخراج در گستره ۱۰ تا ۴۰ دقیقه با سرعت چرخش ۷۰۰ دور بر دقیقه و طول فیبر ۸ سانتی‌متر آزمایش شد. نتیجه‌ها در شکل ۳ نشان داده شده است. مطابق شکل، با افزایش زمان تا ۳۵ دقیقه، عامل غنی‌سازی افزایش یافت. پس از ۳۵ دقیقه، کاهش در آن مشاهده شد. با توجه به نتیجه‌ها، زمان ۳۵ دقیقه، برای آزمایش‌های بعدی در نظر گرفته شد.

گذاشت [۲۸]. از طرف دیگر، با افزایش دمای محلول نمونه، به‌علت افزایش حلالیت حلال آلی در فاز آبی، حجم حلال آلی در طول زمان استخراج، کاهش یافته و یا در اثر گرم‌شدن، تبخیر حلال آلی صورت می‌گیرد که نتیجه آن، کاهش بازدهی استخراج است [۲۹]. در این پژوهش، دمای محلول نمونه در گستره ۱۵ تا ۵۵ درجه سلسیوس بررسی شد. نتیجه‌های به‌دست‌آمده در شکل ۷ نشان‌داده شده است. برپایه نتیجه‌های نشان‌داده‌شده در شکل ۶، دمای اتاق، مناسب‌ترین دما برای آزمایش است.



شکل ۶ اثر دمای آزمایش بر عامل غنی‌سازی محلول ویتامین

جدول ۲، شرایط بهینه به‌دست‌آمده برای استخراج ویتامین را نشان می‌دهد.

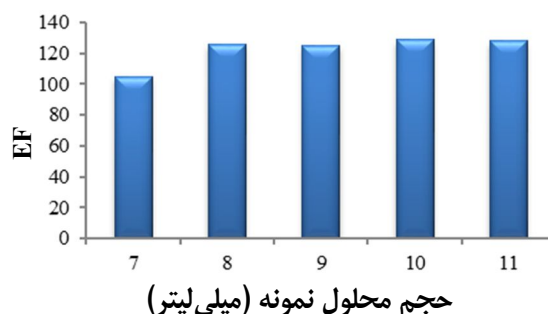
جدول ۲ شرایط بهینه به‌دست‌آمده در دمای اتاق برای استخراج ویتامین

|                  |                       |
|------------------|-----------------------|
| دودکان           | حلال آلی غشاء فیبر    |
| استونیتریل       | حلال آلی درون فیبر    |
| ۸ میلی لیتر      | حجم محلول نمونه       |
| ۱/۵ مولار        | غلظت محلول کلرید سدیم |
| ۳۵ دقیقه         | زمان استخراج          |
| ۷۰۰ دور بر دقیقه | سرعت هم زدن محلول     |
| ۸ سانتی متر      | طول فیبر              |

غنی‌سازی شد. در آزمایش‌های بعدی، محلول نمک با غلظت ۱/۵ مولار به‌کار برده شد.

#### بررسی اثر حجم محلول نمونه

بررسی اثر حجم محلول نمونه در گستره ۷ تا ۱۱ میلی‌لیتر با سرعت ۷۰۰ دور بر دقیقه، ۳۵ دقیقه زمان استخراج و محلول ۱/۵ مولار سدیم کلرید انجام شد. نتیجه‌های به‌دست‌آمده در شکل ۵ نشان داده شده است. برپایه این شکل، عامل غنی‌سازی با افزایش حجم، تا ۸ میلی‌لیتر افزایش داشت، ولی پس از آن، افزایش چندانی مشاهده نشد. زیرا با افزایش حجم محلول نمونه و سرعت هم‌زدن ثابت، هم‌رفت نمی‌تواند موجب انتقال بیشتر آنالیت شود. از طرف دیگر، برپایه قوانین میکرواستخراج مایع، با افزایش حجم نمونه، بازدهی استخراج کاهش می‌یابد. بنابراین، در آزمایش‌های بعدی، حجم محلول نمونه، ۸ میلی‌لیتر در نظر گرفته شد.

