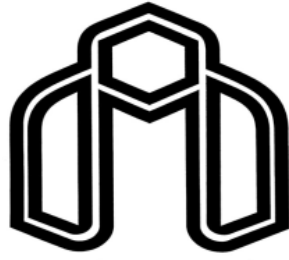


بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه صنعتی شاهرود

دانشکده شیمی

گروه شیمی تجزیه

پایان نامه کارشناسی ارشد

عنوان:

پیش تغلیظ و اندازه گیری تیکلوپیدین و لوزارتان با استفاده از میکرواستخراج قطره آلی
شناور جامد شده توسط امولسیون سازی ورتکس و کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا

دانشجو:

محسن امیری

استاد راهنما:

دکتر ناصر گودرزی

استاد مشاور:

دکتر فاطمه مصدرا لامور

شهریور ۱۳۹۴



دانشگاه شاهرود
دانشکده: شیمی
گروه: شیمی تجزیه

پایان نامه کارشناسی ارشد آقای محسن امیری به شماره دانشجویی: ۹۱۲۴۱۵۴

تحت عنوان: پیش تغلیظ و اندازه گیری تیکلوپیدین و لوزارتان با استفاده از میکرواستخراج قطره آلی شناور جامد شده توسط امولسیون سازی ورتکس و کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا

در تاریخ ۹۴/۶/۲۹ توسط کمیته تخصصی زیر جهت اخذ مدرک کارشناسی ارشد شیمی تجزیه مورد ارزیابی و با درجه مورد پذیرش قرار گرفت.

امضاء	استاد مشاور	امضاء	استاد راهنما
	دکتر فاطمه مصدرا لامور		دکتر ناصر گودرزی

امضاء	نماینده تحصیلات تکمیلی	امضاء	اساتید داور
	دکتر مهدی میرزایی		دکتر قدمعلی باقریان دهقی
			دکتر منصور عرب چم چنگلی

سپاس گذار کسانی، هستم که سرآغاز تولد من هستند. از یکی زاده می شوم و از دیگری جاودانه. استادی که

سپیدی را بر تخته سیاه زندگیم مگاشت و مادری که تار مویی از او پایی من سیاه نماند.

تقدیم به؛

مقدس ترین واژه یاد لغت نامه دلم، پدر و مادر مهربانم که زندگیم را مادیون مهر و عطوفت آنان می دانم.

شکر و قدردانی

سپاس و ستایش مرخصی راجل و جلالت که آثار قدرت او بر چهره روز روشن، تلبان است و انوار حکمت او در دل شب تار، درخشان. آفریدگاری که خوشتن 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. ضمن سپاس و ستایش به درگاه ایزدمنان که به من توانایی داد که با استعانت از او بتوانم این پایان نامه را انجام دهم، بر خود لازم می بینم از دگر می و تشویق اساتید و دوستان که مرایاری نمودند، قدردانی نمایم.

ابتدا از استاد کرامت‌مآب جناب آقای دکتر ناصر کوردزی که در کمال سه صدر، با حسن خلق و فروتنی، از پیچ لکی در این عرصه بر من دریغ ننمودند و زحمت راهنمایی این رساله را بر عهده گرفتند، کمال سپاس را دارم. هم چنین از استاد عالی‌قدرم سرکار خانم فاطمه مصدralامور که زحمت مشاوره این پایان نامه را متحمل شدند و در طول انجام این پایان نامه از نظرات کارشناسانه شان بهره جستم، صمیمانه تشکر می کنم. از اساتید بزرگوارم، جناب آقای دکتر قدسعلی باقریان دہتی و جناب آقای دکتر منصور عرب چم جخلی که زحمت داوری این پایان نامه را متقبل شدند، کمال تشکر و قدردانی را دارم.

هم چنین از پدر بزرگوارم و مادر مهربانم که در تمام سختی ها و دشواری های زندگی همواره یاری دلسوز و فداکار و پشتیبانی محکم و مطمئن برایم بوده اند، صمیمانه سپاس گذارم.

در خاتمه از تمامی کاکنان محترم دانشمده شیمی که بکاری صمیمانه ای با این جناب داشته اند، به دانشجویان ورودی سال ۹۱ و سایر دوستان خوب و ارجمندم و دانشجویان دکترا که در مراد انجام این پایان نامه یاری نمودند، قدردانی و تشکر می نمایم.

تعهد نامه

اینجانب محسن امیری دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته شیمی تجزیه. دانشکده شیمی. دانشگاه صنعتی شاهرود، نویسنده پایان نامه: پیش تغلیظ و اندازه گیری تیکلوپیدین و لوزارتان با استفاده از میکرواستخراج قطره آلی شناور جامد شده توسط امولسیون سازی و رتکس و کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا تحت راهنمایی جناب آقای دکتر ناصر گودرزی متعهد می شوم:

- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است.
- در استفاده از نتایج پژوهش های 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 بافت های 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.

تاریخ

امضاء دانشجو

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) 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 پایان نامه برای اولین بار، روش ساده و حساس میکرواستخراج فاز مایع مبتنی بر انجماد قطره آلی شناور توسط امولسیون سازی ورتکس (VA-SFODME) همراه با کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا برای پیش تغلیظ و اندازه گیری مقادیر کم تیکلوپیدین و لوزارتان بکار برده شده است. در این روش، چند میکرولیتر از حلال ۱- دودکانول به سطح محلول حاوی مقادیر کم تیکلوپیدین و لوزارتان افزوده گردید. پس از قرار گرفتن در دستگاه ورتکس در مدت زمان معینی، ظرف محتوی محلول نمونه در زمان کوتاهی در حمام یخ قرار داده شد. سپس ۱- دودکانول منجمد جدا گردید و درون ویال فوراً ذوب و بوسیله ۵/۰ میکرولیتر متانول رقیق شد و در نهایت به دستگاه HPLC تزریق گردید. برای بهینه سازی اثر عوامل مختلف از روش طراحی آزمایش استفاده شد. به منظور بررسی عوامل مهم و موثر از طرح فاکوریل کامل و برای بهینه سازی عوامل موثر و مهم از طرح مرکب مرکزی مرکز وجوه پر استفاده شد. تحت شرایط بهینه، منحنی کالیبراسیون در محدوده ۵/۵-۰/۰۰۶ میلی گرم بر لیتر برای تیکلوپیدین و ۴/۵-۰/۰۰۴ میلی گرم بر لیتر برای لوزارتان، خطی شد. همچنین حد تشخیص روش برای پیش تغلیظ و اندازه گیری تیکلوپیدین و لوزارتان به ترتیب ۱/۷ و ۱/۰ میکروگرم بر لیتر و فاکتور پیش تغلیظ تحت شرایط بهینه برای تیکلوپیدین و لوزارتان به ترتیب ۹۹/۵ و ۱۵۳/۸ محاسبه شد. انحراف استاندارد نسبی برای ۵ اندازه گیری تکراری غلظت های ۱/۰ و ۴/۰ میلی گرم بر لیتر تیکلوپیدین و لوزارتان به ترتیب ۱/۱ و ۰/۸٪، ۱/۸ و ۰/۵٪ بدست آمد.

واژه های کلیدی: تیکلوپیدین، لوزارتان، ۱- دودکانول، میکرواستخراج فاز مایع مبتنی بر انجماد قطره آلی شناور توسط امولسیون سازی ورتکس، طراحی آزمایش، طرح مرکب مرکزی مرکز وجوه پر

فهرست مطالب

فصل اول

۱-۱- داروهای ضد تشکیل لخته خون	۲
۱-۱-۱- تیکلوپیدین	۲
۲-۱- داروهای ضد فشار خون	۳
۱-۲-۱- لوزارتان	۴
۳-۱- اهمیت اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان	۵
۴-۱- روش‌های اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان	۵
۵-۱- مروری بر کارهای انجام شده برای اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان	۶

فصل دوم

۱-۲- کروماتوگرافی	۱۲
۱-۱-۲- کروماتوگرافی مایع	۱۳
۱-۱-۱-۲- کروماتوگرافی تقسیمی	۱۴
۲-۱-۲- کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا	۱۵
۲-۲- مقدمه‌ای بر روش‌های آماده‌سازی نمونه	۱۷
۳-۲- استخراج	۱۷
۱-۳-۲- میکرواستخراج فاز مایع	۱۹
۱-۱-۳-۲- میکرواستخراج مبتنی بر انجماد قطره آلی شناور (SFODME)	۲۰
۴-۲- روش‌های بهینه‌سازی پارامترها	۲۴
۱-۴-۲- روش تک‌متغیره	۲۴
۲-۴-۲- روش طراحی آزمایش	۲۵
۱-۲-۴-۲- اهداف طراحی آزمایش	۲۶
۲-۲-۴-۲- مزایای طراحی آزمایش	۲۷

۲۷.....	۳-۲-۴-۲- مراحل روش طراحی آزمایش
۲۸.....	۴-۲-۴-۲- انواع روش‌های طراحی آزمایش
۳۱.....	۱-۴-۲-۴-۲- طرح فاکتوریل
۳۳.....	۲-۴-۲-۴-۲- طرح پلاکت- برمن
۳۴.....	۳-۴-۲-۴-۲- طرح مرکب مرکزی
۳۵.....	۴-۴-۲-۴-۲- طرح باکس- بنکن

فصل سوم

۳۸.....	۱-۳- مقدمه
۳۸.....	۲-۳- محلول‌های مورد استفاده و طرز تهیه آنها
۳۹.....	۳-۳- دستگاه‌ها و وسایل مورد استفاده
۴۰.....	۴-۳- شرایط کروماتوگرافی
۴۱.....	۱-۴-۳- ثبت طیف UV آنالیت‌ها و انتخاب بهترین طول موج
۴۱.....	۲-۴-۳- شرایط شویش کروماتوگرافی
۴۲.....	۳-۴-۳- کروماتوگرام مخلوط گونه‌ها
۴۳.....	۵-۳- روش کار در بهینه‌سازی پارامترهای موثر در پیش‌تغلیظ تیکلوپیدین و لوزارتان
۴۳.....	۱-۵-۳- روش کار برای رسم منحنی کالیبراسیون مستقیم
۴۶.....	۲-۵-۳- بررسی و بهینه‌سازی متغیرهای موثر در پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان
۴۷.....	۶-۳- بررسی فاکتورهای تأثیرگذار و بهینه‌سازی عوامل مؤثر در پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان
۴۷.....	۱-۶-۳- ارزیابی فاکتورهای موثر بر فرایند با استفاده از طرح فاکتوریل کامل
۴۸.....	۱-۱-۶-۳- تعیین سطح فاکتورها
۴۹.....	۲-۱-۶-۳- طراحی آزمایش در طرح فاکتوریل کامل
۵۱.....	۳-۱-۶-۳- تعیین فاکتورهای موثر به وسیله DOE
۵۱.....	۱-۳-۱-۶-۳- تفسیر نتایج حاصل از طرح فاکتوریل کامل
۵۴.....	۲-۶-۳- بهینه‌سازی فاکتورهای موثر بر پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان

۵۵	۳-۶-۲-۱- اجرای طرح مرکب مرکزی مرکز وجوه پر
۶۰	۳-۶-۲-۲- ارزیابی مدل
۶۰	۳-۶-۲-۲-۱- تحلیل واریانس (ANOVA)
۶۲	۳-۶-۲-۲-۲- بررسی باقیمانده‌ها
۶۳	۳-۶-۲-۲-۳- نمودار احتمال نرمال
۶۴	۳-۶-۲-۲-۴- نمودار باقیمانده‌ها بر حسب زمان
۶۵	۳-۶-۲-۲-۵- نمودار باقیمانده‌ها در مقابل مقادیر برازش شده
۶۷	۳-۶-۲-۲-۶- منحنی رویه پاسخ
۶۹	۳-۶-۳- توجیه فاکتورهای موثر بر پیش تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان
۶۹	۳-۶-۱- بررسی اثر pH فاز آبی بر میزان استخراج
۶۹	۳-۶-۲- بررسی اثر نوع بافر
۷۰	۳-۶-۳- بررسی اثر حجم بافر
۷۰	۳-۶-۴- بررسی اثر نوع حلال استخراج
۷۱	۳-۶-۵- بررسی اثر حجم حلال استخراج
۷۱	۳-۶-۶- بررسی اثر زمان استخراج
۷۲	۳-۶-۷- بررسی اثر قدرت یونی
۷۲	۳-۷-۱- رسم منحنی‌های کالیبراسیون پیش تغلیظ
۷۲	۳-۷-۱- رسم منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ تیکلوپیدین
۷۴	۳-۷-۲- رسم منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ لوزارتان
۷۶	۳-۸- بررسی اثر گونه‌های مزاحم
۷۸	۳-۹-۱- ارقام شایستگی روش
۷۸	۳-۹-۱- حد تشخیص و حد کمی
۷۸	۳-۹-۲- دقت و صحت
۸۰	۳-۱۰- فاکتور پیش تغلیظ

- ۳-۱۱- اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان در نمونه‌های حقیقی..... ۸۰
- ۳-۱۱-۱- اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان در نمونه قرص..... ۸۰
- ۳-۱۱-۲- اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان در نمونه ادرار..... ۸۱
- ۳-۱۱-۳- اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان در نمونه پلاسما..... ۸۲

فصل چهارم

- ۴-۱- ارقام شایستگی روش..... ۸۸
- ۴-۲- مقایسه روش پیشنهادی با برخی روش‌های موجود..... ۸۹
- ۴-۳- نتیجه‌گیری..... ۹۰
- ۴-۴- آینده‌نگری..... ۹۰
- منابع و مراجع..... ۹۱

فهرست شکل‌ها

- شکل ۱-۱ ساختار تیکلوپیدین هیدروکلراید ۲
- شکل ۲-۱ ساختار لوزارتان پتاسیم ۴
- شکل ۱-۲ طرح کلی روش VA-SFODME [۲۹] ۲۱
- شکل ۲-۲ مدل عمومی یک فرایند [۳۱] ۲۶
- شکل ۳-۲ نمودار انتخاب طرح [۳۲] ۲۹
- شکل ۴-۲ نمایش هندسی طرح فاکتوریل 2^3 [۳۴] ۳۲
- شکل ۵-۲ طرح مرکب مرکزی برای دو فاکتور، (●) نقاط طرح فاکتوریل، (O) نقطه مرکزی، (x) نقاط محوری [۳۵] ۳۵
- شکل ۶-۲ طرح باکس- بنکن برای بررسی سه فاکتور [۳۷] ۳۶
- شکل ۱-۳ طیف جذب UV تیکلوپیدین و لوزارتان ۴۱
- شکل ۲-۳: کروماتوگرام حاصل از محلول استاندارد ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر تیکلوپیدین و لوزارتان ۴۲
- شکل ۳-۳: منحنی کالیبراسیون مستقیم تیکلوپیدین ۴۴
- شکل ۴-۳: منحنی کالیبراسیون مستقیم لوزارتان ۴۵
- شکل ۵-۳ نمودار پرتو حاصل از طرح فاکتوریل کامل ۵۴
- شکل ۶-۳: نمودار احتمال نرمال برای پاسخ پیش تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین ۶۳
- شکل ۷-۳: نمودار احتمال نرمال برای پاسخ پیش تغلیظ و اندازه‌گیری لوزارتان ۶۴
- شکل ۸-۳: نمودار باقیمانده‌ها بر حسب زمان برای پاسخ پیش تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین ۶۵
- شکل ۹-۳: نمودار باقیمانده‌ها بر حسب زمان برای پاسخ پیش تغلیظ و اندازه‌گیری لوزارتان ۶۵
- شکل ۱۰-۳: پاسخ پیش‌بینی شده برای پاسخ پیش تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین در برابر باقیمانده‌ها ۶۶
- شکل ۱۱-۳: پاسخ پیش‌بینی شده برای پاسخ پیش تغلیظ و اندازه‌گیری لوزارتان در برابر باقیمانده‌ها ۶۷
- شکل ۱۲-۳: منحنی رویه پاسخ پیش تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان در مقابل A و B ۶۸
- شکل ۱۳-۳: منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ تیکلوپیدین ۷۴
- شکل ۱۴-۳: منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ لوزارتان ۷۵
- شکل ۱۵-۳: کروماتوگرام حاصل از نمونه ادرار فرد سالم (فاقد تیکلوپیدین و لوزارتان) ۸۲
- شکل ۱۶-۳: کروماتوگرام حاصل از نمونه ادرار فرد بیمار ۸۴

شکل ۳-۱۷: کروماتوگرام نمونه ادرار ۱/۰ میلی گرم بر لیتر تیکلوپیدین و لوزارتان ۸۴

شکل ۳-۱۸: کروماتوگرام حاصل از نمونه پلاسمای فرد بیمار ۸۵

فهرست جداول

جدول ۱-۲	ماتریس آزمایش‌ها برای طرح فاکتوریل 2^3	۳۲
جدول ۲-۲	ماتریس طرح مرکب مرکزی برای دو فاکتور	۳۵
جدول ۱-۳	مواد شیمیایی مورد استفاده	۳۹
جدول ۲-۳	سیگنال مستقیم تیکلوپیدین در غلظت‌های مختلف	۴۴
جدول ۳-۳	سیگنال مستقیم لوزارتان در غلظت‌های مختلف	۴۵
جدول ۴-۳	نتایج حاصل از بهینه‌سازی یک متغیر در یک زمان	۴۷
جدول ۵-۳	تعیین سطح فاکتورهای موثر بر پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان	۴۸
جدول ۶-۳	طرح فاکتوریل کامل و نتایج بدست آمده از آن	۵۰
جدول ۷-۳	جدول ضرایب حاصل از طرح فاکتوریل کامل	۵۱
جدول ۸-۳	میزان اهمیت فاکتورهای دارای اثر معنی‌دار بر استخراج با توجه به مقدار P	۵۳
جدول ۹-۳	سطح فاکتورهای موثر در طرح CCF	۵۵
جدول ۱۰-۳	ماتریس طرح CCF با ۲ فاکتور، ۳ نقطه مرکزی و ۲ تکرار	۵۶
جدول ۱۱-۳	پارامترهای آماری برای طرح CCF انجام شده برای پاسخ پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین	۵۷
جدول ۱۲-۳	پارامترهای آماری برای طرح CCF انجام شده برای پاسخ پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری لوزارتان	۵۷
جدول ۱۳-۳	تحلیل واریانس برای مدل پیشنهادی مربوط به پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین	۶۱
جدول ۱۴-۳	تحلیل واریانس برای مدل پیشنهادی مربوط به پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری لوزارتان	۶۱
جدول ۱۵-۳	مقایسه شرایط بهینه بدست آمده توسط روش‌های یک متغیر در یک زمان و طراحی آزمایش	۶۸
جدول ۱۶-۳	داده‌های مربوط به منحنی کالیبراسیون تیکلوپیدین	۷۳
جدول ۱۷-۳	داده‌های مربوط به منحنی کالیبراسیون لوزارتان	۷۵
جدول ۱۸-۳	نتایج حاصل از بررسی اثر گونه‌های مزاحم در پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین	۷۷
جدول ۱۹-۳	نتایج حاصل از بررسی اثر گونه‌های مزاحم در پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری لوزارتان	۷۷
جدول ۲۰-۳	نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت روش برای تیکلوپیدین	۷۹
جدول ۲۱-۳	نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت روش برای لوزارتان	۷۹
جدول ۲۲-۳	نتایج حاصل از پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان در نمونه‌های حقیقی	۸۳
جدول ۱-۴	مقایسه روش پیشنهادی با برخی از روش‌های گزارش شده برای اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان	۸۹

فصل اول

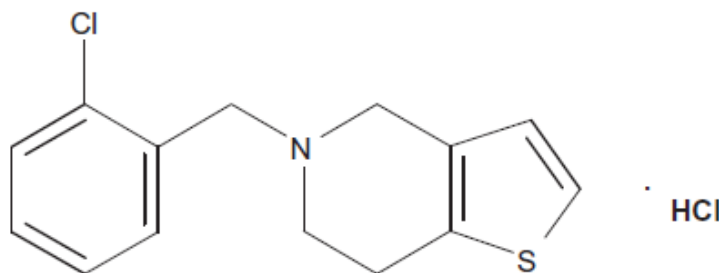
مقدمه

۱-۱- داروهای ضد تشکیل لخته خون

داروهای ضد تشکیل لخته خون جهت پیشگیری از لخته شدن خون یا پیشگیری از بزرگ‌تر شدن لخته موجود تجویز می‌شوند. پلاکت‌ها یکی از اجزای موجود در خون می‌باشند که در انعقاد خون نقش دارند. همچنین خون دارای پروتئین‌های غیر محلولی است که فاکتورهای انعقادی نام دارند و تشکیل لخته را تسریع می‌کنند. داروهای ضد تشکیل لخته خون به دو دسته تقسیم می‌شوند که عبارتند از داروهای مهارکننده تجمع پلاکت و داروهای ضد انعقادی. تیکلوپیدین^۱ (Tic) از جمله داروهای مهارکننده تجمع پلاکت به شمار می‌رود [۱].

۱-۱-۱- تیکلوپیدین

تیکلوپیدین هیدروکلراید، ۵-[۲-(کلروفنیل)متیل]-۷،۶،۵،۴-تترا هیدروتینو (۳،۲-سی) پیریدین هیدروکلراید (شکل ۱-۱) یک مهارکننده تجمع پلاکت قوی در پلاسمای انسان است.



شکل ۱-۱ ساختار تیکلوپیدین هیدروکلراید

تیکلوپیدین هیدروکلراید یک جامد کریستالی سفید رنگ است. فرمول مولکولی تیکلوپیدین $C_{14}H_{14}ClNS.HCl$ است و دارای جرم مولکولی ۳۰۰/۲۵ می‌باشد. تیکلوپیدین در درمان ترومبوز^۲ شریانی حاد (تشکیل لخته در سیستم گردش خون) و پیشگیری از سکتة مغزی مورد استفاده قرار می‌گیرد. براساس مطالعات فارماکولوژی تیکلوپیدین به عنوان یک مهارکننده آدنوزین دی فسفات

^۱ Ticlopidine

^۲ Thrombosis

(ADP)^۱، با عملکرد غشاء پلاکت از طریق مهار ADP و برهم کنش‌های پلاکت-پلاکت تداخل می‌کند. میزان جذب تیکلوپیدین در بدن بیشتر از ۸۰٪ بوده و به صورت گسترده توسط کبد متابولیزه می‌شود. تنها مقادیر بسیار کمی از دارو بدون تغییر در ادرار آشکار می‌شود. از مهمترین مضرات این دارو، می‌توان به آسیب کبدی و مسمومیت خونی اشاره کرد. در حال حاضر قرص تیکلوپیدین در سطح بین المللی به عنوان یک داروی اثر بخش در حفاظت از بیماران در معرض خطر انسداد عروق شناخته شده است [۲].

۱-۲- داروهای ضد فشار خون

فشاری که جریان خون در هر انقباض عضله قلب به دیواره سرخرگ‌ها وارد می‌کند، فشار خون نام دارد. فشار خون دارای یک مقدار ماکزیمم (فشار سیستولی)^۲ است که به هنگام انقباض ماهیچه قلب ایجاد می‌شود و همچنین دارای یک مقدار مینیمم (فشار دیاستولی)^۳ است که مربوط به زمانی است که قلب در حالت استراحت قرار دارد. در صورتی که فشار خون بطور مداوم بیشتر از حد نرمال باشد، فرد دچار بیماری فشار خون بالا می‌باشد. فشار خون بالا به دو دسته فشار خون بالای اولیه و فشار خون بالای ثانویه تقسیم می‌شود. در دسته اول علت فشار خون بالا مشخص نبوده و تقریباً ۸۰٪ از موارد از نوع فشار خون بالای اولیه هستند. فشار خون بالای ثانویه در اثر بیماری‌های دیگر از جمله اختلالات کلیوی، بیماری‌های غدد، بیماری‌های قلبی عروقی و... رخ می‌دهد. داروهای ضد فشار خون بالا به چهار دسته تقسیم می‌شوند که عبارتند از داروهای ادرار آور، بلوک‌کننده‌های سمپاتیک، گشادکننده‌های عروق و مهارکننده‌های آنژیوتانسین^۴ [۳].

^۱ Adenosine diphosphate

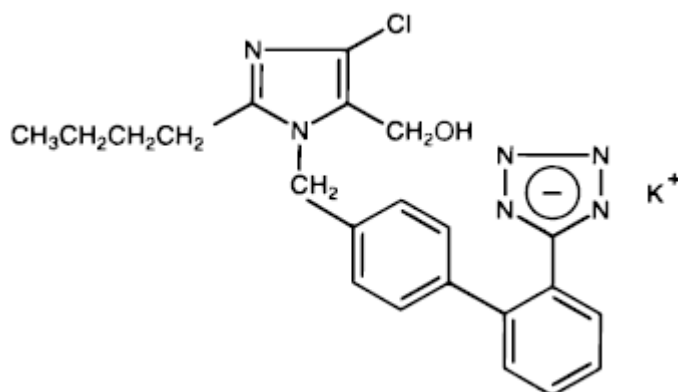
^۲ Systolic

^۳ Diastolic

^۴ Angiotensin

۱-۲-۱- لوزارتان

لوزارتان پتاسیم (Los)^۱، ۲-بوتیل-۴-کلرو-۱-[۵-فنیل-۵-تترازول-۱-یل-۱-هیدروکسی-۵-فنیل-۵-ایمیدازول-۵-یل] متانول مونوپتاسیم (شکل ۲-۱) به صورت پودر کریستالی سفید رنگ با وزن مولکولی ۴۶۱/۰۱ گرم بر مول و فرمول مولکولی $C_{22}H_{22}ClKN_6O$ می‌باشد [۴].



شکل ۲-۱ ساختار لوزارتان پتاسیم

در اوایل سال ۱۹۸۰ دانشمندان به این نتیجه رسیدند که یک سری از مشتقات اسید استیک-۵-ایمیدازول فشار خون را کاهش می‌دهند. در سال ۱۹۸۲ کار بر روی یک سری از ترکیبات غیر پپتیدی خنثی کننده آنژیوتانسین II شروع شد. این ترکیبات از طریق مسدود کردن فعالیت سیستم آنژیوتانسین، فشار خون در حیوانات را کاهش می‌داد. این تحقیقات در نهایت منجر به کشف لوزارتان شد. لوزارتان پتاسیم یک مهارکننده آنژیوتانسین II (نوع AT^1) می‌باشد [۵]. آنژیوتانسین II یک تنگ کننده عروق قوی و یک ترکیب مهم در پاتوفیزیولوژی فشار خون بالا می‌باشد. این ترکیب همچنین ترشح آلدوسترون^۲ توسط قشر آدرنال را تحریک می‌کند. لوزارتان اثرات ترشح آلدوسترون و تنگ کنندگی عروق مربوط به آنژیوتانسین II را مهار می‌کند. اولین مرحله از متابولیسم لوزارتان توسط آنزیم سیتوکروم^۳ P450 انجام می‌شود. لوزارتان به متابولیت اسید کربوکسیلیک فعال تبدیل می‌شود

¹ Losartan

² Aldosterone

³ Cytochrome

که مسئول مهار بیشتر گیرنده‌های آنژیوتانسین II است. پس از مصرف یک تک دوز از لوزارتان به صورت خوراکی، حدود ۴٪ از دوز بدون تغییر و ۶٪ از دوز به صورت متابولیت فعال، از طریق ادرار دفع می‌شود. معرفی لوزارتان به عنوان اولین داروی کاهش فشار خون با یک مکانیسم جدید باعث شد تا این دارو در کمتر از یک دهه قابل دسترس باشد [۴].

۱-۳- اهمیت اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان

لوزارتان و عامل ضد پلاکت تیکلوپیدین را می‌توان به طور همزمان، برای پیشگیری یا درمان بیماری‌های قلبی و عروقی تجویز کرد. تیکلوپیدین هیدروکلراید، مساحت سطح زیر منحنی غلظت در پلاسما-زمان، لوزارتان و متابولیت اصلی آن و همچنین اوج غلظت پلاسمای لوزارتان را به طور قابل توجهی افزایش می‌دهد. این افزایش برای زمانی است که قرص لوزارتان به صورت خوراکی مصرف شده باشد. اثر تیکلوپیدین هیدروکلراید بر فارماکوکینتیک لوزارتانی که به صورت تزریقی مصرف شده باشد، چندان چشمگیر نیست. بنابراین با توجه به تاثیری که تیکلوپیدین بر فارماکوکینتیک لوزارتان دارد اندازه‌گیری دقیق غلظت این دو دارو در نمونه‌های ادرار و پلاسما از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است [۶].

۱-۴- روش‌های اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان

روش‌های متعددی برای اندازه‌گیری تیکلوپیدین گزارش شده‌است که از جمله می‌توان به روش‌های کروماتوگرافی گازی (GC)^۱ به همراه طیف‌سنج جرمی (MS)^۲ یا آشکارساز تله یون (ITD)^۳ [۸]، کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC)^۴ به همراه طیف‌سنج جرمی [۹]، الکتروفورز لوله موئینه^۵ همراه با آشکارساز UV^{۱۰} [۱۰]، اسپکتروفتومتری UV^{۱۱} [۱۱]، آنالیز تزریق در

¹ Gas chromatography

² Mass spectrometry

³ Ion trap detector

⁴ High performance liquid chromatography

⁵ Capillary electrophoresis

جریان پیوسته (FIA)^۲ [۱۲] و ولتامتری [۱۳] اشاره نمود.

همچنین روش‌های مختلفی برای اندازه‌گیری لوزارتان گزارش شده است که مهم‌ترین آنها شامل کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا همراه با آشکارساز UV [۱۴، ۱۵] یا آشکارساز فلوئورسانس [۱۶]، آنالیز اسپکتروفتومتری [۱۷]، طیف سنجی فلوئورسانس [۱۸]، الکتروفورز لوله موئینه [۱۹] و ولتامتری [۲۰] می‌باشد.

بدلیل وجود برخی مشکلات در اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان در نمونه‌های حقیقی از نظر بافت نمونه و همچنین غلظت کم آنالیت‌ها، استفاده از یک روش آماده‌سازی نمونه، به‌منظور پیش-تغلیظ و جداسازی آنالیت‌ها از بافت نمونه، ضروری می‌باشد. در ادامه به مرور برخی از کارهای انجام شده برای اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان خواهیم پرداخت.

۱-۵- مروری بر کارهای انجام شده برای اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان

امروزه روش‌های مختلفی برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری مقادیر بسیار کم تیکلوپیدین و لوزارتان گزارش شده است که در زیر خلاصه‌ای از کارهای انجام شده برای اندازه‌گیری این داروها آورده شده است.

در سال ۲۰۱۴ سیلویا مگیرا^۳ و همکارانش برای اندازه‌گیری همزمان تیکلوپیدین و چند داروی دیگر در نمونه ادرار از روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد فوق‌العاده بالا استفاده کردند. آنها برای پیش‌تغلیظ آنالیت‌ها از نمونه ادرار، از تکنیک میکرواستخراج توسط جاذب بسته‌بندی شده (MEPS)^۴، استفاده کردند. تحت شرایط بهینه محدوده خطی منحنی کالیبراسیون برای تیکلوپیدین ۰/۰۳-۲۰/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، حد تشخیص و حد کمی به ترتیب ۰/۰۰۹ و ۰/۰۲۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر

¹ Ultraviolet absorbance detector

² Flow injection analysis

³ Sylwia Magiera

⁴ Microextraction by packed sorbent

بدست آمد. همچنین بازده استخراج برای آنالیت‌ها بزرگتر از ۷۰/۱٪ گزارش شد [۲۱].

در سال ۲۰۰۸ نفیز او کان^۱ و همکارانش برای اندازه‌گیری تیکلوپیدین در نمونه قرص از روش تزریق در جریان پیوسته (FIA) استفاده کردند. محدوده خطی برای منحنی کالیبراسیون^۵ $10^{-5} \times 7/99$ - $10^{-6} \times 1/59$ مول بر لیتر، حد تشخیص^۸ $10^{-8} \times 8/91$ مول بر لیتر و انحراف استاندارد نسبی کمتر از ۱/۳٪ گزارش شد [۱۲].

در سال ۲۰۰۴ نی کارتر دو کارمو بورگز^۲ و همکارانش برای جداسازی و اندازه‌گیری تیکلوپیدین در نمونه پلاسما روش استخراج مایع-مایع (LLE)^۳ و آنالیز کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا همراه با آشکارساز طیف‌سنج جرمی را پیشنهاد دادند. استخراج تیکلوپیدین از نمونه پلاسما توسط حلال استخراج دی‌اتیل اتر-هگزان (۲۰:۸۰) انجام شد. رنج خطی منحنی کالیبراسیون^۵ 10^{-4} - 10^{-6} نانوگرم بر میلی‌لیتر و حد کمی ۱/۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر گزارش شد [۹].

در سال ۲۰۰۲ آنجلینا پنا^۴ و همکارانش برای اندازه‌گیری تیکلوپیدین در نمونه پلاسما از روش کروماتوگرافی گازی همراه با آشکارساز تله یونی استفاده کردند. آنها برای جداسازی آنالیت از نمونه پلاسما، روش استخراج فاز جامد (SPE)^۵ با ستون Extrelut-1 را بکار بردند و از هگزان به عنوان حلال شوی استفاده کردند. منحنی کالیبراسیون در محدوده $2/50$ - $0/01$ میکروگرم بر میلی‌لیتر خطی بود. حد تشخیص و حد کمی به ترتیب $0/005$ و $0/01$ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ضریب تغییرات بین $5/1$ و $6/9$ ٪ گزارش شد. همچنین درصد بازیابی تیکلوپیدین از نمونه پلاسما برای غلظت‌های $0/01$ و $2/0$ میکروگرم بر میلی‌لیتر در محدوده $84/4$ و $87/3$ ٪ بدست آمد [۸].

