فناوری پلیمر ایران

فصل‌نامه علمی
سال پنجم، شماره ۲، شماره پیاپی ۱۸، تابستان ۱۳۹۹
Vol. 5, No. 1, Issue No. 17
Summer 2020, Quarterly
صفحه ۴۶ - ۳۵

Iran Polymer Technology; Research and Development

مواد با دسترسی محدود (RAMs): نوع، سازوکار و کاربرد

نیلوفرسادات موسوی*[1]، زهرا طالب‌پور[2]

۱ تهران، دانشگاه الزهرا(س)، دانشکده فیزیک وشیمی، گروه شیمی، دانشجوی کارشناسی ارشد شیمی تجزیه

۲ تهران، دانشگاه الزهرا(س)، دانشکده فیزیک وشیمی، گروه شیمی، دانشیار شیمی تجزیه

چکیده ...

با وجود پیشرفت در ساخت دستگاه‌های مشخصه‌یابی، اندازه‌گیری غلظت‌های کم مواد در محیط‌های پیچیده به خصوص سیالات زیستی مانند خون، پلاسما، بزاق، شیر و...، کاری سخت وچالش‌برانگیز است. در حین آماده‌سازی این نمونه‌ها، نه‌تنها لازم است ترکیبات مزاحم از محیط حذف شوند، بلکه باید مواد مورد نظر در حین این فرایند از دست نرفته، حتی بتوانند تغلیظ شوند. از این‌رو در تحلیل مقادیر بسیار کم مواد، مراحل آماده‌سازی نمونه بیش ازپیش، اهمیت پیدا می‌کند. یکی از پرکاربردترین روش‌های آماده‌سازی نمونه، استخراج فاز جامد ((Solid Phase Extraction (SPE) با جاذب‌های پلیمری است که در صورت ادغام با مرحله‌ی حذف پروتئین، که به‌طور معمول برای نمونه‌های زیستی باید اجرا شود، منجر به کاهش خطا و افزایش سرعت روش پیشنهادی می‌شود. از جاذب‌های مناسب در روش SPE می‌توان به پلیمرهای قالب مولکولی و مواد با دسترسی محدود (RAM) اشاره کرد. تاکنون، انواع مختلفی از RAMهای پلیمری، سیلیکایی یا RAMهای اصلاح‌شده با نانولوله‌های کربنی، تولید شده و به‌صورت تجاری درآمده‌اند. استفاده از RAMها درعین سهولت در آماده‌سازی نمونه‌های پیچیده، بازده بالایی نیز دارد. حضور گروه‌های آب‌دوست و از طرفی منافذ کوچک سبب افزایش کارایی این دسته از مواد می‌شود.

واژه‌های کلیدی:

حذف پروتئین
مواد با دسترسی محدود بر پایه‌ی پلیمر،
مواد با دسترسی محدود بر پایه‌ی سیلیکا،
مواد با دسترسی محدود بر پایه‌ی حلّال‌های فراذره‌ای

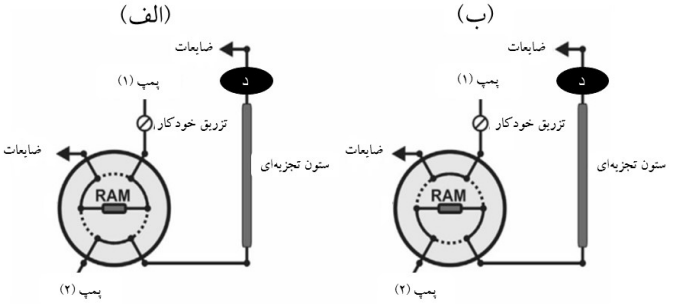
*پست الکترونیکی مسئول مکاتبات:
mousavi.nilufar@gmail.com

۱ مقدمه

مدت‌های مدیدی است که وجود پروتئین‌ها، به‌عنوان یکی از چالش‌های مهم اندازه‌گیری مقادیر بسیارکم ترکیبات برون‌زا مانند داروها و ترکیبات درون‌زا مانند متابولیت‌ها در محیط‌های زیستی به‌شمار می‌آیند. استخراج فاز جامد (Solid Phase Extraction, SPE) یکی از روش‌های کارامد برای آماده‌سازی نمونه است. پلیمرها به‌ویژه پلیمرهای قالب مولکولی (Molecular Imprinted Polymer, MIP) به عنوان جاذب در SPE بسیار مورد استفاده هستند و آن‌ها را با نام MISPE (Molecularly Imprinted Solid-phase Extraction) می‌شناسند .در مقایسه با جاذب‌های به کاربرده شده در SPEهای معمولی به‌کارگیری MIPها در SPE، همراه با انتخاب‌پذیری و حساسیت بالا و ثبات مناسب در دما، pH و حلال‌های مختلف است [۱]. اما با این حال وجود ترکیباتی مانند پروتئین‌ها در محیط نمونه با اغلب روش‌های استخراج فاز جامد SPE ناسازگار است و نه‌تنها برای جذب ترکیبات هدف روی فاز جاذب ایجاد مزاحمت می‌کند، بلکه باعث کاهش ظرفیت و انتخاب‌پذیری جاذب و در نتیجه کاهش عملکرد استخراج می‌شود. از این رو قبل از به کارگیری روش‌های SPE، انجام مرحله‌ای برای حذف پروتئین الزامی است. از طرف دیگر اگرچه روش‌های سنتی حذف پروتئین، سریع و ساده هستند، اما انتخاب‌پذیری کم این روش‌ها منجر به از بین‌رفتن برخی نمونه‌ها در مرحله‌ی ته‌نشینی پروتئین‌ها می‌شود. همچنین استفاده از این روش‌ها، فقط باعث پاک‌سازی نمونه از پروتئین‌ها می‌شود و مولکول‌های دیگر مانند فسفولیپیدها را که در محیط وجود دارند و باعث سرکوب یون‌ها در طیف‌سنجی جرمی می‌شوند و در مراحل بعدی مشخصه‌یابی، مشکل‌آفرین هستند، حذف نمی‌کند. بنابراین استفاده از روش استخراج پس از مرحله حذف پروتئین، اجتناب‌ناپذیر است.