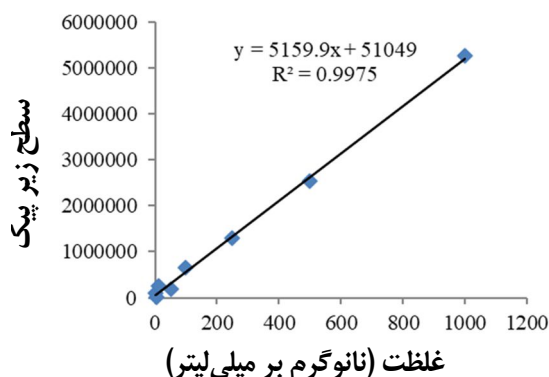


شکل ۵ اثر حجم نمونه بر عامل غنی‌سازی محلول ویتامین

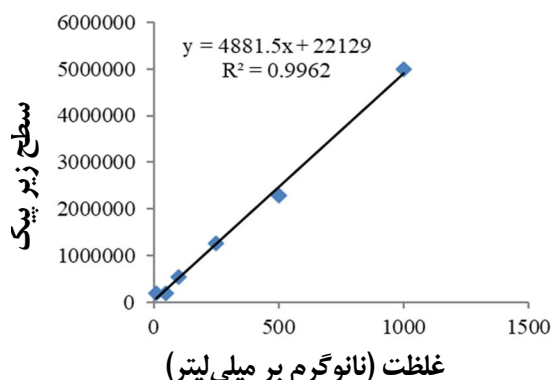
#### بررسی اثر دما

دما، عامل موثری بر سینتیک و ترمودینامیک استخراج است. دمای بالا، زمان لازم برای رسیدن به تعادل را با افزایش نفوذ آنالیت به فاز پذیرنده افزایش می‌دهد. از طرف دیگر، دما می‌تواند موجب تغییر ضریب توزیع آنالیت بین فاز دهنده و فاز گیرنده آلی باشد. پس بر روی بازدهی استخراج، تاثیر خواهد

در این معادله‌ها،  $C_i$  و  $C_a$ ، به ترتیب غلظت گونه در فاز استخراج شده و غلظت گونه در فاز آبی است. همچنین،  $V_i$  و  $V_a$  به ترتیب حجم فاز استخراجی و حجم فاز آبی و %  $ER$ ، درصد بازده استخراج است. در این مطالعه، افزون بر منحنی واسنجی در آب خالص، برای بررسی اثر زمینه، اندازه گیری‌ها در ادرار و پلاسما نیز انجام شد. ده محلول استاندارد در گستره غلظتی ۳ تا ۱۰۰۰ نانو گرم بر میلی لیتر تهیه شد. سپس، استخراج تحت شرایط بهینه از محلول‌های استاندارد تهیه شده، سه مرتبه انجام و سطح زیر پیک به دست آمده بر حسب غلظت اولیه گونه در فاز دهنده، رسم شد (شکل‌های ۸ تا ۱۰).



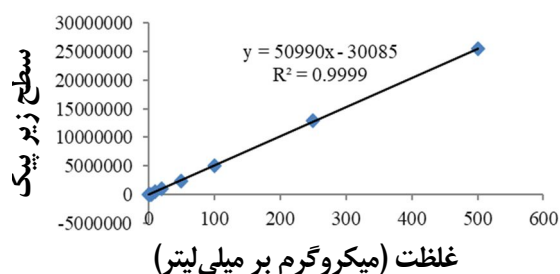
شکل ۸ منحنی واسنجی در پلاسما برای محلول ویتامین



شکل ۹ منحنی واسنجی در ادرار برای محلول ویتامین

#### منحنی واسنجی

برای ارزیابی روش پیشنهادی و اندازه‌گیری عامل غنی‌سازی، نیاز به منحنی واسنجی بود. بدین منظور محلول‌های استاندارد ویتامین با غلظت‌های ۰/۵ تا ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تهیه شد. سپس، مقدار ۲۰ میکرولیتر از استانداردهای ساخته شده به دستگاه سوانگاری تزریق و سطح زیر پیک بر حسب غلظت رسم شد. نمودار به دست آمده در شکل ۷ نشان داده شده است.



