

الحمد لله الذي
خلقنا من
الطين
الذي
خلقنا من
الطين



دانشکده شیمی

پایان نامه کارشناسی ارشد

کاربرد استخراج مایع-مایع جریان مخالف هموزن با اثر نمک خارج کننده و میکرو استخراج
مایع-مایع پخشی جفت شده با HPLC برای پیش تغلیظ و تعیین همزمان آلپرازولام و
کلودیازپوکساید

نگارنده:

عادلہ عبادی

استاد راهنما:

دکتر ناصر گودرزی

استاد مشاور:

دکتر منصور عرب چم جنگلی

شهریور ۱۳۹۶

شماره: ۱۲۱۲ و.ش
تاریخ: ۱۸، ۷، ۹۶

باسمه تعالی



مدیریت تحصیلات تکمیلی

فرم شماره (۳) صورتجلسه نهایی دفاع از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد

با نام و یاد خداوند متعال، ارزیابی جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد خانم / آقای عادلہ عبادی با شماره دانشجویی ۹۳۱۱۶۱۴ رشته شیمی گرایش تجزیه تحت عنوان کاربرد استخراج مایع - مایع جریان مخالف هموزن با اثر نمک خارج کننده و میکرو استخراج مایع - مایع بخشی جفت شده با HPLC برای پیش تغلیظ و تعیین همزمان آلبراولام و کلرودیازپوکساید که در تاریخ ۹۶/۰۶/۲۱ با حضور هیأت محترم داوران در دانشگاه صنعتی شاهرود برگزار گردید به شرح ذیل اعلام می گردد:

قبول (با امتیاز ۱۹/۰۰ درجه عالی) ☒ مردود ☐
نوع تحقیق: نظری ☐ عملی ☒

عضو هیأت داوران	نام و نام خانوادگی	مرتبه علمی	اعضاء
۱- استاد راهنمای اول	دکتر ناصر گودرزی	دانشیار	
۲- استاد راهنمای دوم			
۳- استاد مشاور	دکتر سمیرا عرب جم جنگلی	استاد	
۴- نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر زهرا کلانتر کهدمی	استادیار	
۵- استاد منتحن اول	دکتر فتمعلی باقریان دهقی	دانشیار	
۶- استاد منتحن دوم	دکتر مهدی میرزایی	استادیار	



نام و نام خانوادگی رئیس دانشکده:

تاریخ و امضاء و مهر دانشکده:

نسخه: در صورتی که کسی مردود شود حداکثر یکبار دیگر (در مدت مجاز تحصیل) می تواند از پایان نامه خود دفاع نماید (دفاع مجدد باید زودتر از ۲ ماه برگزار شود).

تقدیم بہ

والا ترین و مقدس ترین ہدایای خداوند مہربان:

پدرم بہ استواری کوه

مادرم بہ مہربانی خورشید

ہمسر عزیزم، صمیمی تر از دوست

استاد فرزانه ام، بہ صبوری زمین

و برادر و خواہرا نم، ہمیشہ یاورانم

کہ تجلی حضور پر مہر و سخاوت بی حدیگانہ پروردگارم، مستند.

تقدیر و شکر از

پروردگارم، که بزرگترین امید و یاور در لحظه لحظه زندگیم است. تنها تو را می پرستم و تنها از تو یاری میجویم، مرا به راه راست هدایت فرما، راه کسانی که بر آنان نعمت بخشیدی، نه راه کسانی که بر آنان خشم فرمودی و نه کمر ایشان...

نه میتوانم موایشان را که در راه عزت من سفید شد، سیاه کنم و نه برای دست های پینه بسته شان که ثمره تلاش برای افتخار من است، مرهمی دارم. پس تو فیتقم ده که هر لحظه شکر گزارشان باشم و ثانیه های عمرم را در عصای دست بودنشان بگذرانم.

بازده ذره وجودم سپاسگزار و قدردان تمامی حمایت ها، محبت ها، همراهی ها و نثار لحظه های عمرتان در راه پیشرفت من، پدر صبور و مادر مهربان و بهمنفر ابدی لحظه های زندگیم، بهمنسر عزیزم.

به مصداق «من لم یسکر المخلوق لم یسکر الخالق» بسی شایسته است از استاد فرهیخته و فرزانه جناب آقای دکتر ناصر کو درزی که از محضر پر فیض تدریستان، بهره باربرده ام و با کرامتی چون خورشید، سرزمین دل را روشنی بخشید و انجام این پروژه را با راهنمایی های کار ساز و سازنده بارور ساختند؛ تقدیر و شکر نمایم. با استنان بی کران از مساعدت های بی شائبه آقای دکتر منصور عرب چم جنگلی که قبول بکارگری در سمت مشاور این پایان نامه را بر عهده گرفتند. شکر و سپاس فراوان از استاد دانشمند آقای دکتر باقریان که از محضر پر فیض تدریستان، بهره باربرده ام و بهواره اسوه استاد اخلاق و صبر در زندگی من خواهند بود. با سپاس بی دریغ خدمت تمامی دوستان صمیمی و مهربانم، که مایه آرامش و خاطرات شیرین در این دوران شدند و تمامی کارکنان دانشکده شیمی آقایان یزدانی و طاهری و مومنی و... و سرکار خانم اشرفی و خانم فارسی و خواهران برزویی و تمامی کسانی که به نوعی مراد به انجام رساندن این مهم یاری نموده اند.

تعهد نامه

اینجانب عادلہ عبادی دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته شیمی تجزیه، دانشکده شیمی دانشگاه شاهرود نویسنده پایان نامه جداسازی و اندازه گیری بعضی داروهای آرام بخش با استفاده از روش میکرواستخراج قطره آلی شناور جامد با کمک افزایش سورفاکتانت و امواج مافوق صوت جفت شده با کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، تحت راهنمایی 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 شاهرود می باشد و مقالات مستخرج با نام «دانشگاه شاهرود» و یا «Shahrood University» به چاپ خواهد رسید.
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که از موجود زنده (یا بافتهای آن ها) 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

امضای دانشجو

مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، کتاب، برنامه های رایانه ای، نرم افزارها و تجهیزات ساخته شده است) متعلق به دانشگاه 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 پروژه، روش استخراج مایع-مایع جریان مخالف هموژن با استفاده از اثر نمک خارج کننده و ترکیب آن با میکرو استخراج مایع-مایع پخشی برای پیش تغلیظ و تعیین همزمان آلپرازولام و کلرودیازپوکساید به وسیله ی کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا با آشکار ساز ماوراء بنفش به کار برده شد. از حلال استونیتریل به عنوان حلال استخراج مرحله اول و حلال پخش در مرحله دوم و حلال ۱-آندکانول به منظور حلال استخراج مرحله دوم به دلیل داشتن چگالی کمتر از آب و نقطه ذوب نزدیک به دمای محیط استفاده شد. بعضی از پارامترهای مؤثر بر استخراج مانند pH، حجم حلال استخراج مرحله اول و اثر نمک با روش طراحی آزمایش بهینه شدند. تحت شرایط بهینه، منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ برای دو داروی کلرودیازپوکساید و آلپرازولام به ترتیب در محدوده ۰/۰۱۷ تا ۵/۶ و ۰/۰۱۰ تا ۵/۵ میلی گرم بر لیتر خطی بوده، و همچنین حد تشخیص ۱/۹ میکروگرم بر لیتر برای آلپرازولام و ۱/۳ میکروگرم بر لیتر برای کلرودیازپوکساید به دست آمد. فاکتور پیش تغلیظ برای آلپرازولام ۹۹/۳ و برای کلرودیازپوکساید ۱۰۴/۹ به دست آمد. انحراف استاندارد نسبی برای سه اندازه گیری تکراری در غلظت های ۰/۶۰ و ۱/۵۰ و ۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر برای آلپرازولام به ترتیب ۳/۳ و ۲/۰ و ۱/۷ و برای کلرودیازپوکساید ۱/۹ و ۱/۵ و ۱/۵ به دست آمد. این روش برای تعیین غلظت این داروها در نمونه های حقیقی مانند قرص، ادرار و سرم خون به کار برده شد.