در سال‌های اخیر تحقیقات متعددی به‌منظور ادغام دو مرحله حذف پروتئین و استخراج ترکیبات هدف، در یک مرحله صورت گرفته است که باعث کاهش خطای نتایج آزمایشگاهی، زمان مراحل آماده‌سازی نمونه و هزینه صرف‌شده می‌شود. یکی از راه‌کارهای پیشنهادی استفاده از مواد با دسترسی محدود (Restricted Access Material, RAM) در ساخت جاذب‌های SPE است. این مواد ترکیباتی هستند که به‌دلیل گروه‌های عاملی مهندسی شده در آن‌ها، در طی فرایند استخراج، پروتئین‌ها را از روی سطح جامد دفع کرده، تنها ترکیبات هدف با جرم مولکولی کم را به‌صورت انتخاب‌پذیر و از طریق سازوکارهای تقسیم، تبادل یونی یا از طریق نفوذ فیزیکی و شیمیایی استخراج می‌کنند. در این جاذب‌ها مولکول‌های بزرگ می‌توانند توسط سد نفوذ فیزیکی (با توجه به قطر منافذ) یا سد نفوذ شیمیایی ایجاد شده در سطح بیرونی ذره (توسط یک شبکه پروتئین یا پلیمر) حذف شوند. به‌عبارت دیگر با استفاده از این مواد، حذف پروتئین‌ها و استخراج انتخابی ترکیبات هدف از محیط‌های زیستی به‌صورت هم‌زمان صورت می‌گیرد. بسیاری از جاذب‌های پلیمری از طریق اضافه کردن گروه‌های عاملی خاص، به RAMها تبدیل می‌شوند. عملکرد این دسته از جاذب‌ها به گونه‌ای است که از یک طرف سطح خارجی پلیمر با گروه‌های آب‌گریز و دارای منافذ کوچک پوشانده می‌شود تا امکان عبور مولکول‌هایی با وزن کم را فراهم نماید و از طرف دیگر سد شیمیایی حاصل از گروه‌های آب‌دوست باعث جلوگیری از اتصال غیرقابل برگشت پروتئین‌ها به جاذب شود[۲].

اگرچه RAMها در روش‌های مختلف SPE و ریزاستخراج فاز جامد (Solid Phase Micro Extraction, SPME) به‌صورت گسترده به کار می‌روند، اما بیشترین استفاده از این جاذب‌ها در روش‌های برخط (On-line) مانند سوانگاری تعویض ستون (Column Switching Chromatography) است. در این روش‌ها حذف پروتئین، استخراج ترکیب هدف و اندازه‌گیری به‌طور خودکار در یک سامانه انجام می‌گیرد. استفاده ازاین روش‌ها به‌دلیل مزایایی همچون کم بودن هزینه مشخصه یابی (آنالیز)، حجم حلال مصرفی و خطای کم اندازه‌گیری، بسیار پیشنهاد می‌شود. نحوه به‌کارگیری جاذب‌های RAM در روش ریز استخراج درون لوله (In-Tube SPME) که به‌صورت برخط به سامانه سوانگاری مایع تبادل یونی متصل است، در شکل ۱ آورده شده است. در این روش نمونه‌ی پلاسما بدون انجام هیچ مرحله آماده‌سازی به داخل لوله‌ی استخراجی تزریق می‌شود. پس از استخراج ترکیبات هدف روی RAM، پروتئین‌ها و دیگر مواد مزاحم از دورریز سامانه خارج می‌شوند. در نهایت با تعویض حالت شیر چندراهه، مواد شسته شده از جاذب وارد ستون تبادل‌گر یونی شده، پس از



شکل ۱ سوانگاری مایع تعویض ستون با استفاده از جاذب RAM [۳]

جداسازی، مشخصه‌یابی می‌شوند.

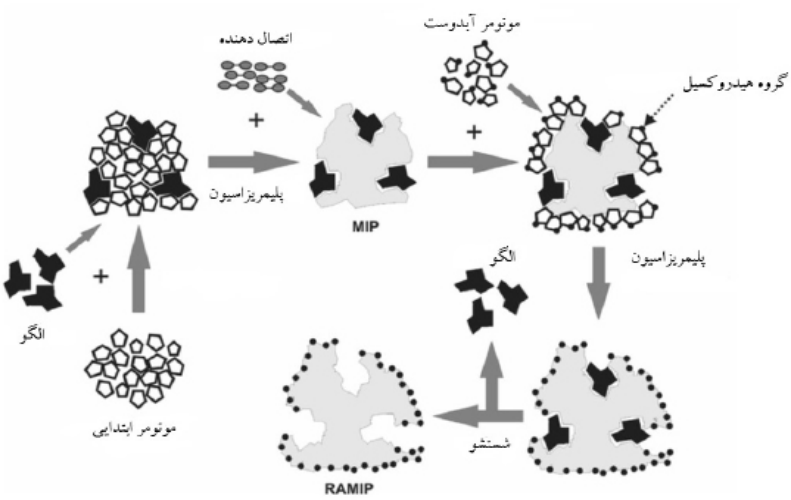
صرف‌نظر از نوع آشکارساز (Detector) مورد استفاده، روش‌هایی که در آن‌ها از جاذب‌های بر پایه RAM استفاده می‌شود به‌دلیل پیش‌تغلیظ خوب، دارای حساسیت و دامنه خطی مناسبی هستند و امکان مشخصه‌یابی مقادیر بسیار کم نمونه‌ها را نیز فراهم می‌کند. همچنین برخی از پلیمرها را می‌توان از طریق اصلاح کردن به RAM تبدیل کرد. برای مثال پلی‌کاپرولاکتون (Poly-ε-caprolactone) از دسته پلیمرهایی است که امروزه با اعمال تغییراتی به‌عنوان RAM برای استخراج مولکول‌های کوچک از نمونه‌های زیستی مورد استفاده قرار می‌گیرد [۴]. از طرفی علاوه بر جاذب‌های جامد، رویکردهای جدیدی نیز برای توسعه RAMهایی که از حلال‌های Supra Molecular استفاده می‌کنند، پیشنهاد شده است [۵]. در ادامه با توجه به گزارش‌های به چاپ رسیده در زمینه‌ی RAMها، متداول‌ترین انواع آن توضیح داده خواهد شد.

۲ RAMهای بر پایه‌ی پلیمرهای قالب مولکولی (RAMIP)

همان‌طورکه توضیح داده شد RAMها جاذب‌هایی هستند که از جذب مولکول‌های بزرگ جلوگیری می‌کنند و می‌توانند مواد با وزن مولکولی کم را جذب کنند. اما متأسفانه اغلب این RAMها دارای محدودیت در انتخاب‌پذیری هستند که روی کارایی مشخصه‌یابی تأثیر می‌گذارد. از طرفی پلیمرهای قالب مولکولی (Molecular Imprinted Polymer, MIP) از آن دسته از جاذب‌ها هستند که بسیار انتخاب‌پذیر عمل می‌کنند ولی از مشکلات بزرگ آن‌ها، می‌توان به اختلال عملکردشان در بسیاری از نمونه‌های آبی اشاره کرد[۶]. به‌منظور غلبه بر محدودیت‌های هر یک از جاذب‌های ذکر شده، جاذب‌های ترکیبی به نام RAMIP (Restricted Access Molecularly Imprinted Polymers) ساخته شده‌اند. این جاذب‌ها، پلیمرهای آلی هستند که توانایی همزمان استخراج انتخاب‌پذیر نمونه و حذف مولکول‌های بزرگ را بدون تداخل آب در محل‌های اتصال دارند [۷]. محققان معرفی‌کننده این جاذب‌ها، آن‌ها را با توجه به معرف‌های اصلاح‌شده برای سطح پلیمر، به چهار دسته تقسیم کرده‌اند که در ادامه به تفکیک در مورد هر کدام توضیحاتی داده خواهد شد.