شکل ۷ منحنی واسنجی تزریق مستقیم ویتامین

استخراج و پیش تغلیظ تحت شرایط بهینه به دست آمده از محلول ۱۰۰ ng/ml از ویتامین انجام شد و سطح زیر پیک به دست آمده، در منحنی واسنجی قرار داده شد و عامل غنی‌سازی از نسبت غلظت آنالیت در فاز پذیرنده به غلظت اولیه به دست آمد (معادله ۱).

$$EF = C_a / C_i \quad (1)$$

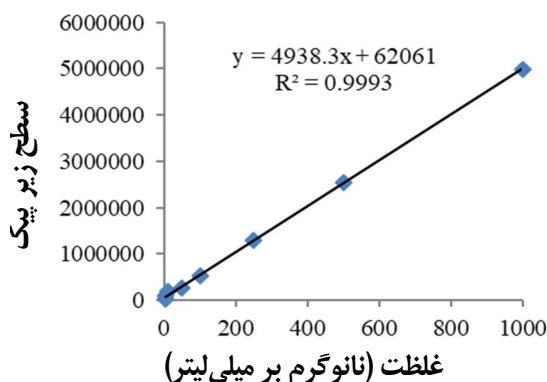
درصد بازیابی استخراج ۱، از معادله ۲ به دست آمد.

$$ER \% = ((C_a \times V_a) / (C_i \times V_i)) \times 100 \quad (2)$$

جدول ۳ آورده شده‌اند. حد تشخیص برپایه نشانک به نوبه برابر ۳، به‌دست آمده است.

#### تکرارپذیری و تکثیرپذیری

مقدار تکرارپذیری و تکثیرپذیری سامانه، با اندازه‌گیری انحراف معیار نسبی به‌دست آمد. مقدارهای به‌دست آمده از مقدار انحراف استاندارد نسبی در یک روز کاری (با ۶ اندازه‌گیری پی‌درپی در شرایط بهینه با غلظت ۵۰ میکروگرم بر لیتر) و انحراف استاندارد نسبی در چند روز کاری پی‌درپی، با ۶ اندازه‌گیری در ۶ روز پی‌درپی در شرایط بهینه با غلظت ۵۰ میکروگرم بر لیتر، در جدول ۳ ارائه شده است.



شکل ۱۰ منحنی واسنجی در آب برای محلول ویتامین

با محاسبه‌های انجام‌شده، گستره خطی منحنی واسنجی، حد تشخیص، ضریب تعیین ( $R^2$ )، عامل غنی‌سازی و بازدهی استخراج برای هر یک از محیط‌های موردآزمایش به‌دست آمد. ارقام شایستگی برای روش پیشنهادشده در

جدول ۳ ارقام شایستگی روش پیشنهادشده در آب، پلاسما و ادرار

| ER % | EF  | RSD***      |           | LOD** | DLR*    | R <sup>2</sup> | معادله                 | نمونه  |
|------|-----|-------------|-----------|-------|---------|----------------|------------------------|--------|
|      |     | بین چند روز | در یک روز |       |         |                |                        |        |
| ۴۱   | ۱۳۰ | ۶٫۱         | ۵٫۶       | ۰٫۹   | ۳-۱۰۰۰  | ۰٫۹۹۹          | $Y = 4938.3 X + 62061$ | آب     |
| ۳۹   | ۱۲۴ | ۶٫۲         | ۵٫۸       | ۱٫۰   | ۱۰-۱۰۰۰ | ۰٫۹۹۷          | $Y = 5159 X + 51049$   | پلاسما |
| ۳۸   | ۱۲۱ | ۶٫۵         | ۶٫۱       | ۱٫۱   | ۱۰-۱۰۰۰ | ۰٫۹۹۲          | $Y = 4580 X + 11650$   | ادرار  |

\* Dynamic linear range (DLR)

\*\* Limit of detection (LOD)

\*\*\* Releative standard deviation (RSD)

میلی‌لیتر از نمونه پلاسما در یک ظرف ۲۵ میلی‌لیتری ریخته و ۴ میلی‌لیتر استونیتریل به آن افزوده شد. سپس، به‌مدت ۸ دقیقه با دستگاه مخلوط‌کن گردابی تکان داده شد. مخلوط به‌دست‌آمده به‌مدت ۱۵ دقیقه در دستگاه گریزان با سرعت ۳۵۰۰ دور بر دقیقه قرار گرفت. پس‌از آن، پروتئین در ظرف دستگاه ته‌نشین و محلول روی آن، جمع‌آوری و به ظرف دیگری منتقل و با آب به نسبت ۱:۳ رقیق شد. نمونه ادرار هم به نسبت ۱:۱ با آب رقیق شد. غشاء فیبر در یک مخلوط پیچیده مانند صافی عمل