کلمات کلیدی: کلرودیازپوکساید، آلپرازولام، میکرو استخراج مایع مایع پخشی، اثر نمک خارج کننده،

طراحی آزمایش

مقالات مستخرج از پایان نامه:

1. Adeleh ebadi, Nasser Goudarzi, Mansour Arab Chamjangali, “Separation and determination of Alprazolam and Chlordiazepoxide by counter current salting-out homogenous liquid–liquid extraction joined with the dispersive liquid–liquid micro-extraction (DLLME) coupled with HPLC”, **(2016)**, *ICS Seminar of Analytical Chemistry 24th*, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran

فهرست مطالب

فصل ۱

- ۱-۱ بنزودیازپین..... ۲
- ۲-۱ خواص بنزودیازپین ها ۳
- ۳-۱ تاریخچه بنزودیازپین ها ۴
- ۴-۱ اهمیت اندازه گیری بنزودیازپین ها ۷
- ۵-۱ روش های مختلف اندازه گیری بنزودیازپین ها ۸
- ۶-۱ مروری بر کارهای انجام شده برای اندازه گیری بنزودیازپین ها ۸

فصل ۲

- ۱-۲ کروماتوگرافی ۱۶
- ۱-۱-۲ کروماتوگرافی تقسیمی ۱۷
- ۱-۱-۲-۱ کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) ۱۸
- ۲-۲ مقدمه ای بر روش های آماده سازی نمونه ۱۹
- ۱-۲-۲ استخراج ۲۰
- ۲-۲-۲ استخراج مایع مایع (LLE) ۲۱
- ۳-۲-۲ میکرواستخراج فاز مایع (LPME) ۲۱

۲۴.....	۴-۲-۲ میکرواستخراج مایع-مایع بخشی بر اساس جامدسازی قطره آلی شناور (DLLME-SFOD)
۲۷.....	۳-۲ روش‌های بهینه سازی پارامترها
۲۸.....	۳-۲-۱ روش تک متغیره
۲۸.....	۳-۲-۲ طراحی آزمایش
۲۹.....	۳-۲-۳ اصول اولیه طراحی آزمایش
۳۱.....	۴-۳-۲ دسته بندی روش‌های طراحی آزمایش
۳۱.....	۴-۳-۲-۱ طرح غربالگری
۳۱.....	۴-۳-۲-۲ طرح فاکتوریل
۳۲.....	۴-۳-۲-۳ طرح پلاکت-برمن
۳۳.....	۵-۳-۲ طراحی بهینه سازی
۳۴.....	۵-۳-۲-۱ طرح‌های چندسطحی
۳۴.....	۵-۳-۲-۲ طرح مرکب مرکزی
۳۶.....	۵-۳-۲-۳ طرح باکس-بنکن

فصل ۳

۳۸.....	۳-۱ مقدمه
۳۸.....	۳-۲ مواد مورد استفاده و طرز تهیه محلول‌ها
۳۹.....	۳-۳ تجهیزات و دستگاه‌های مورد استفاده
۴۰.....	۳-۴ شرایط کروماتوگرافی
۴۰.....	۳-۴-۱ ثبت طیف UV آنالیت‌ها و انتخاب بهترین طول موج

۴۱.....	۵-۳ روش کار در بهینه سازی پارامترهای مؤثر در اندازه گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام
۴۴.....	۶-۳ منحنی کالیبراسیون مستقیم
۴۴.....	۷-۳ بررسی و بهینه سازی فاکتورهای مؤثر در پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام
	۸-۳ بررسی و بهینه سازی فاکتورهای مؤثر بر پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام با استفاده از طراحی آزمایش
۴۸.....	۱-۸-۳ تعیین سطح فاکتورها
۵۰.....	۱-۱-۸-۳ طراحی آزمایش در طرح پلاکت-برمن جهت تعیین فاکتورهای مهم
۵۱.....	۲-۱-۸-۳ تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از طرح پلاکت-برمن و تعیین عوامل مهم
	۲-۸-۳ کاربرد طرح باکس-بنکن جهت به‌دست آوردن شرایط بهینه فاکتورهای مؤثر بر پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری آلپرازولام و کلرودیازپوکساید
۵۷.....	۱-۲-۸-۳ اجرای طرح باکس-بنکن (BBD)
۶۴.....	۲-۲-۸-۳ ارزیابی مدل
۶۴.....	۳-۲-۸-۳ تحلیل واریانس
۶۷.....	۴-۲-۸-۳ نمودار احتمال نرمال باقی مانده‌ها
۶۹.....	۵-۲-۸-۳ نمودار باقی مانده در برابر ترتیب زمان
۷۰.....	۶-۲-۸-۳ نمودار باقی مانده‌ها در مقابل مقادیر برازش شده
۷۲.....	۷-۲-۸-۳ منحنی‌های روبه پاسخ
۷۵.....	۳-۸-۳ توجیه فاکتورهای مؤثر بر پیش‌تغلیظ و اندازه گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام
۷۵.....	۱-۳-۸-۳ بررسی اثر pH فاز آبی بر میزان استخراج
۷۶.....	۲-۳-۸-۳ بررسی اثر نوع بافر
۷۷.....	۳-۳-۸-۳ بررسی اثر حجم بافر

۷۷.....	۴-۳-۸-۳ بررسی اثر نوع حلال استخراج کننده مرحله اول
۷۸.....	۵-۳-۸-۳ بررسی اثر حجم حلال استخراج کننده
۷۸.....	۶-۳-۸-۳ بررسی اثر نوع حلال استخراج کننده مرحله دوم
۷۹.....	۷-۳-۸-۳ بررسی اثر حجم حلال استخراج کننده مرحله دوم
۷۹.....	۸-۳-۸-۳ بررسی اثر قدرت یونی (اثر نمک)
۸۰.....	۹-۳-۸-۳ بررسی اثر سرعت جریان
۸۰.....	۱۰-۳-۸-۳ بررسی اثر زمان اولتراسونیک (حمام فراصوت با فرکانس ۶۰/۰ کیلوهرتز)
۸۱.....	۱۱-۳-۸-۳ بررسی اثر زمان سانتریفیوژ
۸۱.....	۱۲-۳-۸-۳ بررسی اثر دور سانتریفیوژ
۸۲.....	۹-۳ رسم منحنی های کالیبراسیون پیش تغلیظ
۸۲.....	۱-۹-۳ رسم منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ کلرودیازپوکساید
۸۲.....	۲-۹-۳ رسم منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ آلپرازولام
۸۵.....	۱۰-۳ بررسی اثر گونه های مزاحم
۸۶.....	۱۱-۳ ارقام شایستگی روش
۸۷.....	۱-۱۱-۳ دقت و صحت
۸۹.....	۱۲-۳ فاکتور پیش تغلیظ
۸۹.....	۱۳-۳ اندازه گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام در نمونه های حقیقی
۸۹.....	۱-۱۳-۳ نحوه آماده سازی نمونه قرص آلپرازولام و کلرودیازپوکساید
۹۱.....	۲-۱۳-۳ نحوه آماده سازی سرم خون
۹۱.....	۳-۱۳-۳ نحوه آماده سازی ادرار