¹ Nafiz O Can

² Ney Carter do Carmo Borges

³ Liquid-liquid extraction

⁴ Angelina Pena

⁵ Solid phase extraction

در سال ۲۰۰۷ ابرو ترکز^۱ و نور اونار^۲ به منظور اندازه‌گیری تیکلوپیدین در محصولات دارویی، رفتار الکتروشیمیایی تیکلوپیدین هیدروکلراید را توسط روش ولتامتری چرخه‌ای، جریان مستقیم و موج مربعی مورد مطالعه قرار دادند. آنها از یک سیستم سه الکترودی شامل الکترود قطره جیوه معلق به عنوان الکترود کار، الکترود رفرنس Ag/AgCl و یک الکترود کمکی سیم پلاتین استفاده کردند. ولتاموگرام چرخه‌ای تیکلوپیدین هیدروکلراید یک پیک کاهشی در پتانسیل ۰/۱۰- ولت و یک پیک اکسایشی در پتانسیل ۰/۰۵ ولت نشان می‌دهد. تحت شرایط بهینه محدوده خطی منحنی کالبراسیون 10^{-4} تا 10^{-6} مول بر لیتر، حد تشخیص و حد کمی به ترتیب $5/17 \times 10^{-7}$ و 10^{-6} بدست آمد [۱۳].

در سال ۱۹۹۳ کواگلیا^۳ و همکارانش از روش الکتروفورز موئینه برای اندازه‌گیری تیکلوپیدین و ناخالصی‌های اصلی آن استفاده کردند. تحت شرایط بهینه محدوده خطی منحنی کالبراسیون برای تیکلوپیدین ۰/۱-۲/۰ میلی گرم بر میلی لیتر، ضریب همبستگی و انحراف استاندارد نسبی (برای ۸ اندازه‌گیری) به ترتیب ۰/۹۹۹ و ۱/۳٪ گزارش شد [۱۰].

در سال ۲۰۰۹ آربی کاکد^۴ و همکارانش یک روش ساده اسپکتروفتومتری برای اندازه‌گیری تیکلوپیدین در فرم دارویی را توسعه دادند. منحنی کالبراسیون در محدوده ۱/۰-۵۰/۰ میکروگرم بر میلی لیتر خطی شد و ضریب همبستگی ۰/۹۹۹ بدست آمد. حد تشخیص و حد کمی به ترتیب ۰/۶۳۴۴ و ۱/۹۲۲۴ میکروگرم بر میلی لیتر گزارش شد [۱۱].

در سال ۲۰۰۰ پولن یونگ^۵ و همکارانش برای اندازه‌گیری لوزارتان و متابولیت فعال آن در نمونه پلاسمای خون از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا استفاده کردند. آنها برای جداسازی

¹ Ebru Turkoz

² A. Nur Onar

³ M.G. Quaglia

⁴ RB Kakde

⁵ Pollen K.F. Yeung

آنالیت‌ها از نمونه پلاسما، روش استخراج فاز جامد با استفاده از سیلیکا ژل C₂ پیوندی استاندارد را بکار گرفتند. محدوده خطی منحنی کالیبراسیون برای لوزارتان و متابولیت آن ۱۰/۰-۳۰۰/۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر و حساسیت روش کمتر از ۱۰/۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر گزارش شد [۱۴].

در سال ۲۰۰۸ حبیب^۱ و همکارانش برای تعیین مقدار لوزارتان در ترکیبات دارویی روش ولتامتری برهنه سازی کاتدی را توسعه دادند. این روش بر مبنای جذب توده گونه‌ها در سطح الکتروکد قطره جیوه آویزان در pH=۷ پس از اعمال جریان متناوب AC رفت و برگشتی بود. در ولتاموگرام چرخه‌ای، لوزارتان یک پیک کاهش در پتانسیل ۱/۲- ولت و یک پیک اکسایشی در پتانسیل ۱/۱- ولت به نمایش گذاشت. محدوده خطی منحنی کالیبراسیون ۱/۲۰-۰/۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر و حد تشخیص ۰/۱۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شد [۲۰].

در سال ۲۰۰۸ ماریا آنتونیئا اوباندو^۲ و همکارانش سیستم کروماتوگرافی چند سرنگی (MSC)^۳ را برای استخراج فاز جامد آنالین و اندازه‌گیری هیدروکلروتیازید^۴ و لوزارتان در نمونه‌های آب سطحی، زیر زمینی و فاضلاب توسعه دادند. این روش بر مبنای استخراج آنالین آنالیت‌ها از نمونه به دیسک-های جاذب، سپس شویش آنالیت‌ها از جاذب و انتقال آنها به ستون کروماتوگرافی می‌باشد. تحت شرایط بهینه محدوده خطی منحنی کالیبراسیون برای هیدروکلروتیازید و لوزارتان به ترتیب ۱/۷-۰/۳ و ۱/۸-۰/۴ میلی‌گرم بر لیتر و حد تشخیص برای هیدروکلروتیازید و لوزارتان به ترتیب ۰/۰۷ و ۰/۰۹ میلی‌گرم بر لیتر بدست آمد [۲۲].

در سال ۲۰۰۱ کواگلیا و همکارانش برای اندازه‌گیری لوزارتان و هیدروکلروتیازید در نمونه قرص از روش‌های الکتروفورز موئینه و الکتروکروماتوگرافی موئینه (CEC)^۵ استفاده کردند. CEC یک

¹ I.H.I. Habib

² Maria Antonieta Obando

³ Multi-syringe chromatography

⁴ Hydrochlorothiazide

⁵ Electrochromatography

تکنیک الکتروفورز قدرتمند برای جداسازی تعداد زیادی از ترکیبات مربوط به کلاس‌های مختلف می-باشد. CEC در لوله موئینه پر شده با فاز ثابت RP-18 انجام شد. منحنی کالیبراسیون تحت شرایط بهینه در محدوده ۰/۴۸۰ - ۰/۱۰۶ و ۰/۱۰۸ - ۰/۰۲۴۴ میلی گرم بر میلی لیتر به ترتیب برای لوزارتان و هیدروکلروتیازید خطی شد. حد تشخیص و حد کمی برای لوزارتان به ترتیب ۰/۰۳۲ و ۰/۰۹۶ نانو گرم و برای هیدروکلروتیازید به ترتیب ۰/۰۴ و ۰/۱۲ نانو گرم بدست آمد. همچنین مقدار RSD برای لوزارتان و هیدروکلروتیازید به ترتیب ۱/۵٪ و ۱/۹٪ گزارش شد [۱۹].

در سال ۲۰۱۳ ناگس ورا ریو^۱ و همکارانش برای اندازه‌گیری همزمان ۵ داروی ضد فشار خون بالا از جمله لوزارتان، از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا استفاده کردند. آنها برای پیش‌تغلیظ آنالیت‌ها از نمونه سرم، تکنیک میکرواستخراج مایع-مایع پخشی با استفاده از مایع یونی (IL-DLLME)^۲ را بکار بردند. تحت شرایط بهینه محدوده خطی منحنی کالیبراسیون برای لوزارتان ۰/۱-۲۰/۰ میکروگرم بر میلی لیتر، حد تشخیص و حد کمی به ترتیب ۰/۰۱۸ و ۰/۰۶ میکروگرم بر میلی لیتر بدست آمد [۱۵].

در این پروژه برای نخستین بار، روش میکرواستخراج فاز مایع مبتنی بر انجماد قطره آلی شناور توسط امولسیون‌سازی ورتکس (VA-SFODME)^۳ همراه با کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری مقادیر کم تیکلوپیدین و لوزارتان بکار برده شده است.

¹ R. Nageswara Rao

² Ionic liquid based dispersive liquid-liquid microextraction

³ Vortex-assisted emulsification solidified floating organic drop microextraction

فصل دوم

تئوری

۲-۱- کروماتوگرافی

کروماتوگرافی لغتی یونانی به معنی نوشتن با رنگ است که ترکیبی از دو واژه "کروما" به معنی رنگ و "گرافین" به معنی نوشتن است. در سال ۱۹۰۳ برای اولین بار از این روش در جداسازی رنگدانه‌های گیاهی استفاده شد که این کار توسط میخائیل تسوت^۱ انجام گرفت. کروماتوگرافی به طور گسترده‌ای برای جداسازی، شناسایی و تعیین اجزای سازنده شیمیایی در مخلوط‌های پیچیده به کار می‌رود. روش‌های کروماتوگرافی را می‌توان به کروماتوگرافی ستونی و کروماتوگرافی سطح تقسیم-بندی نمود. در کروماتوگرافی ستونی، فاز ساکن در لوله‌ای باریک نگه داشته شده و فاز متحرک تحت فشار یا توسط نیروی گرانشی از درون لوله عبور می‌کند. در کروماتوگرافی سطح، فاز ساکن روی یک صفحه صاف یا در منافذ یک کاغذ نگه داشته می‌شود و فاز متحرک توسط اثر موینه‌ای یا تحت تاثیر نیروی گرانشی از درون فاز ساکن حرکت می‌کند. روش‌های کروماتوگرافی بر اساس ماهیت فاز متحرک به سه دسته کروماتوگرافی گازی (GC)^۲، کروماتوگرافی مایع (LC)^۳ و کروماتوگرافی سیال فوق‌بحرانی (SFC)^۴ تقسیم می‌شوند [۲۳].

در تمامی روش‌های کروماتوگرافی، جداسازی بر اساس تفاوت در تمایل آنالیت جهت رفتن به فاز ساکن و متحرک انجام می‌شود و می‌توان گفت غلظت آنالیت در فاز ساکن و متحرک متفاوت می‌باشد. این تفاوت غلظت، در نهایت منجر به تشکیل تعادلی می‌گردد که آن را با پارامتری به نام ضریب توزیع (K) بیان می‌کنند (معادله ۱-۲). در این رابطه C_m و C_s به ترتیب نشان‌دهنده غلظت مولی آنالیت در فاز متحرک و فاز ساکن است [۲۳].

$$K = \frac{C_s}{C_m} \quad (1-2)$$

پدیده‌های فیزیکی و شیمیایی متفاوتی بر روی سرعت و بازده جداسازی تاثیر دارند. از بین

¹ Mikhail tswett

² Gas chromatography

³ Liquid chromatography

⁴ Supercritical fluid chromatography

تئوری‌های موجود که به توجیه و محاسبه این عوامل می‌پردازند، تئوری بشقابک‌های فرضی کاربرد بیشتری دارد. در این تئوری فرض می‌شود که هر ستون از یک سری صفحات نازک، افقی و کاملاً مجزا از هم، که به‌طور متوالی قرار گرفته‌اند، تشکیل شده‌است. به هریک از این صفحات، بشقابک نیز گفته می‌شود. در هر کدام از این بشقابک‌ها آنالیت در تعادل بین فاز متحرک و ساکن قرار دارد و در نهایت با انتقال بین بشقابک‌ها عمل جداسازی صورت می‌پذیرد. کارایی هر ستون به تعداد بشقابک‌های موجود در ستون و یا به عبارت دیگر به تعداد تعادل‌های ایجادشده در ستون بستگی دارد. برای بررسی کارایی ستون، تعداد بشقابک‌های فرضی (N) از معادله ۲-۲ محاسبه می‌شود که در این رابطه H نشان‌دهنده ارتفاع هر بشقابک و L نیز نشان‌دهنده طول ستون می‌باشد [۲۳].

$$N = \frac{L}{H} \quad (2-2)$$

با توجه به اینکه در این پروژه از روش کروماتوگرافی مایع استفاده شده‌است، در ادامه به‌طور خلاصه به توصیف این روش خواهیم پرداخت.

۲-۱-۱- کروماتوگرافی مایع

کروماتوگرافی مایع بر اساس نوع فاز متحرک و ساکن، به چهار دسته تقسیم می‌شود [۲۳]:

- ✓ کروماتوگرافی تقسیمی^۱
- ✓ کروماتوگرافی جذب سطحی^۲
- ✓ کروماتوگرافی تبادل یونی^۳
- ✓ کروماتوگرافی طرد اندازه‌ای^۴

¹ Partition chromatography
² Adsorption chromatography
³ Ion-exchange chromatography
⁴ Size-exclusion chromatography

۲-۱-۱-۱- کروماتوگرافی تقسیمی

توزیع متفاوت مولکول‌های نمونه در دو فاز مایع غیر قابل امتزاج، اساس کروماتوگرافی تقسیمی است. در این نوع کروماتوگرافی، فاز ساکن مایع است که به صورت یک لایه نازک توسط جذب سطحی یا پیوند شیمیایی، بر روی ذرات نگهدارنده بی‌اثر پوشانده شده است. کروماتوگرافی تقسیمی براساس قطبیت فاز ساکن و متحرک، به دو دسته کروماتوگرافی فاز نرمال (NP)^۱ و کروماتوگرافی فاز معکوس (RP)^۲ تقسیم می‌شود [۲۳].

در کروماتوگرافی NP، فاز متحرک یک حلال غیرقطبی مانند هگزان و فاز ساکن قطبی است و تفاوت در قدرت برهم‌کنش‌های قطبی مولکول‌های نمونه با فاز ساکن، اساس جداسازی است. مواد پرکننده ستون رایج در کروماتوگرافی NP، اکسیدهای متخلخل مانند سیلیس و آلومینا هستند که سطح این مواد پرکننده با جمعیت انبوهی از گروه‌های OH پوشیده شده‌است. این نوع از کروماتوگرافی برای جداسازی نمونه‌هایی با قطبیت بالا و محلول در آب استفاده می‌شود [۲۳].

در کروماتوگرافی RP، فاز ساکن غیر قطبی و فاز متحرک نیز قطبی می‌باشد و تفاوت در قدرت برهم‌کنش‌های واندروالس مولکول‌های نمونه با فاز ساکن، اساس جداسازی است. کروماتوگرافی فاز معکوس تا به امروز متداول‌ترین روش کروماتوگرافی مایع است. از عوامل اصلی شهرت و کاربرد زیاد این روش، توانایی تمایز ترکیبات بسیار مشابه و سهولت تغییر بازداري و گزینش‌پذیری در آن است. گروه‌های هیدروکربن بلند زنجیره به صورت موازی با یکدیگر و عمود بر سطح ذره قرار می‌گیرند و یک سطح هیدروکربنی غیرقطبی به وجود می‌آورند همچنین فاز متحرک به کار گرفته شده اغلب یک محلول آبی حاوی نسبت‌های متفاوتی از حلال‌هایی مانند متانول، استونیتریل و تتراهیدروفوران است. از این روش برای جداسازی نمونه‌هایی که حلالیت کمی در آب دارند، استفاده می‌شود [۲۳].

¹ Normal phase chromatography

² Reversed phase chromatography

۲-۱-۲- کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا

کروماتوگرافی مایع ابتدایی، در ستون‌های شیشه‌ای با قطر ۱ تا ۵ سانتیمتر و طول ۵۰ تا ۵۰۰ سانتیمتر انجام می‌شد. برای دستیابی به سرعت جریان مطلوب، قطر ذرات در فاز ساکن جامد معمولاً در گستره ۱۵۰ تا ۲۰۰ میکرومتر بود. حتی با این قطر، سرعت جریان تنها چند دهم میلی‌متر در دقیقه بود و بنابراین زمان جداسازی طولانی بود. تلاش برای افزایش سرعت با اعمال خلأ یا توسط پمپ کردن مؤثر نبود، زیرا افزایش در سرعت جریان، ارتفاع بشقابک فرضی را به بیش از مقدار مینیمم در منحنی نوعی ارتفاع بشقابک در برابر سرعت جریان افزایش می‌داد و بنابراین باعث کاهش بازدهی می‌شد. در آغاز توسعه کروماتوگرافی مایع، مشاهده شد که افزایش عمده در بازدهی ستون همراه با کاهش در اندازه ذرات پرکننده خواهد بود. در اواخر سال ۱۹۶۰ فن‌آوری برای تولید و کاربرد مواد پرکننده با قطر ۱۰ میکرومتر توسعه یافت و بدین منظور واژه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا به کار گرفته شد تا این روش جدید از روش‌های قدیمی‌تر متمایز گردد. این روش برای تجزیه کمی و کیفی مواد دارویی، شیمیایی، غذایی، پلیمری، بیوشیمی (تجزیه پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک و...) و بکار می‌رود [۲۳].

اجزاء دستگاه HPLC عبارتند از: مخازن حلال، گازدا، پمپ، سیستم تزریق نمونه، ستون، آشکارساز، داده‌پرداز و نمایشگر. در HPLC، جریانی از یک حلال از درون یک ستون پر شده با فاز ساکن عبور کرده و نمونه مورد آزمایش نیز توسط سیستم تزریق وارد ستون شده و اجزاء نمونه بر اساس میزان برهم‌کنش با فاز ساکن و متحرک، با فاصله زمانی متفاوت از ستون عبور کرده و جدا می‌شوند. پس از خروج از ستون بوسیله یک آشکارساز مناسب شناسایی شده و نتایج به صورت پیک-هایی به ثبت می‌رسند [۲۳].

دستگاه HPLC دارای یک یا چند مخزن شیشه‌ای مجهز به میکرو فیلتر جهت ممانعت از ورود ذرات ریز احتمالی موجود در فاز متحرک است که حلال‌های فاز متحرک درون آنها قرار دارند. قسمت

گاززدای دستگاه متشکل از یک سیستم پمپ خلأ است و از ورود حباب‌های هوا به داخل ستون جلوگیری می‌کند. حباب‌های هوا باعث پهن شدن نوار و تداخل در عملکرد آشکارساز می‌شوند. در HPLC دو نوع پمپ مکانیکی به کار گرفته می‌شود: پمپ سرنگی با رانش پیچی و پمپ رفت و برگشتی. پمپ‌های رفت و برگشتی کاربرد گسترده‌تری دارند و متشکل از یک محفظه استوانه‌ای کوچک‌اند که با حرکت یک پیستون به جلو و عقب، خالی و پر می‌شود [۲۳].

متداول‌ترین روش وارد کردن نمونه براساس حلقه^۱ تزریق نمونه استوار است. سیستم تزریق نمونه، حلقه‌های تعویض‌پذیری دارد که انتخاب مقدار نمونه تزریقی از ۵ تا ۵۰۰ میکرولیتر را ممکن می‌سازد. ستون‌های کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا معمولاً از جنس فولاد زنگ نزن هستند. طول ستون‌ها در گستره ۳۰ تا ۳۰۰ میلی‌متر و قطر درونی آنها بین ۲/۱ تا ۴/۶ میلی‌متر می‌باشد. متداول‌ترین ماده پرکننده متشکل از ذرات سیلیس است که اغلب توسط لایه آلی نازک، اندود می‌شود و از مرسوم‌ترین ستون‌های غیرقطبی می‌توان به ستون C₁₈ (اکتا دسیل سیلان ODS)^۲ اشاره کرد [۲۴]. سرانجام هر ترکیبی که از درون ستون شسته می‌شود، به صورت یک پیک توسط آشکارساز ظاهر می‌گردد. پرکاربردترین نوع آشکارساز، طیف سنج UV-Vis بوده و برای ترکیباتی که در این ناحیه جذب داشته باشند مورد استفاده قرار می‌گیرد. انتخاب طول موج مناسب یکی از مواردی است که می‌بایست مورد توجه قرار بگیرد. اساس کار آشکارساز ضریب شکست بر مبنای تغییراتی است که در ضریب شکست سیستم حلال به تنهایی و سیستم حلال همراه با مولکول‌های آنالیت، ایجاد می‌شود. آشکارساز فلورسانس حساس‌تر از آشکارساز UV-Vis است ولی ترکیباتی که خاصیت فلورسانس دارند، محدود بوده و در نتیجه کاربرد این آشکارساز نیز محدود است. عملکرد آشکارساز الکتروشیمیایی نیز بر پایه واکنش‌های اکسید و احیا می‌باشد. آشکارساز طیف سنج جرمی به دلیل مزایای زیادی که دارد به طور وسیعی مورد استفاده قرار می‌گیرد. از جمله مزایای این آشکارساز می‌توان به حد

¹ Loop

² Octadecylsilane

تشخیص بسیار پایین، حساسیت و گزینش پذیری بالا و امکان بررسی نمونه در حضور مزاحم‌های شیمیایی اشاره کرد. پاسخ آشکارساز برای هر ترکیب روی نمودار یا صفحه نمایش کامپیوتر نمایش داده می‌شود که به عنوان کروماتوگرام شناخته می‌شود. برای گردآوری، ذخیره و آنالیز داده‌های کروماتوگرافی از کامپیوتر، انتگرال گیر و سایر تجهیزات پردازش داده‌ها استفاده می‌شود [۲۳].

۲-۲- مقدمه‌ای بر روش‌های آماده‌سازی نمونه

طی چند دهه اخیر رشد چشم‌گیری در استفاده از تکنیک‌های اندازه‌گیری نمونه صورت گرفته- است. دستگاه‌های تجزیه‌ای از قبیل کروماتوگرافی، اسپکتروسکوپی و همین‌طور حسگرها و ابزارهای میکرو نیز تحت تاثیر همین پیشرفت‌ها قرار گرفته‌اند. اما علی‌رغم پیشرفت در ساخت ابزارهای تجزیه- ای، اندازه‌گیری‌های بسیار دقیق و غیرتخریبی هنوز در بیشتر موارد امکان‌پذیر نمی‌باشد. لذا جهت کمک به بهبود روش‌های موجود، در اغلب موارد یک یا چند مرحله آماده‌سازی نمونه ضروری است. آماده‌سازی نمونه در یک فرآیند تجزیه‌ای عمدتاً شامل مرحله استخراج است که منجر به تغلیظ و جداسازی گونه‌های مورد نظر از بافت نمونه می‌گردد. به‌طور کلی آماده‌سازی نمونه به منظور تحقق اهداف زیر صورت می‌گیرد [۲۳]:

- ✓ حذف مزاحمت‌های موجود در نمونه به‌منظور افزایش گزینش پذیری روش
- ✓ پیش‌تغلیظ آنالیت‌ها و افزایش حساسیت روش
- ✓ در صورت لزوم تبدیل گونه به شکلی که برای جداسازی یا آنالیز مناسب باشد.

۲-۳- استخراج

در چند دهه اخیر با وجود پیشرفت‌های بسیار در توسعه دستگاه‌های تجزیه‌ای برای اندازه‌گیری آنالیت در نمونه‌های محیطی و بیولوژیکی و محصولات دارویی، آماده‌سازی نمونه به منظور

استخراج و تغلیظ آنالیت‌ها از ماتریکس‌های پیچیده معمولاً ضروری است، زیرا بسیاری از دستگاه‌های آنالیز نمی‌توانند به طور مستقیم بافت‌های پیچیده را آنالیز کنند [۲۵].

روش‌هایی از قبیل استخراج مایع-مایع (LLE)، استخراج فاز جامد (SPE) و رسوب دادن، از اولین روش‌هایی بودند که برای جداسازی و پیش‌تغلیظ آنالیت‌ها از بافت‌های مختلف مورد استفاده قرار گرفته‌اند. در LLE، فرایند استخراج توسط یک حلال آلی غیرقابل امتزاج با آب انجام گرفته و پس از استخراج، در اثر تبخیر حلال، تغلیظ آنالیت صورت می‌گیرد. روش LLE، برخلاف کاربردهای گسترده‌اش دارای معایبی از جمله چند مرحله‌ای بودن و امکان از دست دادن بخشی از نمونه و مصرف مقادیر زیادی از حلال‌های آلی سمی می‌باشد. بعلاوه LLE روشی با هزینه بالا، بسیار وقت‌گیر و بعضاً خسته‌کننده می‌باشد. توجه اخیر شیمیدانان به روش‌های استخراج باعث شده است که این روش‌ها دستخوش اصلاحات جدید گردند. تعیین راهکارهایی برای کاهش مصرف حلال، خودکار نمودن و امکان اندازه‌گیری مقادیر بسیار کم و پیدا کردن روش‌های سازگار با محیط زیست از جمله اهداف مهم این اصلاحات می‌باشد.

امروزه تکنیک‌های متنوعی جایگزین روش‌های کلاسیک شده‌اند که یا عاری از حلال هستند و یا حجم حلال مصرفی آنقدر کوچک است که می‌توان آن‌ها را جزء روش‌های عاری از حلال محسوب کرد. همچنین روند تکاملی در شیمی تجزیه به سمت ساده‌سازی و مینیاتوری شدن مرحله آماده‌سازی نمونه است. بنابراین، روش‌های میکرواستخراج برای بهبود کیفیت و حساسیت روش‌های تجزیه‌ای معرفی شدند. به همین منظور روش‌های میکرواستخراج به دو دسته کلی میکرواستخراج فاز مایع (LPME)^۱ و میکرواستخراج فاز جامد (SPME)^۲ تقسیم می‌شوند [۲۶].

^۱ Liquid phase microextraction

^۲ Solid phase microextraction

۲-۳-۱- میکرواستخراج فاز مایع

میکرواستخراج فاز مایع (LPME) یک تکنیک آماده‌سازی نمونه مشابه استخراج مایع-مایع می‌باشد، با این تفاوت که حجم حلال استخراج در LPME به حداقل مقدار کاهش یافته است. از اواسط تا اواخر سال ۱۹۹۰، داسگوپتا^۱ و همکارانش سری قابل توجهی از مقالات درباره کاربرد بالقوه میکروقطره منتشر کردند. آنها ویژگی‌های منحصر به فرد و مفیدی از قطره‌های مایع را نشان دادند. آنها اولین کسانی بودند که یک سیستم قطره در قطره جدید را گزارش کردند. در این سیستم، یک میکروقطره از یک حلال آلی غیر قابل امتزاج با آب در یک قطره آبی بزرگتر در حالت تعلیق قرار داشت [۲۷].

در همان زمان، ژنو^۲ و کانتول^۳ یک تکنیک جدید میکرواستخراج با حلال را معرفی کردند. در این تکنیک، فرایند میکرواستخراج توسط تعلیق یک قطره ۸ میکرولیتری به‌طور مستقیم، از نوک سوزن یک میکروسرنگ غوطه‌ور در محلول نمونه آبی، انجام شد. پس از استخراج، فاز آلی به داخل میکروسرنگ برگشت داده شد و سپس به دستگاه کروماتوگرافی گازی تزریق شد [۲۷].

تا به امروز، مقالات متعددی در زمینه روش‌های مختلف میکرواستخراج گزارش شده است. به‌طور کلی LPME به سه دسته اصلی تقسیم می‌شود:

۱- میکرواستخراج فاز مایع قطره تنها (SDME)^۴ (بدون استفاده از غشاء فیبر متخلخل)

۲- میکرواستخراج فاز مایع با استفاده از غشاء فیبر متخلخل (HF-LPME)^۵

۳- میکرواستخراج مایع-مایع پخشی (DLLME)^۶

¹ Dasgupta

² Jeannot

³ Cantwell

⁴ Single-drop microextraction

⁵ Hollow-fiber liquid-phase microextraction

⁶ Dispersive liquid-liquid microextraction

تفاوت اصلی دسته اول و دوم وجود یا عدم وجود غشا بین دو فاز آبی و آلی است که هر یک مزایا و معایب مخصوص به خود را دارند. اما تکنیک DLLME به دلیل استفاده از یک سیستم سه تایی حلال با دیگر روش‌های میکرواستخراج فاز مایع تفاوت اساسی دارد [۲۳].

میکرواستخراج فاز مایع قطره تنها به دو روش اصلی انجام می‌شود [۲۶]:

✓ غوطه‌ور شدن مستقیم (DI-SDME)^۱

✓ قرار گرفتن در فضای فوقانی (HS-SDME)^۲

روش بکار برده شده در این پروژه، میکرواستخراج مبتنی بر انجماد قطره آلی شناور توسط امولسیون‌سازی و رتکس، جزء روش‌های DI-SDME بوده که در ادامه به بررسی کامل این روش خواهیم پرداخت.

۲-۳-۱-۱- میکرواستخراج مبتنی بر انجماد قطره آلی شناور (SFODME)

در سال ۲۰۰۷ محمدرضا خلیلی زنجانی و همکارانش یک روش میکرواستخراج فاز مایع جدید مبتنی بر انجماد قطره آلی شناور را ارائه کردند [۲۸]. میکرواستخراج مبتنی بر انجماد قطره آلی شناور مانند دیگر تکنیک‌های میکرواستخراج با حلال، به سرعت توجه پژوهشگران را به خود جلب کرد و در میان شیمیدانان بسیار محبوب شد.

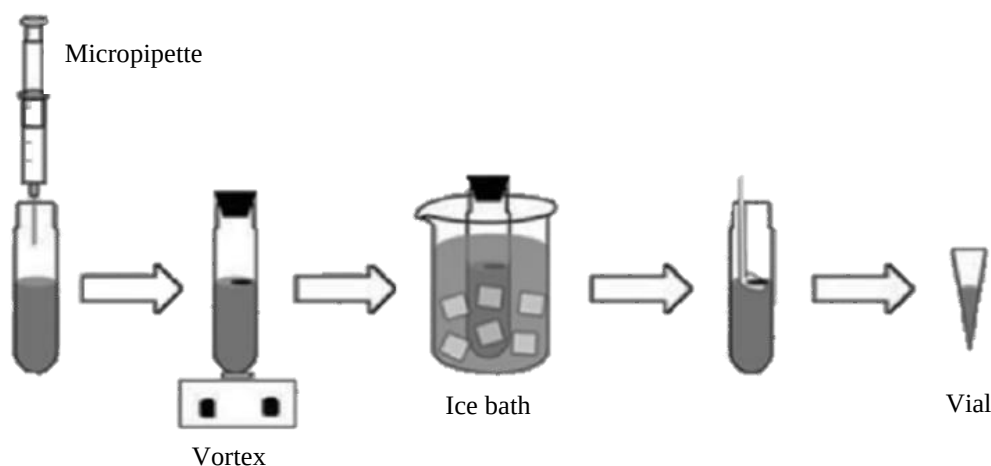
در SFODME، حجم کمی از یک حلال آلی مناسب با نقطه ذوب نزدیک به دمای اتاق (در محدوده ۱۰-۳۰ درجه سانتیگراد) در سطح محلول نمونه آبی شناور می‌شود. سپس محلول نمونه به منظور افزایش سطح تماس دو فاز، برای مدت زمان مشخص همزده می‌شود. پس از انجام فرایند استخراج، محلول آبی حاوی قطره آلی به حمام یخ منتقل شده و در مرحله بعد، قطره آلی جامد شده

¹ Direct immersion-SDME

² Headspace-SDME

که بدلیل چگالی کمتر نسبت به آب در روی سطح محلول شناور می‌باشد، توسط اسپاتول به یک ویال منتقل می‌گردد. در این مرحله احتمال این وجود دارد که همراه با خارج کردن قطره جامد شده از لوله آزمایش، مقداری از محلول نمونه نیز وارد ویال شده باشد، که در این صورت باعث ایجاد خطا در مرحله تزریق حلال آلی به دستگاه می‌شود. بنابراین پس از ذوب شدن قطره در دمای اتاق، محلول آبی موجود در ویال بوسیله یک سرنگ یک میلی‌لیتری، به دقت خارج می‌شود. در نهایت قطره آلی، توسط سیستم دستگاهی مناسب، مورد آنالیز قرار می‌گیرد.

با توجه به اینکه در این پروژه از دستگاه ورتکس برای همزدن محلول نمونه استفاده شده است، روش SFODME به صورت میکرواستخراج مبتنی بر انجماد قطره آلی شناور توسط امولسیون‌سازی ورتکس (VA-SFODME) نام‌گذاری شد [۲۷].



شکل ۱-۲ طرح کلی روش VA-SFODME [۲۹]

ا) ویژگی‌های حلال استخراج

بطور کلی حلال استخراج در VA-SFODME باید خصوصیات زیر را داشته باشد [۲۷]:

✓ حلالیت بسیار کم در آب به منظور پایدار ماندن حلال در طول استخراج

✓ نقطه ذوب نزدیک به دمای اتاق

✓ چگالی کمتر از آب

✓ عدم ایجاد مزاحمت در آشکارسازی آنالیت

ب) مزایا و معایب روش VA-SFODME

مزایا: از مزایای این روش می‌توان به سادگی، مصرف کم حلال آلی، تکرار پذیری بالا، زمان استخراج کوتاه، هزینه پایین و فاکتور پیش تغلیظ بالا اشاره کرد. همچنین این روش برای تجزیه نمونه‌های با بافت پیچیده مناسب است [۲۷]

معایب: محدودیت در انتخاب نوع حلال استخراج کننده [۲۷]، این روش برای آنالیت‌های با درجه‌ی چربی دوستی زیاد و متوسط مناسب می‌باشد [۲۸].