جاذب‌های RAMIP ساخته شده باکومونومرهای آب‌دوست اولین دسته از این جاذب‌ها هستند. ساخت این جاذب‌ها (گروه I) مانند سنتز جاذب‌های MIP به روش سنتی یعنی با مخلوط کردن مونومر، مولکول هدف به‌عنوان قالب (Template) و اتصال‌دهنده و در نهایت انجام فرایند پلیمری‌شدن شروع می‌شود. پس از مدتی، کومونومرهای آب‌دوست برای اصلاح MIP شکل‌گرفته تولید شود. RAMIP به محیط واکنش اضافه می‌شوند تا موجب ایجاد لایه آب‌دوست شوند. این لایه علاوه بر جلوگیری از ورود مولکول‌های بزرگ، از تداخل مولکول‌های آب نیز در محل‌های اتصال MIP جلوگیری می‌کند (شکل ۲) [۳]. همچنین سطح آب‌دوست مانند محافظ عمل کرده، از واکنش غیرانتخابی بین آب و جایگاه‌های اتصال جلوگیری می‌کند. به همین دلیل به این دسته از مواد، MIP سازگار با آب نیز می‌گویند [۸].

برای سنتز جاذب‌های RAMIP باکومونومرهای آب‌دوست و (Bovine Serun Albumin (BSA)) که در گروه II جای می‌گیرند، همانند گروه I، ابتدا سطح MIP با لایه آب‌دوست پوشانده می‌شود (شکل ۳). سپس این لایه آب‌دوست با لایه‌ای از BSA احاطه شده

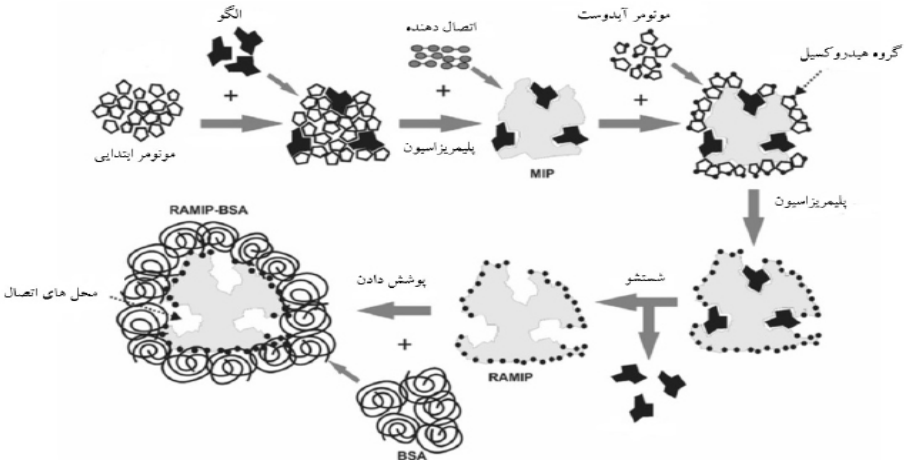


شکل ۲ طرح‌واره سنتز عمومی RAMIP گروه I [۳].

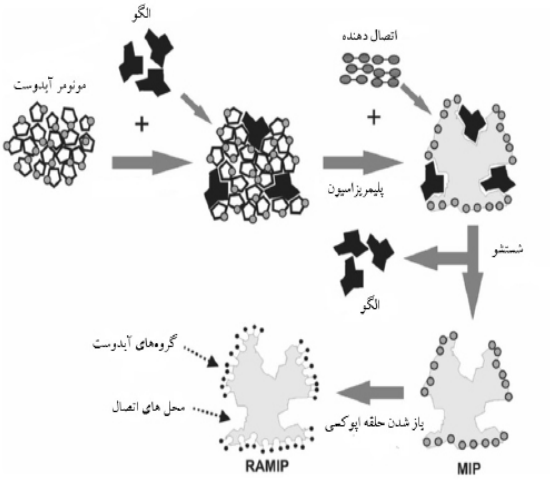
و در نهایت، پلیمر RAMIP-BSA تولید می‌شود. پوشش BSA زمانی که pH محیط، بالاتر از نقطه ایزوالکتریک آن باشد، به‌دلیل افزایش چگالی بار منفی روی سطح پلیمر، عملکرد حذف مولکول‌های بزرگ را بهبود می‌بخشد [۳].

به‌منظور درک بهتر رفتار RAMIPهای گروه‌های I و II، مطالعه مقایسه‌ای بر روی استخراج داروی β-Blocker با این جاذب‌ها انجام گرفت. در این تحقیق، جاذب‌هایی از جنس MIP سنتی، RAMIP نوع I و II و MIP سنتی پوشیده شده با لایه BSA، سنتز شد. مقایسه‌ها نشان داد، این پلیمرها برای جذب داروی مورد بررسی کارآمد هستند. پوشش آب‌دوست به‌طور قابل توجهی گزینش‌پذیری در محیط‌های آبی را بهبود بخشیده است. همچنین نتایج نشان داد اضافه شدن لایه آب‌دوست و همچنین پوشش BSA، نه تنها باعث تغییر خواص شیمیایی پلیمر نمی‌شود، بلکه برای حذف تمام مولکول‌های بزرگ موجود در محیط‌های زیستی بسیار مهم است. از طرفی با استفاده از بررسی مشخصات فیزیکی مشخص شد مراحل سنتز روی اندازه و شکل ذرات جاذب تأثیرگذار است [۹].

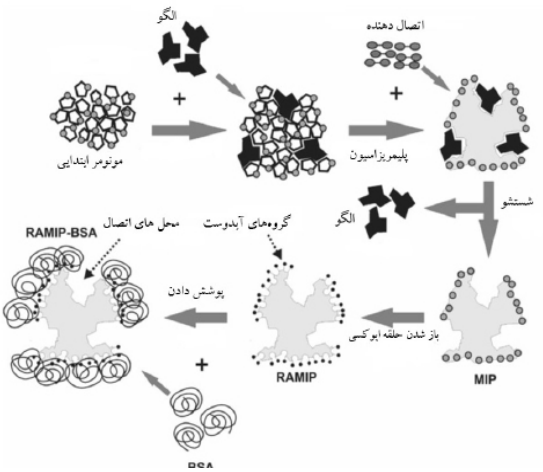
RAMIPهای گروه III شامل کومونومرهایی هستند که بعد از اصلاحاتی در حین سنتز، آب‌دوست می‌شوند. بدین صورت که لایه آب‌دوست پس از ساخت پلیمر،



شکل ۳ طرح‌واره سنتز عمومی RAMIP گروه II [۳]



شکل ۴ طرح‌واره سنتز عمومی RAMIP گروه III [۱۰].



شکل ۵ طرح‌واره سنتز عمومی RAMIP گروه IV [۳]

توسط واکنش شیمیایی تولید می‌شود. به‌طور مثال گلیسیدیل متاکریلات (Glycidyl Methacrylate) به‌دلیل وجود حلقه اپوکسید در ساختار شیمیایی، به‌طور معمول به‌عنوان کومونومر مورد استفاده قرار می‌گیرد. در ادامه باز شدن حلقه‌ی اپوکسید، تراکم بالایی از گروه‌های هیدروکسیل ایجاد می‌کند و باعث ایجاد سطح آب‌دوست می‌شود (شکل ۴).