#### تجزیه نمونه‌های واقعی

برای راستی آزمایی روش پیشنهادشده، استخراج ویتامین از سیال‌های زیستی مانند پلاسما و ادرار انجام شد. نمونه ادرار از فرد سالم جمع‌آوری و نمونه پلاسما از بیمارستان طالقانی تهران از فرد سالم و بزرگسال تهیه و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. برای بررسی اثر زمینه بر استخراج ویتامین، به روش میکرواستخراج مایع-مایع با فیبر توخالی، باید ابتدا نمونه پلاسما پروتئین زدایی می‌شد [۳۰]. برای این کار، ۱۰

قطره آلی منجمد شناور و استخراج با فاز جامد را نشان می‌دهد. در همه روش‌های یادشده، دستگاه سوانگاری مایع با عملکرد بالا به کارگرفته شد. روش ارائه‌شده در مقایسه با روش‌های گزارش‌شده، گستره خطی گسترده‌تر، حد تشخیص مطلوب و عامل غنی‌سازی بالاتری دارد. افزون‌بر آن، در مقایسه با روش‌های استخراج مایع-مایع و استخراج فاز جامد، حلال آلی کمتری استفاده شده است.

جدول ۴ اندازه‌گیری ویتامین در سیال‌های زیستی

| نمونه  | C <sub>added</sub><br>(µg/l) | C <sub>found</sub><br>(µg/l) | RSD%      |             | RR*<br>(%) |
|--------|------------------------------|------------------------------|-----------|-------------|------------|
|        |                              |                              | در یک روز | بین چند روز |            |
| ادرار  | ---                          | ---                          | ---       | ---         | ---        |
|        | ۲۰                           | ۱۸٫۷±۰٫۶                     | ۵٫۳       | ۶٫۲         | ۹۳٫۵       |
|        | ۵۰                           | ۴۸٫۲±۰٫۸                     | ۵٫۸       | ۷٫۱         | ۹۶٫۲       |
| پلاسما | ---                          | ---                          | ---       | ---         | ---        |
|        | ۲۰                           | ۱۸٫۷±۰٫۵                     | ۷٫۸       | ۸٫۳         | ۹۳٫۵       |
|        | ۵۰                           | ۴۷٫۸±۰٫۴                     | ۷٫۵       | ۸٫۴         | ۹۷٫۶       |

\* Relative recovery (RR)

می‌کند و ملکول‌های بزرگ نمی‌توانند از آن عبور کنند. سیال‌های زیستی مانند پلاسما و ادرار شامل اسیدها، بازها و ترکیب‌های دیگر آلی هستند [۳۱]. در ابتدا بدون افزودن ویتامین، استخراج از نمونه‌ها در شرایط بهینه انجام شد. هیچ‌کدام از نمونه‌ها، علامت چشمگیری نشان ندادند. در مرحله بعد، دو غلظت متفاوت از ویتامین (۲۰ و ۵۰ میکروگرم برلیتر) به نمونه‌های پلاسما و ادرار افزوده شد و استخراج در شرایط بهینه انجام گرفت. این آزمایش‌ها شش مرتبه تکرار و نتیجه‌ها با حدود ۹۵ درصد اطمینان گزارش و بازده نسبی محاسبه شد. نتیجه‌ها در جدول ۴ ارائه شده‌اند.

برای بررسی دقت روش پیشنهادشده، تکرارپذیری (در یک روز کاری) و تکثیرپذیری (در چند روز کاری) در غلظت‌های متفاوت افزوده‌شده از آنالیت، بررسی شدند. آزمایش‌ها شش مرتبه تکرار و انحراف معیار نسبی تعیین شد (جدول ۴).