ج) روابط تئوری حاکم بر VA-SFODME

در روش میکرواستخراج فاز مایع مبتنی بر انجماد قطره آلی شناور، آنالیت بین حلال استخراج و محلول نمونه آبی توزیع می‌شود. فاکتور پیش تغلیظ (PF)^۱ به صورت نسبت غلظت آنالیت در حلال آلی (C_o) به غلظت اولیه آنالیت در فاز آبی (C_{aq}) تعریف می‌شود (معادله ۲-۳).

$$PF = \frac{C_o}{C_{aq}} \quad (۲-۳)$$

¹ Preconcentration factor

همچنین برای بدست آوردن درصد بازیابی استخراج (ER)^۱ از رابطه زیر استفاده می‌شود که در آن V_o و V_{aq} به ترتیب حجم فاز آلی و حجم نمونه آبی می‌باشد [۲۸].

$$ER = \frac{C_o V_o}{C_{aq} V_{aq}} \times 100 \quad (۴-۲)$$

د) مقایسه‌ی روش VA-SFODME با سایر روش‌های میکرواستخراج

در روش VA-SFODME، بدلیل استفاده از دستگاه ورتکس و افزایش سطح تماس بین حلال آلی و نمونه آبی، زمان استخراج حدود یک دقیقه است در حالی که در روش‌های میکرواستخراج فاز مایع توسط فیبر توخالی و میکرواستخراج قطره تنها، زمان استخراج حداقل ۳۰ دقیقه می‌باشد. روش VA-SFODME بدلیل جمع‌آوری کامل حلال استخراج پس از انجماد، از تکرارپذیری بالایی برخوردار است. همچنین در این روش بدلیل استفاده از حلال آلی تازه در هر استخراج، اثر حافظه وجود ندارد. روش VA-SFODME، برای نگه داشتن قطره آلی نیاز به وسیله خاصی ندارد و چون قطره آلی در محلول نمونه شناور است، همزدن محلول نمونه در سرعت‌های بالا امکان‌پذیر است [۲۷].

¹ Percent extraction recovery

۴-۲- روش‌های بهینه‌سازی^۱ پارامترها

روش‌های بهینه‌سازی، روش‌هایی هستند که سطوحی از متغیرهای موثر در آزمایش را مشخص می‌نمایند. به طوری که در این سطوح از متغیرها، پاسخ بهینه بدست آید. یک روش بهینه‌سازی خوب باید دو ویژگی داشته باشد. اول اینکه شرایط تجربی را مشخص نماید که در آن شرایط پاسخ بهینه یا نزدیک به بهینه ایجاد شود و دوم اینکه تا حد ممکن تعداد آزمایش‌های کمتری نیاز داشته باشد. روش‌های متفاوتی برای بهینه‌سازی متغیرها وجود دارد که از بین آنها می‌توان به موارد زیر اشاره کرد [۳۰]:

۱- روش تک‌متغیره

۲- روش سیمپلکس

۳- روش طراحی آزمایش (طراحی فاکتوریال^۲)

۴- روش مربعات لاتین

در این پروژه از روش‌های تک‌متغیره و طراحی آزمایش برای بهینه‌سازی متغیرها استفاده شده است. بنابراین در این بخش، این دو روش مورد بررسی قرار خواهند گرفت.

۴-۲-۱- روش تک‌متغیره

در این روش برای بهینه‌سازی یک متغیر، سایر متغیرها ثابت نگه داشته شده و متغیر مورد نظر تغییر داده می‌شود تا حداکثر پاسخ بدست آید. سایر متغیرها نیز به همین روش بهینه می‌شوند. مزیت روش بهینه‌سازی تک‌متغیره، سادگی آن است ولی این روش زمانی مفید است که برهم‌کنشی بین متغیرها وجود نداشته باشد. در صورت وجود برهم‌کنش، باید از سایر روش‌های بهینه‌سازی استفاده شود. برای مطالعه برهم‌کنش‌ها از روش طراحی آزمایش استفاده می‌شود.

^۱ Optimization

^۲ Factorial design

۲-۴-۲- روش طراحی آزمایش

روش طراحی آزمایش در سال ۱۹۲۰ توسط یک دانشمند انگلیسی به نام سر رونالد فیشر^۱ به عنوان روشی برای حداکثر کردن دانش بدست آمده از داده‌های تجربی ایجاد شد. اکثر آزمایش‌ها شامل چندین متغیر هستند که به منظور پیدا کردن شرایط بهینه و فهمیدن رابطه بین متغیرها طراحی آزمایش انجام می‌شود. فیشر نشان داد که روش یک متغیر در یک زمان، وقتی بین متغیرها برهم‌کنش وجود دارد، نقطه‌ای غیر از نقطه بهینه‌ی واقعی را نشان می‌دهد. روش یک متغیر در یک زمان، برای بهینه‌کردن چند فاکتور، نه صرفاً به دلیل زمان بیشتر بلکه به دلیل نادیده‌گرفتن برهم‌کنش موجود بین فاکتورها، نامناسب است. محدودیت این روش با استفاده از طرح‌های آماری برطرف می‌شود. زیرا در این روش‌ها برهم‌کنش بین فاکتورهای مختلف بررسی می‌شود [۳۱].

طراحی آزمایش‌ها شامل یک سری از آزمایش‌هایی می‌شود که در آنها به طور آگاهانه در متغیرهای ورودی فرآیند تغییراتی ایجاد می‌گردد تا از این طریق میزان تغییرات حاصل در پاسخ خروجی فرآیند مشاهده و شناسایی شود. در واقع این روش یک چارچوب ریاضی محکم برای تغییر تمام متغیرهای وابسته، به صورت همزمان و در کمترین تعداد آزمایش فراهم می‌کند. در این روش خطاها به وسیله میانگین‌گیری کاهش یافته و برهم‌کنش‌ها قابل مشاهده است. روش طراحی آزمایش در دو زمینه استفاده می‌شود [۳۱]:

✓ انجام مجموعه‌ای از آزمایش‌ها به منظور ایجاد مدل

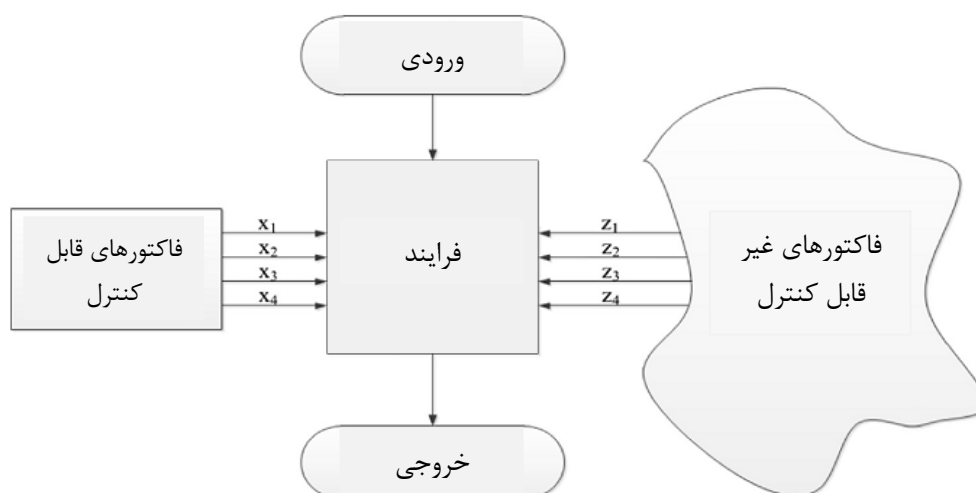
✓ بهینه‌سازی روش‌ها و فرآیندها

¹- Sir Ronald A. Fisher

۲-۴-۱- اهداف طراحی آزمایش

همان گونه که در شکل ۲-۲ نشان داده شده است یک فرایند را می توان ترکیبی از دستگاه ها، روش ها و افراد تصور نمود که مواد ورودی را به یک محصول خروجی تبدیل می کنند. این محصول خروجی دارای یک یا چند مشخصه کیفی با پاسخ های قابل مشاهده است. بعضی از متغیرهای فرایند قابل کنترل ($x_1, x_2, \dots, x_p$) و سایر آنها غیر قابل کنترل ($z_1, z_2, \dots, z_q$) هستند. اهداف روش طراحی آزمایش شامل موارد زیر است:

- ✓ تعیین متغیرهایی (x ها) که بیشترین اثر را بر روی پاسخ دارند.
- ✓ تعیین مقادیر متغیرهایی (x ها) که بیشترین اثر را بر روی پاسخ دارند، به گونه ای که به مقدار بهینه واقعی خود نزدیک باشد.
- ✓ تعیین مقادیر متغیرهایی (x ها) که بیشترین اثر را بر روی پاسخ دارند، به گونه ای که تغییرپذیری کم باشد.
- ✓ تعیین مقادیر متغیرهایی (x ها) که بیشترین اثر را بر روی پاسخ دارند، به گونه ای که اثرات متغیرهای غیر قابل کنترل حداقل گردد [۳۱].



شکل ۲-۲ مدل عمومی یک فرایند [۳۱]

۲-۲-۴-۲- مزایای طراحی آزمایش

با توجه به مطالبی که ذکر شد، مزایای روش طراحی آزمایش نسبت به روش متداول یک متغیر در زمان عبارتند از:

- ✓ افزایش شانس انجام یک آزمایش موفق
- ✓ سرعت در انجام آزمایش‌ها و صرف زمان کمتر بخاطر انجام تعداد کمتر آزمایش‌ها
- ✓ کاهش هزینه‌ها به علت انجام تعداد کمتر آزمایش‌ها
- ✓ با طراحی آزمایش، اطلاعات بیشتر و مفیدتری درباره سیستم مورد مطالعه بدست می‌آید، زیرا تاثیر پیوسته و همزمان تمام متغیرهای موثر در نظر گرفته می‌شود [۳۰].

۲-۲-۴-۳- مراحل روش طراحی آزمایش

الف) تعریف اهداف آزمایش و بیان مسئله

در عمل، غالباً تشخیص اینکه یک مسئله را می‌توان از طریق طراحی آزمایش‌ها حل کرد، بسیار دشوار است. به همین علت شاید نتوان به طور واضح مسئله را بیان کرد. با این حال باید بدانیم که ارائه کلیه نظرات به طور کامل در مورد مسئله و اهداف آزمایش ضرورت دارد. غالباً بیان صریح مسئله و اهداف آزمایش در درک بهتر فرایند و حل مسئله کمک به سزایی خواهد داشت.

ب) شناسایی فاکتورهای تاثیرگذار و تعیین سطح مناسب برای آنها

به منظور شناسایی فاکتورهای تاثیرگذار و تعیین سطح مناسب برای آنها، باید شناخت و دانش کافی در مورد فرایند مورد نظر وجود داشته باشد. معمولاً این شناخت ترکیبی از تجارب عملی و درک تئوری است. کلیه فاکتورهایی که ممکن است به گونه‌ای در آزمایش نقش مهمی داشته باشند باید مورد بررسی قرار گیرند. زمانی که هدف غربال فاکتورها یا ویژگی‌شناسی فرایند باشد بهتر است که تعداد سطوح فاکتور مورد مطالعه کم در نظر گرفته شود (در اغلب موارد از دو سطح استفاده می‌شود).

ج) انتخاب طرح آزمایش

انتخاب نوع طرح شامل تعیین تعداد دفعاتی است که آزمایش باید تکرار شود، و همچنین تعیین ترتیب صحیح انجام آزمایش‌ها و تعیین محدودیت‌هایی نظیر بلوک‌بندی و غیره می‌باشد.

د) انجام آزمایش

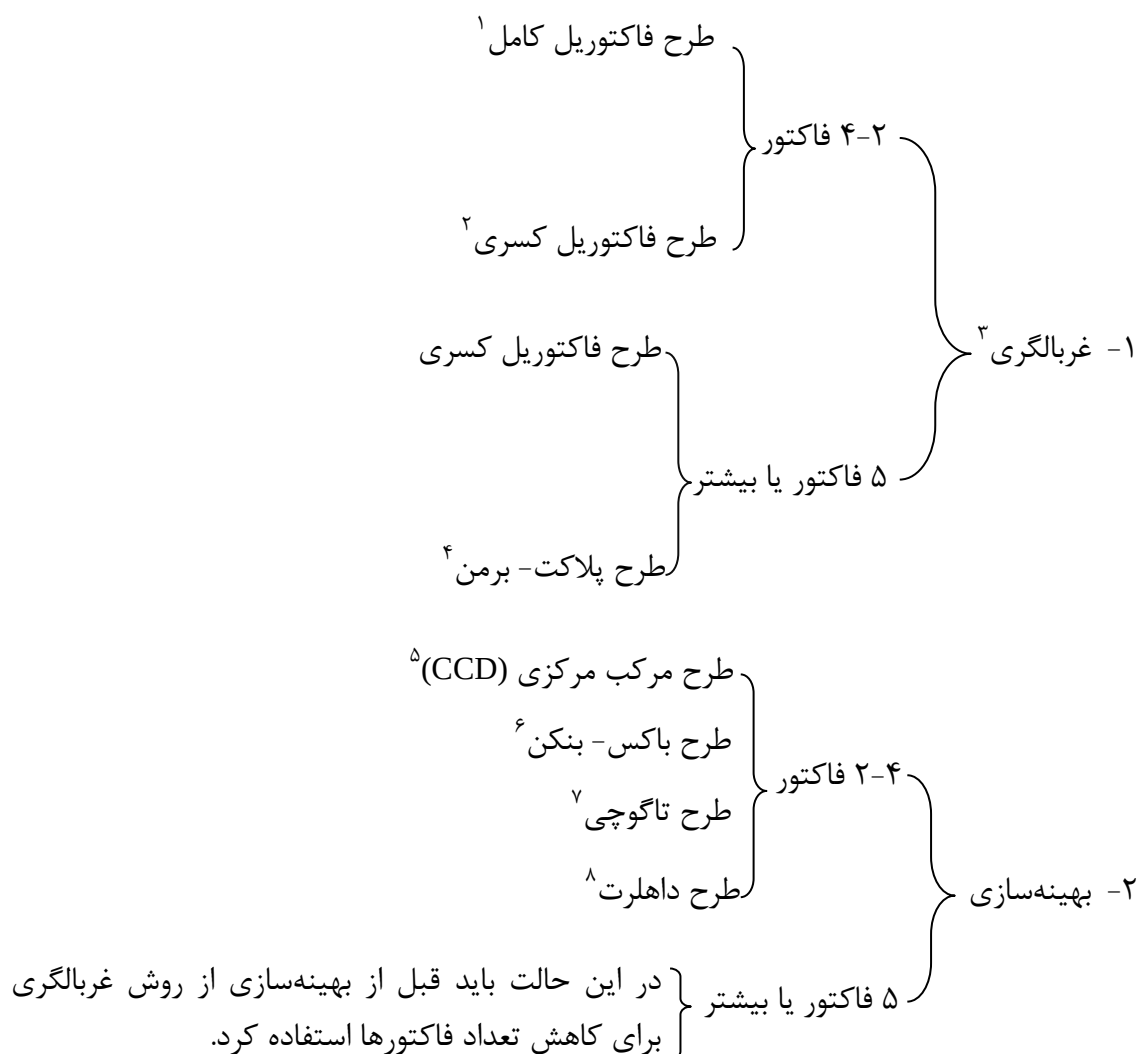
وقتی آزمایش انجام می‌شود، باید فرایند انجام آن را به دقت تحت نظر گرفت تا اطمینان حاصل گردد که همه چیز طبق نقشه پیش می‌رود. وجود خطا در روش آزمایش در این مرحله معمولاً منجر به از بین رفتن صحت آزمایش می‌گردد.

ه) تحلیل اطلاعات بدست آمده توسط آزمایش‌ها

از روش‌های آماری برای تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده می‌شود. امروزه نرم‌افزارهای مختلفی برای انجام محاسبات مورد نیاز وجود دارد. همچنین باید توجه داشت که روش‌های نموداری ساده نیز نقش مهمی در تعبیر و تفسیر داده‌ها ایفا می‌کنند [۳۱].

۲-۴-۲-۴- انواع روش‌های طراحی آزمایش

براساس هدف یک آزمایش، طرح‌های آزمایشی به دو گروه عمده تقسیم می‌شوند و هریک از این دو گروه براساس تعداد فاکتورها شامل چندین طرح می‌باشند (شکل ۲-۳):



شکل ۳-۲ نمودار انتخاب طرح [۳۲]

طرح غربالگری برای تعیین فاکتورهای مهم و اثر متقابل آنها از تمام فاکتورهای بالقوه استفاده می‌شود. در این نوع طرح‌ها فاکتورها کیفی، کمی و ترکیب آنها به‌طور همزمان بررسی می‌شوند. بهینه‌سازی یکی از جنبه‌های دیگر طراحی آزمایش است که شرایط مطلوب و تنظیمات یک آزمایش را تعیین می‌کند.

¹ Full factorial design

² Fractional factorial design

³ Screening

⁴ Plackett-Burman design

⁵ Central composite design

⁶ Box-Behnken design

⁷ Taguchi design

⁸ Doehlert design

فاکتور، متغیری است که می‌تواند بر نتیجه آزمایش تأثیر بگذارد. این متغیرها می‌توانند تنها تعداد معدودی از مقادیر ممکن را داشته باشند که به آنها سطوح عامل^۱ گفته می‌شود و همچنین می‌تواند یک متغیر طبقه‌ای باشد (مانند کاتالیزور که حضور آن به عنوان سطح بالا و عدم حضور آن به عنوان سطح پایین در نظر گرفته می‌شود) و یا می‌تواند یک متغیر پیوسته باشد (مانند دما که توانایی پذیرش هر مقداری را به عنوان سطح بالا و پایین دارد). مشخصه‌ای از محصول یا فرایند که قرار است بهینه شود، پاسخ نامیده می‌شود. پاسخ‌ها را می‌توان متغیرهایی دانست که کارایی را توصیف می‌کنند. بنابراین دو نوع متغیر وجود دارد، فاکتورهایی که متغیرهای مستقل هستند (x_i) و متغیرهای وابسته که همان پاسخ‌ها (y_i) هستند. ارتباط بین پاسخ‌ها و متغیرهای مستقل در معادله ۲-۵ نشان داده شده است.

$$(y_1, y_2, \dots, y_i) = f(x_1, x_2, \dots, x_i) \quad (5-2)$$

در اکثر موارد هر پاسخ بطور جداگانه مورد بررسی قرار می‌گیرد. لذا معادله به شکل زیر نشان داده می‌شود:

$$y = f(x_1, x_2, \dots, x_n) \quad (6-2)$$

مدلی که پاسخ را به اثرات فاکتورها ربط می‌دهد، تابع پاسخ^۲ نام دارد. تابع پاسخ درجه اول برای دو فاکتور x_1 و x_2 برطبق رابطه ۲-۷ می‌باشد.

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_1x_2 \quad (7-2)$$

در این رابطه b_0 مقدار ثابت، b_1 و b_2 ضرایب خطی و b_{12} ضریب برهم‌کنش فاکتورهای x_1 و x_2 می‌باشد [۳۳].

¹ Factor levels

² Response function

۲-۴-۲-۱- طرح فاکتوریل

طرح فاکتوریل می‌تواند بیش از یک فاکتور در دو یا چند سطح را مطالعه کند. طرح فاکتوریل دو سطحی برای اهداف غربالگری مورد استفاده قرار می‌گیرد و اثرات اصلی و متقابل فاکتورهای مورد نظر را با کمترین تعداد آزمایش مشخص می‌کند. در حقیقت منظور از طراحی فاکتوریل، آزمایشی-هایی است که در هر تکرار کامل آن کلیه ترکیبات سطوح فاکتورهای مورد نظر بررسی می‌شود. طرح فاکتوریل به دو دسته تقسیم می‌شود که یکی طرح فاکتوریل کامل و دیگری طرح فاکتوریل کسری است [۳۲].

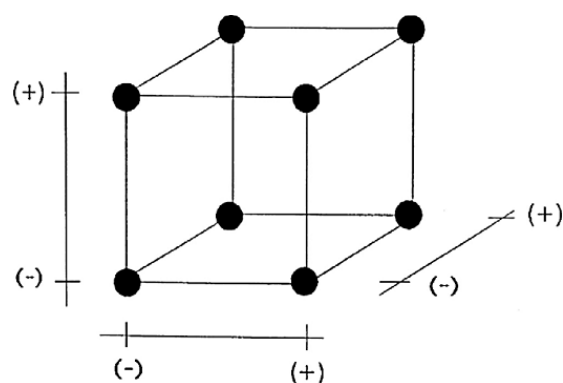
۱- طرح فاکتوریل کامل

زمانی که تعداد فاکتورهای مورد مطالعه اندک باشند، یک طرح فاکتوریل کامل دو سطحی می‌تواند برای غربالگری مفید باشد. یک طرح فاکتوریل کامل دو سطحی تمام ترکیبات ممکن از تمام متغیرهای ورودی و سطوح آنها را شامل می‌شود. تعداد آزمایشی‌ها در یک طرح فاکتوریل کامل را می‌توان به صورت 2^n نشان داد که n تعداد فاکتورها می‌باشد. هریک از فاکتورها دارای دو سطح می‌باشند: سطح بالا و سطح پایین، که به ترتیب به صورت $+$ و $-$ نشان داده می‌شوند. برای یک طرح فاکتوریل کامل با افزایش تعداد فاکتورها، تعداد آزمایش‌ها به صورت هندسی افزایش می‌یابد. ماتریس آزمایش‌ها برای یک طرح فاکتوریل کامل برای سه فاکتور در جدول ۲-۱ نشان داده شده است. این ماتریس دارای هشت سطر (2^3)، هر سطر مربوط به یک آزمایش) و سه ستون (هر ستون مربوط به یک فاکتور) می‌باشد. $-$ و $+$ در ستون اول به صورت متناوب در هر سطر، در ستون دوم به صورت متناوب در هر دو سطر و در ستون سوم به صورت متناوب در هر چهار سطر قرار دارند [۳۲].

از نقطه نظر هندسی، طرح فاکتوریل در گوشه‌های یک مکعب قرار می‌گیرد (شکل ۲-۴). اگر تعداد فاکتورها بیشتر از سه باشد، شکل هندسی طرح به صورت یک ابرمکعب خواهد بود که ذهن ما قادر به تجسم آن نیست اما از نظر ریاضی تغییر نمی‌کند [۳۴].

جدول ۱-۲ ماتریس آزمایش‌ها برای طرح فاکتوریل 2^3

فاکتور A	فاکتور B	فاکتور C
-	-	-
+	-	-
-	+	-
+	+	-
-	-	+
+	-	+
-	+	+
+	+	+



شکل ۴-۲ نمایش هندسی طرح فاکتوریل 2^3 [۳۴]

در طرح فاکتوریل 2^3 ، فاکتور ۱ تغییر می‌کند در حالی که فاکتورهای ۲ و ۳ مقادیر مختلف دارند (البته برای همه فاکتورها همین اتفاق می‌افتد). این بدان معنی است که طرح فاکتوریل برای تخمین برهم‌کنش بین فاکتورها مناسب است (به عنوان مثال، تفاوت در تغییر فاکتور ۱ زمانی که فاکتور ۲ در سطح بالا یا پایین خود قرار دارد، و به همین ترتیب). مدل ریاضی طرح فاکتوریل به شرح زیر می‌باشد [۳۴]:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 + b_{123}X_1X_2X_3 \quad (۸-۲)$$

۲- طرح فاکتوریل کسری

به منظور ارزیابی اثرات تعداد زیادی از فاکتورها، انجام تعداد زیادی آزمایش ضروری است که از

لحاظ اقتصادی و عملی امکان‌پذیر نیست. در این حالت اثر فاکتورهای خاص بر یک پاسخ توسط طرح فاکتوریل کسری مورد مطالعه قرار می‌گیرد. زمانی که تعداد نسبتاً زیادی آزمایش برای یک طرح فاکتوریل کامل لازم است، اغلب از کسری از طرح فاکتوریل کامل برای بدست آوردن اطلاعات مورد نظر استفاده می‌شود [۳۲]. در اغلب تحقیقات، منطقی است که فرض شود اثر برهم‌کنش‌های مرتبه سوم یا بالاتر بسیار کوچک است، بنابراین می‌توان اثر این برهم‌کنش‌ها را در مدل چند جمله‌ای حذف نمود [۳۵]. طرح فاکتوریل کسری با دو سطح و تعداد f فاکتور را می‌توان توسط 2^{f-v} آزمایش بررسی کرد (v اندازه کسر می‌باشد، $v = 1, 2, 3, \dots, n$) [۳۲].

۲-۴-۲-۲ طرح پلاکت-برمن

طرح پلاکت-برمن که در سال ۱۹۴۶ توسط پلاکت و برمن ابداع شد، یک طرح فاکتوریل ناقص دو سطحی است که برهم‌کنش‌های بین فاکتورها را در نظر نمی‌گیرد. از این طرح برای تعیین فاکتور-های تأثیرگذار و مهم استفاده می‌شود. با توجه به اطلاعات نرم‌افزار تعداد آزمایش‌ها در این طرح هنگامی که نقطه مرکزی و تکرار وجود نداشته باشد عددی بین ۱۲ تا ۴۸ است که می‌بایست مضربی از ۴ باشد [۳۳]. به‌طور مثال ۱۲، ۲۰، ۲۴، ۲۸، ۳۶، ۴۰، ۴۴، ۴۸ تعداد آزمایش‌های تعریف شده در طرح پلاکت-برمن می‌باشد که در آن ماکزیمم فاکتورهایی که می‌توان در هر طراحی آزمایش بررسی کرد از رابطه ۲-۹ بدست می‌آید [۳۲].

$$f = N - 1 \quad (۲-۹)$$

در این رابطه، f حداکثر تعداد فاکتورهای مورد بررسی و N تعداد آزمایش‌های تعریف شده توسط نرم‌افزار می‌باشند. هنگامی که در یک طرح پلاکت-برمن نقاط مرکزی و تکرار وجود داشته باشد، تعداد آزمایش‌ها از معادله ۲-۱۰ بدست می‌آید.

$$(N + X) \times Y = \text{تعداد کل آزمایش} \quad (۲-۱۰)$$

در این رابطه، X تعداد نقاط مرکزی و Y تعداد تکرارها می‌باشد. گاهی اوقات برای تعیین

خطاها، آزمایش‌ها تکرار می‌شوند. معمولاً یک مدل چند جمله‌ای مرتبه اول به منظور تخمین زدن اثرات فاکتورهای مختلف برای طرح پلاکت- برمن استفاده می‌شود [۳۲].

۲-۴-۲-۳- طرح مرکب مرکزی

ترسیم منحنی رویه پاسخ^۱ مستلزم مدل‌سازی پاسخ به صورت تابعی از فاکتورها و برهم‌کنش-های موثر است. طرح‌های آزمایشی با بیش از دو سطح، جهت ایجاد مدل‌های خمیده برای توصیف رابطه کمی بین پاسخ و فاکتورها بکار می‌روند. به نظر می‌رسد که طرح مرکب مرکزی جایگزین مناسبی برای طرح فاکتوریل کامل سه سطحی باشد، زیرا این طرح نتایج قابل مقایسه‌ای با تعداد آزمایش کمتر فراهم می‌کند [۳۲].

CCD معمولاً شامل یک طرح فاکتوریل کامل یا فاکتوریل کسری با دو سطح، نقاط محوری اضافی و حداقل یک نقطه مرکزی از طرح آزمایشی است (شکل ۲-۵). تعداد آزمایش‌های طرح مرکب مرکزی توسط رابطه زیر بدست می‌آید [۳۲]:

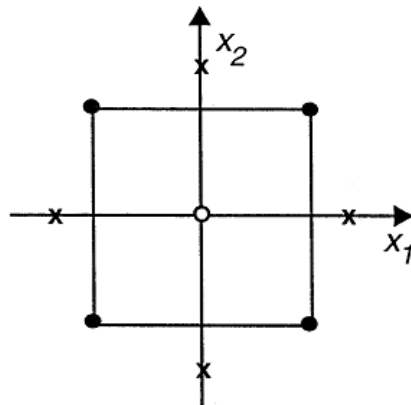
$$N = k^2 + 2k + c_p \quad (۱۱-۲)$$

در این رابطه c_p تعداد تکرار نقطه مرکزی و k تعداد فاکتورها می‌باشد. ماتریس طرح مرکب مرکزی برای دو فاکتور در جدول ۲-۲ نشان داده شده است. فاصله نقاط محوری از نقطه مرکزی طرح با پارامتر α نمایش داده شده است. مقدار پارامتر α با تغییر تعداد فاکتورها متغیر است. بسته به مقدار α دو نوع CCD وجود دارد، مرکب مرکزی مرکز وجوه پر (CCF)^۲ با $\alpha = 1$ که فاکتورها را در سه سطح بررسی می‌کند و مرکب مرکزی محدود شده (CCC)^۳ با $\alpha > 1$ که فاکتورها را در پنج سطح بررسی می‌کند [۳۵].

¹ Response surface

² Central composite face-centered

³ Central composite circumscribed



شکل ۲-۵ طرح مرکب مرکزی برای دو فاکتور، (•) نقاط طرح فاکتوریل، (o) نقطه مرکزی، (x) نقاط محوری [۳۵]

جدول ۲-۲ ماتریس طرح مرکب مرکزی برای دو فاکتور

X_1	X_2	
-	-	طرح فاکتوریل
+	-	
-	+	
+	+	
•	•	نقاط مرکزی
$-\alpha$	•	نقاط محوری
α	•	
•	$-\alpha$	
•	α	

۲-۴-۲-۴-۴ طرح باکس- بنکن

این طرح در سال ۱۹۶۰ توسط باکس و بنکن ارائه شد. این طرح یک مدل مرتبه دوم سه سطحی و چرخش پذیر می باشد که برای مطالعه فاکتورهای متعدد مورد استفاده قرار می گیرد. تعداد آزمایشات در این طرح از معادله ۲-۱۲ بدست می آید [۳۲].

$$N = 2k(k - 1) + C_0 \quad (۲-۱۲)$$

در این رابطه، k تعداد فاکتورها و C_0 تعداد نقاط مرکزی است. شکل کلی این مدل به صورت

یک معادله چندجمله‌ای درجه دوم می‌باشد که در زیر نشان داده شده است [۳۶]:

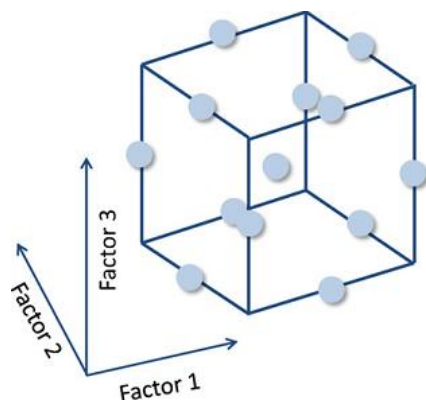
$$y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j \quad (۱۳-۲)$$

در این رابطه y پاسخ و X_i و X_j متغیرهای ورودی هستند که بر پاسخ تاثیر می‌گذارند، β_0 مقدار

ثابت، β_i ضریب خطی، β_{ii} ضریب برهمکنش دوتایی و β_{ij} ضریب برهمکنش بین X_i و X_j هستند.

طرح باکس- بنکن برای بررسی سه فاکتور تعداد ۱۳ آزمایش تعریف می‌کند که در شکل ۶-۲ نشان

داده شده است.



شکل ۶-۲ طرح باکس- بنکن برای بررسی سه فاکتور [۳۷]

فصل سوم

بخش تجربی

۳-۱- مقدمه

با توجه به اهمیت و کاربردهای داروهای تیکلوپیدین و لوزارتان و همچنین نقش آنها بر سلامتی انسان، روشی ساده، حساس و گزینش پذیر برای اندازه گیری مقادیر کم از این داروها ارائه شد. در این پژوهش، روش میکرواستخراج فاز مایع مبتنی بر انجماد قطره آلی شناور توسط امولسیون سازی ورتکس (VA-SFODME) برای پیش تغلیظ مقادیر کم تیکلوپیدین و لوزارتان در نمونه های حقیقی و روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا برای آنالیز آنها مورد بررسی قرار گرفت.

۳-۲- محلول های مورد استفاده و طرز تهیه آنها

برای تهیه تمام محلول ها از آب دو بار تقطیر استفاده گردید. ۰/۰۱۰۰ گرم از ماده جامد داروهای تیکلوپیدین و لوزارتان تهیه شده از شرکت داروسازی نوکام ساوه، در متانول حل شده و به حجم ۱۰/۰ میلی لیتر رسانیده شد و بدین صورت محلول مادر تیکلوپیدین و لوزارتان با غلظت ۱۰۰۰/۰ میلی گرم بر لیتر تهیه شد. محلول ۱۰۰/۰ میلی گرم بر لیتر به صورت روزانه، از رقیق کردن محلول مادر در متانول تهیه گردید. محلول های رقیق تر نیز به صورت روزانه در آب دوبار تقطیر ساخته و در یخچال نگهداری شد.

محلول های بافر فسفاتی با pH ۴/۰۰ تا ۸/۰۰ از مخلوط کردن حجم های معینی از محلول های پتاسیم دی هیدروژن فسفات دو آبه ۰/۰۶۷ مولار و پتاسیم هیدروژن فسفات ۰/۰۶۷ مولار تهیه شدند. همچنین برای تهیه محلول بافر فسفاتی با pH=۳/۰۰ نیز از محلول های پتاسیم دی هیدروژن فسفات دو آبه ۰/۰۶۷ مولار و فسفریک اسید ۰/۱۰۰ مولار و برای تهیه محلول بافر فسفاتی با pH بالاتر از ۸/۰۰ از محلول های پتاسیم هیدروژن فسفات ۰/۰۶۷ مولار و سود ۰/۱۰۰ مولار استفاده گردید. مشخصات مواد شیمیایی مورد استفاده در جدول ۳-۱ آمده است.