طی تحقیقاتی در زمینه ریزساختار و اندازه‌گیری خصوصیات آب‌دوستی این گروه از RAMIPها، مشخص شد که از یک طرف برهم‌کنش غیراختصاصی آب‌گریز بین قالب و بافت پلیمری برقرار شده و از طرف دیگر جذب مولکول‌های بزرگ به‌دلیل سطح آب‌دوست به شدت کاهش یافته است [۱۱]. RAMIPهای گروه IV، همانند RAMIPهای گروه III هستند؛ با این تفاوت که در انتها، سطح آن‌ها با استفاده از BSA پوشش داده می‌شود (شکل ۵).

از جدیدترین تحقیقات در زمینه RAMIPها می‌توان به RAMIPهای مغناطیسی اشاره کرد. این نوع از RAMIPها با استفاده از ظرفیت مغناطیسی مواد، باعث آماده‌سازی سریع و راحت‌تر نمونه می‌شوند تا جایی که بسیاری از نمونه‌های زیستی مثل پلاسما بدون نیاز به آماده‌سازی، مستقیم وارد مرحله استخراج آنالیت می‌شوند [۱۲].

در جدول ۱ به برخی از کاربردهای RAMIPها برای مشخصه‌یابی ترکیبات مختلف در محیط‌های زیستی یا حاوی پروتئین اشاره شده است. شایان گفتن است تمامی RAMIPهای معرفی شده دارای عیب بزرگی هستند و آن وجود قالب‌های اختصاصی است تنها می‌تواند برای یک آنالیت و یا یک دسته از مواد، مورد استفاده قرار گیرند. درنتیجه ساخت این جاذب‌ها، نیازمند زمان و هزینه فراوان است.

۳ RAMهای بر پایه‌ی سیلیکا

RAMهای بر پایه‌ی سیلیکا اولین مورد از RAMهای تولید شده هستند. با آن که این مواد از سال ۱۹۸۵ توسط محققان با عنوان موادی با سطح درونی فاز معکوس (Internal Surface Reversed-Phase, ISRP) توسعه پیدا کردند [۱۵]، اما واژه RAM برای اولین بار در سال ۱۹۹۱ به آن‌ها اطلاق شد [۱۰]. به طور معمول در این جاذب‌ها یک سطح داخلی و یک سطح خارجی وجود دارد که بر اساس هماهنگی ویژگی شیمیایی این دو سطح، به دو دسته تقسیم‌بندی می‌شوند:

• فاز تک‌حالته (Unimodal Phases) که در آن نوع گروه‌های عاملی سطح خارجی و داخلی یکسان هستند.

• فاز دوحالته (Biomodal Phases) که در آن گروه‌های عاملی سطح خارجی از نوع آب‌دوست و گروه‌های عاملی سطح داخلی آب‌گریز هستند.

به علاوه، سازوکار حذف در RAMها می‌تواند از طریق سد نفوذ فیزیکی بر اساس منافذ یا سد نفوذ شیمیایی بر اساس حضورگروه‌های عاملی باشد [۱۶]. با

جدول ۱ کاربردهایی از مواد دسترسی محدود با پایه پلیمر قالب مولکولی (RAMIP)

آنالیت	نمونه	نوع RAM	فن آماده‌سازی نمونه	روش	محدوده خطی/μg L^{-1}	LOD/LOQ[11] μg L^{-1}	پایداری	مرجع
مسدودکننده‌های بتا[1]	ادرار	۱	سوانگاری تعویض ستونی[5]	LC-MS/MS[8]	۱-۷۵	۰/۱-۱/۱-۳	۲۰۰	[۸]
کلروپرومازین[2]	پلاسما انسان	۲	سوانگاری تعویض ستونی	HPLC-UV[9]	۳۰-۳۵۰	-/۳۰	۹۰	[۳]
اسیدفولیک[3]	پودرشیر	۳	SPE برونخط[6]	HPLC-PDA[10]	۴/۸۳-۲۵۰	۱/۴۵/۴/۸۳	بیش‌از ۱۰۰	[۱۳]
داروهای ضدافسردگی سه‌حلقه ای[4]	پلاسما انسان	۴	SPEبرخط[7]	LC-MS/MS	۱۵-۵۰۰	-/۱۵	۲۰۰	[۱۴]

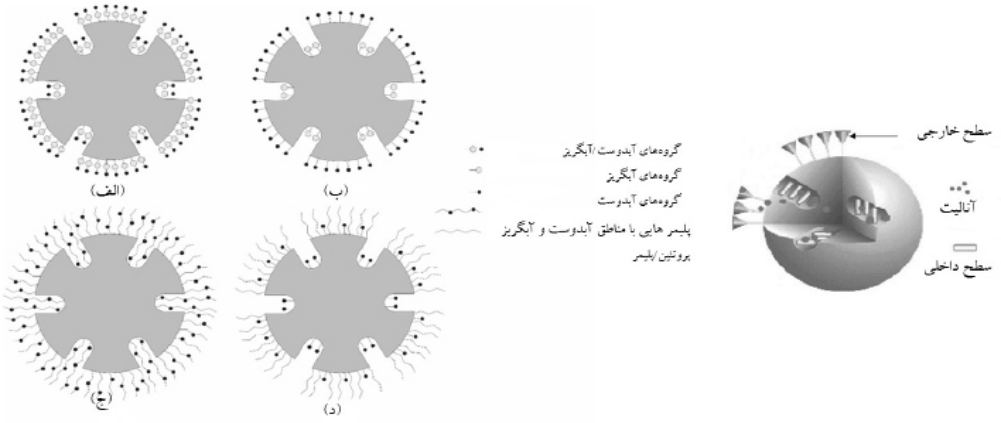
1: β-Blockers; 2: Chlorpromazine; 3: Folic Acid; 4: Tricyclic Antidepressants; 5: Column Switching; 6: SPE Offline; 7: SPE Online; 8: Liquid chromatography Tandem Mass spectrometry; 9: High Performance liquid Chromatography-Ultraviolet Detector; 10: High Performance liquid Chromatography- Photo Diode Array; 11: Limit of Detection/ Limit of Quantitation.

ترکیب هر دو طبقه‌بندی می‌توان RAMها را به چهار دسته‌ی کلی تقسیم کرد که در شکل ۶ نشان داده شده است و در ادامه به تفکیک، در مورد هر کدام توضیح داده می‌شود.

الف) سد نفوذ فیزیکی تک حالته، ب) سد نفوذ فیزیکی دو حالته، ج) سد نفوذ شیمیایی تک حالته و د) سد نفوذ شیمیای دو حالته [۲]

در RAMهایی با سد نفوذ فیزیکی تک‌حالته (نوع A)، خاصیت آب‌دوستی و آب‌گریزی هر دو سطح داخلی و خارجی یکسان است [۱۶]. در این جاذب به‌دلیل وجود حفرات کوچک در سطح داخلی از ورود مولکول‌های بزرگ جلوگیری می‌شود، درحالی‌که مولکول‌های کوچک از طریق زنجیره‌های کوچک داخل حفرات جذب می‌شوند [۱۷]. از طرف دیگر به‌دلیل پوشیده شدن سطح خارجی جاذب با زنجیره‌های آب‌دوست، تجمع پروتئین‌ها بر روی سطح خارجی به حداقل می‌رسد. مهم‌ترین مزیت RAM نوع A، سهولت آماده‌سازی آن‌ها است. از طرفی در این جاذب‌ها، آنالیت می‌تواند در گروه‌های آب‌گریز سطح خارجی نیز باقی بماند. در نتیجه مرحله شستشو برای آنالیت‌هایی که در سطح خارجی حفظ می‌شوند، سریع‌تر انجام می‌گیرد.