مقایسه روش پیشنهادی با روش‌های گزارش‌شده

جدول ۵، مقایسه‌ای را بین ارقام شایستگی روش پیشنهادی با روش‌های استخراج مایع-مایع، میکرواستخراج

جدول ۵ مقایسه روش‌های انجام‌شده با روش پیشنهادشده

| روش تجزیه‌ای                      | LOD  | DLR       | RSD% | EF  | R <sup>2</sup> | مرجع       |
|-----------------------------------|------|-----------|------|-----|----------------|------------|
| استخراج مایع-مایع                 | ۱٫۰  | ۱٫۰-۱۰۰   | ۹٫۲  | --- | ۰٫۹۹۸۰         | ۳۲         |
| میکرواستخراج قطره آلی منجمد شناور | ۱٫۰  | ۵-۴۰۰     | ۱۰٫۷ | ۳۳  | ۰٫۹۹۸۴         | ۳۳         |
| استخراج با فاز جامد               | ۰٫۰۵ | ۰٫۱۶-۱٫۳۰ | ۲٫۳  | --- | ۰٫۹۹۹۸         | ۳۴         |
| استخراج با فیبر توخالی            | ۰٫۹  | ۳-۱۰۰۰    | ۸٫۰  | ۱۳۰ | ۰٫۹۹۹۰         | پژوهش حاضر |

روش نسبت به روش‌های دیگر، دارای مزیت‌های زیر است.

- به‌دلیل استفاده از فاز گیرنده آلی استونیتریل، این روش سازگار با دستگاه سوانگاری مایع با عملکرد بالا است.

## نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر، برای نخستین بار مفهوم جدیدی از روش سه فاز فیبر توخالی و استفاده از دو حلال آلی امتزاج‌ناپذیر برای اندازه‌گیری ویتامین D<sub>3</sub> ارائه شد. نتیجه‌های به‌دست‌آمده در این پژوهش، نشان داد که این

- روش ارائه‌شده روشی حساس، دقیق، ساده، ارزان و با مصرف کم حلال آلی است و کاربرد آن برای استخراج از نمونه‌های پیچیده زیستی بسیار مناسب است.

- شرایط سوانگاری به‌گونه‌ای است که هیچ‌گونه تداخلی با پیک آنالیت ایجاد نمی‌شود.
- به خاطر سادگی و قیمت ارزان این روش، فیبر توخالی پس از هر استخراج دور انداخته می‌شود که این کار موجب اجتناب از اثر حافظه می‌شود.

## مراجع

- [1] Song Y, Slominski R, Qayyum S, Kang K, Janjetovic Z, Raman C. Improvement of copper FAAS determination conditions via preconcentration procedure with the use of salicylaldoxime complex trapped in polymer matrix. *Talanta*. 2012;96:82-88. doi: **10.1016/j.talanta.2012.02.005**
- [2] Campos Gomes F, Faria Santos I, Makino Stephani C, Ramires M. Vitamin D<sub>3</sub> supplementation may attenuate morphological and molecular abnormalities of the olfactory bulb in a mouse model of Down syndrome. *Tissue and Cell*. 2022;78;101898. doi: **org/10.1016/j.tice.2022.101898**
- [3] Xu H, Liao Y, Yao J. Development of a novel ultrasound-assisted headspace liquid-phase microextraction and its application to the analysis of chlorophenols in real aqueous samples. *Journal of Chromatography A*. 2007;1167(1):1-8. doi: **org/10.1016/j.chroma.2007.08.022**
- [4] Bilodeau L, Dufresne G, Deeks J, Clément G, Bertrand J, Turcotte S. Determination of vitamin D<sub>3</sub> and 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> in foodstuffs by HPLC UV-DAD and LC-MS/MS. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2011;24(3):441-448. doi: **org/10.1016/j.jfca.2010.08.002**
- [5] Hymøller L, Krogh Jensen S. Vitamin D analysis in plasma by high performance liquid chromatography (HPLC) with C<sub>30</sub> reversed phase column and UV detection – Easy and acetonitrile-free. *Journal of Chromatography A*. 2011;1218(14):1835-1841. doi: **org/10.1016/j.chroma.2011.02.004**
- [6] Iwase H. Determination of vitamin D<sub>2</sub> in emulsified nutritional supplements by solid-phase extraction and column-switching high-performance liquid chromatography with UV detection. *Journal of Chromatography A*. 2000;881(1-2):189-196. doi: **org/10.1016/S0021-9673(00)00198-9**
- [7] Qian H, Sheng M. Simultaneous determination of fat-soluble vitamins A, D and E and pro-vitamin D<sub>2</sub> in animal feeds by one-step extraction and high-performance liquid chromatography analysis. *Journal of Chromatography A*. 1988;526(6):127-133. doi: **10.1016/s0021-9673(98)00733-x**
- [8] Luque-García JL, Luque de Castro MD. Extraction of fat-soluble vitamins. *Journal of Chromatography A*. 2001;935(1-2):3-11. doi: **org/10.1016/S0021-9673(01)01118-9**
- [9] Tapadia K, Shrivastava K, Bachan Upadhyay L. GC-MS Coupled with hollow-fiber drop-to-drop solvent microextraction for determination of antidepressants drugs in human blood sample. *Chromatographia*. 2011;74:437-442. doi: **org/10.1007/s10337-011-2096-1**
- [10] van Hoof HJC, Swinkels LMJW, van Stevenhagen JJ. Advantages of paper chromatography as a preparative step in the assay of 1,25-dihydroxyvitamin D. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1993; 621(1):33-39. doi: **org/10.1016/0378-4347(93)80073-D**
- [11] V. Justová, Z. Wildtová, V. Pacovský. Determination of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in plasma using thin-layer chromatography and modified competitive protein binding assay. *Journal of*