جدول ۱-۳ مواد شیمیایی مورد استفاده

نام ماده شیمیایی	فرمول	شرکت سازنده
متانول	CH ₃ OH	مرک ^۱
استونیتریل	CH ₃ CN	مرک
استون	C ₃ H ₆ O	مرک
پتاسیم دی هیدروژن فسفات دو آب	KH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	مرک
پتاسیم هیدروژن فسفات	K ₂ HPO ₄	مرک
هیدروکلریک اسید	HCl	مرک
سدیم هیدروکسید	NaOH	مرک
۱- دودکانول ^۲	CH ₃ (CH ₂) ₁₁ OH	مرک
۱- آندکانول ^۳	CH ₃ (CH ₂) ₁₀ OH	مرک
۱۰ و ۱- دی کلرودکان ^۴	Cl(CH ₂) ₁₀ Cl	مرک
سدیم کلرید	NaCl	مرک
فسفریک اسید	H ₃ PO ₄	مرک

۳-۳- دستگاه‌ها و وسایل مورد استفاده

جداسازی و اندازه‌گیری نمونه‌ها با استفاده از یک دستگاه HPLC اجیلنت^۵ مدل ۱۱۰۰ مجهز

به آشکارساز فرابنفش چند طول موجی (UV-MWD)^۶، گاز زدای مدل G1374A و یک لوپ ۵/۰۰

¹ Merck

² 1-Dodecanol

³ 1-Undecanol

⁴ 1,10-Dichlorodecan

⁵ Agilent

⁶ Ultraviolet-multi wavelength detector

میکرولیتری انجام شد. همچنین یک رایانه مجهز به برنامه ChemStation Agilent برای پردازش داده‌های کروماتوگرافی مورد استفاده قرار گرفت. ستون مورد استفاده نیز از نوع C_{18} ($4/5 \times 150$) با اندازه ذرات ۵ میکرومتر) بود.

جهت تهیه فاز متحرک مخلوطی از بافر فسفاتی (pH برابر ۲/۷ با غلظت ۰/۰۶ M) و استونیتریل و آب (۳۵:۴۵:۲۰٪) و سرعت جریان ۱/۰ میلی لیتر بر دقیقه انتخاب گردید [۳۸]. تنظیم و اندازه‌گیری pH محلول نمونه و فاز متحرک با استفاده از pH متر مترام^۱ ۷۸۰ مجهز به الکتروود ترکیبی شیشه-ای-کالومل (۳/۰ مولار پتاسیم کلرید) انجام شد.

برای وزن کردن جرم معینی از مواد شیمیایی از ترازوی تجزیه‌ای با دقت ۰/۱ میلی گرم ساتریوس^۲ مدل A200S ساخت کشور آلمان استفاده شد. میکروپیپت‌های ۱۰۰/۰ و ۱۰۰۰/۰ میکرولیتری با حجم قابل تنظیم، ساخت شرکت اپندورف^۳ مدل Research 100 برای برداشتن حجم معینی از حلال‌ها استفاده شد. فرایند امولسیون‌سازی توسط یک دستگاه ورتکس انجام شد. همچنین یک دستگاه سانتریفیوژ (EBA Hettich ۲۰، آلمان) در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت. برای ثبت طیف جذبی در ناحیه مرئی-ماوراءبنفش، از دستگاه اسپکتروفتومتر ریلی^۴ مدل UV-2601 مجهز به سل کوارتز ۱/۰ سانتیمتری استفاده شد. برای طراحی آزمایش‌ها به‌منظور تعیین فاکتورهای موثر و همچنین یافتن نقطه بهینه، از بسته نرم‌افزاری Statgraphics استفاده گردید.

۳-۴- شرایط کروماتوگرافی

از آنجا که در این پروژه برای جداسازی و اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان از دستگاه HPLC مجهز به آشکارساز UV-Vis استفاده شده است، تعیین شرایط کروماتوگرافی امری ضروری می‌باشد.

¹ Metrohm

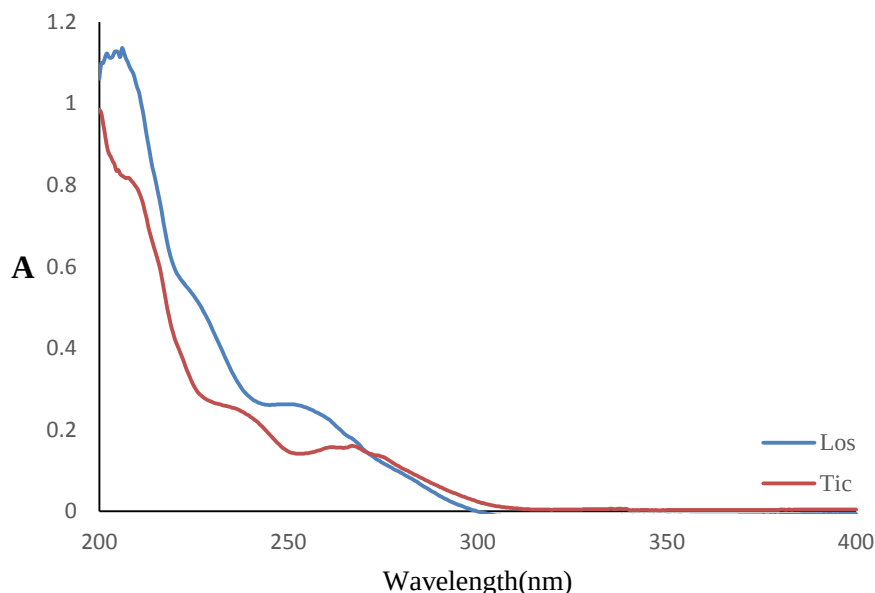
² Sartorius

³ Eppendorf

⁴ Rayleigh

۳-۴-۱- ثبت طیف UV آنالیت‌ها و انتخاب بهترین طول موج

به منظور مشخص کردن بهترین طول موج برای آشکارسازی، طیف جذبی آنالیت‌ها در گستره ۲۰۰-۴۰۰ نانومتر ثبت شد. برای این منظور محلول‌های ۵/۰ میلی گرم بر لیتر تیکلوپیدین و لوزارتان به صورت جداگانه در فاز متحرک تهیه گردید و سپس به داخل سل اسپکتروفتومتر منتقل و طیف جذبی هر یک از آنها نسبت به فاز متحرک ثبت شد (شکل ۳-۱). با توجه به طیف‌های جذبی، طول موج ۲۲۰ نانومتر، به عنوان بهترین طول موج برای آشکارسازی تیکلوپیدین و لوزارتان انتخاب شد.



شکل ۳-۱ طیف جذب UV تیکلوپیدین و لوزارتان

شرایط آزمایش: غلظت تیکلوپیدین و لوزارتان ۵/۰ میلی گرم بر لیتر، حلال مخلوط بافر فسفاتی (pH برابر ۲/۷ با غلظت ۰/۰۶ M)، استونیتریل و آب (۳۵:۴۵:۲۰٪)

۳-۴-۲- شرایط شویش کروماتوگرافی

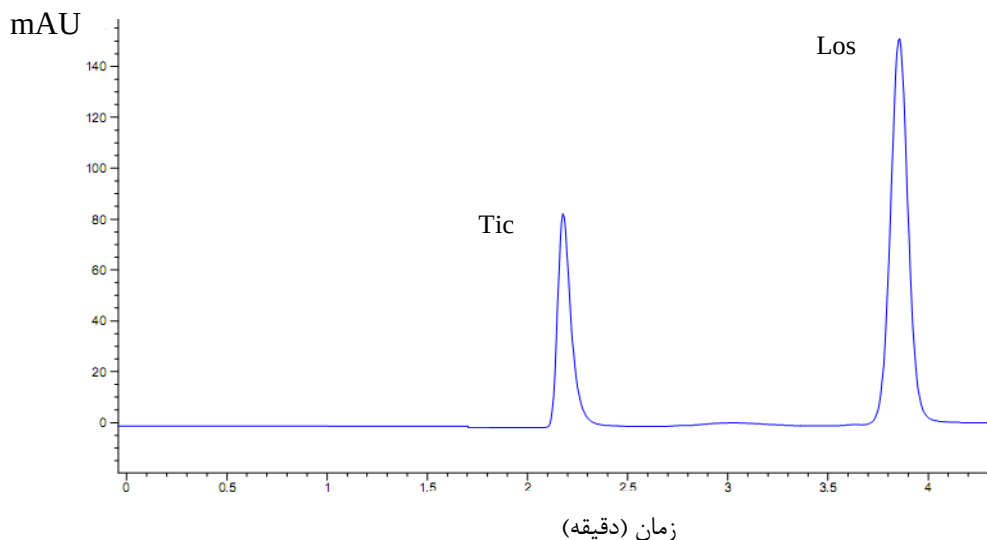
از آنجا که ماهیت داروهای تیکلوپیدین و لوزارتان نسبتاً غیرقطبی می‌باشد، از سیستم کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالای فاز معکوس (RP-HPLC)^۱ برای جداسازی آنها استفاده شد. از طرفی بدلیل تفاوت نسبتاً زیاد در میزان قطبیت تیکلوپیدین و لوزارتان، جداسازی این ترکیبات به

^۱ Reversed phase-high performance liquid chromatography

صورت همزمان با استفاده از یک روش شویش ساده قابل انجام می‌باشد. بنابراین مخلوطی از بافر فسفاتی (pH برابر ۲/۷ با غلظت ۰/۰۶ M)، استونیتریل و آب (۳۵:۴۵:۲۰٪) به‌عنوان فاز متحرک استفاده گردید [۳۸]. ابتدا فاز متحرک به‌منظور همگن‌سازی و گاز زدایی در حمام اولتراسونیک قرار گرفت و سپس به مخازن فاز متحرک دستگاه منتقل شد. کلیه آزمایش‌ها در دمای اتاق و با سرعت جریان فاز متحرک ۱/۰ میلی‌لیتر بر دقیقه انجام گرفت. همچنین قبل از تزریق نمونه به داخل ستون، اجازه داده شد تا فاز متحرک برای مدت زمان حدود یک ساعت با سرعت جریان ۱/۰ میلی‌لیتر بر دقیقه از داخل ستون عبور کرده تا ستون به حالت تعادل برسد.

۳-۴-۳- کروماتوگرام مخلوط گونه‌ها

در ابتدا لازم است تا زمان بازداری و برهم‌کنش هر کدام از ترکیبات با فاز ساکن مشخص شود. برای این منظور، محلول استاندارد ۱۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر داروهای تیکلوپیدین و لوزارتان به صورت مستقیم به دستگاه HPLC تزریق گردید. با توجه به کروماتوگرام حاصل (شکل ۳-۲)، زمان بازداری برای تیکلوپیدین و لوزارتان به ترتیب ۲/۳ و ۳/۹ دقیقه بدست آمد.



شکل ۳-۲: کروماتوگرام حاصل از محلول استاندارد ۱۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر تیکلوپیدین و لوزارتان

شرایط آزمایش: ترکیب بافر فسفات با pH برابر ۲/۷، استونیتریل و آب (۳۵:۴۵:۲۰٪) به عنوان فاز متحرک، سرعت

جریان فاز متحرک ۱/۰ میلی‌لیتر بر دقیقه، حجم لوپ ۵/۰ میکرولیتر

۳-۵- روش کار در بهینه‌سازی پارامترهای موثر در پیش‌تغلیظ تیکلوپیدین و لوزارتان

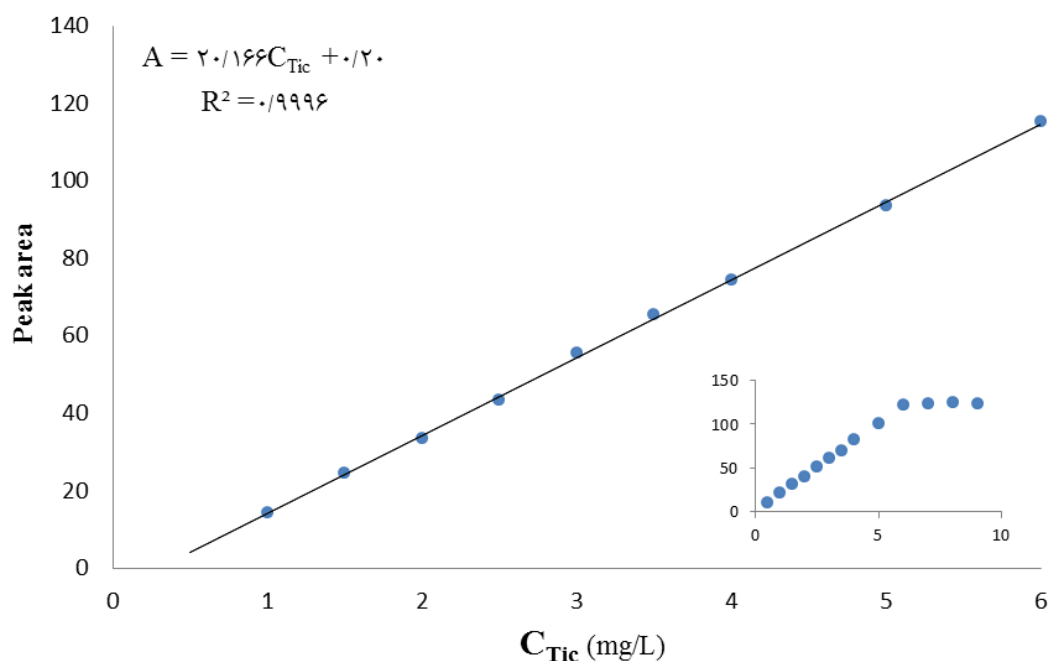
در یک لوله آزمایش ۱/۰ میلی‌لیتر از محلول ۱۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر تیکلوپیدین، ۱/۰ میلی‌لیتر از محلول ۱۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر لوزارتان و ۲/۰ میلی‌لیتر بافر با pH مورد نظر اضافه و توسط آب مقطر به حجم نهایی ۱۰/۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس به‌وسیله یک میکروپیپت، ۳۰/۰ میکرولیتر ۱-دودکانول به عنوان حلال استخراج به سطح محلول نمونه اضافه شد. در مرحله بعد به‌منظور امولسیون-سازی مخلوط، لوله آزمایش به مدت ۲ دقیقه در دستگاه ورتکس قرار گرفت. پس از اتمام عمل استخراج، لوله آزمایش به حمام یخ منتقل گردید و بعد از گذشت ۲۰ دقیقه، قطره آلی منجمد، در سطح محلول تشکیل گردید. سپس قطره آلی منجمد شده توسط اسپاتول به یک ویال منتقل شد. بدلیل اینکه حلال ۱-دودکانول در دمای اتاق نسبتاً منجمد است، قطره آلی توسط ۵/۰ میکرولیتر متانول رقیق شد و در انتها مقداری از آن با دقت به دستگاه HPLC تزریق گردید. برای محلول شاهد نیز به طور مشابه عمل شد، با این تفاوت که به جای محلول‌های تیکلوپیدین و لوزارتان، حجم‌های مساوی از آب اضافه گردید. اختلاف سیگنال محلول نمونه و شاهد به عنوان سیگنال تجزیه‌ای مورد استفاده قرار گرفت.

۳-۵-۱- روش کار برای رسم منحنی کالیبراسیون مستقیم

حجم‌های مشخصی از محلول ۱۰۰۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر تیکلوپیدین و لوزارتان توسط حلال استخراج تا حجم ۱/۰ میلی‌لیتر رقیق شد و محلول‌هایی با غلظت‌های متفاوت نسبت به تیکلوپیدین و لوزارتان بدست آمد. سپس مقداری از این محلول‌ها با دقت به دستگاه HPLC تزریق شد و سطح زیر پیک هریک از داروها در طول موج ۲۲۰ نانومتر ثبت گردید. از رسم تغییرات سیگنال هریک از داروها بر حسب تغییرات غلظت آنها، منحنی‌های کالیبراسیون بدست آمد. نتایج بدست آمده در جدول ۳-۲ و شکل ۳-۳ برای تیکلوپیدین و جدول ۳-۳ و شکل ۳-۴ برای لوزارتان آمده است.

جدول ۳-۲: سیگنال مستقیم تیکلوپیدین در غلظت‌های مختلف

سیگنال (سطح زیر پیک)	غلظت تیکلوپیدین (میلی گرم بر لیتر)
۹/۴	۰/۵
۲۱/۱	۱/۰
۳۱/۲	۱/۵
۳۹/۸	۲/۰
۵۱/۱	۲/۵
۶۰/۸	۳/۰
۶۹/۸	۳/۵
۸۱/۷	۴/۰
۱۰۰/۵	۵/۰
۱۲۱/۴	۶/۰
۱۲۳/۵	۷/۰
۱۲۴/۶	۸/۰
۱۲۲/۵	۹/۰

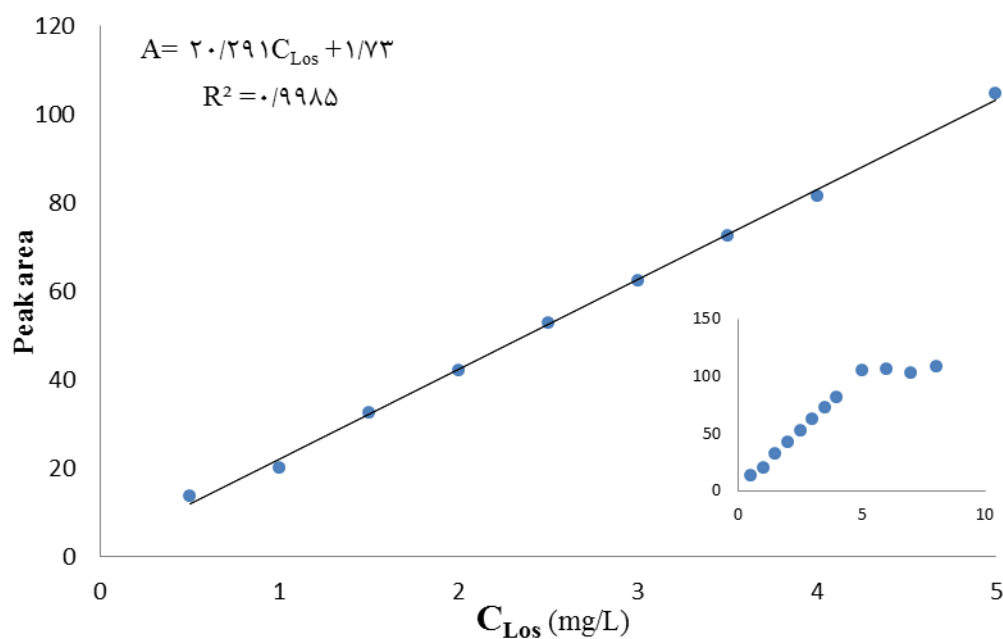


شکل ۳-۳: منحنی کالیبراسیون مستقیم تیکلوپیدین

شرایط آزمایش: غلظت‌های مختلف تیکلوپیدین در حجم ۱/۰ میلی لیتر حلال ۱-دودکانول، ترکیب بافر فسفات با pH برابر ۲/۷، استونیتریل و آب (۳۵:۴۵:۲۰) به عنوان فاز متحرک، سرعت جریان فاز متحرک ۱/۰ میلی لیتر بر دقیقه، حجم لوپ ۵/۰ میکرولیتر

جدول ۳-۳: سیگنال مستقیم لوزارتان در غلظت‌های مختلف

سیگنال (سطح زیر پیک)	غلظت لوزارتان (میلی گرم بر لیتر)
۱۳/۷	۰/۵
۲۰/۲	۱/۰
۳۲/۴	۱/۵
۴۲/۲	۲/۰
۵۲/۹	۲/۵
۶۲/۳	۳/۰
۷۲/۴	۳/۵
۸۱/۶	۴/۰
۱۰۴/۶	۵/۰
۱۰۶/۲	۶/۰
۱۰۳/۴	۷/۰
۱۰۷/۹	۸/۰



شکل ۳-۴: منحنی کالیبراسیون مستقیم لوزارتان

شرایط آزمایش: غلظت‌های مختلف لوزارتان در حجم ۱/۰ میلی لیتر حلال ۱-دودکانول، ترکیب بافر فسفات با pH برابر ۲/۷، استونیتریل و آب (۳۵:۴۵:۲۰٪) به عنوان فاز متحرک، سرعت جریان فاز متحرک ۱/۰ میلی لیتر بر دقیقه، حجم لوپ ۵/۰ میکرولیتر

۳-۵-۲- بررسی و بهینه‌سازی متغیرهای موثر در پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان

در این پروژه، به‌منظور فراهم نمودن بهترین حساسیت و در نتیجه بهترین حد تشخیص، پارامترهای مؤثر بر میکرواستخراج داروها، مورد بررسی قرار گرفتند. در بررسی فاکتورهای مؤثر، ابتدا از روش بهینه‌سازی یک متغیر در یک زمان، جهت تعیین سطوح متغیرهای مؤثر بر روش و سپس از طرح فاکتوریل کامل جهت مشخص نمودن فاکتورهای مهم در استخراج استفاده شد. پس از مشخص شدن فاکتورهای مهم، از طرح مرکب مرکزی مرکز وجوه پر (CCF) برای بهینه‌سازی فاکتورهای مؤثر بر استخراج استفاده شد. فاکتورهایی که مورد بررسی قرار گرفتند عبارتند از:

۱- pH نمونه

۲- نوع بافر

۳- حجم بافر

۴- نوع حلال استخراج

۵- حجم حلال استخراج

۶- زمان استخراج

۷- قدرت یونی (اثر نمک)

فاکتورهای ذکرشده توسط روش بهینه‌سازی یک متغیر در یک زمان مورد بررسی قرار گرفتند. با توجه به مقادیر بهینه هر فاکتور (جدول ۳-۴)، سطوح مورد نظر برای روش طراحی آزمایش تعیین گردید. قابل ذکر است که در مراحل بهینه‌سازی پارامترها به روش یک متغیر در یک زمان غلظت داروهای مورد بررسی برابر ۱/۰ میلی‌گرم بر لیتر در حجم ۱۰/۰ میلی‌لیتر بوده است (نتایج و نمودارهای حاصل از روش بهینه‌سازی یک متغیر در یک زمان در پیوست آورده شده است).

جدول ۳-۴ نتایج حاصل از بهینه‌سازی یک متغیر در یک زمان

فاکتور	محدوده مورد بررسی یا نوع فاکتور	مقدار بهینه
pH	۲/۰-۹/۰	۵/۰۰
نوع بافر	فتالاتی، سیتراتی، فسفات	فسفاتی
حجم بافر	۰/۵-۳/۵ میلی‌لیتر	۰/۵ میلی‌لیتر
نوع حلال استخراج	۱-آندکانول، ۱-دودکانول، ۱ و ۱۰-دی کلرودکان	۱-دودکانول
حجم حلال استخراج	۱۵/۰-۱۰۰/۰ میکرولیتر	۳۰/۰ میکرولیتر
زمان استخراج	۵/۰-۱/۰ دقیقه	۲/۰ دقیقه
قدرت یونی(اثر نمک)	۱-۱/۰ %/۰	۱۰/۱ %/۰

۳-۶- بررسی فاکتورهای تأثیرگذار و بهینه‌سازی عوامل مؤثر در پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری

تیکلوپیدین و لوزارتان

به‌منظور شناسایی فاکتورهای مهم در فرایند پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری آنالیت‌ها و تعیین مقادیر بهینه آنها، از تکنیک‌های مختلف طراحی آزمایش استفاده شد. به کمک طرح فاکتوریل کامل، متغیرهایی که بیشترین تأثیر را بر پاسخ دارند، تعیین و سپس با استفاده از طرح CCF، فاکتورهای مؤثر به گونه‌ای تعیین گردیدند که مقادیر پاسخ به مقدار بهینه واقعی خود نزدیکتر باشد، یعنی تغییرپذیری آنها کوچک و تأثیر فاکتورهای غیرقابل کنترل بر متغیر پاسخ، مینیمم باشد.

۳-۶-۱- ارزیابی فاکتورهای مؤثر بر فرایند با استفاده از طرح فاکتوریل کامل

با توجه به قسمت‌های قبل فاکتورهای نظیر: pH، حجم بافر، حجم حلال استخراج، زمان استخراج و قدرت یونی در میزان پاسخ آشکارساز مؤثر می‌باشند. از طرفی احتمال برهم‌کنش متغیرها

وجود دارد و در نتیجه شرایط حاصل از بهینه‌سازی تغییر یک متغیر در یک زمان نمی‌تواند شرایط بهینه واقعی باشد. بنابراین لازم است اثر فاکتورهای موثر بر فرایند به روش‌های بهینه‌سازی همزمان مورد بررسی قرار گیرد. در این پروژه از روش طراحی فاکتوریل برای بررسی برهم‌کنش‌ها و بهینه‌سازی فاکتورهای موثر بر فرایند استفاده گردید. بهینه‌سازی به روش طراحی فاکتوریل مستلزم یافتن مهمترین فاکتورهای موثر و بهینه‌سازی آنها می‌باشد. در ادامه، مراحل انجام کار در بهینه‌سازی همزمان متغیرها به روش طراحی فاکتوریل آورده شده است.

۳-۶-۱-۱- تعیین سطح فاکتورها

با توجه به تعداد فاکتورهای مورد بررسی، طرح فاکتوریل کامل برای بررسی و تشخیص فاکتورهای مهم و تاثیرگذار بر پاسخ، انتخاب گردید. برای فاکتورهای نوع حلال استخراج، نوع و حجم بافر از مقادیر بهینه حاصل از روش یک متغیر در یک زمان استفاده شد. همچنین با استفاده از نتایج حاصل از روش بهینه‌سازی یک متغیر در یک زمان، سطوح بالا و پایین هریک از فاکتورها مشخص گردید. سطوح انتخاب شده برای فاکتورها در جدول ۳-۵ آورده شده است.

جدول ۳-۵ تعیین سطح فاکتورهای موثر بر پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان

علامت	فاکتور	سطح بالا (+)	سطح پایین (-)
A	pH	۹/۰	۲/۰
B	حجم حلال استخراج (μl)	۱۰۰/۰	۱۵/۰
C	زمان استخراج (min)	۵/۰	۱/۰
D	قدرت یونی (اثر نمک) (درصد)	۰/۸۰	۰/۰۱

۳-۶-۱-۲- طراحی آزمایش در طرح فاکتوریل کامل

برای طراحی آزمایش‌ها به منظور تعیین تاثیرگذارترین فاکتورها بر پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان، از نرم‌افزار Statgraphics برای انجام طرح فاکتوریل کامل و پردازش داده‌ها استفاده شد. با توجه به مطالبی که در بخش ۲-۴-۲ ذکر شد، تعداد آزمایش‌ها در طرح فاکتوریل کامل هنگامی که ۴ فاکتور مورد بررسی باشد و دو تکرار نیز وجود داشته باشد، ۳۲ آزمایش خواهد بود. جدول ۳-۶ آزمایش‌های این طرح را نشان می‌دهد. تمامی آزمایش‌ها تحت شرایط مشخص شده در طرح فاکتوریل کامل و بصورت زیر انجام شد. نتایج حاصل نیز در جدول ۳-۶ آورده شده است.

در یک لوله آزمایش ۱/۰ میلی‌لیتر از محلول ۱۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر تیکلوپیدین، ۱/۰ میلی‌لیتر از محلول ۱۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر لوزارتان، ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفاتی با pH مورد نظر و مقدار نمک مورد نظر اضافه و توسط آب مقطر به حجم نهایی ۱۰/۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس به‌وسیله یک میکروپیپت، حجم‌های مورد نظر از حلال ۱-دودکانول به عنوان حلال استخراج به سطح محلول نمونه اضافه شد. در مرحله بعد به‌منظور امولسیون‌سازی مخلوط، لوله آزمایش در مدت زمان‌های مورد نظر در دستگاه ورتکس قرار گرفت. پس از اتمام عمل استخراج، لوله آزمایش به حمام یخ منتقل گردید و بعد از گذشت ۲۰ دقیقه، قطره آلی منجمد، در سطح محلول تشکیل گردید. سپس قطره آلی منجمد شده توسط اسپاتول به یک ویال منتقل شد. در انتها قطره آلی توسط ۵/۰ میکرولیتر متانول رقیق شد و مقداری از آن با دقت به دستگاه HPLC تزریق گردید. روش کار برای نمونه شاهد مطابق روش ذکر شده در بالا می‌باشد با این تفاوت که داروهای مورد بررسی در نمونه شاهد وجود ندارند.

جدول ۳-۶، ماتریس طرح فاکتوریل کامل و مقادیر مجموع سطح زیر پیک کروماتوگرام برای دو آنالیت را نشان می‌دهد. لازم به ذکر است در تمام آزمایش‌ها نمونه شاهد نیز اندازه‌گیری شد. سیگنال تجزیه‌ای از اختلاف بین سیگنال اندازه‌گیری شده و سیگنال شاهد بدست آمد.

جدول ۳-۶: طرح فاکتوریل کامل و نتایج بدست آمده از آن

شماره آزمایش	pH	حجم حلال استخراج (μl)	زمان استخراج (min)	قدرت یونی (درصد)	پاسخ (مجموع سطح زیر پیک)
۱	-	-	+	+	۴۴۷۵/۶۶
۲	-	+	-	+	۲۲۹۹/۷۱
۳	+	+	+	-	۱۰۰۹/۶۱
۴	-	+	+	+	۳۰۷۸/۴۷
۵	+	-	-	+	۱۴۵۵/۳۶
۶	+	+	-	+	۱۴۶۲/۹۲
۷	-	-	-	-	۳۹۶۴/۶۱
۸	+	-	+	+	۲۳۳۸/۶۱
۹	-	-	-	+	۵۱۷۱/۲۳
۱۰	-	+	-	-	۲۶۹۹/۶۹
۱۱	-	-	+	-	۴۰۲۶/۸۴
۱۲	+	-	+	-	۱۵۴۴/۶۷
۱۳	-	+	+	-	۲۷۵۵/۸۸
۱۴	+	-	-	-	۸۷۷/۵۱
۱۵	+	+	+	+	۱۳۱۳/۴
۱۶	+	+	-	-	۹۱۵/۷۶
۱۷	-	-	+	+	۲۴۶۹/۵۶
۱۸	-	+	-	+	۲۰۴۷/۰۶
۱۹	+	+	+	-	۱۳۴۲/۷۳
۲۰	-	+	+	+	۳۳۴۵/۴
۲۱	+	-	-	+	۲۴۵۷/۲۲
۲۲	+	+	-	+	۱۳۰۴/۱۲
۲۳	-	-	-	-	۳۴۴۴/۱۹
۲۴	+	-	+	+	۲۳۹۰/۱
۲۵	-	-	-	+	۳۷۵۰/۵
۲۶	-	+	-	-	۲۹۲۴/۲۸
۲۷	-	-	+	-	۴۰۰۲/۸۴
۲۸	+	-	+	-	۵۵۵/۷۲
۲۹	-	+	+	-	۳۹۲۹/۹۷
۳۰	+	-	-	-	۱۳۵۶/۵۸
۳۱	+	+	+	+	۱۹۱۹/۳۹
۳۲	+	+	-	-	۱۰۹۳/۶۵

۳-۱-۶-۳- تعیین فاکتورهای موثر به وسیله DOE

در ادامه نتایج بدست آمده توسط نرم افزار Statgraphics، مورد تحلیل قرار گرفته و فاکتورهای موثر به ترتیب اهمیت مشخص می شوند. نتایج حاصل در جدول ۷-۳ نشان داده شده است.

جدول ۷-۳: جدول ضرایب حاصل از طرح فاکتوریل کامل

فاکتور	اثر $\hat{E}_X$	ضریب	خطای استاندارد ضریب $\hat{SE}_C$	ارزش t	ارزش P ^۱
pH	-۱۹۴۰/۵۳	-۹۷۰/۲۶	۲۰۸/۷۰	-۴/۶۵	۰/۰۰۰۰
حجم حلال استخراج	-۶۷۷/۴۵	-۳۳۸/۷۲	۲۰۸/۷۰	-۱/۶۲	۰/۰۰۴۰
زمان استخراج	-۲۰۴/۶۵	-۱۰۲/۳۲	۲۰۸/۷۰	-۰/۴۹	۰/۳۳۸۵
قدرت یونی	۳۰۲/۱۴	۱۵۱/۰۷	۲۰۸/۷۰	۰/۷۲	۰/۱۶۳۲

۳-۱-۶-۳- تفسیر نتایج حاصل از طرح فاکتوریل کامل

اثر: مقدار مثبت هر اثر نشان دهنده آن است که با افزایش سطح یک متغیر از پایین به بالا مقدار پاسخ افزایش یافته و مقدار منفی یک اثر نشان دهنده آن است که با افزایش سطح یک متغیر از پایین به بالا مقدار پاسخ کاهش می یابد. مقدار اثر هر متغیر طبق معادله ۱-۳ بدست می آید.

$$E_X = \frac{[\sum(y^+) - \sum(y^-)]}{N/2} \quad (۱-۳)$$

در این رابطه، N تعداد کل آزمایش ها، y^+ پاسخ هایی که در آن متغیر مورد بررسی در سطح بالا و y^- پاسخ هایی که در آن متغیر مورد بررسی در سطح پایین خود قرار دارد، می باشند. با توجه به جدول ۷-۳، فاکتور pH دارای بیشترین اثر بر پاسخ می باشد و علامت منفی آن بیانگر این است که با کاهش pH، مقدار پاسخ افزایش می یابد. بعد از pH، فاکتور حجم حلال استخراج بیشترین اثر را بر پاسخ می گذارد. با توجه به علامت منفی آن، با کاهش حجم حلال استخراج مقدار پاسخ افزایش می -

^۱ P value

^۲ Standard error of Coefficient

^۳ Effect

یابد. فاکتورهای زمان استخراج و قدرت یونی کمترین اثر را بر پاسخ می‌گذارد.