در RAMهای با سد نفوذ فیزیکی دو حالته (نوع B) نیز از اندازه منافذ برای حذف پروتئین استفاده می‌شود اما گروه‌های آب‌دوست داخلی و آب‌گریز خارجی باعث نگه‌دارندگی‌های متفاوت می‌شوند [۱۵]. در حقیقت ISRPها زیرمجموعه گروه RAMهای نوع



شکل ۶ طبقه‌بندی RAM بر پایه‌ی سیلیکا

B هستند [۱۶]. از اولین موارد گزارش شده از این نوع RAMها می‌توان از(Glycine - L-Phenylalanine - L-Phenylalanine) GFF نام برد که از اسیدهای آمینه L-فنیل آنالین و گلایسین در سطح داخلی آن استفاده شده است. آب‌دوست بودن این نگه‌دارنده با گروه‌های گلیسرول پروپیل (این گروه‌ها مسئول جلوگیری از جذب پروتئین‌ها هستند) که به سطح خارجی سیلیکا پیوند شده‌اند، تقویت می‌شوند. در روش‌هایی که GFF به‌عنوان فاز استخراج‌کننده به‌کار گرفته می‌شود، زمان مشخصه‌یابی کوتاه‌تر، تکرارپذیری بالاتر، استفاده ساده‌تر و حد تشخیص پایین‌تر است. همچنین با استفاده از این مواد تا ۹۹٪ از پروتئین‌ها حذف می‌شوند. با افزودن گروه‌هایی به سطح داخلی و خارجی یا با تغییر اندازه حفره‌ها، GFFها را می‌توان بهینه کرد [۱۶].

از پرکاربردترین RAMهای نوع B می‌توان به ADS (Alkyl Diol Silica Group) اشاره کرد. این نوع RAM دارای حفره‌های کوچکی هستند که برای مولکول‌های بزرگ غیرقابل دسترس است. در حالی که آنالیت‌های کوچک به‌وسیله‌ی منطقه‌ی داخلی آب‌گریز حفظ می‌شوند [۱۶]. وظیفه‌ی حذف پروتئین‌ها را نیز گروه‌های آب‌دوست دیول، در سطح خارجی این RAMها به عهده دارند. RAMهای کایرال از دیگر مواردی هستند که در این گروه معرفی شده‌اند. به‌طور معمول این ویژگی با افزودن لیگاند کایرال بر روی سطح آب‌گریز داخلی RAM، ایجاد می‌شود. سطح خارجی نیز همانند ADS آب‌دوست است [۱۸].

ازدیگر RAMهای اصلاح شده نوع B، می‌توان به تعویض گروه‌های دیول با گروه یونی اشاره کرد. بر طبق اصلاحاتی که روی آن‌ها انجام می‌گیرد می‌توان در گروه جاذب‌های تعویض کاتیونی(Cation Exchange) ضعیف و قوی یا تعویض آنیونی (Anion Exchange) ضعیف و قوی طبقه‌بندی شوند. برای حذف پروتئین‌ها و کربوهیدرات‌ها اغلب تبادل‌گرهای آنیونی که کاتیون روی سطح جاذب قرار می‌گیرد و بارهای منفی جابه‌جا می‌شوند رواج بیشتری دارند [۱۹].

دسته سوم، شامل RAMهای با سد نفوذ شیمیایی تک‌حالته (نوع C) است. در این دسته نیز از سیلیکای پرحفره با گروه‌های آب‌گریز و آب‌دوست که سطح داخلی و خارجی را با سد نفوذ شیمیایی پوشش می‌دهند، استفاده می‌شود. اولین RAM نوع C در سال ۱۹۸۸ ساخته شد. در این RAM منطقه آب‌گریز توسط منطقه آب‌دوست که وظیفه حذف پروتئین را دارد، احاطه شده است [۲۰]. Hisep از مدل‌های تجاری شده این نوع RAM است که گاهی امکان پاسخ‌گویی تا هزار بار استفاده را دارد.

برای آخرین دسته از این گروه می‌توان به RAM های با سد نفوذشیمیایی دو حالته (نوع D) اشاره کرد. در این نوع از RMAها از پروتئین سرم گاوی (BSA) استفاده می‌شود تا به‌وسیله‌ی آلفا اسید گلیکوپروتئین، لایه آب‌دوست خارجی ایجاد و در نهایت RAM-BSA تولید شود. طول عمر این گروه از RAMها نسبت به RAMهای با نفوذ فیزیکی دو حالتی کمتر است.

در جدول ۲ به تعدادی از گزارش‌های به چاپ رسیده اشاره شده است. انواع مختلف RAMهای استفاده شده، نوع و ویژگی‌های روش مشخصه‌یابی، فن آماده‌سازی نمونه به‌کار برده شده، محدوده‌ی خطی و حد تشخیص به‌دست آمده در این جدول آورده شده است.

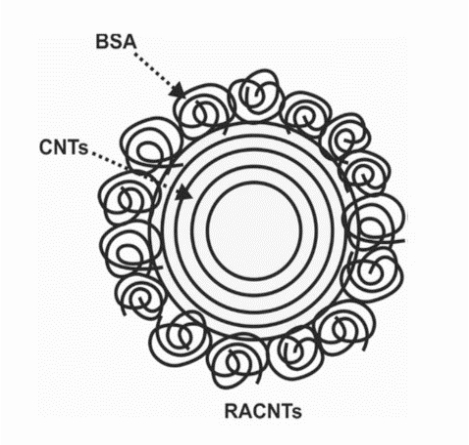
۴ RAMهای بر پایه نانولوله‌های کربنی (RACNT)

نانو لوله‌های کربنی (Carbon Nano Tubes, CNT) در سال ۱۹۹۱ معرفی شدند. این مواد، نتایج و دستاوردهای گسترده‌ای را در جاذب‌ها به ارمغان آوردند. مقالات اخیر، نشان‌دهنده‌ی قابلیت CNTها برای استخراج و پیش‌تغلیظ آنالیت‌های آلی و معدنی است. ویژگی‌های بارز CNTها، همچون مساحت سطح بالا و پایداری شیمیایی و فیزیکی مناسب، با نیازهای اولیه برای جاذب‌ها هماهنگی بالایی دارد [۲۹]. با این حال بسیاری از کاربردهای CNT برای اندازه‌گیری ترکیبات آلی و معدنی در نمونه‌های زیستی، نیازمند مرحله آماده سازی نمونه به‌منظور حذف مولکول‌های بزرگ است که باعث اثرات نامطلوب ماتریسی می‌شوند. برای حل این مشکل محققان نظریه RACNT (Restricted Access Carbon Nano Tube) را مطرح کردند (شکل ۷) که در آن CNTهای معمولی با لایه خارجی BSA از طریق اتصال عرضی اصلاح می‌شود. در کاربردهای اولیه، این جاذب‌ها قادر به حذف مؤثر پروتئین‌های سرم انسانی بودند. علاوه بر این،RACNT ها می‌توانند تا ۳۰۰ چرخه، بدون اندکی کاهش در توانایی استخراج و جذب استفاده شوند [۲۹].