- Chromatography A. 1984;290:107-112. doi: **org/10.1016/S0021-9673(01)93565-4**
- [12] Si Ho T, Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen K. Recovery, enrichment and selectivity in liquid-phase microextraction: Comparison with conventional liquid-liquid extraction. *Journal of Chromatography A*. 2002;963(1-2):3-17. doi: **org/10.1016/S0021-9673(02)00215-7**
- [13] Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen K. Liquid-Liquid-Liquid Microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry*. 1999;71(14):2650-2656. doi: **org/10.1021/ac990055n**
- [14] Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen K. Bioanalysis of drugs by liquid-phase microextraction coupled to separation techniques. *Journal of Chromatography B*. 2005;817(1):3-12. doi: **org/10.1016/j.jchromb.2004.08.034**
- [15] Ghambarian M, Yamini Y, Esrafil A, Yazdanfar N. A new concept of hollow fiber liquid-liquid-liquid microextraction compatible with gas chromatography based on two immiscible organic solvents. *Journal of Chromatography A*. 2010;1217(36):5652-5658. doi: **org/10.1016/j.chroma.2010.07.013**
- [16] Ali Khan W, Arain M, Yamini Y, Shah N. hollow fiber-based liquid phase microextraction followed by analytical instrumental techniques for quantitative analysis of heavy metal ions and pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2020;10:109-122. doi: **org/10.1016/j.jpha.2019.12.003**
- [17] Khafi M, Javadi A, Afshar Mogaddam M. Combination of three-phase extraction with deep eutectic solvent-based dispersive liquid-liquid microextraction for the extraction of some antibiotics from egg samples prior to HPLC-DAD. *Microchemical Journal*. 2023; 190: 108652. doi: **org/10.1016/j.microc.2023.108652**
- [18] Darvishnejad F, Raoof J, Ghani M, Ojani R. Keggin type phosphotungstic acid intercalated copper-chromium-layered double hydroxide reinforced porous hollow fiber as a sorbent for hollow fiber solid phase microextraction of selected chlorophenols besides their quantification via high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2023;1697:463993. doi: **org/10.1016/j.chroma.2023.463993**
- [19] Yang S, Wu C, Ji D, Xi Z, Chen K. Preparation and characterization of fiber braided tube reinforced polyethylene hollow fiber membranes via thermally induced phase separation. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 2023;11(9):109375. doi: **org/10.1016/j.jece.2023.109375**
- [20] Tahmasebi E, Yamini Y, Saleh A. Extraction of trace amounts of pioglitazone as an anti-diabetic drug with hollow fiber liquid phase microextraction and determination by high-performance liquid chromatography-ultraviolet detection in biological fluids. *Journal of Chromatography B*. 2009;877(20-21):1923-1929. doi: **org/10.1016/j.jchromb.2009.05.033**
- [21] Esrafil A, Baharfar M, Tajik M, Yamini Y. Two-phase hollow fiber liquid-phase microextraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2018;108:314-322. doi: **org/10.1016/j.trac.2018.09.015**
- [22] Jeannot M, Cantwell F. Mass Transfer Characteristics of Solvent Extraction into a Single Drop at the Tip of a Syringe Needle. *Analytical Chemistry*. 1997;69(2):235-239. doi: **org/10.1021/ac960814r**
- [23] Tao Y, Liu J, Hu X, Li H, Wang Th. Hollow fiber supported ionic liquid membrane microextraction for determination of sulfonamides in environmental water samples by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2009;1216(35):6259-6266. doi: **org/10.1016/j.chroma.2009.06.025**
- [24] Es'haghi Z, Kalateh Khooni M, Heidari T. Determination of brilliant green from fish