ضریب: تغییر در میانگین پاسخ، به ازاء هر واحد افزایش در X ، وقتی که سایر فاکتورها ثابت نگه داشته شوند را برآورد می‌کند. با توجه به ضرایب نشان داده شده در جدول ۳-۷، هرچه مقدار ضریب بیشتر باشد، تاثیر آن اثر بر روی پاسخ بیشتر است، با توجه به ضرایب نشان داده شده، pH بالاترین ضریب را دارد، بنابراین تاثیر آن بر روی پاسخ بیشتر می‌باشد. بعد از pH، فاکتور حجم حلال استخراج بیشترین ضریب و در نتیجه بیشترین تاثیر بر پاسخ را دارد. فاکتورهای زمان استخراج و قدرت یونی دارای کمترین ضریب می‌باشند. مقدار ضریب برای هر متغیر از تقسیم اثر آن بر دو بدست می‌آید (معادله ۳-۲).

$$\text{ضریب} = \frac{E_X}{2} \quad (3-2)$$

خطای استاندارد ضریب: برای هر اثر یک انحراف استاندارد گزارش شده است که نشان‌دهنده اندازه خطای تصادفی می‌باشد که روی اثر تاثیر می‌گذارد. مقدار خطای استاندارد ضریب مثبت بوده و همچنین مقدار کوچکتر آن نشان‌دهنده برآورد دقیق‌تر است.

آماره t : برای بررسی معنی دار بودن یک متغیر به کار می‌رود، به این صورت که هرچه مقدار قدر مطلق t مربوط به یک متغیر بزرگ‌تر باشد، با احتمال زیاد آن متغیر معنی‌دار است. مقدار t گزارش شده در جدول نشان می‌دهد که ضریب در برابر خطای استاندارد چقدر بزرگ است. مفهوم آن چیزی شبیه به نسبت سیگنال به نویز می‌باشد. مقدار t از تقسیم کردن هر ضریب بر ضریب خطای استاندارد بدست می‌آید (معادله ۳-۳). با توجه به مقادیر t ارائه شده در جدول ۳-۷، pH و حجم حلال استخراج دارای مقدار t بزرگتری نسبت به دو فاکتور دیگر هستند، بنابراین تاثیر این دو پارامتر روی پاسخ بیشتر می‌باشد.

$$t = \frac{\text{ضریب}}{(SE)_C} \quad (3-3)$$

ارزش P: برای تعیین اهمیت فاکتورها، $P < 0.05$ به عنوان نقطه حد در نظر گرفته شد. در نتیجه فاکتورهای با مقدار P کمتر از 0.05 به عنوان فاکتورهای موثر بر پاسخ و فاکتورهای با مقدار P بیشتر از 0.05 به عنوان فاکتورهای غیرموثر بر پاسخ می‌باشند. با توجه به مقدار P، فاکتورهایی که اثر معنی‌دار بر پاسخ دارند، در جدول ۳-۸ مشخص شدند.

جدول ۳-۸ میزان اهمیت فاکتورهای دارای اثر معنی‌دار بر استخراج با توجه به مقدار P

فاکتور	مقدار P	اثر فاکتور
pH	0.0000	موثر
حجم حلال استخراج	0.0040	موثر
زمان استخراج	0.3385	غیر موثر
قدرت یونی	0.1632	غیر موثر

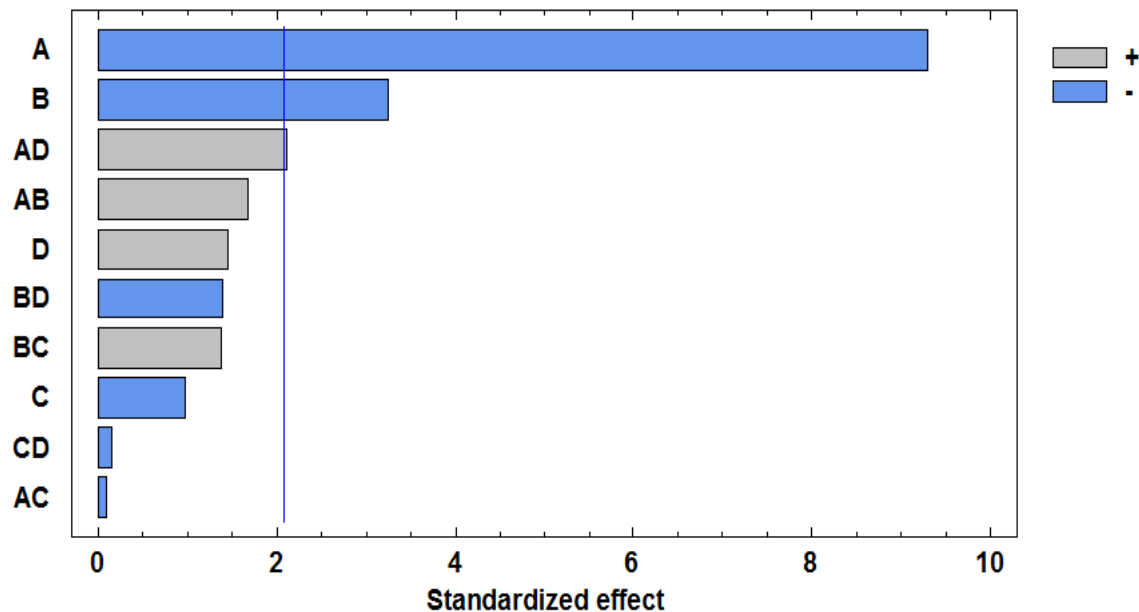
یکی مزایای نرم‌افزارهای DOE، ارائه نمودارهایی است که می‌توانند در تعیین فاکتورهای اصلی مفید باشند. از جمله این نمودارها می‌توان به نمودار پرتو^۱ اشاره کرد.

نمودار پرتو: این نمودار با استفاده از T-test، اختلاف معنادار اثرات با مقدار صفر را تعیین می‌کند. T بحرانی در این نمودار به صورت یک خط مبنا وجود دارد که مقدار عددی آن به تعداد درجات آزادی مرتبط با $(SE)_C$ ، و معمولاً در سطح اطمینان $\alpha = 0.05$ از جدول t محاسبه می‌شود. براساس این نمودار فاکتورهایی که مقدار t آنها سمت راست خط مبنا قرار دارد، دارای اثر معنا داری بر روی پاسخ هستند یا به عبارت دیگر جزء فاکتورهای مهم و موثر بر پاسخ می‌باشند. همچنین فاکتورهایی که مقدار t آنها سمت چپ خط مبنا قرار دارد، فاکتورهای غیر موثر هستند.

علامت + و - نشان داده شده در این نمودار، مقدار بهینه فاکتورهای غیر موثر را به صورت سطح بالا یا

¹ Pareto

پایین برای استفاده در آزمایش‌های مراحل بعد مشخص می‌کند. بنابراین با توجه به نمودار پرتو حاصل، فاکتورهای pH و حجم حلال استخراج به عنوان فاکتورهای موثر بر پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان انتخاب شدند. همچنین سطح پایین زمان استخراج و سطح بالای قدرت یونی، به عنوان مقادیر بهینه فاکتورهای غیر موثر انتخاب شدند (شکل ۳-۵).



شکل ۳-۵: نمودار پرتو حاصل از طرح فاکتوریل کامل

۳-۶-۲- بهینه سازی فاکتورهای موثر بر پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان

بر اساس نتایج حاصل از مرحله غربالگری، فاکتورهای pH و حجم حلال استخراج به عنوان فاکتورهای مهم و موثر بر پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان انتخاب شدند. در ادامه توسط طرح مرکب مرکزی مرکز وجوه پر (CCF)، مقادیر بهینه این فاکتورهای مهم تعیین می‌شوند. در طرح CCF هر فاکتور در سه سطح بالا، میانی و پایین مورد بررسی قرار می‌گیرد. این سطوح با توجه به نتایج حاصل از بهینه‌سازی تغییر یک متغیر در یک زمان، تعیین شد (جدول ۳-۹).

جدول ۳-۹ سطح فاکتورهای موثر در طرح CCF

فاکتور	سطح پایین (-)	سطح میانی (۰)	سطح بالا (+)
pH	۲/۰	۵/۵۰	۹/۰
حجم حلال استخراج (V_{org})	۱۵/۰	۵۷/۵۰	۱۰۰/۰

در تمام آزمایش‌های انجام شده در طرح CCF، فاکتورهای غیر مهم ثابت در نظر گرفته شدند. مقادیر این فاکتورها با توجه به ضرایب آن‌ها در طرح فاکتوریل کامل که در جدول ۳-۷ نشان داده شد، انتخاب شدند. برای متغیرهایی که دارای ضریب مثبت بودند از سطح بالای آن‌ها و برای متغیر-هایی که دارای ضریب منفی بودند از سطح پایین آن‌ها در انجام آزمایش‌های طراحی شده استفاده شد. همچنین برای فاکتورهای نوع حلال استخراج، نوع و حجم بافر از مقادیر بهینه حاصل از روش یک متغیر در یک زمان استفاده شد.

۳-۶-۲-۱- اجرای طرح مرکب مرکزی مرکز وجوه پر

برای طراحی آزمایش‌ها و نیز بررسی برهم‌کنش بین فاکتورهای مهم و همچنین برای تعیین مقدار بهینه این فاکتورها از نرم‌افزار Statgraphics برای ایجاد آزمایش‌های طرح مرکب مرکزی مرکز وجوه پر استفاده شد. براساس رابطه ۲-۱۱، تعداد آزمایش‌ها هنگامی که ۲ فاکتور با دو تکرار و ۳ نقطه مرکزی وجود دارد، برابر با ۲۲ آزمایش می‌باشد.

به‌منظور انجام طرح CCF، در یک لوله آزمایش ۱/۰ میلی‌لیتر از محلول ۱۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر تیکلوپیدین، ۱/۰ میلی‌لیتر از محلول ۱۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر لوزارتان، ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفاتی با pH مورد نظر و ۰/۰۸ گرم نمک سدیم کلرید افزوده شد و توسط آب مقطر به حجم نهایی ۱۰/۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس به‌وسیله یک میکروپیپت، حجم‌های مورد نظر از حلال ۱-دودکانول به سطح محلول نمونه اضافه شد. در مرحله بعد به‌منظور امولسیون‌سازی مخلوط، لوله آزمایش به مدت

۱/۰ دقیقه در دستگاه ورتکس قرار گرفت. پس از اتمام عمل استخراج، لوله آزمایش به حمام یخ منتقل گردید و بعد از گذشت ۲۰ دقیقه، قطره آلی منجمد، در سطح محلول تشکیل گردید. سپس قطره آلی منجمد شده توسط اسپاتول به یک ویال منتقل شد. در انتها قطره آلی توسط ۵/۰ میکرولیتر متانول رقیق شد و مقداری از آن با دقت به دستگاه HPLC تزریق گردید. جدول ۳-۱۰، ماتریس طرح مرکب مرکزی مرکز وجوه پیر (CCF) و مقادیر سطح زیر پیک کروماتوگرام برای دو آنالیت را نشان می‌دهد.

جدول ۳-۱۰: ماتریس طرح CCF با ۲ فاکتور، ۳ نقطه مرکزی و ۲ تکرار

شماره آزمایش	pH	حجم حلال استخراج (μl)	پاسخ (تیکلوپیدین) (mAU)	پاسخ (لوزارتان) (mAU)
۱	۰	۰	۱۴۲۳/۶	۵۷۰/۶
۲	۰	-	۱۸۱۴/۳	۶۴۲/۶
۳	+	۰	۱۷۴۵/۳	۵۱/۰
۴	+	+	۱۱۵۶/۸	۲۷/۴
۵	۰	+	۸۸۶/۹	۵۸۷/۷
۶	+	-	۲۶۴۵/۵	۶۴/۵
۷	-	+	۲۳/۶	۱۲۷۱/۰
۸	-	-	۲۹/۲	۱۵۰۴/۶
۹	۰	۰	۱۵۷۲/۲	۵۴۸/۸
۱۰	-	۰	۳۱/۰	۱۲۰۱/۳
۱۱	۰	۰	۱۵۶۹/۷	۵۶۹/۰
۱۲	۰	۰	۱۵۶۱/۱	۵۴۱/۷
۱۳	۰	-	۱۹۵۰/۹	۶۵۰/۱
۱۴	+	۰	۱۷۴۹/۳	۴۱/۰
۱۵	+	+	۱۰۵۲/۸	۲۶/۵
۱۶	۰	+	۹۸۶/۶	۵۵۳/۷
۱۷	+	-	۲۷۲۵/۰	۷۱/۲
۱۸	-	+	۲۶/۵	۱۲۰۷/۷
۱۹	-	-	۲۸/۴	۱۵۳۱/۲
۲۰	۰	۰	۱۴۹۱/۹	۵۱۳/۶
۲۱	-	۰	۲۴/۳	۱۲۱۰/۴
۲۲	۰	۰	۱۵۷۶/۷	۵۷۰/۸

نتایج تجربی حاصل از انجام آزمایش‌های طراحی شده، به وسیله روش ANOVA مورد تجزیه و بررسی قرار گرفتند. به منظور بدست آوردن مدل تجربی برای پیش‌بینی پاسخ، رابطه‌های خطی و درجه دوم و برهم‌کنش‌ها و داده‌های بدست‌آمده از آزمایش‌ها پردازش شده و ضرایب رگرسیونی مربوط به پاسخ تیکلوپیدین و لوزارتان به ترتیب در جداول ۱۱-۳ و ۱۲-۳، نشان داده شده است.

جدول ۱۱-۳: پارامترهای آماری برای طرح CCF انجام شده برای پاسخ پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین

ارزش P	ارزش t	خطای استاندارد ضریب	ضریب	عبارت
۰/۰۰۰	۴۶/۳۸	۳۲/۱۵	۱۴۹۱/۱۹	Constant
۰/۰۰۰	۳۵/۵۴	۲۵/۵۹	۹۰۹/۳۱	*A
۰/۰۰۰	-۱۶/۴۸	۲۵/۵۹	-۴۲۱/۶۸	**B
۰/۰۰۰	-۱۳/۷۶	۳۹/۳۸	-۵۴۱/۷۱	AA
۰/۰۰۰	-۱۲/۵۸	۳۱/۳۴	-۳۹۴/۱۸	AB
۰/۶۲۷	-۰/۴۹	۳۹/۳۸	-۱۹/۵۱	BB
*A= pH **B= V _{org}				

با استفاده از ضرایب داده شده در جدول ۱۱-۳ ساده‌ترین مدل برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین به صورت زیر پیشنهاد می‌شود.

$$\text{Response} = 1491.19 + 909.31A - 421.68B - 541.71A^2 - 19.51B^2 - 394.18AB \quad (4-3)$$

$$R^2 = 99.22\% \quad R^2_{\text{adj}} = 98.90\%$$

جدول ۱۲-۳: پارامترهای آماری برای طرح CCF انجام شده برای پاسخ پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری لوزارتان

ارزش P	ارزش t	خطای استاندارد ضریب	ضریب	عبارت
۰/۰۰۰	۳۲/۶۰	۱۶/۷۶	۵۴۶/۴۳	Constant
۰/۰۰۰	-۴۷/۸۹	۱۳/۳۴	-۶۳۸/۷۰	*A
۰/۰۰۰	-۵/۰۶	۱۳/۳۴	-۶۷/۵۰	**B
۰/۰۰۱	۴/۳۱	۲۰/۵۳	۸۸/۴۹	AA
۰/۰۰۳	۳/۴۸	۱۶/۳۳	۵۶/۸۹	AB
۰/۰۰۳	۳/۴۶	۲۰/۵۳	۷۱/۰۸	BB

با استفاده از ضرایب داده شده در جدول ۳-۱۲ ساده‌ترین مدل برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری لوزارتان به صورت زیر پیشنهاد می‌شود.

$$\text{Response} = 546/43 - 638/70 \cdot A - 67/50 \cdot B + 88/49 A^2 + 71/0.8 B^2 + 56/89 AB \quad (5-3)$$

$$R^2 = 99/37\% \quad R^2_{\text{adj}} = 99/12\%$$

ضریب تعیین (آماره R^2): این آماره به عنوان یک شاخص برای بیان دقت خط رگرسیون برآورد شده به کار می‌رود و نشان‌دهنده نسبت تغییرات متغیر وابسته توسط متغیر مستقل است. هرچه مقدار R^2 به یک یا درصد R^2 به صد نزدیک‌تر باشد، مدل مناسب‌تر است و بهتر می‌تواند پاسخ را پیش‌بینی کند. مقدار R^2 در این روش نشان می‌دهد که به ترتیب ۹۹/۲۲٪ و ۹۹/۳۷٪ تغییرات در پاسخ تیکلوپیدین و لوزارتان می‌تواند توسط مدل توضیح داده شود و نیز مشخص می‌شود که بین نتایج تجربی و پیش‌بینی شده توافق خوبی وجود دارد. ضریب تعیین طبق رابطه ریاضی زیر محاسبه می‌شود:

$$R^2 = \frac{SSR}{SST} = 1 - \frac{SSE}{SST} \quad (6-3)$$

در رابطه فوق SSR ^۱، SST ^۲ و SSE ^۳ به ترتیب بیانگر مجموع مربعات انحراف مقادیر پیش‌بینی شده متغیر وابسته از میانگین مقادیر آن، مجموع مربعات انحراف مقادیر واقعی متغیر وابسته از میانگین مقادیر آن و مجموع مربعات انحراف مقادیر واقعی متغیر وابسته از مقادیر پیش‌بینی شده برای آن می‌باشند و طبق روابط زیر محاسبه می‌شوند:

$$SSR = \sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2 \quad (7-3)$$

^۱ - Sum of Square Regression

^۲ - Sum of Square Total

^۳ - Sum of Square Error

$$SST = \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2 \quad (۸-۳)$$

$$SSE = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad (۹-۳)$$

در روابط فوق، y_i مقادیر واقعی، $\bar{y}$ میانگین مقادیر و $\hat{y}_i$ مقادیر پیش بینی شده متغیر وابسته است. با توجه به روابط فوق می توان نوشت:

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \quad (۱۰-۳)$$

طبق رابطه ۹-۳، اگر تمام مشاهدات بر روی خط برازش شده قرار گرفته باشند، یعنی به ازای تمام نقاط $y_i = \hat{y}_i$ باشد، مقدار R^2 برابر یک می شود و هرگونه انحرافی از این حالت باعث می شود که مقدار R^2 از یک کوچکتر شود. مقدار ضریب تعیین (R^2)، برای پاسخ اندازه گیری تیکلوپیدین و لوزارتان به ترتیب ۹۹/۲۲ و ۹۹/۳۷ درصد می باشد که نشان می دهد ۹۹/۲۲ و ۹۹/۳۷ درصد، تغییرات در متغیر وابسته می تواند توسط متغیر مستقل توضیح داده شود.

میزان ضریب تعیین تعدیل شده (R^2_{adj})^۱ برای مدل ارائه شده، به ترتیب برای تیکلوپیدین و لوزارتان ۹۸/۹۰٪ و ۹۹/۱۲٪ بدست آمده است. از آنجایی که در ضریب تعیین تعداد پارامترهای مدل در نظر گرفته نمی شود از ضریب تعیین تعدیل شده استفاده می شود. ضریب تعیین تعدیل شده سعی دارد مربع R را تصحیح نماید تا بیشترین میزان انطباق مدل را در جمعیت انعکاس دهد. به همین منظور ضریب تعیین تعدیل شده طبق رابطه زیر برای انتخاب مدل برتر محاسبه می گردد:

$$R^2_{adj} = 1 - \frac{n-1}{n-p-1} \cdot \frac{SSE}{SST} = 1 - (1 - R^2) \frac{n-1}{n-p-1} \quad (۱۱-۳)$$

^۱ - Adjusted Determination Coefficient

در رابطه فوق n تعداد متغیرهای مستقل و p تعداد آزمایش‌ها می‌باشد. همان‌طور که در این رابطه ملاحظه می‌شود مقدار عددی مفهوم R^2_{adj} از مقدار R^2 کمتر است و عموماً در یک مدل معتبر و مناسب این دو مفهوم باید از نظر عددی به هم نزدیک باشند.

۳-۶-۲-۲- ارزیابی مدل

برای اطمینان از اینکه مدل بدست آمده مدل مناسبی است، باید مدل را ارزیابی کرد. در ارزیابی مدل فرضیات زیر باید محقق شود.

- ✓ پاسخ حاصل به خوبی با مدل توضیح داده شود
- ✓ داده پرت وجود نداشته باشد
- ✓ توزیع باقیمانده‌ها نرمال باشد
- ✓ واریانس همگون باشد
- ✓ تغییرات خطاها مستقل باشد

برای ارزیابی مدل بدست آمده از روش تحلیل واریانس و بررسی باقیمانده‌ها استفاده شد.

۳-۶-۲-۲-۱- تحلیل واریانس (ANOVA)

مدل ریاضی برای پاسخ مربوط به پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان به‌ترتیب طبق معادلات ۳-۴ و ۳-۵ پیشنهاد شده است. برای بررسی صحت مدل‌های ارائه شده، تحلیل واریانس انجام شد که نتایج آن در جداول ۳-۱۳ و ۳-۱۴ نشان داده شده است.

جدول ۳-۱۳: تحلیل واریانس برای مدل پیشنهادی مربوط به پیش تغلیظ و اندازه گیری تیکلوپیدین

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	۵	۱۴۹۳۲۲۸۰	۲۹۸۶۴۵۶	۳۸۰/۱۲	۰/۰۰۰
Linear	۲	۱۲۰۵۵۸۱۷	۶۰۲۷۹۰۹	۷۶۷/۲۴	۰/۰۰۰
Square	۲	۱۶۳۳۴۷۱	۸۱۶۷۳۵	۱۰۳/۹۶	۰/۰۰۰
Interaction	۱	۱۲۴۲۹۹۱	۱۲۴۲۹۹۱	۱۵۸/۲۱	۰/۰۰۰
Residual Error	۱۵	۱۱۷۸۴۹	۷۸۵۷	-	-
Lack-of-Fit	۱۱	۹۹۲۹۶	۹۰۲۷	۱/۹۵	۰/۲۷۳
Pure Error	۴	۱۸۵۵۲	۴۶۳۸	-	-
Total	۲۱	-	-	-	-

جدول ۳-۱۴: تحلیل واریانس برای مدل پیشنهادی مربوط به پیش تغلیظ و اندازه گیری لوزارتان

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	۵	۵۰۶۴۳۸۲	۱۰۱۲۸۷۶	۴۷۴/۴۸	۰/۰۰۰
Linear	۲	۴۹۴۹۹۲۷	۲۴۷۴۹۶۴	۱۱۵۹/۳۹	۰/۰۰۰
Square	۲	۸۸۵۶۵	۴۴۲۸۳	۲۰/۷۴	۰/۰۰۰
Interaction	۱	۲۵۸۹۰	۲۵۸۹۰	۱۲/۱۳	۰/۰۰۳
Residual Error	۱۵	۳۲۰۲۱	۲۱۳۵	-	-
Lack-of-Fit	۱۱	۳۰۰۸۹	۲۷۳۵	۵/۶۷	۰/۰۵۴
Pure Error	۴	۱۹۳۱	۴۸۳	-	-
Total	۲۱	-	-	-	-

یک مدل زمانی عدم برازش^۱ نشان می‌دهد که نتواند به صورت مناسب رابطه بین فاکتورها و متغیر پاسخ را نشان دهد. برای اینکه بتوان تعیین کرد مدل به صورت صحیح می‌تواند داده‌ها را برازش کند، باید به مقدار P توجه کرد. اگر مقدار P کمتر از ۰/۰۵ باشد می‌توان نتیجه گرفت مدل به خوبی داده‌ها را برازش نمی‌کند. با توجه به نتایج حاصل شده، مقدار P بدست آمده مربوط به عدم برازش

^۱ Lack-of-fit

مدل‌های پیشنهادی مربوط به پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان بیشتر از ۰/۰۵ می‌باشد که نشان می‌دهد بین مدل‌ها و داده‌های تجربی تطابق خوبی وجود دارد.

آماره F: آزمون F یا آزمون فیشر در واقع آزمون معنی‌دار بودن آماری در تحلیل رگرسیون ساده و چند متغیره است و برابر با نسبت میانگین مربعات رگرسیون (MSR) به میانگین مربعات باقیمانده‌ها (MSE) است و بیان ریاضی آن به صورت زیر می‌باشد:

$$F = \frac{MSR}{MSE} = \frac{SSR/df_m}{SSE/df_{res}} \quad (۱۲-۳)$$

$$df_m = p, \quad df_{res} = n - p - 1$$

دراین رابطه df_m درجه آزادی مدل، p تعداد متغیرهای مستقل مدل، n تعداد کل ترکیبات مربوط به مدل (تعداد کل آزمایش‌ها) و df_{res} درجه آزادی باقیمانده‌ها است. هرچه مقدار میانگین مربع فاکتور به باقی‌مانده بیشتر باشد، مقدار F بیشتر است. با توجه به جداول ۱۳-۳ و ۱۴-۳، مقدار آماره F برای اثرات خطی بیشترین مقدار بوده و تاثیر بیشتری روی فاکتورها دارد. مقدار Adj MS، از تقسیم SS بر درجه آزادی بدست می‌آید که در محاسبه آماره F بکار می‌رود. همچنین خطای خالص^۱، برای یک سری داده‌های تکراری بکار می‌رود، که مقدار کوچکتر آن نشان‌دهنده برآورد دقیق‌تر است.

۳-۶-۲-۲-۲- بررسی باقیمانده‌ها

باقیمانده‌ها به صورت زیر تعریف شده‌اند:

$$e_i = y_i - \hat{y}_i, \quad i = 1, 2, \dots, n \quad (۱۳-۳)$$

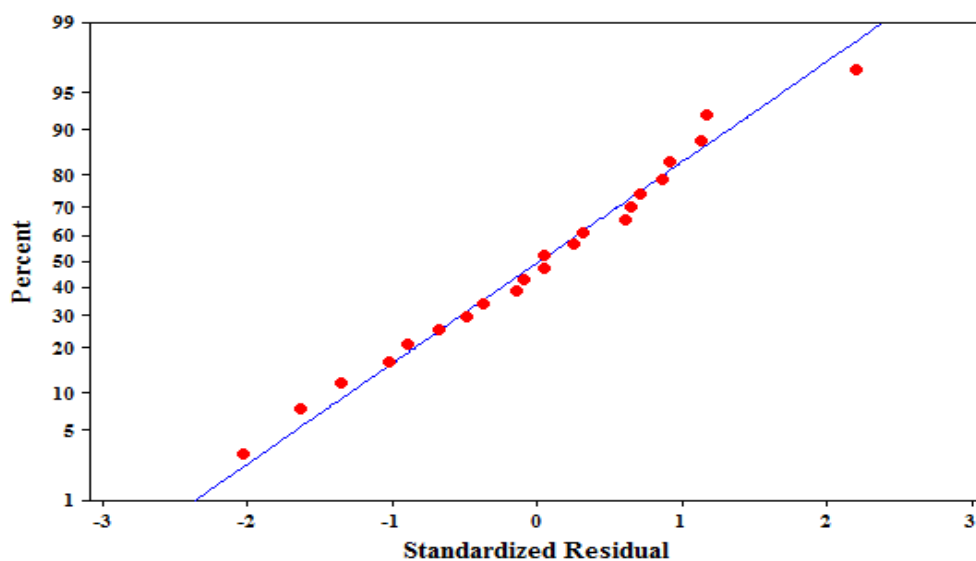
که در آن y_i مقدار مشاهده شده و $\hat{y}_i$ مقدار برازش شده متناظر آن است. چون تلقی از باقیمانده به صورت انحراف بین مقدار مشاهده شده و مقدار برازش شده می‌باشد، لذا یک معیار یا

¹ Pure Error

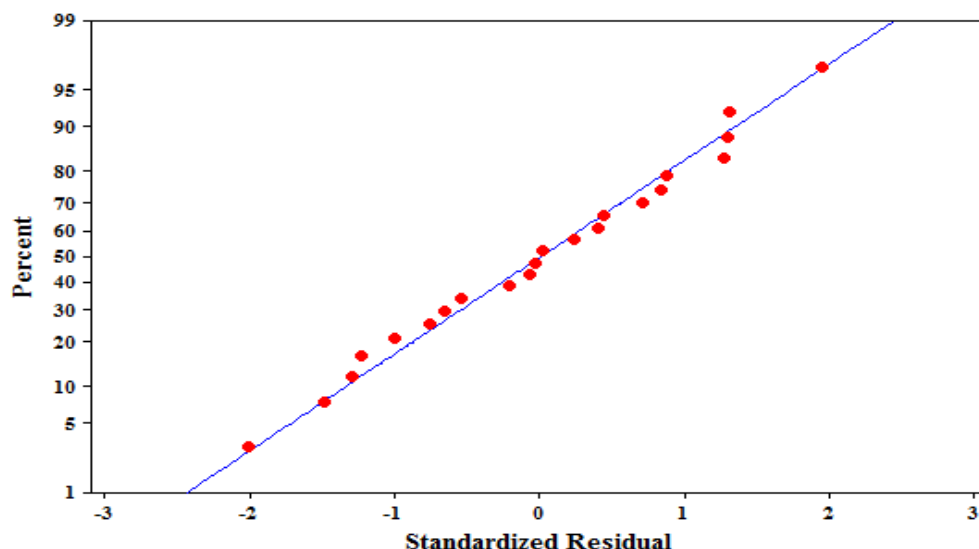
اندازه از تغییراتی است که به وسیله مدل رگرسیون توضیح داده نشده است. همچنین می‌توان باقیمانده‌ها را مقادیر شناخته شده‌ی خطا دانست، بنابراین هر انحراف از مفروضات در مورد خطاها بایستی در باقیمانده‌ها نمایان شود. در واقع نقض مفروضات اولیه و کفایت مدل را می‌توان به راحتی از طریق بررسی باقیمانده‌ها انجام داد. در ادامه چند نمودار باقیمانده ارائه خواهند شد که برای تعیین عدم کفایت مدل کاربرد دارند.

۳-۶-۲-۲-۳- نمودار احتمال نرمال

رسم نمودار احتمال نرمال برای باقیمانده‌ها، روش مفیدی برای فرض نرمال بودن مشاهدات محسوب می‌شود. اگر توزیع باقیمانده‌ها نرمال باشد، آنگاه نقاط باید روی یک خط راست قرار گیرند. انحرافات اساسی از خط مستقیم اشاره بر این دارد که توزیع نرمال نیست. نمودار احتمال و آزمون‌های برازش را می‌توان برای تعیین نرمال بودن باقیمانده‌ها بکار برد، در صورتی که مقدار احتمال از سطح α مورد نظر کمتر باشد، داده‌ها از توزیع نرمال پیروی نمی‌کنند. نمودار احتمال نرمال برای پاسخ پیش-تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان به ترتیب در شکل‌های (۳-۶) و (۳-۷) نشان می‌دهند که توزیع خطاها تقریباً نرمال است.