جدول ۲ کاربردهایی از RAMهای بر پایه سیلیکا

آنالیت	نمونه	نوع RAM	فن آماده‌سازی نمونه	روش مشخصه‌یابی	محدوده خطی $\mu g\ L^{-1}$	LOD/LOQ[۱۵] $\mu g\ L^{-1}$	مرجع
			نوعA				
پپتیدهای درون‌زا[۱]	سرم انسانی و مغز موش	سیلیس مزوپور مغناطیسی با دیوارهای منافذ داخلی اصلاح‌شده با C8	SPE برخط[۱۱]	HPLC-UV[۱۳]	-	-	[۲۱]
مشتقات متیل اکسانتین و سفالوسپورین‌ها[۲]	سرم انسانی	فازداخلی: فنیل، بوتیل یا گروه‌های اکتیل فازبیرونی: گروه‌های دیول	SPE (جداسازی مغناطیسی)	Nano-LC-MS/MS[۱۴]	-	-	[۲۲]
			نوعB				
استر فتالات[۳]	شیر گاومیش	فازداخلی: اکتادسیل و گروه‌های بنزیل فازبیرونی: زنجیره‌های پلیمری باگروه‌های دیول	SPEبرون‌خط[۱۲]	HPLC-UV	۰/۳-۳۰۰	۱۰- ۱/۳۵-۳۷/ ۰/٤٦	[۲۳]
آگونیست‌های دوپامین[٤]	پلاسما موش، میمون و انسان	GFF[۹]	سوانگاری تعویض ستونی	-HPLC Coulometry	۱/۵-۱۰۰۰	- /۱/۵	[۲٤]
			نوعC				
آنتی‌بیوتیکها و مشتقات زاناتین[۵]	سرم انسانی و گاومیش	فازداخلی: متیل، فنیل یا گروه‌های اکتیل فازبیرونی:گروه‌های پلی اوکسی‌اتیلن	In-Tube SPE	HPLC-UV	-	-	[۲۵]
داروهای ضد ویروس[٦]	ادرار و سرم موش	Hisep®	سوانگاری تعویض ستونی	LC-MS/MS	٤-۵۰	۱/۷/٤/۳-۵/۱- ۱/٤	[۲٦]
			نوعD				
سولفامتوکس ازولوتریمتوپریم[۷]	تخم‌مرغ	RAM-Octadecyl-BSA[۱۰]	سوانگاری تعویض ستونی	HPLC-UV	۸۰-۲۰۰۰	۲۵-٤۰/۸۰	[۲۷]
آلبندازولومتابولیت‌ها[۸]	کبدموش	RAM-Phenyl-BSA	سوانگاری تعویض ستونی	HPLC-UV	-	-	[۲۸]

1:Endogenous Peptides; 2: Methylxanthine Derivatives and Cephalosporins; 3: Phthalate Esters; 4: Dopamine Agonist; 5: Antibiotics and Xanthine Derivatives; 6: Antiretrovirals; 7:Sulfamethoxazole and Trimethoprim; 8: Albendazole and Metabolites; 9: Glycine - L-Phenylalanine - L-Phenylalanine; 10: Bovine Serum Albumin; 11: On-line Solid Phase Extraction; 12: Off-line Solid Phase Extraction; 13:High Performance liquid Chromatography-Ultraviolet Detector; 14: Nano liquid Chromatography Tandem Mass spectrometry; 15: Limit of Detection/ Limit of Quantitation.



شکل ۷ طرح‌واره نانولوله‌های کربنی دسترسی محدود (RACNT)

گروهی از محققان، تأثیر pH بر روی ظرفیت RACNTها، در حذف پروتئین را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد برای محدوده pH ۳–۲/۲ و ۷–۵/۶، RACNTها قادر بودند تا بالاتر از ۸۵٪ از پروتئین‌ها را حذف کنند. در این محدوده pH، بار خالص پروتئین (هم در نمونه و هم در جاذب) مثبت یا منفی است که باعث دافعه‌ی الکترواستاتیک بین پروتئین‌های نمونه و لایه BSA بر روی سطح RACNTها می‌شود [۲۹]. هنگامی که نمونه‌ی پروتئینی در pHهای بالاتر از نقطه‌ی ایزوالکتریک پروتئین، از کارتریج حاوی RACNT عبور کند، پروتئین‌های نمونه و لایه BSA با بار منفی باردار می‌شوند. بنابراین دافعه‌ی الکتروستاتیکی، از جذب پروتئین‌های نمونه بر سطح RACNT جلوگیری می‌کند، در حالی که یون‌های فلزی روی CNT (یعنی هسته این جاذب)، جذب می‌شوند.

از معایب استفاده از RACNTها، می‌توان به فشار برگشتی ناشی از قطر کم ذرات اشاره کرد. علاوه بر این حتی با ظرفیت جذب بالا، دیده شده است برای اعتبارسنجی روش تجزیه‌ای معرفی‌شده با استفاده از این جاذب‌ها، رسم منحنی‌های درجه‌بندی حاوی ماتریس (Matrix Matched Calibration Curve) لازم است [۳۰].

علاوه بر RACNTها، دسته دیگری از جاذب‌ها به نام RACC (Restricted Access Carbon Clothes)ها وجود دارند که در آن‌ها نوع پوشش کربن فعال، متفاوت است. اگرچه RACCها نسبت به RACNTها هزینه کم‌تری دارند اما در عین‌حال دارای ظرفیت جذب کم‌تری نیز هستند و تنها برای آماده‌سازی نمونه‌های ساده مناسب هستند [۳۰].

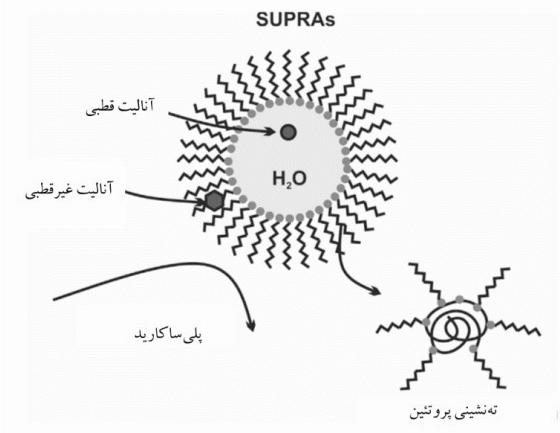
۵ RAMهای بر پایه حلال‌های فراذره‌ای (RAM–SUPRAS)

امروزه رویکرد جدیدی برای توسعه RAMها برپایه‌ی حلال‌های فراذره‌ای (Supramolecular Solvent, SUPRAS)، پیشنهاد شده است. این حلال‌ها، مایعات غیرقابل امتزاج ساخته شده از مولکول‌هایی بزرگ هستند که در فاز پیوسته پخش و شکل‌گیری آن‌ها توسط فرایند خودسامانی (Self-Assembly) در مقیاس مولکولی و نانومولکولی انجام می‌شود. این حلال‌ها در تماس با نمونه‌های زیستی، پروتئین‌ها را به‌واسطه اندازه و ته‌نشینی به‌وسیله تماس با حلال جدا می‌کنند. برای اولین بار در سال ۲۰۱۰، از حلال‌های فراذره‌ای (SUPRAS) به‌عنوان RAM استفاده شد [۳۱]. سازوکار حذف برای RAM-SUPRASها شامل رسوب پروتئین به‌وسیله ماده فعال سطحی یا اندازه طردی به‌وسیله ساختار حلال است. همان طور که در شکل ۸ نشان داده شده است در این جاذب‌ها، آنالیت‌های قطبی در حفره‌ها، به‌دلیل برهم‌کنش بین گروه‌های دهنده و پذیرنده آنالیت و سر قطبی ماده‌ی فعال سطحی حل می‌شوند و آنالیت‌های غیرقطبی، می‌توانند با برهم‌کنش‌های واندروالس بین ساختار هیدروکربن و زنجیره‌ی کربنی روغنی ماده‌ی فعال سطحی، حل شوند [۳۲].