فصل ۴

۱-۴ ارقام شایستگی روش ۹۸

۲-۴ مقایسه روش پیشنهادی با برخی روش‌های موجود ۹۸

۳-۴ نتیجه‌گیری ۱۰۰

۴-۴ آینده‌نگری ۱۰۱

پیوست

نمودارها و نتایج بررسی یک متغیر در زمان برای اندازه‌گیری آلپرازولام و کلرودیازپوکساید ۱۰۲

منابع ۱۱۵

فهرست شکل‌ها

فصل ۱

- شکل (۱-۱) ساختار کلی بنزودیازپین ۲
- شکل (۲-۱) ساختار آلپرازولام ۶
- شکل (۳-۱) ساختار کلرودیازپوکساید ۶

فصل ۲

- شکل (۱-۲) تقسیم‌بندی انواع میکرواستخراج فاز مایع ۲۳
- شکل (۲-۲) مدل عمومی یک فرآیند [۶۲] ۲۹
- شکل (۳-۲) طراحی آزمایش در طرح مرکب مرکزی [۷۰] ۳۵
- شکل (۴-۲) طراحی آزمایش در روش باکس-بنکن [۶۷] ۳۶

فصل ۳

- شکل (۱-۳) طیف جذبی آلپرازولام و کلرودیازپوکساید، شرایط آزمایش: غلظت آلپرازولام و کلرودیازپوکساید $(10^{-5}$ میلی گرم بر لیتر)، حلال فاز متحرک (مخلوطی آر بافر فسفات pH برابر ۷/۲۵، با غلظت 0.1 M)، متانول و آب با نسبت ۲۵:۵۵:۲۰. رنگ آبی مربوط به طول موج ۲۲۲ نانومتر و دارو آلپرازولام و رنگ قرمز مربوط به طول موج ۲۶۰ نانومتر و دارو کلرودیازپوکساید می‌باشد. ۴۱
- شکل (۲-۳) کروماتوگرام محلول استاندارد $20/0$ میلی گرم بر لیتر آلپرازولام و کلرودیازپوکساید، ترکیب بافر فسفات pH برابر با ۷/۲۵، آب و متانول با نسبت ۲۵:۵۵:۲۰ به عنوان فاز متحرک، سرعت جریان ۱ میلی لیتر بر دقیقه، رنگ آبی مربوط به طول موج ۲۲۲ نانومتر و دارو آلپرازولام و رنگ قرمز مربوط به طول موج ۲۶۰ نانومتر و دارو کلرودیازپوکساید می‌باشد. ۴۳

شکل (۳-۳) کروماتوگرام پیش تغلیظ محلول ۱/۵۰ میلی گرم بر لیتر آلپرازولام و کلرودیازپوکساید تحت شرایط بهینه، ترکیب بافر فسفاتی با pH برابر با ۷/۲۵، آب و متانول با نسبت ۵۵:۲۵:۲۰ به عنوان فاز متحرک، سرعت جریان ۱ میلی لیتر بر دقیقه، رنگ آبی مربوط به طول موج ۲۲۲ نانومتر و دارو آلپرازولام و رنگ قرمز مربوط به طول موج ۲۶۰ نانومتر و دارو کلرودیازپوکساید می باشد. ۴۳

شکل (۴-۳) منحنی کالبراسیون مستقیم آلپرازولام: غلظت های مختلفی از آنالیت در حجم ۱ میلی لیتر در حلال ۱-آندکانول ترکیب بافر فسفاتی با pH برابر با ۷/۲۵، آب و متانول با نسبت ۵۵:۲۵:۲۰ به عنوان فاز متحرک، سرعت جریان ۱ میلی لیتر بر دقیقه و طول موج ۲۲۲ نانومتر ۴۵

شکل (۵-۳) منحنی کالبراسیون مستقیم کلرودیازپوکساید. غلظت های مختلفی از آنالیت در حجم ۱ میلی لیتر در حلال ۱-آندکانول ترکیب بافر فسفاتی با pH برابر با ۷/۲۵، آب و متانول با نسبت ۵۵:۲۵:۲۰ به عنوان فاز متحرک، سرعت جریان ۱ میلی لیتر بر دقیقه و طول موج ۲۶۰ نانومتر ۴۶

شکل (۶-۳): نمودار پارتو اثر فاکتورها بر پیش تغلیظ و اندازه گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام ۵۶

شکل (۷-۳): نمودار احتمال نرمال اثر فاکتورها بر پیش تغلیظ و اندازه گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام ۵۷

شکل (۸-۳): نمودار باقی مانده ها برای پیش تغلیظ و اندازه گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام در طراحی باکس- بنکن مربوط به پاسخ آلپرازولام ۶۸

شکل (۹-۳): نمودار باقی مانده ها برای پیش تغلیظ و اندازه گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام در طراحی باکس- بنکن مربوط به پاسخ کلرودیازپوکساید ۶۸

شکل (۱۰-۳): نمودار باقی مانده ها به ترتیب زمان جمع آوری برای پیش تغلیظ و اندازه گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام در طراحی باکس- بنکن مربوط به پاسخ آلپرازولام ۶۹

شکل (۱۱-۳): نمودار باقی مانده ها به ترتیب زمان جمع آوری برای پیش تغلیظ و اندازه گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام در طراحی باکس- بنکن مربوط به پاسخ کلرودیازپوکساید ۷۰

شکل (۳-۱۲): نمودار باقیمانده در مقابل مقدار برآزش برای پیش تغلیظ و اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام در طراحی باکس - بنکن مربوط به پاسخ آلپرازولام ۷۱

شکل (۳-۱۳): نمودار باقیمانده در مقابل مقدار برآزش برای پیش تغلیظ و اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام در طراحی باکس - بنکن مربوط به پاسخ کلرودیازپوکساید ۷۱

شکل (۳-۱۴): منحنی رویه پاسخ پیش تغلیظ و اندازه‌گیری آلپرازولام در مقابل اثر نمک (S) و pH ۷۲

شکل (۳-۱۵): منحنی رویه پاسخ پیش تغلیظ و اندازه‌گیری آلپرازولام در مقابل حجم حلال استخراج و اثر نمک ۷۳

شکل (۳-۱۶): منحنی رویه پاسخ پیش تغلیظ و اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید در مقابل اثر نمک و pH ۷۳

شکل (۳-۱۷): منحنی رویه پاسخ پیش تغلیظ و اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید در مقابل حجم حلال استخراج و اثر نمک ۷۴

شکل (۳-۱۸): منحنی کالبراسیون پیش تغلیظ کلرودیازپوکساید در شرایط بهینه ۸۳

شکل (۳-۱۹): منحنی کالبراسیون پیش تغلیظ آلپرازولام در شرایط بهینه ۸۴

شکل (۳-۲۰): کروماتوگرام پیش تغلیظ محلول نمونه قرص همراه با محلول استاندارد داروها حاوی ۱/۰ میلی گرم بر لیتر کلرودیازپوکساید و آلپرازولام ۹۵