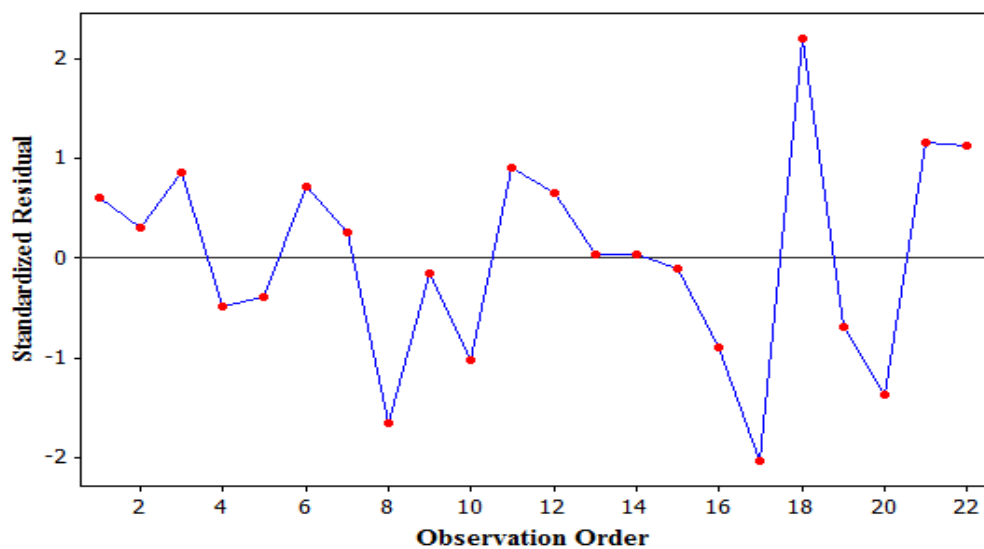
شکل ۳-۶: نمودار احتمال نرمال برای پاسخ پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین



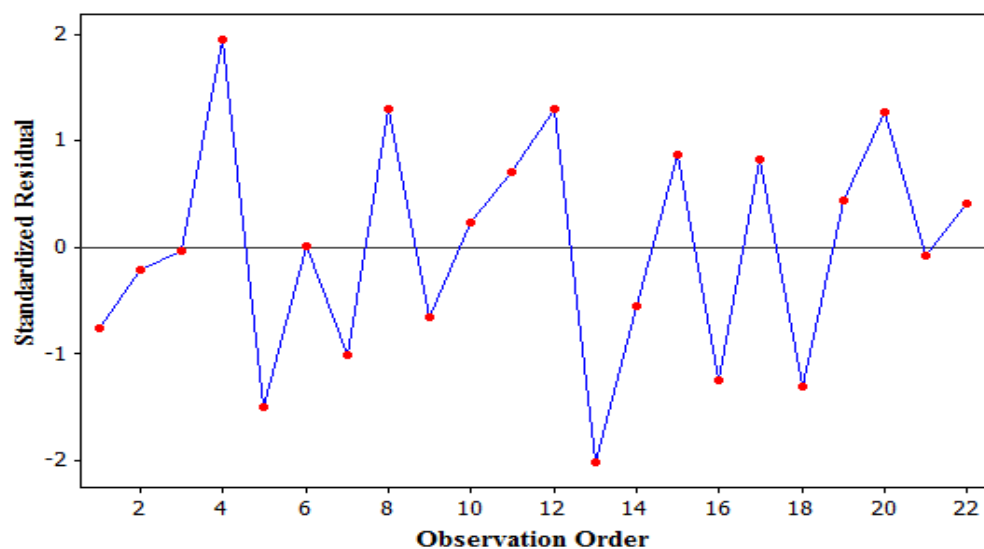
شکل ۳-۷: نمودار احتمال نرمال برای پاسخ پیش تغلیظ و اندازه‌گیری لوزارتان

۳-۶-۲-۲-۴- نمودار باقیمانده‌ها بر حسب زمان

رسم داده‌ها بر حسب ترتیب زمانی آن‌ها می‌تواند در شناسایی همبستگی بین باقیمانده‌ها مفید واقع شود. وجود گرایش‌های مثبت و منفی بیانگر همبستگی مثبت بین باقیمانده‌ها و به معنای نقض فرض استقلال خطاها می‌باشد. این مسئله یک مشکل بالقوه جدی محسوب شده و برطرف کردن آن معمولاً کار ساده‌ای نیست. بنابراین باید سعی شود تا در زمان جمع‌آوری داده از بروز چنین مشکلی پیشگیری به عمل آید. تصادفی سازی مناسب انجام آزمایش‌ها می‌تواند گام مهمی جهت دستیابی به استقلال مشاهدات باشد. در برخی مواقع مهارت آزمایشگر ممکن است با پیشرفت آزمایش تغییر کند و یا فرایند مورد مطالعه ممکن است قادر به حفظ شرایط خاصی نباشد و یا به عبارت دیگر غیر قابل پیش‌بینی باشد. وجود چنین شرایطی باعث می‌شود تا واریانس خطا با زمان تغییر کند. در چنین شرایطی، نمودار باقیمانده‌ها بر حسب زمان، تغییرات زیادی را در یک طرف نمودار در مقایسه با طرف دیگر از خود نشان می‌دهد. اگر باقیمانده‌ها به صورت تصادفی اطراف محور باقیمانده صفر پراکنده شده باشند و نمودار طرح خاصی نداشته باشد مبین فرض وجود استقلال خطاست. نمودارهای باقیمانده‌ها بر حسب زمان مربوط به پیش تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان در شکل‌های (۳-۸) و (۳-۹) ارائه شده است، که نشان دهنده استقلال میان خطاهاست.



شکل ۳-۸: نمودار باقیمانده‌ها بر حسب زمان برای پاسخ پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین



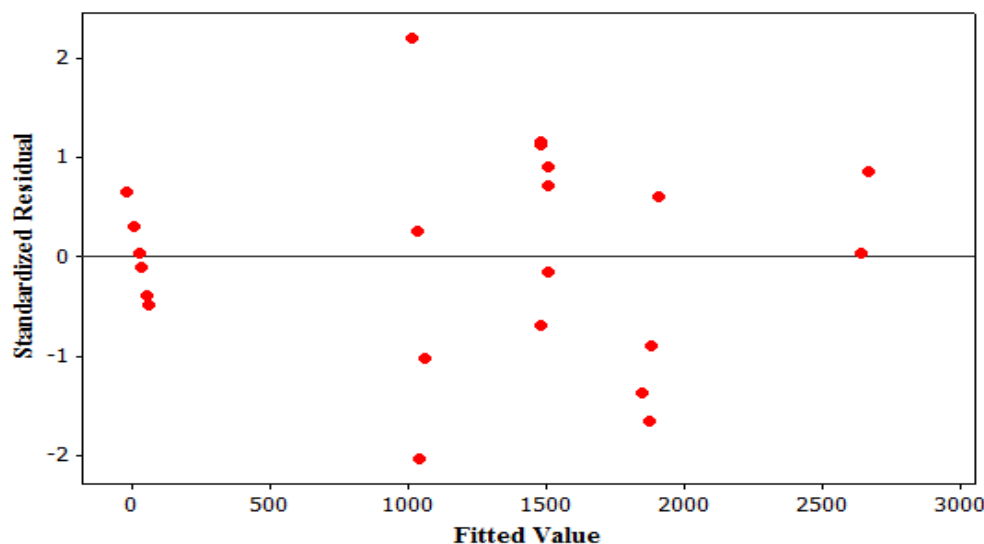
شکل ۳-۹: نمودار باقیمانده‌ها بر حسب زمان برای پاسخ پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری لوزارتان

۳-۶-۲-۵- نمودار باقیمانده‌ها در مقابل مقادیر برازش شده

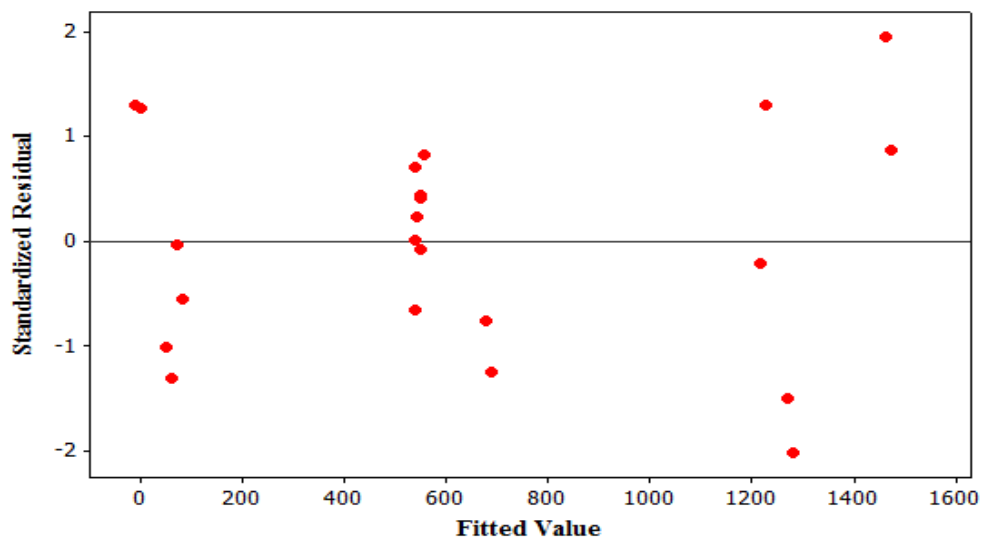
با رسم نمودار باقیمانده‌ها در مقابل مقادیر برازش شده متناظر یعنی $\hat{y}_i$ ها یک الگوی تصادفی باقیمانده‌ها در طرفین خط صفر ایجاد می‌شود. اگر مدل برازش شده مناسب باشد این نمودار بایستی

نسبت به خط باقیمانده صفر متقارن بوده و نقاط حول این خط به‌طور یکنواخت پراکنده شده باشند. این وضعیت ثابت بودن واریانس خطاها را نشان می‌دهد و در واقع این نمودار بیانگر یک الگوی تصادفی باقیمانده‌ها در طرفین محور باقیمانده صفر است. اگر نقطه‌ای دور تر از سایر نقاط واقع شود، ممکن است آن نقطه، نقطه پرت باشد و همچنین ممکن است هیچ الگوی قابل تشخیصی در نمودار باقیمانده‌ها پیدا نشود. وجود اکثریت داده‌های مثبت یا منفی یا یکسری از نقاط صعودی یا نزولی، و یا وجود الگویی مانند باقی‌مانده‌های افزایشی با برازش‌های افزایشی در نمودار، نشان‌دهنده خطای غیر تصادفی می‌باشد.

بنابراین اگر مدل صحیح و مفروضات برقرار باشد، آنگاه باقیمانده‌ها نباید ساختار خاصی از خود نشان دهند. با توجه به نمودارهای باقیمانده‌ها در مقابل مقادیر برازش شده حاصل از طرح (شکل ۳-۱۰ و ۱۱-۳)، پراکندگی در دو طرف خط صفر تقریباً یکسان است.



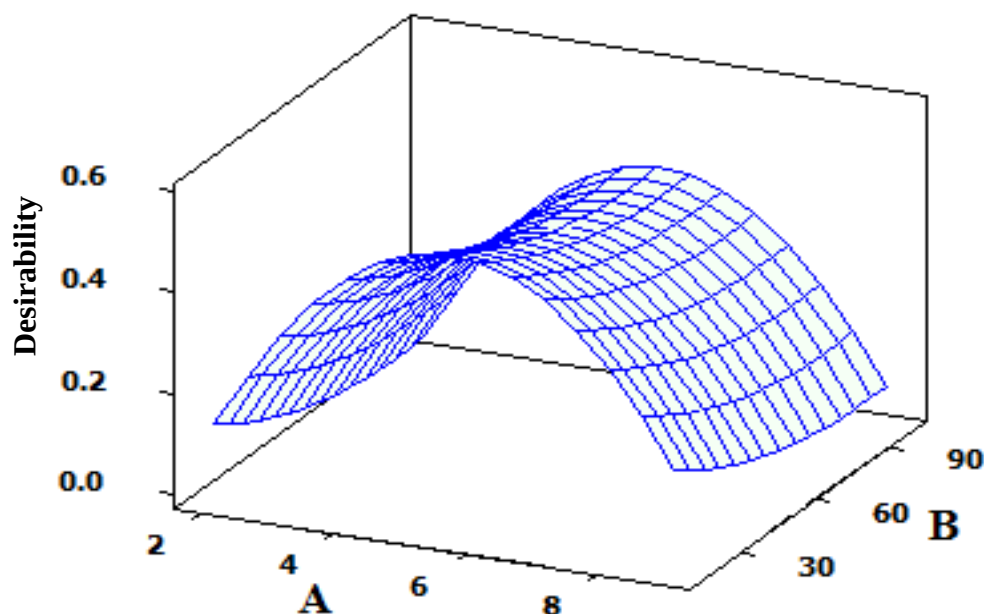
شکل ۳-۱۰: پاسخ پیش‌بینی شده برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین در برابر باقی‌مانده‌ها



شکل ۱۱-۳: پاسخ پیش‌بینی شده برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری لوزارتان در برابر باقی‌ماندها

۳-۶-۲-۲-۶- منحنی رویه پاسخ

به نمایش گرافیکی مدل رگرسیون، منحنی‌های رویه پاسخ گفته می‌شود. از منحنی‌های سه بعدی رویه پاسخ برای نشان دادن رابطه و برهم‌کنش بین متغیرها و نیز اثر این متغیرها روی پاسخ استفاده می‌شود. هر منحنی رویه پاسخ، اثر دو متغیر مستقل را نشان می‌دهد در حالی که سایر متغیرها در سطح صفر (سطح میانی) ثابت نگه داشته می‌شوند. شکل ۱۲-۳ منحنی رویه پاسخ را برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان نشان می‌دهد.



شکل ۳-۱۲: منحنی رویه پاسخ پیش تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان در مقابل A و B

با توجه به مدل ریاضی پیشنهادی، شرایط بهینه پیش تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان با استفاده از نرم‌افزار Statgraphics محاسبه شد. نتایج در جدول ۳-۱۵ گزارش شده است. مقایسه این نتایج، با نتایج حاصل از روش یک متغیر در یک زمان نشان می‌دهد که شرایط بهینه بدست آمده از روش طراحی آزمایش با استفاده از مدل CCF، تا حدودی متفاوت از شرایط بهینه حاصل از روش یک متغیر در یک زمان است که نشان‌دهنده این است که بین فاکتورهای موثر بر سیگنال پیش تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان برهم‌کنش وجود داشته است و در نتیجه شرایط بدست آمده از روش طراحی آزمایش باید به مقادیر بهینه واقعی نزدیک‌تر باشد، زیرا تمام برهم‌کنش‌ها در نظر گرفته شده است.

جدول ۳-۱۵: مقایسه شرایط بهینه بدست آمده توسط روش‌های یک متغیر در یک زمان و طراحی آزمایش

فاکتور	مقادیر بهینه یک متغیر در یک زمان	مقادیر بهینه طراحی فاکتوریل
pH	۵/۰۰	۴/۹۰
حجم حلال استخراج (میکرولیت)	۳۰/۰	۱۵/۰
زمان استخراج (دقیقه)	۲/۰	۱/۰
قدرت یونی (w/v/.)	٪۰/۱۰	٪۰/۸۰

۳-۶-۳- توجیه فاکتورهای موثر بر پیش تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان

۳-۶-۳-۱- بررسی اثر pH فاز آبی بر میزان استخراج

در بررسی pH محلول نمونه، از بافر فسفاتی در رنج pH ۹/۰-۲/۰ استفاده شد. این رنج pH با توجه به ثابت اسیدی لوزارتان و تیکلوپیدین انتخاب شد. در استخراج فاز مایع بایستی آنالیت مورد نظر در محلول نمونه خنثی و بدون بار شود تا بتواند از محلول آبی به فاز آلی انتقال یابد. به منظور بررسی pH، در یک لوله آزمایش ۱/۰ میلی‌لیتر از محلول ۱۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر تیکلوپیدین، ۱/۰ میلی‌لیتر از محلول ۱۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر لوزارتان، ۲/۰ میلی‌لیتر بافر فسفاتی با pH ۲/۰ تا ۹/۰ و ۰/۱۰ گرم نمک سدیم کلراید اضافه شد و توسط آب مقطر به حجم نهایی ۱۰/۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس به وسیله یک میکروپیپت ۳۰/۰ میکرولیتر ۱-دودکانول به عنوان حلال استخراج به سطح محلول نمونه اضافه شد. در مرحله بعد به منظور امولسیون‌سازی مخلوط، لوله آزمایش به مدت ۲ دقیقه در دستگاه ورتکس قرار گرفت. پس از اتمام عمل استخراج، لوله آزمایش به حمام یخ منتقل گردید و بعد از گذشت ۲۰ دقیقه، قطره آلی منجمد، در سطح محلول تشکیل شد. سپس قطره آلی منجمد توسط اسپاتول به یک ویال منتقل شد. پس از ذوب شدن در دمای اتاق، توسط ۵/۰ میکرولیتر متانول رقیق شد و مقداری از آن به دستگاه HPLC تزریق شد. نتایج نشان داد که با تغییرات pH، دو داروی مذکور رفتاری متفاوت و مخالف یکدیگر دارند. بهترین سیگنال در محیط اسیدی برای لوزارتان بوده و در این حالت تیکلوپیدین در کمترین مقدار خود قرار گرفت. در نهایت دو دارو در pH برابر با ۵/۰ سیگنالی مطلوب داشته و این pH به عنوان نقطه بهینه در روش یک متغیر در یک زمان در نظر گرفته شد. همچنین با انجام بهینه سازی به روش طراحی فاکتوریل، مقدار بهینه pH برابر با ۴/۹ بدست آمد.

۳-۶-۳-۲- بررسی اثر نوع بافر

با توجه به pH بهینه برای دستیابی به حساسیت بیشتر، سه نوع بافر شامل بافر فتالاتی، سیتراتی، فسفاتی مورد بررسی قرار گرفت. در این بررسی روش کار مطابق با بخش ۳-۶-۳-۱ و فقط

هر بار ۲/۰ میلی لیتر محلول بافر از نوع فسفاتی، سیتراتی و فتالاتی با $\text{pH} = 5/0$ به آن اضافه شد و پس از انجام میکرواستخراج، سیگنال تجزیه ای توسط HPLC بدست آمد. با توجه به نتایج بدست آمده، بیشترین سیگنال در بافر فسفاتی و کمترین سیگنال در حضور بافر سیتراتی بدست آمد، بنابراین از بافر فسفاتی به عنوان بافر بهینه استفاده گردید.

۳-۳-۶-۳- بررسی اثر حجم بافر

پس از بررسی نوع بافر، اثر حجم بافر فسفاتی با $\text{pH} = 5/0$ در محدوده ۰/۵۰ تا ۳/۵۰ میلی لیتر مورد بررسی قرار گرفت. روش کار جهت بررسی مطابق با روش ارائه شده در بخش ۳-۳-۶-۱ انجام شد. بیشترین سیگنال در حجم ۰/۵ میلی لیتر از بافر فسفاتی با $\text{pH} = 5/0$ مشاهده شد. بنابراین حجم ۰/۵ میلی لیتر از بافر فسفاتی با $\text{pH} = 5/0$ به عنوان حجم بهینه بافر در بررسی های بعدی در نظر گرفته شد.

۳-۳-۶-۴- بررسی اثر نوع حلال استخراج

به منظور دستیابی به گزینش پذیری خوب ترکیبات استخراج شونده، بررسی نوع حلال استخراج از اهمیت زیادی برخوردار است. حلال استخراج بایستی غیر قابل امتزاج با آب باشد و توانایی انحلال نمونه ها در این حلال نیز بیشتر از فاز آبی باشد و همچنین قابلیت استخراج آنها را داشته باشد تا کارایی استخراج بیشتر شود. حلال های استخراج در روش میکرواستخراج قطره آلی شناور جامد شده علاوه بر داشتن شرایط فوق، لازم است شرایط ذکر شده در بخش ۲-۳-۱-۱ را نیز داشته باشند. در بررسی اثر نوع حلال استخراج، حلال های ۱ و ۱۰- دی کلرودکان، ۱- آندکانول و ۱- دودکانول مورد بررسی قرار گرفتند. عمل استخراج همانند روش ارائه شده در بخش ۳-۳-۶-۱ انجام شد، با این تفاوت که در هر مورد از حلال های استخراج متفاوتی که در بالا ذکر شد، استفاده گردید. با توجه به نتایج بدست آمده، بیشترین سیگنال با استفاده از حلال ۱- دودکانول بدست آمد. همچنین تشکیل قطره جامد زمانی که از حلال ۱- دودکانول استفاده می شود بهتر از حالتی که از دو حلال دیگر به عنوان

حلال استخراج استفاده می‌شد، در سطح محلول آبی جمع می‌شود. بنابراین درصد بازیابی استخراج در این حالت بیشترین مقدار است. بنابراین در بررسی‌های بعدی از حلال ۱-دودکانول به عنوان حلال استخراج استفاده گردید.

۳-۶-۳-۵- بررسی اثر حجم حلال استخراج

به منظور بررسی اثر حجم حلال استخراج، از حلال ۱-دودکانول در محدوده ۱۵/۰ تا ۱۰۰/۰ میکرولیتر استفاده شد. عمل استخراج همانند روش ارائه شده در قسمت ۳-۶-۳-۱ انجام شد با این تفاوت که در هر مورد حجم‌های متفاوتی از حلال‌های استخراج به محلول نمونه اضافه شد. با توجه به نتایج بدست آمده، حجم ۳۰/۰ میکرولیتر به عنوان مقدار بهینه بدست آمد. در حجم‌های پائین از حلال استخراج، تمام آنالیت موجود در فاز آبی به دلیل اشباع شدن حلال استخراج بازیابی نمی‌شود، لذا با افزایش حجم حلال استخراج تا ۳۰/۰ میکرولیتر سیگنال و در نتیجه راندمان استخراج افزایش می‌یابد. از طرفی در حجم‌های بالاتر از ۳۰/۰ میکرولیتر از حلال استخراج به دلیل افزایش حجم و در نتیجه کاهش غلظت، سیگنال کاهش می‌یابد. بنابراین حجم ۳۰/۰ میکرولیتر به عنوان حجم بهینه حلال استخراج برای بررسی‌های بعدی انتخاب شد. همچنین با انجام بهینه سازی به روش طراحی فاکتوریل، حجم بهینه حلال استخراج برابر با ۱۵/۰ میکرولیتر بدست آمد.

۳-۶-۳-۶- بررسی اثر زمان استخراج

یکی از پارامترهای مهم در اکثر روش‌های استخراج، زمان استخراج می‌باشد. برای افزایش تکرارپذیری استخراج، انتخاب زمان استخراج مناسب، که طی آن تعادل بین فاز آبی و آلی برقرار شود، ضرورت دارد. در این روش زمان استخراج به عنوان فاصله زمانی قرار گرفتن لوله آزمایش در دستگاه ورتکس، در نظر گرفته شد [۳۹]. بنابراین زمان استخراج در محدوده ۱/۰ تا ۵/۰ دقیقه مورد بررسی قرار گرفت. عمل استخراج مطابق با روش ارائه شده در بخش ۳-۶-۳-۱ انجام شد. زمان استخراج یکی از فاکتورهای مهم در روش میکرواستخراج فاز مایع بر اساس انجماد قطره آلی می‌باشد که روی

راندمان استخراج، دقت، حساسیت و تکرارپذیری داده‌ها تاثیر می‌گذارد. انتخاب زمان استخراج مناسب می‌تواند تضمینی برای تعادل بین فاز آبی و آلی باشد تا حداکثر میزان استخراج از آنالیت حاصل شود. با توجه به نتایج بدست آمده، با افزایش زمان استخراج تا ۲/۰ دقیقه راندمان استخراج افزایش یافت ولی در زمان‌های بیشتر از ۲/۰ دقیقه راندمان استخراج تقریباً ثابت بود. بنابراین در بررسی‌های بعدی زمان استخراج ۲/۰ دقیقه، به عنوان زمان استخراج بهینه انتخاب گردید. همچنین با انجام بهینه سازی به روش طراحی فاکتوریل، زمان استخراج بهینه برابر با ۱/۰ دقیقه بدست آمد.

۳-۶-۷- بررسی اثر قدرت یونی

اثر قدرت یونی بر راندمان استخراج با اضافه کردن مقادیر مختلفی از ماده جامد سدیم کلراید مورد بررسی قرار گرفت. عمل استخراج مطابق با روش ارائه شده در بخش ۳-۶-۱ انجام شد با این تفاوت که در هر مورد مقادیر مختلفی از سدیم کلراید در محدوده ۰/۱ تا ۱/۰ درصد وزنی-حجمی به محلول اضافه گردید. تاثیر قدرت یونی بر راندمان استخراج را می‌توان تحت تاثیر دو نیروی مختلف بررسی کرد. در حالت اول با افزایش نمک پدیده Salting-out اتفاق می‌افتد. به این ترتیب که نمک با کاهش حلالیت آنالیت در فاز آبی سبب افزایش توزیع آن به درون فاز آلی می‌شود و در حالت دوم در غلظت‌های بالای نمک، ویسکوزیته و چگالی محلول آبی افزایش یافته که منجر به کاهش کارایی فرایند انتقال جرم و در نتیجه کاهش بازده استخراج می‌شود. براساس نتایج حاصل از روش یک متغیر در یک زمان، سدیم کلراید ۰/۱٪ به عنوان مقدار بهینه انتخاب شد. همچنین با انجام بهینه سازی به روش طراحی فاکتوریل، درصد سدیم کلرید بهینه برابر با ۰/۸۰٪ بدست آمد.

۳-۷- رسم منحنی‌های کالیبراسیون پیش تغلیظ

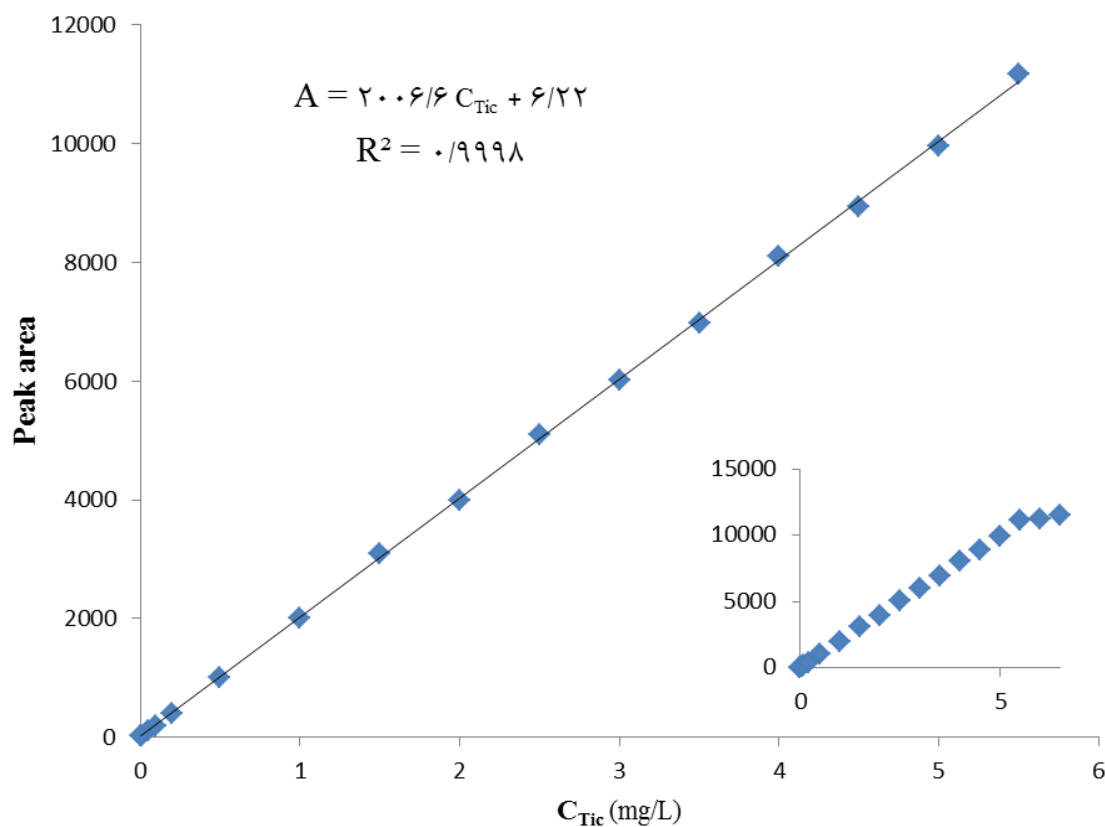
۳-۷-۱- رسم منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ تیکلوپیدین

به منظور رسم منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ، محلول‌های نمونه با غلظت‌های متفاوت از تیکلوپیدین تهیه شد. به این ترتیب که در لوله‌های آزمایش، ۰/۵ میلی لیتر بافر فسفاتی با $\text{pH}=4/90$

۰/۰۸ گرم نمک سدیم کلراید و حجم‌های معینی از محلول‌های ۰/۱۰ ، ۱/۰ و ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر تیکلوپیدین برای ایجاد گستره غلظتی ۰/۰۰۱ تا ۶/۵ میلی گرم بر لیتر اضافه شد. سپس ۱۵/۰ میکرولیتر ۱-دودکانول به عنوان حلال استخراج بهینه به سطح محلول نمونه اضافه شد. در مرحله بعد به منظور امولسیون‌سازی مخلوط، لوله آزمایش به مدت ۱/۰ دقیقه در دستگاه ورتکس قرار گرفت. پس از اتمام عمل استخراج، لوله آزمایش به حمام یخ منتقل گردید و بعد از گذشت ۲۰ دقیقه، قطره آلی منجمد، در سطح محلول تشکیل شد. سپس قطره آلی منجمد توسط اسپاتول به یک ویال منتقل شد و توسط ۵/۰ میکرولیتر متانول رقیق شد و مقداری از آن به دستگاه HPLC تزریق گردید. از رسم سیگنال‌های بدست آمده بر حسب غلظت تیکلوپیدین، منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ تیکلوپیدین بدست آمد. نتایج حاصل در جدول ۳-۱۶ و شکل ۳-۱۳ نشان داده شده است.

جدول ۳-۱۶: داده‌های مربوط به منحنی کالیبراسیون تیکلوپیدین

غلظت تیکلوپیدین (میلی گرم بر لیتر)	سیگنال تجزیه‌ای (سطح زیر منحنی)
۰/۰۰۶	۱۷/۶۱
۰/۰۱	۲۶/۱۲
۰/۰۵	۹۹/۶۳
۰/۱	۱۹۷/۵۰
۰/۲	۳۹۵/۶۲
۰/۵	۱۰۱۰/۶۸
۱/۰	۲۰۰۹/۷۱
۱/۵	۳۰۸۶/۱۸
۲/۰	۳۹۸۱/۷۲
۲/۵	۵۰۹۶/۲۹
۳/۰	۶۰۱۱/۲۴
۳/۵	۶۹۶۷/۳۱
۴/۰	۸۰۹۸/۳۳
۴/۵	۸۹۳۸/۰۶
۵/۰	۹۹۵۱/۳۰
۵/۵	۱۱۱۶۴/۵۱
۶/۰	۱۱۲۷۲/۷۳
۶/۵	۱۱۳۲۰/۲۰



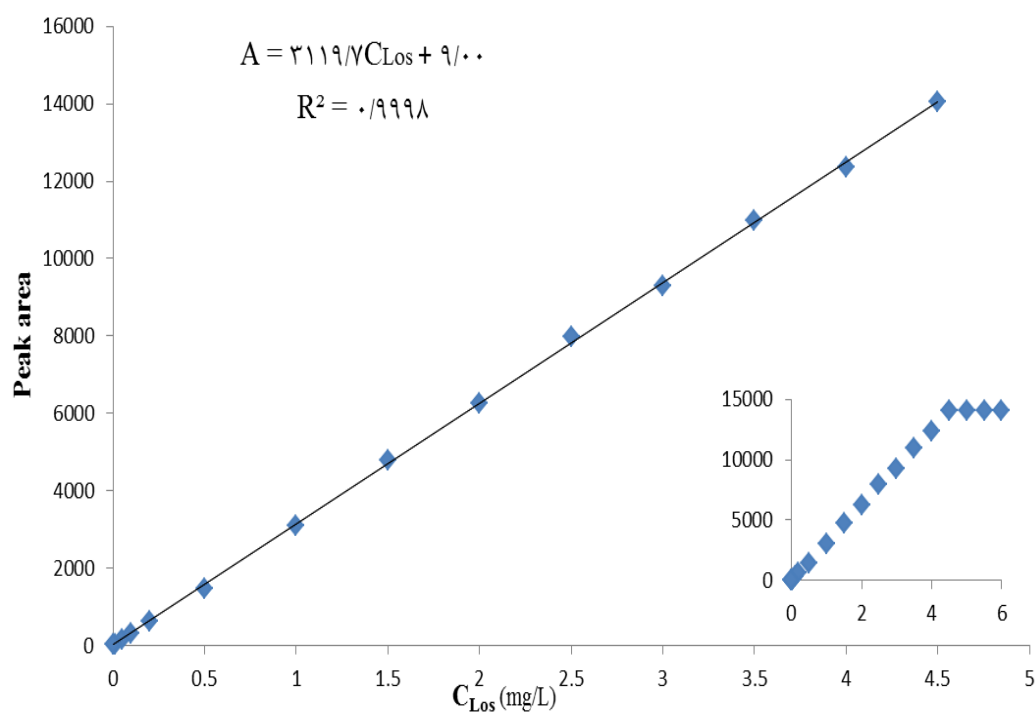
شکل ۳-۱۳: منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ تیکلوپیدین

۳-۷-۲- رسم منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ لوزارتان

مشابه روش بخش ۳-۷-۱، به منظور رسم منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ لوزارتان محلول‌هایی با غلظت‌های متفاوت از لوزارتان تهیه شد. نتایج حاصل در جدول ۳-۱۷ و شکل ۳-۱۴ نشان داده شده است.

جدول ۳-۱۷: داده‌های مربوط به منحنی کالیبراسیون لوزارتان

سیگنال تجزیه‌ای (سطح زیر منحنی)	غلظت تیکلوپیدین (میلی گرم بر لیتر)
۲۱/۵۰	۰/۰۰۴
۳۷/۵۹	۰/۰۱
۱۷۵/۱۵	۰/۰۵
۳۱۷/۳۰	۰/۱
۶۳۱/۸۰	۰/۲
۱۴۶۴/۱۹	۰/۵
۳۰۸۶/۹۹	۱/۰
۴۷۸۷/۹۹	۱/۵
۶۲۶۳/۹۲	۲/۰
۷۹۸۷/۲۰	۲/۵
۹۲۸۶/۲۷	۳/۰
۱۰۹۷۰/۷۶	۳/۵
۱۲۳۵۹/۵۰	۴/۰
۱۴۰۶۳/۷۸	۴/۵
۱۴۰۴۲/۰۱	۵/۰
۱۴۰۶۹/۵۱	۵/۵
۱۴۱۱۰/۳۶	۶/۰



شکل ۳-۱۴: منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ لوزارتان

با توجه به شکل‌های ۱۳-۳ و ۱۴-۳، دامنه خطی منحنی کالیبراسیون پیش‌تغلیظ برای تیکلوپیدین در محدوده ۵/۵-۰/۰۰۶ میلی گرم بر لیتر با ضریب تعیین $R^2=0/9998$ و برای لوزارتان در محدوده ۴/۵-۰/۰۰۴ میلی گرم بر لیتر با ضریب تعیین $R^2=0/9998$ می‌باشد. همچنین معادله بهترین خط برای غلظت و سیگنال مربوط به پیش‌تغلیظ تیکلوپیدین و لوزارتان در زیر نشان داده شده است.

$$A = 2006.6C_{Tic} + 6.22 \quad (14-3)$$

$$A = 3119.7C_{Los} + 9.00 \quad (15-3)$$

۳-۸- بررسی اثر گونه‌های مزاحم

به منظور بررسی قابلیت کاربرد روش میکرواستخراج فاز مایع مبتنی بر انجماد قطره آلی شناور توسط امولسیون‌سازی ورتکس، در نمونه‌های حقیقی، اثر مزاحمت‌های احتمالی در پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان مورد بررسی قرار گرفت.