در سازوکار مکانیسم اندازه طردی (Size Exclusion)، RAM-SUPRASها، مولکول‌های بزرگ مانند بعضی از پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدها را حل نمی‌کنند. در این جاذب‌ها با افزایش وزن مولکولی آنالیت، استخراج کاهش می‌یابد. این امر نشان‌دهنده‌ی ارتباط استخراج، با نوع برهم‌کنش آنالیت و جاذب، همچنین اندازه آنالیت‌ها است. درنتیجه اندازه منافذ نقش کلیدی در استخراج، توسط این جاذب‌ها ایفا می‌کنند. به همین دلیل مطالعات به‌منظور تنظیم اندازه منافذ ایده‌ال برای هر آنالیت و ماتریس انجام می‌شود. در مشخصه‌یابی‌های مربوط به صنایع غذایی این دسته از RAMها بسیار مورد استفاده هستند [۵]. از مزیت‌های RAM-SUPRASها می‌توان به استخراج و پاک‌سازی در یک مرحله، سرعت بالا، مصرف کم حلال و استخراج آنالیت‌های متنوع از لحاظ قطبیت، اشاره کرد [۳۱].

۶ نتیجه‌گیری

با ظهور مواد بر پایه‌ی RAM، تحولی جدید در فازهای



شکل ۸ نمایی از حلال‌های فراذره‌ای دسترسی محدود (RAM-SUPRAS)

ساکن سوانگاری مایع و جاذب‌های روش‌های استخراج فاز جامد رخ داد. درگذشته نمونه‌های زیستی به‌صورت دستی قبل از مشخصه‌یابی، آماده‌سازی می‌شدند اما اکنون می‌توانند مستقیم، به سامانه سوانگاری‌مایع دارای RAM، تزریق شوند. متداول‌ترین مواد با دسترسی محدود، دسته‌ای هستند که پایه‌ی سیلیکایی دارند و به‌دلیل عمر طولانی و ظرفیت بالای حذف پروتئین، تجاری شده‌اند. البته، به‌جز آلکیل دیول سیلیکاها، به‌دلیل تخریب احتمالی سیلیکا در گستره وسیعی از pH مورد استفاده قرار نمی‌گیرند. همچنین این مواد انتخاب‌پذیری کمی نیز دارند اما با وجود آشکارساز قوی مثل طیف‌سنج‌جرمی، بسیار کارآمد هستند. در بین RAM ها، RAMIPها از انتخاب‌پذیری و همچنین مقاومت بالا در مقابل دما، pH و حلال، برخوردار هستند. با این حال این جاذب‌ها در تعیین همزمان بسیاری از ترکیبات با ساختار شیمیایی متفاوت، عملکرد مناسبی نشان نمی‌دهند. بنابراین RAMIPها انحصاری هستند که این خود مستلزم صرف هزینه و زمان اضافی است. از دیگر RAMها می‌توان به RACNTها اشاره کرد. این دسته از RAMها دارای ظرفیت جذب بالا و پایداری شیمیایی و دمایی مناسب هستند. از مزیت اصلی این دسته از جاذب‌ها می‌توان به استخراج آنالیت‌ها درغلظت‌های کم اشاره کرد. همچنین به‌دلیل سهولت اصلاح سطح بیرونی CNTها با گروه‌های آب‌دوست و آب‌گریز، بسیار مورد استقبال محققان واقع شدند. نقطه ضعف این جاذب، فشار برگشتی بالا به واسطه‌ی قطر کوچک نانوذرات است. در نهایت می‌توان از RAM-SUPRASها نام برد که در مقایسه با جاذب‌های عنوان‌شده، جدیدتر بوده، برای آماده‌سازی نمونه‌های حاوی مولکول‌های بزرگ بسیار کارآمد هستند.

اما این حلال‌ها فقط برای استخراج برخط مناسب هستند و قابلیت استفاده مجدد از آن‌ها وجود ندارد. درنتیجه هزینه استفاده از این مواد بالا است. براساس ویژگی‌های مربوط به RAMها، می‌توان پیش‌بینی کرد استفاده از این نوع جاذب‌ها در آینده در سامانه‌های برخط و به‌صورت رایج درمواردی که نیاز به سرعت بالای مشخصه‌یابی است به‌ویژه درآزمایشگاه‌های تشخیص طبی افزایش یابد. در جدیدترین مطالعات، محققان به‌دنبال استفاده از جاذب‌های طبیعی مثل دانه‌های برنج هستندکه با انجام اصلاحاتی، آن‌ها را تبدیل به RAM طبیعی کنند.

مراجع

1. Khatibi S. A., Hamidi S., Siahi-Shadbad M. R., Current Trends in Sample Preparation by Solid-Phase Extraction Techniques for The Determination of Antibiotic Residues in Foodstuffs: AReview, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 0, 1–22, **2020**.

2. Mullett W.M., Determination of Drugs in Biological Fluids by Direct Injection of Samples for Liquid-Chromatographic Analysis,*Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70, 263-273, **2007.**

3. Moraes G.O.I., Silva L.M.R., Santos-Neto A.J., Florenzano F.H., FigueiredoE.C., A New Restricted Access Molecularly Imprinted Polymer Capped with Albumin for Direct Extraction of Drugs from Biological Matrices: The Case of Chlorpromazine in Human Plasma, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*,405, 7687-7696, **2013**.

4. Raabová H.,Háková M.,Havlíková L., Poly-ϵ-caprolactone Nanofibrous Polymers: A Simple Alternative to Restricted Access Media for Extraction of Small Molecules from Biological Matrixes, *Analytical Chemistry*, 92,6801–6805, **2020**.

5. González-RubioS., García-GómezD., Ballesteros-GómezA., RubioS., A New Sample Treatment Strategy Based on Simultaneous Supramolecular Solvent and Dispersive Solid-Phase Extraction for The Determination of Ionophore Coccidiostats in All Legislated Foodstuffs,*Food Chemistry*, 326, 126987, **2020**.

6. BoosK.S., FleischerC.T., Multidimensional On-Line Solid-Phase Extraction (SPE) Using Restricted Access Materials (RAM) in Combination with Molecular Imprinted Polymers (MIP), *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 371, 16-20, **2001**.