شکل (۳-۲۱): کروماتوگرام حاصل از نمونه سرم شاهد ۹۵

شکل (۳-۲۲): کروماتوگرام نمونه سرم حاوی ۲/۰ میلی گرم بر لیتر کلرودیازپوکساید و آلپرازولام ۹۶

شکل (۳-۲۳): کروماتوگرام نمونه ادرار شاهد بدون حضور داروهای کلرودیازپوکساید و آلپرازولام ۹۶

شکل (۳-۲۴): کروماتوگرام نمونه ادرار حاوی ۲/۰ میلی گرم بر لیتر کلرودیازپوکساید و آلپرازولام ۹۶

پیوست

شکل ۱ پ): نمودار تأثیر pH فاز آبی بر میزان استخراج ۱۰۳

شکل ۲ پ): نمودار تأثیر نوع بافر بر میزان استخراج ۱۰۴

- شکل ۳ پ): نمودار تأثیر حجم بافر بر میزان استخراج ۱۰۵
- شکل ۴ پ): نمودار تأثیر حجم حلال استخراج کننده مرحله اول بر میزان استخراج ۱۰۶
- شکل ۵ پ): نمودار تأثیر نوع حلال استخراج کننده مرحله دوم بر میزان استخراج ۱۰۷
- شکل ۶ پ): نمودار تأثیر حجم حلال استخراج کننده مرحله دوم بر میزان استخراج ۱۰۸
- شکل ۷ پ): نمودار اثر نمک (قدرت یونی) بر میزان استخراج ۱۰۹
- شکل ۸ پ): نمودار تأثیر سرعت جریان بر میزان استخراج ۱۱۰
- شکل ۹ پ): نمودار تأثیر زمان اولتراسونیک بر میزان استخراج ۱۱۱
- شکل ۱۰ پ): نمودار تأثیر اثر زمان سانتریفیوژ بر میزان استخراج ۱۱۲
- شکل ۱۱ پ): نمودار تأثیر اثر دور زمان سانتریفیوژ بر میزان استخراج ۱۱۳

فهرست جدول‌ها

جدول (۱-۳) مواد شیمیایی مورد استفاده	۳۹
جدول (۲-۳) سیگنال مستقیم به‌دست آمده برای داروی آلپرازولام با غظت‌های متفاوت	۴۵
جدول (۳-۳) سیگنال مستقیم به‌دست آمده برای داروی کلرودیازپوکساید با غظت‌های متفاوت	۴۶
جدول (۴-۳) نتایج حاصل از بهینه‌سازی یک متغیر در یک زمان در پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری آلپرازولام و کلرودیازپوکساید	۴۸
جدول (۵-۳): نام، علامت و سطوح فاکتورهای مؤثر بر پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری آلپرازولام و کلرودیازپوکساید	۵۰
جدول (۶-۳): طرح پلاکت-برمن و نتایج به‌دست آمده با ۸ فاکتور و ۲ بار تکرار برای پاسخ پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام	۵۲
جدول (۷-۳): جدول ضرایب حاصل از طرح پلاکت-برمن	۵۳
جدول (۸-۳): سطوح فاکتورهای مؤثر در طرح باکس-بنکن	۵۸
جدول (۹-۳): طرح باکس-بنکن با ۳ فاکتور، ۲ بار تکرار و ۲ نقطه مرکزی برای اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام	۶۰
جدول (۱۰-۳): پارامترهای آماری برای طرح باکس-بنکن انجام شده برای پاسخ پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری آلپرازولام	۶۱
جدول (۱۱-۳): پارامترهای آماری برای طرح باکس-بنکن انجام شده برای پاسخ پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید	۶۲
جدول (۱۲-۳): تحلیل واریانس برای مدل پیشنهادی مربوط به پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری آلپرازولام	۶۵
جدول (۱۳-۳): تحلیل واریانس برای مدل پیشنهادی مربوط به پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید	۶۵

جدول (۳-۱۴): مقایسه شرایط بهینه‌سازی یک متغیر در زمان و طراحی آزمایش ۷۵

جدول (۳-۱۵): داده‌های مربوط به منحنی کالیبراسیون کلرودیازپوکساید ۸۳

جدول (۳-۱۶): داده‌های مربوط به منحنی کالیبراسیون آلپرازولام ۸۴

جدول (۳-۱۷): نتایج حاصل از بررسی اثر گونه‌های مزاحم در پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید با غلظت ۲/۰ میلی گرم بر لیتر ۸۶

جدول (۳-۱۸): نتایج حاصل از بررسی اثر گونه‌های مزاحم در پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری آلپرازولام با غلظت ۱/۰ میلی گرم بر لیتر ۸۶

جدول (۳-۱۹): بررسی دقت و صحت در شرایط منحنی کالیبراسیون کلرودیازپوکساید ۸۸

جدول (۳-۲۰): بررسی دقت و صحت در شرایط منحنی کالیبراسیون آلپرازولام ۸۸

جدول (۳-۲۱): نتایج حاصل از پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید در نمونه قرص کلرودیازپوکساید ۹۳

جدول (۳-۲۲): نتایج حاصل از پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری آلپرازولام در نمونه قرص آلپرازولام ۹۳

جدول (۳-۲۳): نتایج حاصل از پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری آلپرازولام در نمونه سرم خون ۹۳

جدول (۳-۲۴): نتایج حاصل از پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید در نمونه سرم خون ۹۴

جدول (۳-۲۵): نتایج حاصل از پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری آلپرازولام در نمونه ادرار ۹۴

جدول (۳-۲۶): نتایج حاصل از پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید در نمونه ادرار ۹۴

جدول (۴-۱): مقایسه روش پیشنهادی با برخی از روش‌های گزارش شده برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام ۹۹

جدول ۱ پ): نتایج حاصل از بررسی اثر pH فاز آبی بر میزان استخراج ۱۰۳

جدول ۲ پ): نتایج حاصل از بررسی نوع بافر بر میزان استخراج ۱۰۴

جدول ۳ پ): نتایج حاصل از بررسی اثر حجم بافر بر میزان استخراج ۱۰۵

جدول ۴ پ): نتایج حاصل از بررسی اثر حجم حلال استخراج‌کننده مرحله اول بر میزان استخراج ۱۰۶

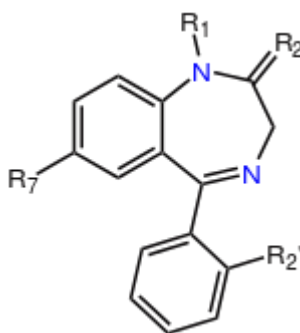
- جدول ۵ پ): نتایج حاصل از بررسی اثر نوع حلال استخراج کننده مرحله دوم بر میزان استخراج ۱۰۷
- جدول ۶ پ): نتایج حاصل از بررسی حجم حلال استخراج کننده مرحله دوم بر میزان استخراج ۱۰۸
- جدول ۷ پ): نتایج حاصل از بررسی اثر نمک (قدرت یونی) بر میزان استخراج ۱۰۹
- جدول ۸ پ): نتایج حاصل از بررسی سرعت جریان (میلی لیتر بر دقیقه) بر میزان استخراج ۱۱۰
- جدول ۹ پ): نتایج حاصل از بررسی اثر زمان اولتراسونیک بر میزان استخراج ۱۱۱
- جدول ۱۰ پ): نتایج حاصل از بررسی اثر زمان سانتریفیوژ بر میزان استخراج ۱۱۲
- جدول ۱۱ پ): نتایج حاصل از بررسی اثر دور سانتریفیوژ بر میزان استخراج ۱۱۳

فصل ۱

مقدمه

۱-۱ بنزودیازپین

بنزودیازپین‌ها (BZD)^۱ گروهی از داروهای روان‌گردان هستند که ساختار شیمیایی آن شامل یک حلقه بنزن و یک حلقه دیازپین است [۱]. شکل ۱-۱ ساختار کلی بنزودیازپین‌ها را نشان می‌دهد.