به منظور بررسی اثر مزاحمت‌ها، ابتدا سیگنال محلول نمونه تحت شرایط بهینه و در غیاب گونه‌های مزاحم اندازه‌گیری شد. به این صورت که در یک لوله آزمایش ۱/۰ میلی‌لیتر از محلول ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر تیکلوپیدین، ۱/۰ میلی‌لیتر از محلول ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر لوزارتان و ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفاتی با $pH=4/9$ و ۰/۸٪ نمک سدیم کلراید اضافه شد و توسط آب مقطر به حجم نهایی ۱۰/۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس ۱۵/۰ میکرولیتر از حلال ۱-دودکانول به لوله آزمایش تزریق شده و به مدت ۱/۰ دقیقه در دستگاه ورتکس قرار گرفت. پس از اتمام عمل استخراج، لوله آزمایش به حمام یخ منتقل گردید و در نهایت استخراج حاوی نمونه‌ها حلال به دستگاه تزریق شد. این فرایند ۳ بار تکرار شد و میانگین سیگنال‌ها و انحراف استاندارد آنها محاسبه شد و محدوده قابل قبول برای نوسان سیگنال، با توجه به رابطه زیر بدست آمد:

$$\bar{A} \pm 3S_A \quad (16-3)$$

در این رابطه $\bar{A}$ میانگین و S_A انحراف استانداردهای سیگنال‌های اندازه‌گیری شده می‌باشد. برای بررسی اثر مزاحمت احتمالی، هرگونه با نسبت ۱۰۰۰ برابر وزنی-حجمی نسبت به تیکلوپیدین و لوزارتان به محلول اضافه شد سپس عمل استخراج انجام گرفت و سیگنال مربوطه به هر آنالیت بدست آمد. اگر سیگنال بدست آمده در حضور گونه مورد نظر در دامنه $\bar{A} \pm 3S_A$ قرار می‌گرفت به این معنا بود که یون مورد نظر با نسبت موجود مزاحم نیست. در غیر این صورت نسبت وزنی-حجمی گونه مزاحم آنقدر کاهش داده می‌شد تا سیگنال تجزیه‌ای در دامنه $\bar{A} \pm 3S_A$ قرار گیرد. نتایج حاصل از بررسی اثر گونه‌های مزاحم در جداول (۳-۱۸) و (۳-۱۹) نشان داده شده است.

جدول ۳-۱۸: نتایج حاصل از بررسی اثر گونه‌های مزاحم در پیش تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین

نسبت غلظت گونه به غلظت تیکلوپیدین	گونه‌های مورد بررسی
۱۰۰۰	نیکوتین آمید، گلوکز، متیونین، آلانین
۴۰۰	لاکتوز
۳۰۰	تیواوره
۲۰۰	ویتامین B1، ویتامین B6

جدول ۳-۱۹: نتایج حاصل از بررسی اثر گونه‌های مزاحم در پیش تغلیظ و اندازه‌گیری لوزارتان

نسبت غلظت گونه به غلظت لوزارتان	گونه‌های مورد بررسی
۱۰۰۰	نیکوتین آمید، گلوکز، متیونین
۴۰۰	لاکتوز، آلانین
۳۰۰	تیواوره، ویتامین B6
۲۰۰	ویتامین B1، لاکتوز

با توجه به نتایج این جدول مشخص گردید که بسیاری از گونه‌های مورد بررسی، در پیش تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان ایجاد مزاحمت نمی‌کنند.

۹-۳- ارقام شایستگی روش

۳-۹-۱- حد تشخیص و حد کمی

حد تشخیص (LOD)^۱ یک روش، حداقل غلظتی از آنالیت است که می‌تواند با یک سطح اطمینان مشخص آشکارسازی شود. حد تشخیص از رابطه زیر محاسبه می‌شود [۳۰]:

$$LOD = \frac{kS_{bl}}{m} \quad (۱۷-۳)$$

در این رابطه، S_{bl} انحراف استاندارد شاهد که برای تیکلوپیدین و لوزارتان به ترتیب ۱/۱۳ و ۱/۱۰ می‌باشد، m شیب منحنی کالیبراسیون پیش‌تغلیظ و k ضریب اطمینان می‌باشد. مقدار منطقی و قابل قبول برای این ضریب ثابت عدد $k = ۳/۰$ است. محلول شاهد تحت شرایط بهینه، ۶ بار اندازه‌گیری تکراری می‌شود. با قرار گرفتن نتایج در معادله (۱۷-۳) حد تشخیص روش برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان به ترتیب ۱/۷ و ۱/۰ میکروگرم بر لیتر بدست آمد.

حد کمی (LOQ)^۲ یک روش، حداقل غلظتی از آنالیت است که می‌تواند با دقت و صحت قابل قبول اندازه‌گیری شود. برای محاسبه حد کمی، مقدار ضریب $k = ۱۰/۰$ در نظر گرفته می‌شود [۳۰]. بنابراین حد کمی روش برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان به ترتیب ۵/۷ و ۳/۳ میکروگرم بر لیتر بدست آمد.

۳-۹-۲- دقت و صحت

دقت نشان‌دهنده میزان تکرارپذیری نتایج است و به صورت درصد انحراف استاندارد نسبی بیان می‌شود که تابعی از غلظت نمونه می‌باشد. درصد انحراف استاندارد نسبی (RSD%) از رابطه زیر محاسبه می‌شود [۳۰]:

^۱ Limit of detection

^۲ Limit of quantification

$$\%RSD = \frac{S_C}{C} \times 100 \quad (18-3)$$

در این رابطه S_C انحراف استاندارد غلظت و C میانگین غلظت می‌باشد. برای بررسی دقت و صحت روش، غلظت‌های متفاوتی از تیکلوپیدین و لوزارتان در دامنه خطی منحنی کالیبراسیون انتخاب و تحت شرایط بهینه عمل استخراج بر روی آنها انجام گرفت. برای هر یک از غلظت‌های انتخاب‌شده، ۳ بار اندازه‌گیری تکراری انجام گرفت و با قرار دادن سیگنال‌های بدست آمده در معادله-های کالیبراسیون مقدار تیکلوپیدین و لوزارتان بدست آمد. نتایج حاصل در جداول (۲۰-۳) و (۲۱-۳) آمده است. مقادیر t و درصد انحراف نسبی به‌ترتیب نشان دهنده دقت و صحت خوب روش است (سطح اطمینان ۹۵٪ مقدار t بحرانی برای ۲ درجه آزادی برابر ۴/۳۰ است).

جدول ۲۰-۳: نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت روش برای تیکلوپیدین

تیکلوپیدین موجود در محلول آبی (میلی گرم بر لیتر)	تیکلوپیدین اندازه‌گیری شده (میلی گرم بر لیتر)	RSD%	مقدار t	درصد بازیابی
۰/۲۰۰	۰/۱۹۴±۰/۰۰۵	۲/۶	۱/۹۶	۹۷/۰
۱/۰۰۰	۰/۹۹۸±۰/۰۱۱	۱/۱	۰/۳۳	۹۹/۸
۴/۰۰۰	۴/۰۱۵±۰/۰۳۲	۰/۸	۰/۸۲	۱۰۰/۴

جدول ۲۱-۳: نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت روش برای لوزارتان

لوزارتان موجود در محلول آبی (میلی گرم بر لیتر)	لوزارتان اندازه‌گیری شده (میلی گرم بر لیتر)	RSD%	مقدار t	درصد بازیابی
۰/۲۰۰	۰/۱۹۸±۰/۰۰۶	۳/۰	۰/۴۸	۹۹/۰
۱/۰۰۰	۰/۹۹۸±۰/۰۱۸	۱/۸	۰/۱۹	۹۹/۸
۴/۰۰۰	۳/۹۶۹±۰/۰۲۰	۰/۵	۲/۶۸	۹۹/۲

۳-۱۰- فاکتور پیش تغلیظ

فاکتور پیش تغلیظ (PF)^۱، طبق رابطه (۳-۱۹) به صورت نسبت شیب منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ بر شیب منحنی کالیبراسیون مستقیم تعریف می‌شود. در این رابطه m_1 شیب منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ و m_2 شیب منحنی کالیبراسیون مستقیم می‌باشد. فاکتور پیش تغلیظ برای تیکلوپیدین و لوزارتان به ترتیب ۹۹/۵ و ۱۵۳/۸ بدست آمد.

$$PF = \frac{m_1}{m_2} \quad (۳-۱۹)$$

۳-۱۱- اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان در نمونه‌های حقیقی

به منظور بررسی توانایی روش پیشنهادی، در اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان در نمونه‌های حقیقی با بافت‌های متفاوت، از این روش برای پیش تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان در نمونه‌های قرص، ادرار و پلاسما استفاده شد.

۳-۱۱-۱- اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان در نمونه قرص

برای اندازه‌گیری تیکلوپیدین در نمونه قرص، ابتدا ۴ عدد قرص تیکلوپیدین هیدروکلراید که هر قرص حاوی ۲۵۰/۰ میلی گرم ماده مؤثر است، به دقت توزین شد و پس از آنکه قرص‌ها در هاون عقیق پودر و همگن شدند، یک چهارم از آن که معادل ۲۵۰/۰ میلی گرم ماده مؤثره تیکلوپیدین است، توزین شد. سپس مقدار توزین شده به یک بالن حاوی ۱۰۰/۰ میلی لیتر متانول اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه در حمام التراسونیک قرار گرفت و پس از آنکه صاف شد در یک بالن حجمی ۲۵۰/۰ میلی لیتری با متانول به حجم رسانده شد. سپس ۱۰/۰ میلی لیتر از آن به بالن ۱۰۰/۰ میلی لیتری منتقل و با متانول به حجم رسانده شد. از این محلول، ۱۰/۰ میلی لیتر به بالن ۱۰۰/۰ میلی لیتری منتقل و با آب به حجم رسانده شد. ۱/۰ میلی لیتر از این محلول نمونه قرص به روش افزایش استاندارد مورد آنالیز

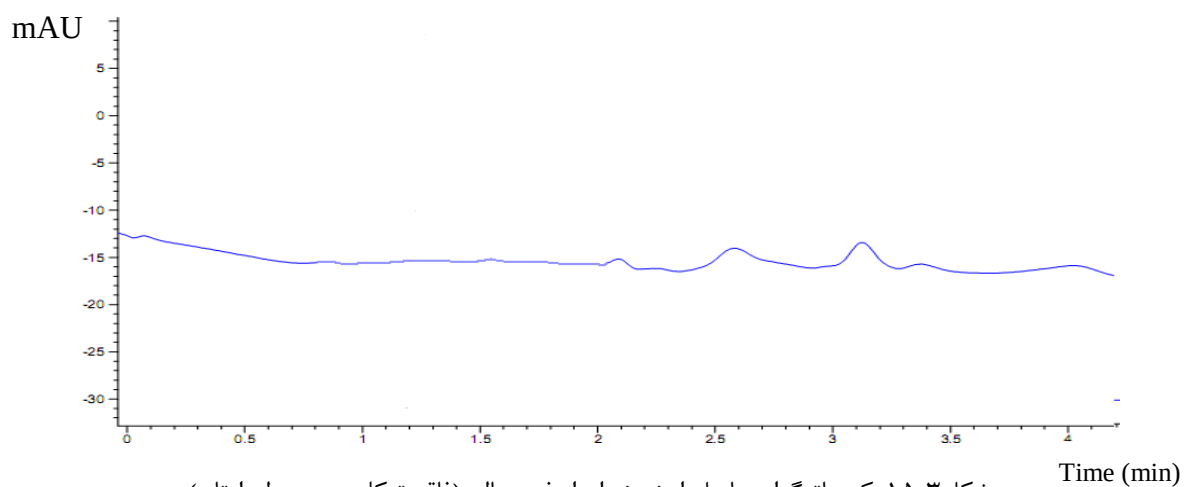
¹ Preconcentration Factor

قرار گرفت، به این صورت که ابتدا سیگنال محلول نمونه حاوی ۱/۰ میلی لیتر نمونه‌ی قرص و فاقد استاندارد تحت شرایط بهینه بدست آمد و در مراحل بعد، به ترتیب حجم‌های ۱/۰، ۱/۵ و ۲/۵ میلی - لیتر از محلول استاندارد ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر تیکلوپیدین به محلول نمونه اضافه شد. همچنین به منظور دستیابی به هدف اندازه‌گیری همزمان، به ترتیب حجم‌های ۱/۰، ۱/۵ و ۲/۵ میلی لیتر از محلول استاندارد ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر لوزارتان نیز به محلول نمونه اضافه شد و پس از انجام پیش- تغلیظ تحت شرایط بهینه، سیگنال تجزیه‌ای محاسبه شد. هر اندازه‌گیری ۳ بار تکرار شد که نتایج آن در جدول ۳-۲۲ آمده است. با توجه به نتایج اندازه‌گیری تیکلوپیدین در حضور لوزارتان تغییری در سیگنال تیکلوپیدین ایجاد نشد، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که اندازه‌گیری هم زمان این داروها در نمونه حقیقی مزاحمتی ندارند. آماده سازی قرص لوزارتان نیز به همین ترتیب صورت گرفت، که نتایج آن در جدول ۳-۲۲ آمده است.

۳-۱۱-۲- اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان در نمونه ادرار

به منظور آماده‌سازی نمونه ادرار فرد بیمار که قرص لوزارتان مصرف کرده بود، ابتدا ادرار جمع - آوری شده که تا زمان آنالیز فریز شده بود، در دمای اتاق ذوب شد و سپس به ازای هر ۲/۰ میلی لیتر از ادرار، ۰/۵ میلی لیتر استونیتریل به منظور جدا کردن پروتئین‌های موجود در آن اضافه گردید و به مدت ۱۰/۰ دقیقه در سانتریفیوژ با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد. سپس ۱/۰ میلی لیتر از محلول رویی ادرار به لوله آزمایش منتقل شد و آنالیز نمونه با روش افزایش استاندارد انجام شد، به این صورت که ابتدا سیگنال محلول نمونه حاوی ۱/۰ میلی لیتر نمونه‌ی ادرار و فاقد استاندارد تحت شرایط بهینه بدست آمد و در مراحل بعد سه حجم متفاوت از محلول‌های استاندارد ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر تیکلوپیدین و لوزارتان به محلول نمونه اضافه شد. هر اندازه‌گیری ۳ بار تکرار شد که نتایج آن در جدول ۳-۲۲ آمده است. لازم به ذکر است که نمونه ادرار حاوی داروی لوزارتان (شکل ۳-۱۶)، ۸ ساعت پس از مصرف قرص لوزارتان ۲۵/۰ میلی گرمی از فرد بیمار بدست آمد. برای آماده‌سازی نمونه دوم ادرار مربوط به داوطلب مرد سال ۳۰ ساله، به ۵/۰ میلی لیتر از ادرار، ۲/۵ میلی لیتر استونیتریل

به منظور جدا کردن پروتئین‌های موجود در آن اضافه گردید و به مدت ۱۰/۰ دقیقه در سانتریفیوژ با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد. سپس محلول رویی آن برداشته و به بالن ۲۵/۰ میلی لیتری منتقل کرده و محلول ۵/۰ میلی گرم بر لیتر دارو تهیه شد. سپس ۱/۰ میلی لیتر از این محلول با استفاده از روش افزایش استاندارد در ظرف نمونه ۱۰/۰ میلی لیتری در شرایط بهینه به روش پیشنهادی در سه غلظت متفاوت از استاندارد داروهای تیکلوپیدین و لوزارتان مورد بررسی قرار گرفت. هر اندازه گیری سه بار تکرار شد که نتایج آن در جدول ۳-۲۲ آورده شده است.



شرایط آزمایش: $pH=4/9$ ، حجم محلول نمونه ۱۰/۰ میلی لیتر، حجم حلال استخراج (۱-دودکانول) ۱۵ میکرولیتر، زمان استخراج ۱/۰ دقیقه، قدرت یونی ۸۰/۰٪، ترکیب بافر فسفات با pH برابر ۲/۷، استونیتریل و آب (۲۰:۴۵:۳۵)٪ به عنوان فاز متحرک، سرعت جریان فاز متحرک ۱/۰ میلی لیتر بر دقیقه، حجم لوپ ۵/۰ میکرولیتر

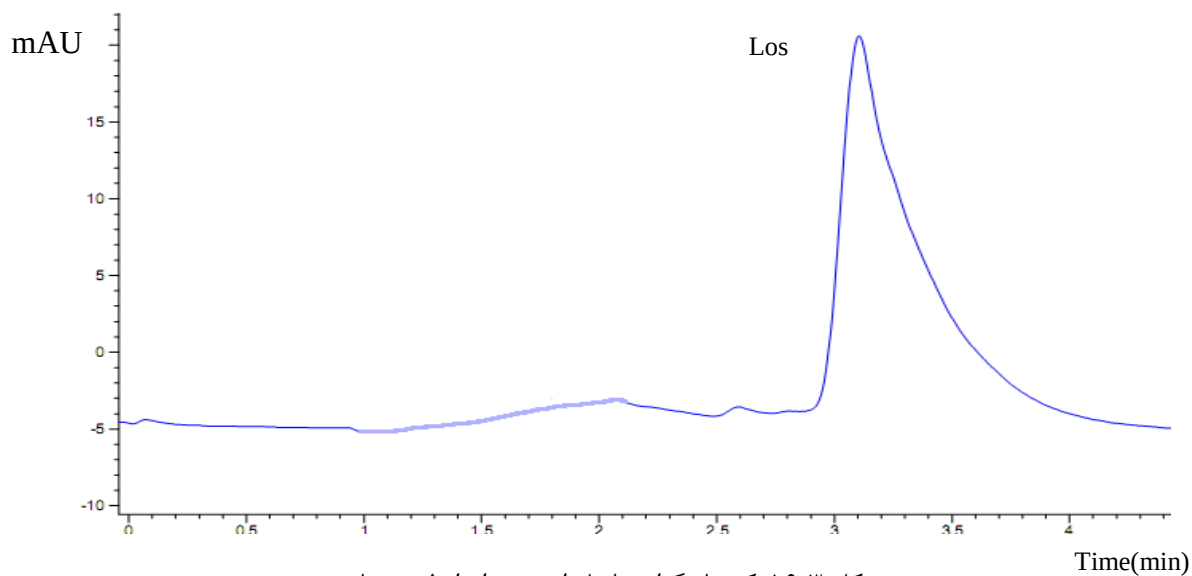
۳-۱۱-۳- اندازه گیری تیکلوپیدین و لوزارتان در نمونه پلاسما

به منظور آماده سازی نمونه پلاسما، ابتدا پلاسمای جمع آوری شده که تا زمان آنالیز فریز شده بود، در دمای اتاق ذوب شد و سپس به ازای هر ۲/۰ میلی لیتر از پلاسما، ۰/۵ میلی لیتر استونیتریل به منظور جدا کردن پروتئین‌های موجود در آن اضافه گردید و به مدت ۱۰/۰ دقیقه در سانتریفیوژ با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد. سپس ۱/۰ میلی لیتر از محلول رویی پلاسما به لوله آزمایش منتقل شد و آنالیز نمونه با روش افزایش استاندارد انجام شد، به این صورت که ابتدا سیگنال محلول نمونه حاوی ۱/۰ میلی لیتر نمونه ی پلاسما و فاقد استاندارد تحت شرایط بهینه بدست آمد و در مراحل

بعد سه حجم متفاوت از محلول‌های استاندارد ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر تیکلوپیدین و لوزارتان به محلول نمونه اضافه شد. هر اندازه‌گیری ۳ بار تکرار شد که نتایج آن در جدول ۳-۲۲، آمده است. لازم به ذکر است که نمونه پلاسمای حاوی داروی لوزارتان (شکل ۳-۱۸)، ۶ ساعت پس از مصرف قرص لوزارتان ۲۵/۰ میلی گرمی از فرد بیمار بدست آمد.

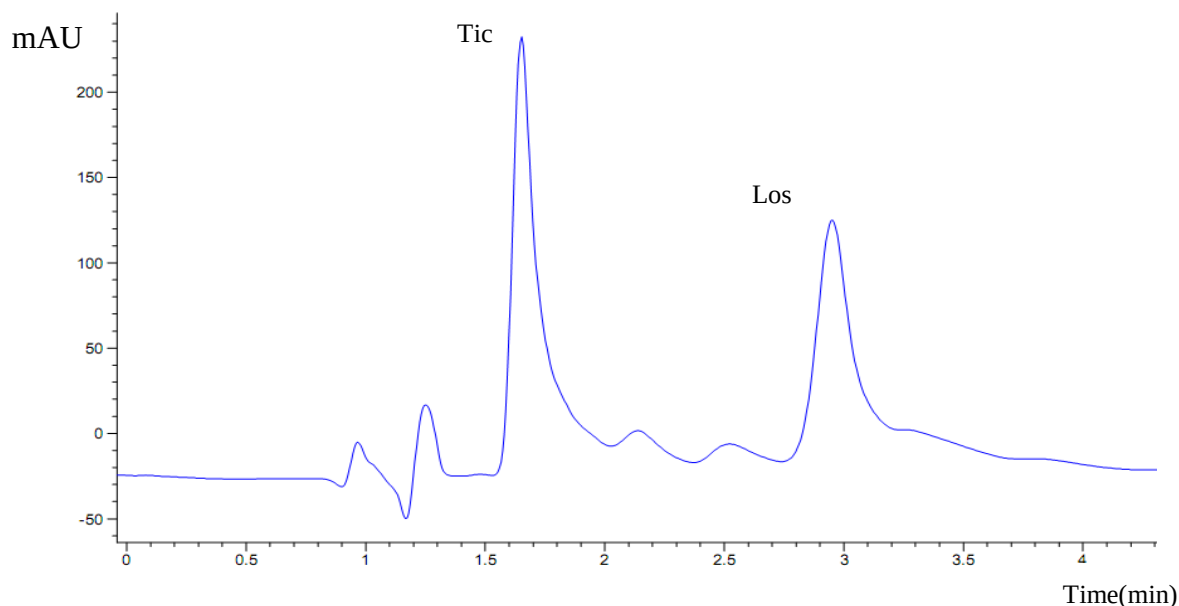
جدول ۳-۲۲: نتایج حاصل از پیش تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان در نمونه‌های حقیقی

نمونه	مقدار در نمونه اصلی		درصد بازیابی		مقدار t		RSD% (n=3)		اندازه‌گیری شده (ppm)		اضافه شده (ppm)	
	لوزارتان	تیکلوپیدین	لوزارتان	تیکلوپیدین	لوزارتان	تیکلوپیدین	لوزارتان	تیکلوپیدین	لوزارتان	تیکلوپیدین	لوزارتان	تیکلوپیدین
قرص لوزارتان	-	-	-	-	-	-	۱/۲	-	۰/۹۱۸	۰/۰۰۰	۰/۰	۰/۰
	۱۰۲/۴	۱۰۲/۹	۰/۹۲	۱/۴۸	۴/۳	۳/۳	۱/۰۲۴	۱/۰۲۹	۱/۰	۱/۰	۱/۰	۱/۰
	۱۰۲/۵	۹۹/۶۵	۱/۵۳	۰/۱۴	۲/۷	۴/۴	۱/۵۳۷	۱/۹۹۳	۱/۵	۲/۰	۲/۰	۲/۰
	۱۰۰/۷	۱۰۱/۷	۰/۲۶	۱/۷۸	۴/۶	۱/۶	۲/۰۱۴	۴/۰۶۸	۲/۰	۴/۰	۴/۰	۴/۰
قرص تیکلوپیدین	-	-	-	-	-	-	۳/۴	۰/۰	۰/۹۸۴	۰/۰	۰/۰	۰/۰
	۹۵/۷	۹۸/۶	۲/۱۳	۰/۵۱	۳/۶	۴/۸	۰/۹۵۷	۰/۹۸۶	۱/۰	۱/۰	۱/۰	۱/۰
	۹۶/۶	۱۰۳/۹	۲/۶۸	۳/۴۱	۲/۳	۱/۹	۱/۴۴۹	۱/۵۵۹	۱/۵	۲/۵	۲/۵	۲/۵
	۱۰۰/۴	۱۰۱/۴	۰/۲۷	۳/۳۷	۲/۸	۰/۷	۲/۵۱۱	۲/۵۳۵	۲/۵	۴/۵	۴/۵	۴/۵
ادار لوزارتان	-	-	-	-	-	-	۴/۶	-	۰/۱۷۴	۰/۰۰۰	۰/۰	۰/۰
	۱۰۱/۸	۱۰۱/۳	۰/۸۹	۰/۵۸	۳/۴	۳/۸	۱/۰۱۸	۱/۵۱۹	۱/۵	۴/۵	۴/۵	۴/۵
	۱۰۰/۷	۹۹/۱	۰/۴	۰/۶۳	۲/۸	۲/۳	۱/۵۱۰	۴/۴۶۲	۱/۵	۴/۵	۴/۵	۴/۵
ادار تیکلوپیدین	-	-	-	-	-	-	-	<LOD	۰/۰	۰/۰	۰/۰	۰/۰
	۹۸/۴	۱۰۱/۷	۲/۶	۲/۶۷	۲/۱	۱/۱	۰/۹۸۴	۱/۰۱۷	۱/۰	۱/۰	۱/۰	۱/۰
	۱۰۱/۴	۱۰۱/۵	۱/۲	۲/۵	۲/۱	۱/۰	۱/۵۲۲	۲/۵۳۷	۱/۵	۲/۵	۲/۵	۲/۵
پلازما لوزارتان	-	-	-	-	-	-	۳/۰	-	۰/۰۱۹	۰/۰۰۰	۰/۰	۰/۰
	۱۰۳/۶	۹۹/۱۵	۱/۸	۰/۳۲	۳/۳	۴/۶	۰/۵۱۸	۱/۹۸۳	۰/۵	۲/۰	۲/۰	۲/۰
	۱۰۴/۷	۱۰۲/۵	۴/۱	۱/۵	۱/۹	۲/۸	۱/۰۴۰	۳/۰۷۵	۱/۰	۳/۰	۳/۰	۳/۰
پلازما تیکلوپیدین	-	-	-	-	-	-	-	<LOD	۰/۰	۰/۰	۰/۰	۰/۰
	۹۷	۹۸/۶	۲/۴	۲/۵	۲/۲	۱/۰	۰/۹۷۰	۱/۹۷۲	۱/۰	۲/۰	۲/۰	۲/۰
	۹۸/۱	۹۸/۹	۳/۴	۴/۰	۱/۰	۰/۴۸	۱/۹۶۲	۳/۹۵۵	۲/۰	۴/۰	۴/۰	۴/۰



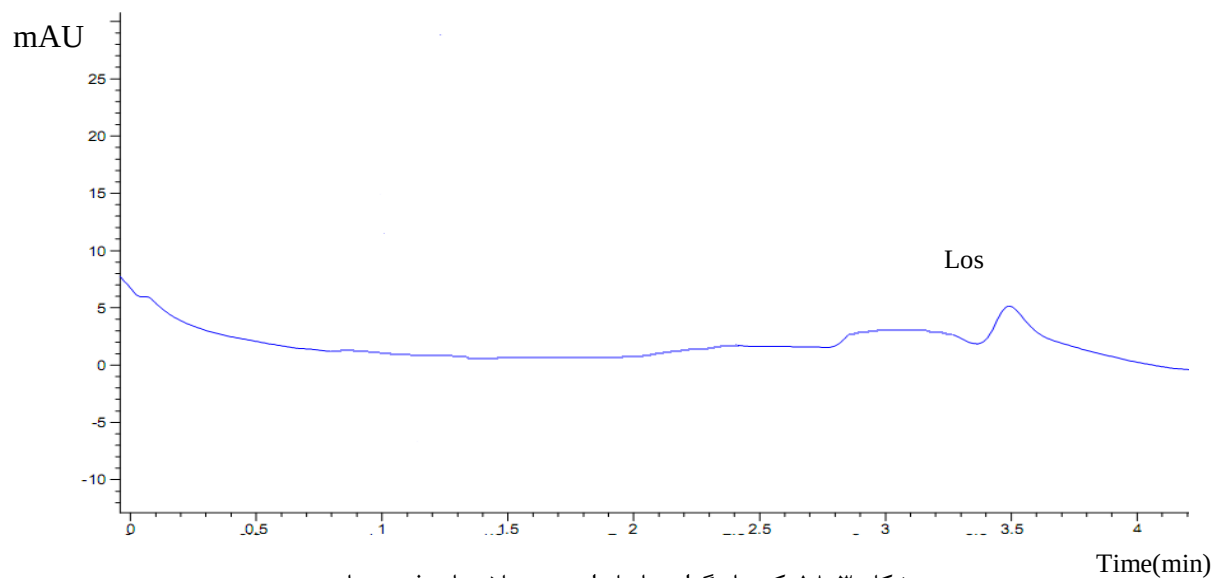
شکل ۳-۱۶: کروماتوگرام حاصل از نمونه ادرار فرد بیمار

شرایط آزمایش: pH=۴/۹، حجم محلول نمونه ۱۰/۰ میلی لیتر، حجم حلال استخراج (۱-دودکانول) ۱۵ میکرولیتر، زمان استخراج ۱/۰ دقیقه، قدرت یونی ۸۰/۰٪، ترکیب بافر فسفات با pH برابر ۲/۷، استونیتریل و آب (۳۵:۴۵:۲۰) به عنوان فاز متحرک، سرعت جریان فاز متحرک ۱/۰ میلی لیتر بر دقیقه، حجم لوپ ۵/۰ میکرولیتر



شکل ۳-۱۷: کروماتوگرام نمونه ادرار ۱/۰ میلی گرم بر لیتر تیکلوپیدین و لوزارتان

شرایط آزمایش: غلظت تیکلوپیدین و لوزارتان ۱/۰ میلی گرم بر لیتر، pH=۴/۹، حجم محلول نمونه ۱۰/۰ میلی لیتر، حجم حلال استخراج (۱-دودکانول) ۱۵ میکرولیتر، زمان استخراج ۱/۰ دقیقه، قدرت یونی ۸۰/۰٪، ترکیب بافر فسفات با pH برابر ۲/۷، استونیتریل و آب (۳۵:۴۵:۲۰) به عنوان فاز متحرک، سرعت جریان فاز متحرک ۱/۰ میلی لیتر بر دقیقه، حجم لوپ ۵/۰ میکرولیتر



شکل ۳-۱۸: کروماتوگرام حاصل از نمونه پلاسمای فرد بیمار

شرایط آزمایش: $pH=4/9$ ، حجم محلول نمونه $10/0$ میلی لیتر، حجم حلال استخراج (۱-دودکانول) 15 میکرولیتر، زمان استخراج $1/0$ دقیقه، قدرت یونی $80/0/0$ ، ترکیب بافر فسفات با pH برابر $2/7$ ، استونیتریل و آب ($35:45:20$) به عنوان فاز متحرک، سرعت جریان فاز متحرک $1/0$ میلی لیتر بر دقیقه، حجم لوپ $5/0$ میکرولیتر

فصل چهارم

بحث و نتیجه گیری

در این پروژه، با استفاده از روش میکرواستخراج فاز مایع مبتنی بر انجماد قطره آلی شناور توسط امولسیون سازی و رتکس و دستگاه HPLC، مقادیر کم تیکلوپیدین و لوزارتان اندازه گیری شد.

۴-۱- ارقام شایستگی روش

بررسی منحنی های کالیبراسیون نشان می دهد که در ناحیه غلظتی ۵/۵۰-۰/۰۰۶ میلی گرم بر لیتر برای تیکلوپیدین و ۴/۵۰-۰/۰۰۴ میلی گرم بر لیتر برای لوزارتان، بین غلظت و سیگنال تجزیه ای رابطه خطی وجود دارد. مطابق جداول ۳-۲۰ و ۳-۲۱، مقادیر انحراف استاندارد نسبی برای ۳ اندازه گیری تکراری در غلظت های ۰/۲، ۱/۰ و ۴/۰ میلی گرم بر لیتر به ترتیب برابر ۲/۶، ۱/۱ و ۰/۸٪ برای تیکلوپیدین و ۳/۰، ۱/۸ و ۰/۵٪ برای لوزارتان می باشد که نشان دهنده دقت خوب روش است. همچنین مقادیر درصد بازیابی نشان داده شده برای غلظت های ذکر شده، بیانگر صحت خوب روش است. حد تشخیص روش برای پیش تغلیظ و اندازه گیری تیکلوپیدین و لوزارتان به ترتیب ۱/۷ و ۱/۰ میکروگرم بر لیتر و فاکتور پیش تغلیظ تحت شرایط بهینه برای تیکلوپیدین و لوزارتان به ترتیب ۹۹/۵ و ۱۵۳/۸ محاسبه شد.

بر اساس نتایج ارائه شده در جداول ۳-۱۸ و ۳-۱۹، بیشتر گونه ها در اندازه گیری تیکلوپیدین و لوزارتان مزاحم نیستند و روش از گزینش پذیری بالایی برخوردار است.

نتایج حاصل از اندازه گیری تیکلوپیدین و لوزارتان در نمونه های قرص، ادرار و پلاسما در جدول ۳-۲۲ آمده است. این نتایج نشان می دهد که می توان روش پیشنهادی را با دقت و صحت خوبی در اندازه گیری تیکلوپیدین و لوزارتان در نمونه های حقیقی به کار گرفت.