7. AbrãoL. C. D. C., FigueiredoE. C., A New Restricted Access Molecularly Imprinted Fiber for Direct Solid Phase Microextraction of Benzodiazepines from Plasma Samples, *Analyst*,144, 4320-4330, **2019**.

8. Santos M.G., Tavares I.M.C., Boralli V.B., Figueiredo E.C., Direct Doping Analysis of Beta-Blocker Drugs from Urinary Samples by On-Line Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction Coupled to Liquid Chromatography/Mass Spectrometry, *Analyst*, 140, 2696-2703, **2015**.

9. Santos M.G., Nakamura M.G., Santos-Neto A.J., Figueiredo E.C., Restricted Access Molecularly Imprinted Polymers Obtained by Bovine Serum Albumin and/or Hydrophilic Monomers' External Layers: AComparison Related to Physical and Chemical Properties, *Analyst*, 140, 7768-7775, **2015**.

10. DesiletsC.P.,RoundsM.A.,RegnierF.E.,Semipermeable-Surface Reversedphase Media for High-Performance Liquid Chromatography, *Journal of Chromatography A*, 544, 25-39, **1991**.

11. Mendes T. V., Franqui L. S.,Santos M. G., WisniewskiC., FigueiredoE. C., Synthesis and Characterization of ANew Magnetic Restricted Access Molecularly Imprinted Polymer for Biological Sample Preparation,*Materials Today Communications*, 24, 101002, **2020**.

12. Oliveira F.M.,Segatelli M.G., Tarley C.R.T., Preparation of ANew Restricted Access Molecularly Imprinted Hybrid Adsorbent for The Extraction of Folic Acid from Milk Powder Samples, *Analytical Methods*, 8, 656-665, **2016**.

13. Santos M.G., TavaresI.M.C., Barbosa A.F., Bettini J., FigueiredoE.C., Analysis of Tricyclic Antidepressants in Human Plasma Using Online-Restricted Access Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction Followed by Direct Mass Spectrometry Identification/Quantification, *Talanta*, 163, 8-16, **2016**.

14. Cook S.E., Pinkerton T.C., Characterization of Internal Surface Reversed-Phase Silica Supports for Liquid Chromatography, *Journal of Chromatography A*, 368, 233-248, **1986**.

15. Desilets C.P., Rounds M.A., Regnier F.E., Semipermeable-Surface Reversed- Phase Media for High-Performance Liquid Chromatography,*Journal of Chromatography A*, 544, 25-39,**1991**.

16. RudolphiA., Boos K.S., The Use of Restricted-Access Media in HPLC, Part I -Classification and Review ,*LC-GC*,15, 602-611, **1997**.

17. Cassiano N.M., Lima V.V., Oliveira R.V., De Pietro A.C., Cass Q.B., Development of Restricted-Access Media Supports and Their Application to the Direct Analysis of Biological Fluid Samples via High Performance Liquid Chromatography, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 384, 1462-1469, **2006**.

18. Wang H., Jiang P., Zhang M., DongX., Synthesis of A Novel Restricted Access Chiral Stationary Phase based on Atom Transfer Radical Polymerization and Click Chemistry for the Analysis of Chiral Drugs in Biological Matrices, *Journal of Chromatography A*,1218, 1310-1313, **2011**.

19. Willemsen O., Machtejevas E., Unger K.K., Enrichment of Proteinaceous Materials on AStrong Cation-Exchange Diol Sil-

ica Restricted Access Material: Protein-Protein Displacement and Interaction Effects, *Journal of Chromatography A*, 1025, 209-216, **2004**.
20. Gisch D.J., Hunter B., Feibush B., Shielded Hydrophobic Phase: ANew Concept for Direct Injection Analysis of Biological Fluids by High-Performance Liquid Chromatography, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications,* 433, 264-268, **1988**.
21. Liu S., Li Y., Deng C., Mao Y., Zhang X., Yang P., Preparation of Magnetic Coremesoporous Shell Microspheres with C8-Modified Interior Pore-Walls and Their Application in Selective Enrichment and Analysis of Mouse Brain Peptidome, *Proteomics*, 11, 4503-4513, **2011**.
22. Haginaka J., Wakai J., Preparation and Characterization of Mixed Functional Phase Silica Materials Using Phenyl-, Butyl- or Octylchlorosilane as ASilylating Agent, *Journal of Chromatography A*, 596, 151-156, **1992**.
23. WangC., Li M., Xu H., Wei Y., Preparation of An Internal Surface Reversedphase Restricted-Access Material for The Analysis of Hydrophobic Molecules in Biological Matrices, *Journal of Chromatography A*, 1343, 195-199, **2014**.
24. Ruckmick S.C., Hench B.D., Direct Analysis of The Dopamine Agonist (-)-2-(Npropyl- N-2-Thienylethylamino)-5-Hydroxytetralin Hydrochloride in Plasma by High-Performance Liquid Chromatography Using Two-Dimensional Column Switching, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 565, 277-295, **1991**.
25. Nageswara Rao R., Shinde D.D., Two-dimensional LC-MS/MS Determination of Antiretroviral Drugs in Rat Serum and Urine, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 50, 994-999, **2009**.
26. Kanda T., Shirota O., Ohtsu Y., Yamaguchi M., Synthesis and Characterization of Polymer-Coated Mixed-Functional Stationary Phases with Several Different Hydrophobic Groups for Direct Analysis of Biological Samples by Liquid Chromatography, *Journal of Chromatography A*, 722, 115-121, **1996**.
27. De Paula F.C.C.R., De Pietro A.C., Cass Q.B., Simultaneous Quantification of Sulfamethoxazole and Trimethoprim in Whole Egg Samples by Columnswitching High-Performance Liquid Chromatography Using Restricted Access Media Column for On-Line Sample Clean-Up, *Journal of Chromatography A*, 1189, 221-226, **2008**.
28. Belaz K.R.A., Pereira-Filho E.R., Oliveira R.V., Development of Achiral and Chiral 2D HPLC Methods for Analysis of Albendazole Metabolites in Microsomal Fractions Using Multivariate Analysis for the in Vitro Metabolism, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 932, 26-33, **2013**.
29. Gomes R.A.B., Luccas P.O., De Magalhaes C.S., De Figueiredo E.C., Evaluation of The pH Influence on Protein Exclusion by Restricted Access Carbon Nanotubes Coated with Bovine Serum Albumin, *Journal of Materials Science*, 51, 7407-7414, **2016**.
30. Ullah N., Shah F., Khan R.A., Ateeq M., Muhammad H., Khan A.R., Restricted Access-Activated Carbon Clothes-Based Lead Extraction from Human Serum: Skipping the Sample Preparation Step for Biological Media, *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 96, 1048-1058, **2016**.
31. Ballesteros-Gomez A., Sicilia M.D., Rubio S., Supramolecular Solvents in The Extraction of Organic Compounds. A Review, *Analytica Chimica Acta*, 677, 108-130, **2010**.
32. Caballero-Casero N., Çabuk H., Martínez-Sagarra G., Devesa J.A., Rubio S., Nanostructured Alkyl Carboxylic Acid-Based Restricted Access Solvents: Application to the Combined Microextraction and Cleanup of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Mosses, *Analytica Chimica Acta*, 890, 124-133, **2015**.