شکل (۱-۱) ساختار کلی بنزودیازپین

این داروها در درمان بی‌خوابی [۲،۳]، آرام‌بخش [۴]، اضطراب [۵]، حملات پانیک [۶،۷،۸]، صرع [۹،۱۰،۱۱]، ترک الکل [۱۲،۱۳]، اختلالات حافظه‌ای، شل‌کننده عضلانی و خواب‌پریشی [۱۴] و... به کار می‌روند.

مکانیسم اثر بنزودیازپین‌ها بدین صورت است که این داروها به عنوان آگونیست^۲ گیرنده‌های گابا^۳ اثر کرده و باعث تسهیل ورود و یا افزایش عمل گاما-آمینو بوتیریک اسید^۴ (GABA) شده و ورود یون کلر را به سلول‌ها افزایش می‌دهند. گیرنده گاما-آمینو بوتیریک اسید یک پنتامر است که از دو زیرواحد آلفا، دو زیرواحد بتا و یک زیرواحد گاما تشکیل شده است. محل قرارگیری بنزودیازپین‌ها محلی بین زیرواحد آلفا و زیرواحد گاما است. با ورود یون کلر سلول دچار هایپرپلاریزیشن^۵ شده و اثر مهارگری گاما-آمینو بوتیریک

^۱ Benzodiazepine

^۲ Agonist

^۳ GABA

^۴ Gamma-aminobutyric acid

^۵ Hyper polarization

اسید تقویت می‌شود. بنزودیازپین‌ها با کاهش تحریک‌پذیری نورون‌ها یک اثر آرامبخش و تضعیف‌کننده بر فعالیت‌های مغزی دارند و گیرنده گاما-آمینو بوتیریک اسید نقش اساسی در این فرآیند دارد [۱۵].

بنزودیازپین‌ها را بر اساس ساختمان می‌توان به ۵ گروه بنزودیازپین‌های مشابه دیازپام‌ها، ۳-هیدروکسی بنزودیازپین‌ها، ۷-نیتروبنزودیازپین‌ها، ۱-۲-بنزودیازپین‌های ادغام شده و ۱-۵-بنزودیازپین‌ها، تقسیم نمود [۱۶].

۲-۱ خواص بنزودیازپین‌ها

بنزودیازپین‌ها بسته به سرعت اثر و نیمه عمر به انواع کوتاه اثر، متوسط اثر و طولانی اثر تقسیم می‌شوند. عموماً بنزودیازپین‌های دارای نیمه عمر کوتاه‌تر در درمان بی‌خوابی و بنزودیازپین‌های با اثر طولانی‌تر در درمان افسردگی و اضطراب کاربرد دارند. به عنوان مثال میدازولام^۱ و تریازولام^۲ دارای اثر کوتاه مدت، آلپرازولام^۳، کلونازپام^۴، تمازپام^۵ و لورازپام^۶ دارای اثر متوسط و دیازپام^۷، فلورازپام^۸ و کلرودیازپوکساید^۹ دارای اثر طولانی مدت می‌باشند. به‌طور کلی بنزودیازپین‌ها بی‌خطر و در کوتاه مدت مؤثر هستند، اگرچه ممکن است گاهی باعث اختلالات شناختی و اثرات متناقض مانند پرخاشگری یا عدم بازداری رفتاری شوند [۱۷].

^۱ Midazolam

^۲ Triazolam

^۳ Alprazolam

^۴ Clonazepam

^۵ Temazepam

^۶ Lorazepam

^۷ Diazepam

^۸ Flurazepam

^۹ Chlordiazepoxide

بنزودیازپین‌ها در درون بدن از راه‌های هیدرولیز، هیدروکسیله شدن، حذف آلکیل، احیا و مزدوج شدن دچار تغییرات زیستی شده و به ترکیبات غیرفعال یا فعال تبدیل می‌شوند. از ترکیباتی که متابولیت فعال ایجاد می‌کنند، می‌توان کلرودیازپوکساید، کلرازپات^۱، دیازپام، فلورازپام، هالازپام^۲ و پرازپام^۳ را نام برد. از جمله داروهایی که به متابولیت غیرفعال یا ضعیف‌تر تبدیل می‌گردند، می‌توان به آلپرازولام، کلونازپام، لورازپام، اکسازپام^۴، تمازپام و تریازولام اشاره نمود. معمولاً پس از انجام فرآیند متابولیک، ترکیبات ایجاد شده به صورت گلوکورونید دفع می‌گردند [۱۶].

استفاده طولانی مدت از این داروها به دلیل نگرانی در مورد عوارض جانبی روانی و جسمی آن‌ها هنوز هم مورد بحث است. از ویژگی‌های دیگری که بنزودیازپین‌ها دارند این است که می‌توانند وابستگی فیزیکی ایجاد کنند؛ اما به محض قطع دارو بعد از یک استفاده طولانی مدت، نشانه‌های ترک دارو در بیمار قابل مشاهده است [۱۸، ۱۹]. همچنین استفاده دراز مدت تقریباً به میزان ۵۰ درصد، زوال عقل را افزایش می‌دهد. مصرف بیش از اندازه بنزودیازپین‌ها می‌تواند باعث بیهوشی عمیق شود اما با این حال سمیت آن‌ها کمتر از مشتقات قبلی خود از قبیل باریتورات‌ها^۵ [۲۰] است.

۳-۱ تاریخچه بنزودیازپین‌ها

عواملی که اثر مسکن خواب‌آور ایجاد می‌کنند، به تدریج از صد سال پیش تاکنون کشف شده‌اند. کلرال هیدرات^۶ که در سال ۱۸۳۲ توسط لی‌بیک^۷ در سال ۱۸۶۹ توسط لیبریش^۸ به عنوان یک داروی

^۱ Chlorazpat

^۲ Halazepam

^۳ Prazepam

^۴ Oxazepam

^۵ Barbiturate

^۶ Chloral Hydrate

^۷ Lee Baik

^۸ Lybryshn

خواب‌آور با موفقیت مورد ارزیابی قرار گرفت [۱۶]. اولین دارو از گروه بنزودیازپین‌ها، کلرودیازپوکساید بود که در سال ۱۹۵۵ توسط لئو استرنباخ^۱ تولید شد. به علت اینکه خواص دارویی این ترکیبات نتیجه بخش نبود، استرنباخ طرح را رها کرد و دو سال بعد در آوریل ۱۹۵۷، همکارش ارل ریدر^۲ بر روی کریستال‌های به‌جا مانده در آزمایشگاه توجه کرد و پس از آزمایش‌های لازم دریافت که این ترکیب یک آرام‌بخش قوی، ضد تشنج و شل‌کننده عضلانی است. این ترکیب در سال ۱۹۶۰ با نام تجاری لیبریوم^۳ وارد بازار شد [۲۱، ۲۲]. به دنبال کلرودیازپوکساید، دیازپام با نام تجاری والیوم^۴، در سال ۱۹۶۳ به بازار عرضه شد. معرفی بنزودیازپین‌ها منجر به کاهش تجویز باربیتورات شد به‌طوری که تا سال ۱۹۷۰ این داروها تا حد زیادی جایگزین داروهای قدیمی‌تر آرام‌بخش و خواب‌آور شدند [۱].