۲-۴- مقایسه روش پیشنهادی با برخی روش‌های موجود

در جدول ۱-۴ تعدادی از روش‌های پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان آورده شده است. با توجه به اینکه تا به حال هیچ مقاله‌ای مبنی بر پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری همزمان تیکلوپیدین و لوزارتان گزارش نشده است، لذا مقالاتی که به اندازه‌گیری جداگانه هر یک از این دو دارو مربوط می‌شد، برای مقایسه در جدول زیر آورده شده است. در این جدول پارامترهای مختلف، مانند حد تشخیص، دامنه خطی و فاکتور پیش‌تغلیظ برای مقایسه آورده شده است. مقایسه ارقام شایستگی گزارش شده برای این روش‌ها با روش پیشنهادی نشان می‌دهد که روش پیشنهادی نسبت به برخی از روش‌های گزارش شده بهتر می‌باشد.

جدول ۱-۴ مقایسه روش پیشنهادی با برخی از روش‌های گزارش شده برای اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان

آنالیت	روش پیش‌تغلیظ	روش اندازه‌گیری	حد تشخیص (میلی گرم بر لیتر)	دامنه خطی (میلی گرم بر لیتر)	فاکتور پیش‌تغلیظ	مرجع
تیکلوپیدین	SPE	GC	۰/۰۰۵	۰/۰۱-۲/۵	-	[۸]
تیکلوپیدین	-	اسپکتروفتومتری	۰/۶۳	۱/۰-۵۰/۰	-	[۱۱]
تیکلوپیدین	SPE	GC-MS	۰/۱۴	۰/۳-۱/۵	-	[۷]
لوزارتان	-	ولتامتری	۰/۱۲	۰/۱۶-۱/۲	-	[۲۰]
لوزارتان	DLLME	HPLC-UV	۰/۰۱۱	۰/۱-۱/۰	-	[۴۰]
لوزارتان	IL-DLLME ^۱	HPLC	۰/۰۱۸	۰/۱-۲۰/۰	-	[۱۵]
تیکلوپیدین	VA-SFODME	HPLC	۰/۰۰۱۷	۰/۰۰۶-۵/۵	۹۹/۵	
لوزارتان	VA-SFODME	HPLC	۰/۰۰۱	۰/۰۰۴-۴/۵	۱۵۳/۸	

حد تشخیص روش پیشنهادی نسبت به روش‌های بالا پایین‌تر است و همچنین دارای گستره خطی خوب می‌باشد. حجم حلال آلی و زمان مورد نیاز نیز برای استخراج تیکلوپیدین و لوزارتان در

^۱ Ionic liquid based dispersive liquid-liquid microextraction

این روش بسیار کم می‌باشد. بنابراین می‌توان گفت VA-SFODME یک روش بسیار ساده، سریع، موثر و سازگار با محیط زیست است.

۳-۴- نتیجه‌گیری

در این پروژه برای نخستین بار امکان استفاده از روش میکرواستخراج فاز مایع مبتنی بر انجام قطره آلی شناور توسط امولسیون‌سازی و رتکس و کروماتوگرافی مایع با کارایی برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری مقادیر کم تیکلوپیدین و لوزارتان مورد بررسی قرار گرفت. از مزایای روش پیشنهادی می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

✓ زمان استخراج بسیار کوتاه

✓ مصرف بسیار کم حلال استخراج

✓ دامنه خطی نسبتاً وسیع

✓ دقت و صحت بالا

✓ هزینه کم

۴-۴- آینده‌نگری

✓ کاربرد این روش در پیش‌تغلیظ دیگر ترکیبات دارویی

✓ استفاده از سایر روش‌های میکرواستخراج با فاز مایع برای پیش‌تغلیظ مقادیر کم

تیکلوپیدین و لوزارتان

- [1] E. Panak and M. Verry. (1993) "**Overview of Ticlopidine's Development**" Springer, pp. 13-25.
- [2] D. McTavish, D. Faulds and K.L. Goa. (1990) "Ticlopidine" **Drugs**, 40, 2, pp 238-259.
- [3] N.I.f.C. Excellence. (2011) "Hypertension: clinical management of primary hypertension in adults" **National Institute for Clinical Excellence, London**, pp.
- [4] K.L. Goa and A.J. Wagstaff. (1996) "Losartan potassium" **Drugs**, 51, 5, pp 820-845.
- [5] D.J. Carini, D.D. Christ, J.V. Duncia and M.E. Pierce. (1998) "**The discovery and development of angiotensin II antagonists**" Springer, pp. 29-56.
- [6] S.-h. Yang, Y.-a. Cho and J.-s. Choi. (2011) "Effects of ticlopidine on pharmacokinetics of losartan and its main metabolite EXP-3174 in rats" **Acta Pharmacologica Sinica**, 32, 7, pp 967-972.
- [7] O. Berasaluce, A. Baranda, A. Hidalgo, R. Alonso and R. Jimenez. (2003) "Determination of ticlopidine in human serum and plasma by gas chromatography-mass spectrometry" **Chromatographia**, 58, 9-10, pp 607-614.
- [8] A. Pena, C. Lino and M.I.N. Silveira. (2003) "Determination of ticlopidine in human plasma by capillary gas chromatography with ion trap detection" **J. Pharm. Biomed. Anal.**, 32, 4, pp 879-885.
- [9] N.C.d.C. Borges, G.D. Mendes, A. Borges, S.E.d. Oliveira, R.E. Barrientos-Astigarraga and G.D. Nucci. (2004) "Ticlopidine quantification in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. Application to bioequivalence study" **J. Mass Spectrom.**, 39, 12, pp 1562-1569.
- [10] M. Quaglia, A. Farina, E. Bossu and F. Romolo. (1993) "Analysis of ticlopidine and related impurities by capillary electrophoresis" **J. Pharm. Biomed. Anal.**, 11, 11, pp 1157-1160.
- [11] R. Kakde, A. Barsagade, N. Chaudhary and D. Kale. (2009) "Spectrophotometric Method for Estimation of Ticlopidine HCl in Bulk and Dosage Form" **Asian Journal of Research in Chemistry**, 2, 1, pp 73-75.
- [12] N.Ö. Can, G. Altioikka and H.Y. Aboul-Enein. (2008) "Determination of ticlopidine in pharmaceutical tablets by flow injection analysis using UV-detection" **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies®**, 31, 20, pp 3209-3218.
- [13] E. Türköz and A. Nur Onar. (2007) "Determination of ticlopidine in pharmaceutical products" **Anal. Lett.**, 40, 11, pp 2231-2240.
- [14] P.K. Yeung, P.T. Pollak, A. Jamieson, G.J. Smith and D. Fice. (2000) "Determination of plasma concentrations of losartan in patients by HPLC using solid phase extraction and UV detection" **Int. J. Pharm.**, 204, 1, pp 17-22.
- [15] R.N. Rao, S.S. Raju and R.M. Vali. (2013) "Ionic-liquid based dispersive liquid-liquid microextraction followed by high performance liquid chromatographic determination of anti-hypertensives in rat serum" **J. Chromatogr. B**, 931, pp 174-180.
- [16] M.A. Ritter, C.I. Furtek and M.-W. Lo. (1997) "An improved method for the simultaneous determination of losartan and its major metabolite, EXP3174, in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection" **J. Pharm. Biomed. Anal.**, 15, 7, pp 1021-1029.
- [17] S.S.A. El-Hay, M.Y. El-Mammlı and A.A. Shalaby. (2011) "Determination of clemastine hydrogen fumarate, desloratadine, losartan potassium and moxepiril HCl through binary complex formation with eosin" **Arabian Journal of Chemistry**, pp.
- [18] E. Cagigal, L. Gonzalez, R. Alonso and R. Jimenez. (2001) "Experimental design

methodologies to optimise the spectrofluorimetric determination of Losartan and Valsartan in human urine" **Talanta**, 54, 6, pp 1121-1133.

[19] M. Quaglia, E. Donati, G. Carlucci, P. Mazzeo and S. Fanali. (2002) "Determination of losartan and hydrochlorothiazide in tablets by CE and CEC" **J. Pharm. Biomed. Anal.**, 29, 6, pp 981-987.

[20] I. Habib, S. Weshahy, S. Toubar and M. El-Alamin. (2008) "Cathodic stripping voltammetric determination of losartan in bulk and pharmaceutical products" **Portugaliae Electrochimica Acta**, 26, 4, pp 315-324.

[21] S. Magiera and I. Baranowska. (2014) "A new and fast strategy based on semiautomatic microextraction by packed sorbent followed by ultra high performance liquid chromatography for the analysis of drugs and their metabolites in human urine" **J. Sep. Sci.**, 37, 22, pp 3314-3315.

[22] M.A. Obando, J.M. Estela and V. Cerdà. (2008) "Multi-syringe chromatography (MSC) system for the on-line solid-phase extraction and determination of hydrochlorothiazide and losartan potassium in superficial water, groundwater and wastewater outlet samples" **J. Pharm. Biomed. Anal.**, 48, 1, pp 212-217.

[23] D. Skoog, D. West, F. Holler and S. Crouch. (2013) "**Fundamentals of analytical chemistry**" Cengage Learning, pp.

[24] D. Harvey. (2000) "**Modern analytical chemistry**" 798, McGraw-Hill New York, pp.

[25] Z. Es'haghi, M.A. Golsefidi, A. Saify, A.A. Tanha, Z. Rezaeifar and Z. Alian-Nezhadi. (2010) "Carbon nanotube reinforced hollow fiber solid/liquid phase microextraction: a novel extraction technique for the measurement of caffeic acid in Echinacea purpurea herbal extracts combined with high-performance liquid chromatography" **J. Chromatogr. A**, 1217, 17, pp 2768-2775.

[26] F. Pena-Pereira, I. Lavilla and C. Bendicho. (2009) "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, 1, pp 1-15.

[27] P. Viñas, N. Campillo and V. Andruch. (2015) "Recent achievements in solidified floating organic drop microextraction" **TrAC, Trends Anal. Chem.**, 68, pp 48-77.

[28] M.R.K. Zanjani, Y. Yamini, S. Shariati and J.Å. Jönsson. (2007) "A new liquid-phase microextraction method based on solidification of floating organic drop" **Anal. Chim. Acta**, 585, 2, pp 286-293.

[29] J. Ma, W. Lu and L. Chen. (2012) "Recent advances in dispersive liquid-liquid microextraction for organic compounds analysis in environmental water: a review" **Current Analytical Chemistry**, 8, 1, pp 78-90.

[30] J.N. Miller and J.C. Miller. (2005) "**Statistics and chemometrics for analytical chemistry**" Pearson Education, pp.

[31] D.C. Montgomery, D.C. Montgomery and D.C. Montgomery. (1984) "**Design and analysis of experiments**" 7, Wiley New York, pp.

[32] K. Sharif, M. Rahman, J. Azmir, A. Mohamed, M. Jahurul, F. Sahena and I. Zaidul. (2014) "Experimental design of supercritical fluid extraction—A review" **J. Food Eng.**, 124, pp 105-116.

[33] S.N. Deming and S.L. Morgan. (1993) "**Experimental Design: A Chemometric Approach: A Chemometric Approach**" 11, Elsevier, pp.

[34] R. Leardi. (2009) "Experimental design in chemistry: a tutorial" **Anal. Chim. Acta**, 652, 1, pp 161-172.

[35] T. Lundstedt, E. Seifert, L. Abramo, B. Thelin, Å. Nyström, J. Pettersen and R.

- Bergman. (1998) "Experimental design and optimization" **Chemometrics and intelligent laboratory systems**, 42, 1, pp 3-40.
- [36] B. Dejaegher and Y. Vander Heyden. (2011) "Experimental designs and their recent advances in set-up, data interpretation, and analytical applications" **J. Pharm. Biomed. Anal.**, 56, 2, pp 141-158.
- [37] D.B. Hibbert. (2012) "Experimental design in chromatography: a tutorial review" **J. Chromatogr. B**, 910, pp 2-13.
- [38] A.R. Tengli, B. Gurupadayya and N. Soni. (2013) "Simultaneous estimation of hydrochlorothiazide, amlodipine, and losartan in tablet dosage form by RP-HPLC" **International Journal of Chemical and Analytical Science**, 4, 1, pp 33-38.
- [39] K. Seebunrueng, Y. Santaladchaiyakit and S. Srijaranai. (2014) "Vortex-assisted low density solvent based demulsified dispersive liquid-liquid microextraction and high-performance liquid chromatography for the determination of organophosphorus pesticides in water samples" **Chemosphere**, 103, pp 51-58.
- [40] S. Soltani, A.M. Ramezani, N. Soltani and A. Jouyban. (2012) "Analysis of losartan and carvedilol in urine and plasma samples using a dispersive liquid-liquid microextraction isocratic HPLC-UV method" **Bioanalysis**, 4, 23, pp 2805-2821.

پیوست‌ها

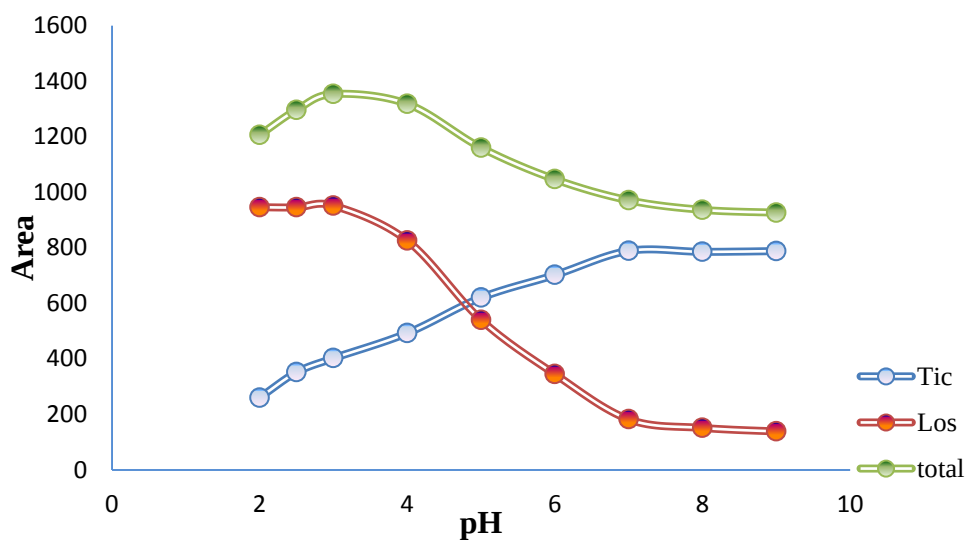
نتایج و نمودارهای حاصل از روش بهینه‌سازی یک متغیر در یک زمان

روش کار:

در یک لوله آزمایش ۱/۰ میلی‌لیتر از محلول ۱۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر تیکلوپیدین، ۱/۰ میلی‌لیتر از محلول ۱۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر لوزارتان، مقداری بافر با pH مورد نظر اضافه و توسط آب مقطر به حجم نهایی ۱۰/۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس به‌وسیله یک میکروپیپت، مقدار مورد نظر از حلال ۱-دودکانول به عنوان حلال استخراج به سطح محلول نمونه اضافه شد. در مرحله بعد به‌منظور امولسیون‌سازی مخلوط، لوله آزمایش به مدت زمان مورد نظر در دستگاه ورتکس قرار گرفت. پس از اتمام عمل استخراج، لوله آزمایش به حمام یخ منتقل گردید و بعد از گذشت ۲۰ دقیقه، قطره آلی منجمد، در سطح محلول تشکیل گردید. سپس قطره آلی منجمد شده توسط اسپاتول به یک ویال منتقل شد. بدلیل اینکه حلال ۱-دودکانول در دمای اتاق نسبتاً منجمد است، قطره آلی توسط ۵/۰ میکرولیتر متانول رقیق شد و در انتها مقداری از آن با دقت به دستگاه HPLC تزریق گردید.

جدول ۱: نتایج حاصل از بررسی اثر pH بر میزان استخراج تیکلوپیدین و لوزارتان

pH	سیگنال تیکلوپیدین	سیگنال لوزارتان	مجموع سیگنال‌ها
۲	۲۶۰/۳	۹۴۶/۴	۱۲۰۶/۷
۲/۵	۳۵۱/۶	۹۴۵/۶	۱۲۹۷/۲
۳	۴۰۲/۴	۹۵۱/۹	۱۳۵۴/۳
۴	۴۹۲/۷	۸۲۶/۱	۱۳۱۸/۸
۵	۶۲۰/۷	۵۴۰/۲	۱۱۶۰/۹
۶	۷۰۲/۲	۳۴۴/۸	۱۰۴۷/۰
۷	۷۸۹/۲	۱۸۲/۰	۹۷۱/۲
۸	۷۸۵/۶	۱۵۱/۲	۹۳۶/۸
۹	۷۸۸/۴	۱۳۸/۶	۹۲۷/۰

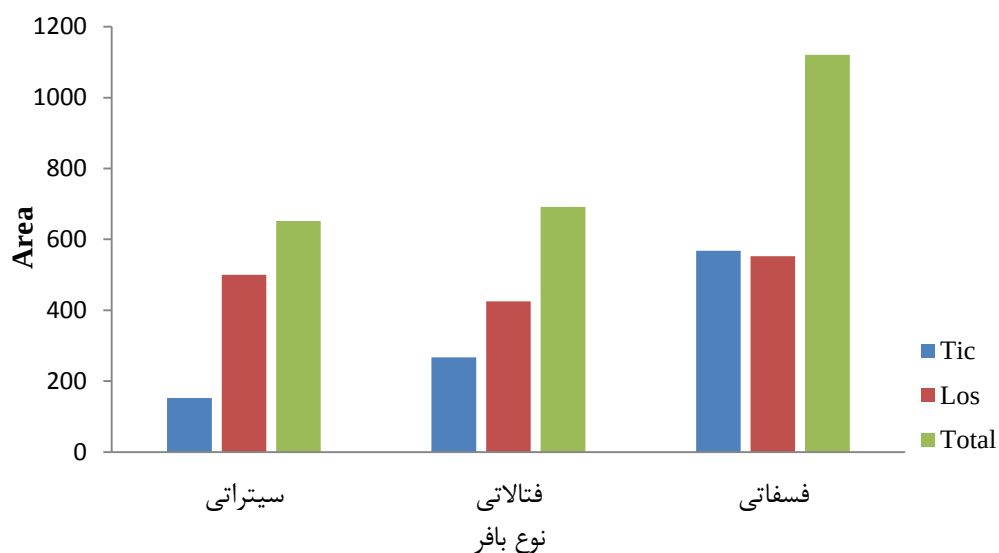


شکل ۱پ: نمودار تاثیر pH بر میزان استخراج

شرایط آزمایش: غلظت تیکلوپیدین و لوزارتان ۱/۰ میلی گرم بر لیتر، ۲/۰ میلی لیتر بافر فسفات، ۱۰/۰ میلی لیتر حجم محلول نمونه، زمان استخراج ۲ دقیقه، حلال استخراج ۱-دودکانول، حجم حلال استخراج ۳۰/۰ میکرولیتر

جدول ۲: نتایج حاصل از بررسی اثر نوع بافر بر میزان استخراج تیکلوپیدین و لوزارتان

نوع بافر	سیگنال تیکلوپیدین	سیگنال لوزارتان	مجموع سیگنال‌ها
فسفاتی	۵۶۸/۶	۵۵۲/۳	۱۱۲۰/۹
سیتراتی	۱۵۱/۸	۵۰۰/۲	۶۵۲/۰
فتالاتی	۲۶۷/۰	۴۲۵/۰	۶۹۲/۰

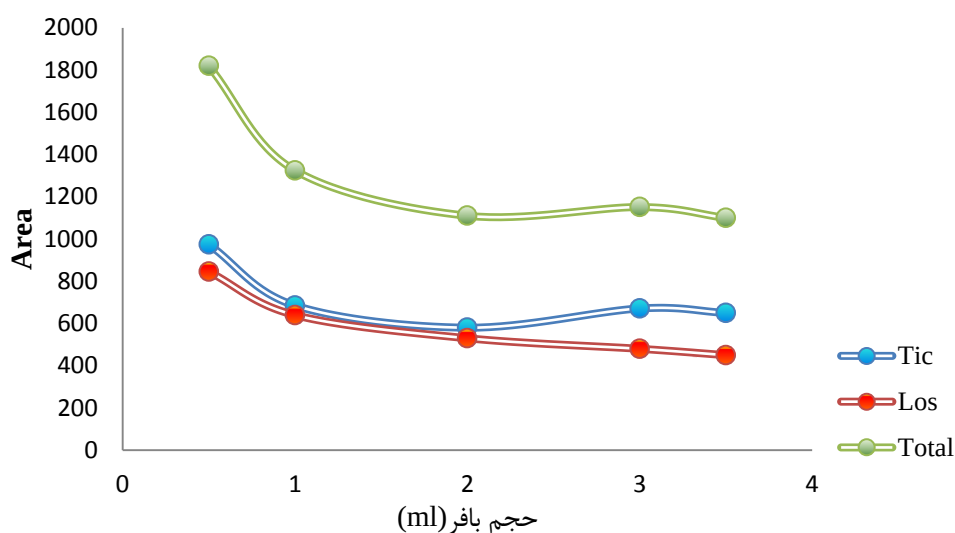


شکل ۲پ: نمودار تاثیر نوع بافر بر میزان استخراج

شرایط آزمایش: غلظت تیکلوپیدین و لوزارتان ۱/۰ میلی گرم بر لیتر، ۲/۰ میلی لیتر بافر با pH=۵/۰، ۱۰/۰ میلی لیتر حجم محلول نمونه، زمان استخراج ۲ دقیقه، حلال استخراج ۱-دودکانول، حجم حلال استخراج ۳۰/۰ میکرولیتر

جدول ۳: نتایج حاصل از بررسی اثر حجم بافر بر میزان استخراج تیکلوپیدین و لوزارتان

حجم بافر	سیگنال تیکلوپیدین	سیگنال لوزارتان	مجموع سیگنال‌ها
۰/۵	۹۷۳/۹	۸۴۵/۲	۱۸۱۹/۱
۱/۰	۶۸۵/۰	۶۳۹/۶	۱۳۲۴/۶
۲/۰	۵۸۰/۰	۵۳۰/۰	۱۱۱۰/۰
۳/۰	۶۷۱/۱	۴۸۱/۰	۱۱۵۲/۱
۳/۵	۶۵۰/۰	۴۵۲/۲	۱۱۰۲/۲

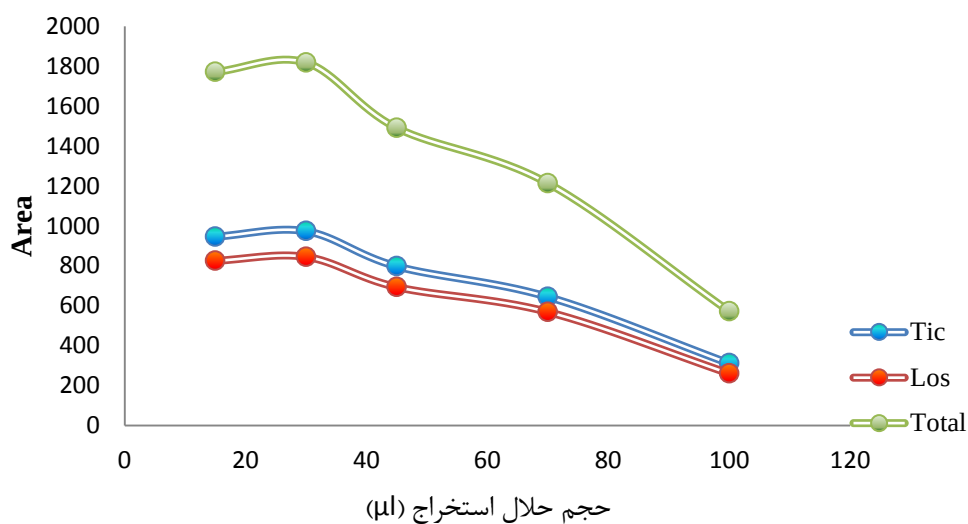


شکل ۳پ: نمودار تاثیر حجم بافر بر میزان استخراج

شرایط آزمایش: غلظت تیکلوپیدین و لوزارتان ۱/۰ میلی گرم بر لیتر، بافر فسفات با pH=۵/۰، ۱۰/۰ میلی لیتر حجم محلول نمونه، زمان استخراج ۲ دقیقه، حلال استخراج ۱-دودکانول، حجم حلال استخراج ۳۰/۰ میکرولیتر

جدول ۴: نتایج حاصل از بررسی اثر حجم حلال استخراج بر میزان استخراج تیکلوپیدین و لوزارتان

حجم حلال	سیگنال تیکلوپیدین	سیگنال لوزارتان	مجموع سیگنال‌ها
۱۵/۰	۹۴۶/۶	۸۲۵/۶	۱۷۷۲/۲
۳۰/۰	۹۷۳/۹	۸۴۵/۲	۱۸۱۹/۱
۴۵/۰	۷۹۷/۷	۶۹۳/۸	۱۴۹۱/۵
۷۰/۰	۶۴۴/۹	۵۶۹/۴	۱۲۱۴/۳
۱۰۰/۰	۳۱۱/۳	۲۶۰/۸	۵۷۲/۱

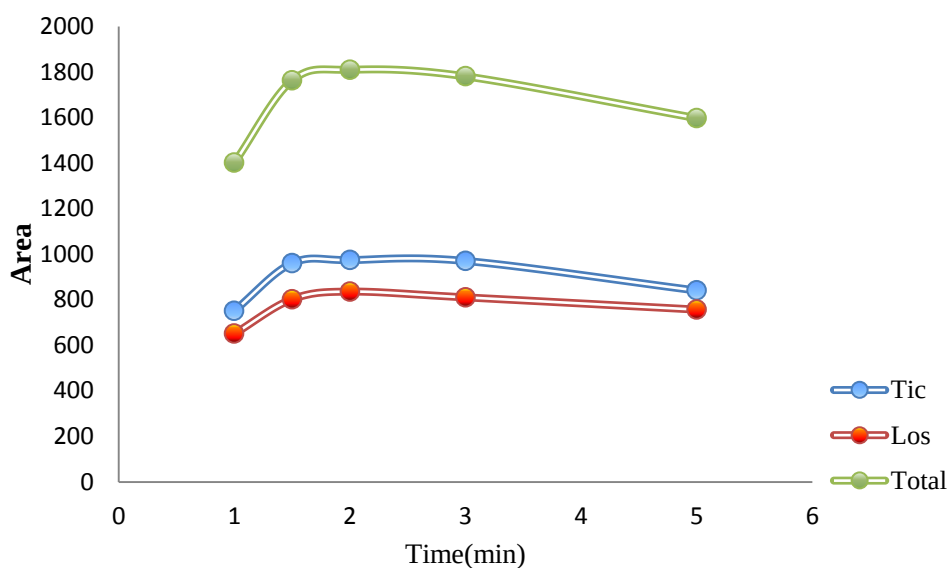


شکل ۴پ: نمودار تاثیر حجم حلال استخراج بر میزان استخراج

شرایط آزمایش: غلظت تیکلوپیدین و لوزارتان ۱/۰ میلی گرم بر لیتر، ۰/۵ میلی لیتر بافر فسفاتی با pH=۵/۰، ۱۰/۰ میلی لیتر حجم محلول نمونه، زمان استخراج ۲ دقیقه، حلال استخراج ۱-دودکانول

جدول ۵: نتایج حاصل از بررسی اثر زمان بر میزان استخراج تیکلوپیدین و لوزارتان

زمان (min)	سیگنال تیکلوپیدین	سیگنال لوزارتان	مجموع سیگنال‌ها
۱/۰	۷۵۰/۷	۶۵۰/۲	۱۴۰۰/۹
۱/۵	۹۶۰/۲	۸۰۱/۹	۱۷۶۲/۱
۲/۰	۹۷۳/۹	۸۳۵/۷	۱۸۰۹/۶
۳/۰	۹۷۰/۲	۸۱۰/۳	۱۷۸۰/۵
۵/۰	۸۴۰/۳	۷۵۶/۷	۱۵۹۷/۰

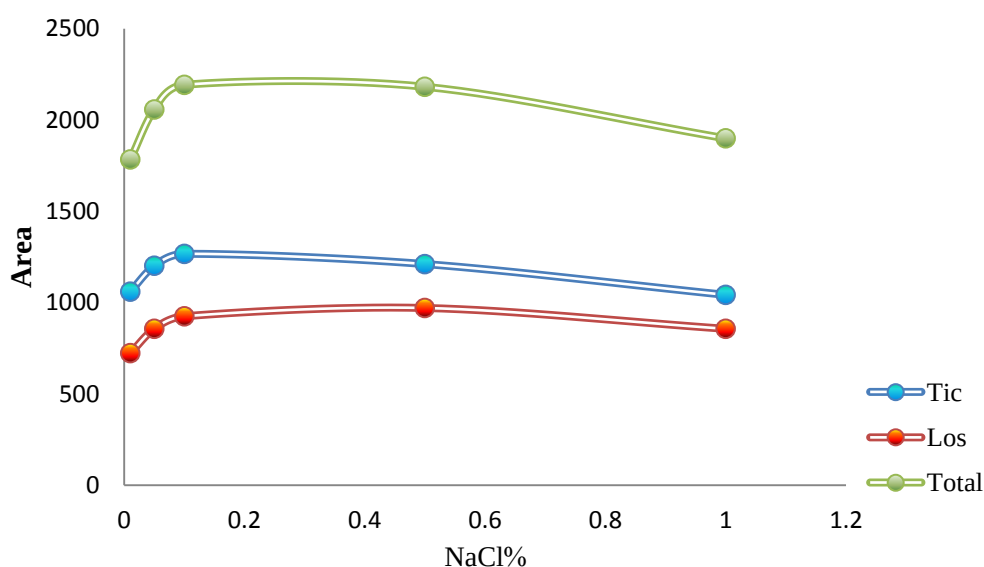


شکل ۵: نمودار تاثیر زمان بر میزان استخراج

شرایط آزمایش: غلظت تیکلوپیدین و لوزارتان ۱/۰ میلی گرم بر لیتر، ۰/۵ میلی لیتر بافر فسفات با pH=۵/۰، ۱۰/۰ میلی لیتر حجم محلول نمونه، حلال استخراج ۱-دودکانول، حجم حلال استخراج ۳۰/۰ میکرولیتر

جدول ۶: نتایج حاصل از بررسی اثر قدرت یونی بر میزان استخراج تیکلوپیدین و لوزارتان

درصد NaCl	سیگنال تیکلوپیدین	سیگنال لوزارتان	مجموع سیگنال‌ها
۰/۰۱	۱۰۶۰/۴	۷۲۲/۶	۱۷۸۳/۰
۰/۰۵	۱۲۰۰/۸	۸۵۶/۴	۲۰۵۷/۲
۰/۱۰	۱۲۶۶/۹	۹۲۵/۳	۲۱۹۲/۲
۰/۵۰	۱۲۱۰/۹	۹۷۰/۵	۲۱۸۱/۴
۱/۰۰	۱۰۴۲/۳	۸۵۶/۵	۱۸۹۸/۸



شکل ۶: نمودار تاثیر قدرت یونی بر میزان استخراج

شرایط آزمایش: غلظت تیکلوپیدین و لوزارتان ۱/۰ میلی گرم بر لیتر، ۰/۵ میلی لیتر بافر فسفاتی با pH=۵/۰، ۱۰/۰ میلی لیتر حجم محلول نمونه، حلال استخراج ۱-دودکانول، حجم حلال استخراج ۳۰/۰ میکرولیتر، زمان استخراج ۲ دقیقه

Abstract

In this study, for the first time a simple, rapid, and highly efficient liquid-phase microextraction method based on the vortex-assisted emulsification solidified floating organic drop, followed by high performance liquid chromatography equipped with UV detection, has been developed for simultaneous preconcentration and determination of Ticlopidine (Tic) and losartan (Los). In this method, a few microliters of 1-dodecanol was delivered to the surface of solution containing trace amounts of Tic and Los. Then this solution was vortexed for a desired time. Then sample solution was cooled by inserting it into an ice bath for a short time. The solidified 1-dodecanol containing analytes was transferred into a suitable vial and immediately melted, it was diluted by 5.0 µl of methanol and injected to HPLC. Full factorial design was used as Screening method to select the important variables that effect extraction efficiency. Then Central composite face-centered design (CCF) was used for optimization of selected factors by Full factorial design such as pH and volume of organic solvent. The calibration curves were linear in the range of 0.006-5.5 ppm for Tic and 0.004-4.5 ppm for Los. Under the optimum conditions, the detection limits were 1.7 ppb for Tic and 1.0 ppb for Los. Preconcentration factor were 99.5 for Tic and 153.8 for Los. The relative standard deviation for five replicate measurements of 1.0 and 4.0 ppm of Tic and Los were obtained 1.1 and 0.8 %, 1.8 and 0.5% respectively.

Keywords: Ticlopidine, Losartan, 1-dodecanol, Liquid-phase microextraction based on the vortex-assisted emulsification solidified floating organic drop, Experimental design, Central composite face-centered design



Shahrood University of Technology

**Preconcentration and determination of ticlopidine and losartan by
vortex assisted emulsification solidified floating organic drop
microextraction and high performance liquid chromatography**

Mohsen Amiri

Supervisor:

Dr. Nasser Goudarzi

Advisor:

Dr. Fatemeh Masdarolomour

September 2015