- pond water using carbon nanotube assisted pseudo-stir bar solid/liquid microextraction combined with UV-vis spectroscopy-diode array detection. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2011;79(3):603-607. doi: [org/10.1016/j.saa.2011.03.042](https://doi.org/10.1016/j.saa.2011.03.042)
- [25] Esrafil A, Yamini Y, Ghambarian M, Shariati SH, Moradi M. Measurement of fluoroquinolone antibiotics from human plasma using hollow fiber liquid phase microextraction based on carrier mediated transport. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2012;35(3):343-354. doi: [org/10.1080/10826076.2011.601488](https://doi.org/10.1080/10826076.2011.601488)
- [26] Esrafil A, Yamini Y, Shariati SH. Hollow fiber-based liquid phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography for extraction and determination of some antidepressant drugs in biological fluids. *Analytica Chimica Acta*. 2007;604(2):127-133. doi: [org/10.1016/j.aca.2007.10.012](https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.10.012)
- [27] Sarafray-Yazdi A, Amiri A.H, Es'haghi Z. BTEX determination in water matrices using HF-LPME with gas chromatography-flame ionization detector. *Chemosphere*. 2008;71(4):671-676. doi: [org/10.1016/j.chemosphere.2007.10.073](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.10.073)
- [28] Es'haghi Z, Azmoodeh R. Hollow fiber supported liquid membrane microextraction of Cu<sup>2+</sup> followed by flame atomic absorption spectroscopy determination. *Arabian Journal of Chemistry*. 2010;3(1):21-26. doi: [org/10.1016/j.arabjc.2009.12.004](https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2009.12.004)
- [29] Siang G.H, Makahleh A, Saad B. Hollow fiber liquid-phase microextraction coupled with gas chromatography-flame ionization detection for the profiling of fatty acids in vegetable oils. *Journal of Chromatography A*. 2010;12174(52):8073-8078. doi: [org/10.1016/j.chroma.2010.10.052](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.10.052)
- [30] Perez-Serradilla JA, Priego-Capote F. Simultaneous ultrasound-assisted emulsification-extraction of polar and nonpolar compounds from solid plant samples. *Analytical Chemistry*. 2007;79(17):6767-6774. doi: [org/10.1021/ac0708801](https://doi.org/10.1021/ac0708801)
- [31] Luque de Castro MD, Priego-Capote F. Ultrasound-assisted preparation of liquid samples. *Talanta*. 2007;72(2): 321-334. doi: [org/10.1016/j.talanta.2006.11.013](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2006.11.013)
- [32] Quesada JM, Mata-Granados JM, Luque de Castro MD. Automated method for the determination of fat-soluble vitamins in serum. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2004;89-90:473-477. doi: [org/10.1016/j.jsbmb.2004.03.056](https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2004.03.056)
- [33] Sobhi HR, Yamini Y, Esrafil A, Baghdad Abadi R. Suitable conditions for liquid-phase microextraction using solidification of a floating drop for extraction of fat-soluble vitamins established using an orthogonal array experimental design. *Journal of Chromatography A*. 2008;1196-1197:28-32. doi: [org/10.1016/j.chroma.2008.05.005](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.05.005)
- [34] Moreno P, Salvadó V. Determination of eight water- and fat-soluble vitamins in multi-vitamin pharmaceutical formulations by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2000;870(1-2):207-215. doi: [org/10.1016/S0021-9673\(99\)01021-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)01021-3)