دیازپام، اکسازپام و پرازپام علاوه بر مشتقات بسیار جدید به سرعت به کلرودیازپوکساید که اولین عضو این دسته بود، اضافه شدند. از جمله بنزودیازپین‌هایی هم که موارد مصرف بسیاری در بین مردم دارد می‌توان به کلرودیازپوکساید، دیازپام، آلپرازولام و نیترازپام^۵ اشاره نمود [۱۶]. در پژوهش پیش رو از آلپرازولام و کلرودیازپوکساید به عنوان دو مورد از بنزودیازپین‌ها استفاده شده است.

آلپرازولام با نام شیمیایی ۸-کلرو-۱-متیل-۶-فنیل-۴H-[۱ و ۲ و ۴] تری‌آزولو [۳-α]-۱ و ۴-بنزودیازپین که ساختار آن در شکل ۱-۲ نشان داده شده است دارای چندین نام تجاری از قبیل زاناکس^۶،

^۱ Leo Sternbach

^۲ Earl Reeder

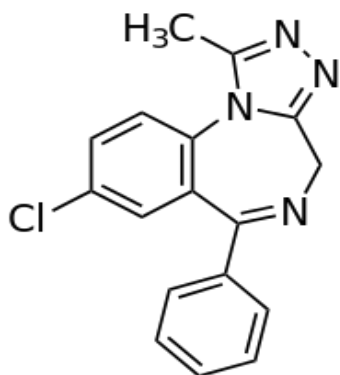
^۳ Librium

^۴ Valium

^۵ Nitrazepam

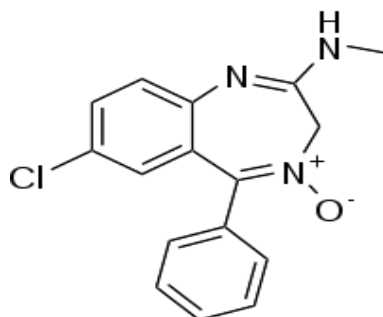
^۶ Xanax

نیراوام^۱، آلپرازولام تی اس^۲ و آلپرازولام تی دی^۳ می‌باشد. آلپرازولام ضد اضطراب و داری اثر متوسط از گروه بنزودیازپین‌ها بوده و نیمه عمر آن بین ۱۵-۱۲ ساعت است. کاربرد پزشکی این دارو شامل درمان وحشت زدگی [۲۳]، اضطراب [۲۴] و تهوع ناشی از شیمی درمانی می‌باشد.



شکل (۲-۱) ساختار آلپرازولام

دیگر داروی مورد استفاده در این پژوهش کلرودیازپوکساید با نام شیمیایی ۷-کلرو-۲-متیل آمینو-۵-فنیل-۳H-۱ و ۲-بنزودیازپین-۴-اکسید هیدروکلرید است که ساختار آن در شکل ۳-۱ نشان داده شده است.



شکل (۳-۱) ساختار کلرودیازپوکساید

¹-Niravam

²-Alprazolam-ts

³-Alprazolam-td

از نام‌های تجاری کلرودیازوپوکساید می‌توان به این مواردی مانند النیوم^۱، انگیرکس^۲، کلپوکسید^۳، سیلیبرین^۴، نوپام^۵، مولتوم^۶، لیبریوم^۷، لیبریتابس^۸، لیبوتریب^۹ و تروپیوم^{۱۰}، اشاره نمود، که ضد اضطراب طولانی اثر است و نیمه عمر آن بین ۳۰-۱۰ ساعت است، این داروها اغلب به اشکال مختلفی مانند قرص، آمپول و حتی شیاف به کار می‌روند. از عوارض جانبی این دارو می‌توان گیجی، یبوست، مشکلات کبد و تهوع را نام برد.

۴-۱ اهمیت اندازه گیری بنزودیازپین‌ها

موارد استفاده از بنزودیازپین‌ها باعث شده که در دسته داروهای قاچاق (DFC)^{۱۱} قرار بگیرند. بنزودیازپین‌ها بهترین انتخاب در درمان ترک الکل، به ویژه برای پیش‌گیری و درمان عارضه خطرناک تشنج هستند و با توجه به اهمیتی که این داروها در سم شناسی پزشکی قانونی و شرایط بالینی دارند و چون اندازه گیری مستقیم آن‌ها در خون و ادرار به دلیل غلظت بسیار کم آن‌ها امکان پذیر نیست، ابتدا باید با یک روش مناسب پیش تغلیظ شده و سپس با روش‌های مناسب که در ادامه به توضیح آن پرداخته می‌شود، اندازه‌گیری شود [۲۵].

¹ Elenium

² Angirex

³ Klopoxid

⁴ Silibrin

⁵ Novapam

⁶ Multum

⁷ Librium

⁸ Libritabs

⁹ Libotryp

¹⁰ Tropium Mass spectrometry

¹¹ Drug-Facilitated Crimes

۱-۵ روش‌های مختلف اندازه‌گیری بنزودیازپین‌ها

روش‌های تحلیلی متعددی برای تعیین بنزودیازپین‌ها وجود دارد. این ترکیبات اغلب توسط دستگاه کروماتوگرافی مایع (LC)^۱ به همراه طیف‌سنجی جرمی (MS)^۲ [۲۶،۲۷،۲۸] یا دتکتور آرایه فتودیودی (PDA)^۳ [۲۹]، کروماتوگرافی گازی (GC)^۴ به همراه طیف‌سنجی جرمی [۳۰]، کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC)^۵ [۳۱،۳۲] و الکتروفورز موئینه^۶ همراه با طیف‌سنجی جرمی [۳۳] اندازه‌گیری می‌شوند.

۱-۶ مروری بر کارهای انجام شده برای اندازه‌گیری بنزودیازپین‌ها

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

در سال ۲۰۰۴ لوزانو^۷ و همکارانش مقدار آلپرازولام در نمونه قرص را با کمک دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا با فاز متحرک مخلوطی از بافر فسفاتی ۰/۰۲ مولار (pH = ۶/۰) و استونیتریل با نسبت (۴۵:۵۵) اندازه‌گیری کردند. محدوده خطی به صورت ۷۰ تا ۱۳۰ درصد غلظت کاری ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای آلپرازولام گزارش شد.

¹ Liquid Chromatography

² Mass Spectrometry

³ Photodiode Array Detector

⁴ Gas Chromatography

⁵ High Performance Liquid Chromatography

⁶ Capillary Electrophoresis

⁷ Lozano

در سال ۲۰۰۸ بلاس^۱ و همکارانش برای جداسازی و اندازه‌گیری ده بنزودیازپین در ادرار از روش الکتروکروماتوگرافی موئین با طیف سنجی جرمی زمان پرواز CEC-MS(TOF)^۲ استفاده کردند. محدوده خطی ۵۰۰-۲۵ نانوگرم بر میلی لیتر برای لورازپام و ۵۰۰-۱۲/۵ نانو گرم بر میلی لیتر برای سایر داروها، انحراف استاندارد نسبی برای ۶ اندازه‌گیری تکراری غلظت، ۱ نانو گرم بر میلی لیتر و حد تشخیص بین ۱/۸-۰/۶ نانو گرم بر میلی لیتر، به‌دست آمد و همچنین فاکتور پیش تغلیظ در محدوده ۱۴۰-۷۵ برای این ترکیبات گزارش شده است [۳۴].

در سال ۲۰۰۸ اودین^۳ و همکارانش یک روش جدید برای تعیین هم‌زمان ۶ نمونه‌ی بنزودیازپین و چهار نمونه داروی ضدافسردگی سه حلقه‌ای^۴ (TCAS) در مایعات بیولوژیک به‌وسیله HPLC با آشکارساز فرابنفش استفاده کردند. جداسازی با استفاده از فاز متحرک CH₃COONH₂/ACN/CH₃OH با نسبت (۵۵:۱۵:۳۰) انجام شد. حد تشخیص و حد کمی به ترتیب ۱/۱۷-۰/۰۸ و ۳/۹-۰/۲۸ نانوگرم بر میکرولیتر و انحراف استاندارد نسبی کمتر از ۱۰/۰٪ برای همه نمونه‌ها گزارش شد [۳۲].

در سال ۲۰۰۹ اسحاقی و همکارانش برای پیش تغلیظ و اندازه‌گیری لورازپام، از روش میکرو استخراج فاز مایع با قطره شناور^۵ (LPME-SD) به‌وسیله کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا با دتکتور آرایه دیودی استفاده کردند. منحنی کالیبراسیون در محدوده ۵۵۰۰-۳۰ نانوگرم بر میلی لیتر خطی بوده، حد تشخیص ۲۵ نانو گرم بر میلی لیتر و فاکتور پیش تغلیظ نیز ۶۴۵ به‌دست آمد [۳۵].

¹ Blas

² Capillary Electrochromatography-Time of Flight Mass Spectrometry

³ Uddin

⁴ Tricyclic Antidepressants

⁵ Suspended Droplet Liquid Phase Microextraction

در سال ۲۰۱۰ کائو^۱ و همکارانش برای آنالیز هفت بنزودیازپین در ادرار از روش الکتروفورز لوله موئین اصلاح شده با سورفاکتانت سدیم دودسیل سولفات (SDS)^۲ استفاده کردند، حد تشخیص آن‌ها در محدوده ۲/۷۴ تا ۴/۴۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر، محدوده خطی برای همه داروها ۱۰ تا ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و انحراف استاندارد نسبی برای ۵ اندازه‌گیری تکراری برای همه داروها کمتر از ۰/۲۳٪ گزارش شده است [۳۶].

در سال ۲۰۱۱ سالومون^۳ و همکارانش از روش کروماتوگرافی مایع سریع همراه با اسپکتروسکوپی جرمی دوگانه برای اندازه‌گیری ۲۳ بنزودیازپین در نمونه ادرار استفاده کردند. برای همه داروها رنج خطی، بین ۵۰ تا ۱۰۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر و حد تشخیص بین ۰/۵ تا ۳۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر گزارش شده است [۱۶].

در سال ۲۰۱۳ رضایی و همکارانش برای پیش تغلیظ و اندازه‌گیری پنج دارو از بنزودیازپین‌ها از روش میکرو استخراج فاز مایع با استفاده از هالو فیبر^۴ (LPME-HF) بر اساس حلال فوق بحرانی بوسیله کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا با دتکتور آرایه فتو دیودی استفاده کردند. تحت شرایط بهینه دامنه خطی در محدوده ۱/۰-۲۰۰/۰ میکروگرم بر لیتر برای دیازپام و برای سایر داروها ۲/۰-۲۰۰/۰ میکروگرم بر لیتر، حد تشخیص در محدوده ۰/۷-۰/۵ میکروگرم بر لیتر و فاکتور پیش تغلیظ نیز در محدوده ۱۹۸-۱۱۲ به‌دست آمد [۳۷].

در سال ۲۰۱۳، خدادوست و همکارانش از روش میکرواستخراج مایع-مایع پخشی همراه با HPLC-UV برای تعیین مقدار کلرودیازوپوکساید در بعضی از نمونه‌های حقیقی استفاده نمودند. بهینه سازی

¹ Kao

² Sodium Dodecyl Sulfate

³ Salomone

⁴ Hollow Fiber Microextraction

فاکتورهای مختلف بر راندمان استخراج کلرودیازوپوکساید و با استفاده از طرح مرکب مرکزی^۱ مورد بررسی قرار گرفت. دامنه خطی در محدوده ۰/۰۰۵-۱۰ میکرو گرم بر میلی لیتر، حد تشخیص ۰/۰۰۰۵ میکرو گرم بر میلی لیتر و انحراف استاندارد نسبی کمتر از ۵٪ به دست آمده است [۳۱].

در سال ۲۰۱۳ فرناندز^۲ و همکارانش از روش میکرواستخراج مایع-مایع پخشی به کمک امواج مافوق صوت (UA-DLLME)^۳ با کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا و دتکتور آرایه فتودیو برای تعیین بنزودیازپین‌های آلپرازولام، برومازپام، کلونازپام، دیازپام و لورازپام در نمونه‌های سرم انسان استفاده کردند. از کلروفرم و متانول نیز به ترتیب به عنوان حلال استخراج و پخش کننده استفاده گردید. تحت شرایط بهینه محدوده خطی ۵-۰/۰۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر، و انحراف استاندارد نسبی کمتر از ۸٪ به دست آمد [۳۸].

در سال ۲۰۱۴ قبادی و همکارانش از روش استخراج فاز جامد همراه با میکرو استخراج مایع-مایع پخشی، برای اندازه‌گیری مقادیر کم بعضی از بنزودیازپین‌ها از جمله دیازپام، میدازولام و آلپرازولام در آب خالص، آب میوه و نمونه ادرار، با استفاده از کروماتوگرافی گازی با دتکتور یونیزاسیون شعله‌ای استفاده کردند. تحت شرایط بهینه فاکتور پیش تغلیظ بالا در محدوده ۷۲۲۲-۳۸۹۵، حد تشخیص در محدوده ۰/۰۲-۰/۰۵ میکروگرم بر لیتر، دامنه خطی در محدوده ۱-۰/۱ میکروگرم بر لیتر و انحراف استاندارد نسبی در محدوده ۷/۱۰-۴/۴٪ به دست آمد [۳۹].

¹-Central composite design

²-Fernández

³-Ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction

در سال ۲۰۱۴ کوئیچی^۱ و همکارانش برای تجزیه بنزودیازپین‌ها در سرم و نمونه ادرار از روش استخراج پخشی با فاز جامد^۲ (SPDE)، ترکیب با کروماتوگرافی مایع-طیف‌سنجی جرمی زمان پرواز^۳ (LC/TOF-MS) استفاده نمودند. منحنی کالیبراسیون خطی در محدوده ۲۰۰-۵۰۰، حد تشخیص در محدوده ۱-۱۰ نانو گرم بر میلی لیتر و انحراف استاندارد نسبی در محدوده ۲/۸-۲/۱٪ گزارش شد [۴۰].

در سال ۲۰۱۵ گودرزی و همکارانش برای اندازه‌گیری نیترازپام و میدازولام از روش بهینه‌سازی میکرواستخراج مایع-مایع پخشی اصلاح شده و جفت شده با کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا^۴ استفاده کردند حد تشخیص روش برای نیترازپام و میدازولام به ترتیب ۰/۰۱۷ و ۰/۰۸۶ نانوگرم بر میلی لیتر و فاکتور پیش‌تغلیظ بیش از ۹۱ را گزارش کردند [۴۱].

در سال ۲۰۱۵ امیرنویی در پایان‌نامه کارشناسی ارشد خود از میکرو استخراج فاز مایع بر اساس قطره‌ی جامد با کمک سورفاکتانت و امواج مافوق صوت برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری هم‌زمان مقادیر کم کلرودیازپوکساید و آلپرازولام به وسیله‌ی کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا با آشکار ساز طول موج متغیر ماوراء بنفش استفاده کرد. منحنی کالیبراسیون خطی برای دو داروی کلرودیازپوکساید و آلپرازولام در محدوده‌ی ۰/۰۱ تا ۳/۵ میلی گرم بر لیتر خطی گزارش شد. حد تشخیص ۰/۰۲۰ میلی گرم بر لیتر برای کلرودیازپوکساید و ۰/۰۲۱ میلی گرم بر لیتر برای آلپرازولام، فاکتور پیش‌تغلیظ برای کلرودیازپوکساید ۱۰۸/۳ و برای آلپرازولام ۱۰۲/۱ به‌دست آمد [۴۲].

¹ Koichi

² Solid-phase dispersive extraction

³ Liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry

⁴ Optimization of Modified Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Coupled with High Performance Liquid Chromatography

در سال ۲۰۱۶ رحیمی با استفاده از روش استخراج فاز جامد پخشی جهت پیش تغلیظ و اندازه‌گیری نیترازپام، آلپرازولام، کلرودیازپوکساید و دیازپام بر اساس جذب آنالیت روی نانوذرات اکسید آهن/پلی‌آنیلین و استفاده از استونیتریل به عنوان حلال شویش در کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا استفاده کرد. تحت شرایط بهینه در رنج ۰/۰۱-۶/۰، ۰/۰۱-۵/۰، ۰/۰۱-۷/۰ میلی گرم بر لیتر به ترتیب برای نیترازپام و دیازپام، آلپرازولام، کلرودیازپوکساید رابطه خطی به دست آمد [۴۳].

در این پژوهش برای اولین بار پیش تغلیظ و اندازه‌گیری همزمان آلپرازولام و کلرودیازپوکساید با استفاده از روش استخراج مایع-مایع هموزن جریان مخالف با اثر نمک خارج کننده و میکرو استخراج مایع-مایع پخشی جفت شده با کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و دتکتور UV استفاده شده است.

فصل ۲

تئوری

۱-۲ کروماتوگرافی

بدون شک مهم‌ترین و پرکاربردترین روش جداسازی، روش "کروماتوگرافی" است. روش‌های کروماتوگرافی دسته‌ای از روش‌های جداسازی هستند که در آن‌ها نمونه در یک فاز متحرک حل گردیده و این مخلوط از درون فاز ساکن غیرقابل امتزاج با فاز متحرک عبور نموده و در نتیجه برهم‌کنش با فاز ساکن، اجزای نمونه به طور متفاوت بین فاز ساکن و متحرک توزیع می‌شوند. لذا هرچه میزان تمایل به فاز متحرک بیشتر باشد نمونه سریع‌تر حرکت نموده و این گونه زودتر از ستون خارج می‌شود و برعکس هرچه میزان تمایل به فاز ساکن بیشتر باشد نمونه‌ها زمان بازداری بیشتری خواهند داشت و دیرتر ستون را ترک می‌کنند. کروماتوگرافی مایع، روشی است که در آن جداسازی اجزای مخلوط براساس اختلاف در تمایل اجزاء مختلف برای توزیع بین فاز متحرک مایع و فاز ساکن صورت می‌گیرد [۴۴].

کروماتوگرافی مایع بر اساس حالت فیزیکی فاز ساکن به دو گروه زیر تقسیم می‌شود:

- کروماتوگرافی مایع – جامد (LSC)^۱ که در آن فاز ساکن جامد است.
 - کروماتوگرافی مایع – مایع (LLC)^۲ که در آن فاز ساکن مایع است.
- نوع دیگر طبقه بندی کروماتوگرافی مایع را می‌توان بر پایه انواع فازهای متحرک و ساکن و انواع تعادل‌های درگیر در انتقال مواد حل شده بین فازها بنا شده است که به چهار دسته تقسیم می‌شود [۴۵]:
- کروماتوگرافی تبادل یونی^۳
 - کروماتوگرافی جذب سطحی^۴

^۱ Liquid- Solid Chromatography

^۲ Liquid- Liquid Chromatography

^۳ Ion Exchange Chromatography

^۴ Adsorption Chromatography

- کروماتوگرافی تقسیمی^۱
- کروماتوگرافی اندازه پردی^۲

۲-۱-۱ کروماتوگرافی تقسیمی

کروماتوگرافی تقسیمی در بین چهار نوع روش کروماتوگرافی مایع، بیشتر از همه به کار برده شده است. در این نوع کروماتوگرافی، مولکول‌های نمونه، بین دو فاز مایع غیر قابل امتزاج توزیع می‌شوند. یک مایع فاز متحرک است و مایع دیگر فاز ساکن است که به صورت لایه نازکی بر روی ذرات نگهدارنده بی‌اثر پوشانده شده است. این نوع از کروماتوگرافی را می‌توان بر اساس روش پوشاندن فاز ساکن بر روی نگهدارنده به دو گروه تقسیم نمود. نوع اول کروماتوگرافی مایع-مایع که در آن فاز ساکن به صورت مکانیکی روی نگهدارنده جذب شده است و نوع دوم کروماتوگرافی با فاز پیوند شده که در آن فاز ساکن به صورت شیمیایی روی نگهدارنده پیوند داده شده است. کروماتوگرافی توزیعی از گزینش پذیری بی‌نظیری برای نمونه‌های مختلف برخوردار است و علت این امر می‌تواند به گستره وسیع فاز ساکن مربوط باشد. براساس خاصیت قطبیت نسبی فاز متحرک و فاز ساکن، کروماتوگرافی توزیعی به دو دسته کروماتوگرافی با فاز نرمال (NPC)^۳ و کروماتوگرافی فاز معکوس (RPC)^۴ تقسیم می‌شود. در NPC، ذرات نگهدارنده با فاز ساکن قطبی پوشش داده شده و فاز متحرک غیر قطبی می‌باشد و این نوع از کروماتوگرافی برای جداسازی نمونه‌هایی با قطبیت بالا و محلول در آب استفاده می‌شود. در RPC، فاز ساکن غیر قطبی و فاز متحرک قطبی است و از این روش برای جداسازی نمونه‌هایی که حلالیت کمی در آب دارند، استفاده می‌شود [۴۵].

¹ Partition Chromatography

² Size Exclusion Chromatography

³ Normal Phase Chromatography

⁴ Revers Phase Chromatography

۲-۱-۱-۱ کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC)^۴

وقتی که اندازه ذرات پر کننده ستون در LC به ۱۰ میکرومتر یا کمتر می‌رسد، به خاطر افزایش تعداد برهم‌کنش‌های فاز ثابت با نمونه و نهایتاً افزایش تعداد تعادلات توزیع، راندمان جداسازی افزایش زیادی خواهد یافت، در این حالت روش LC را کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا یا HPLC می‌نامند. HPLC برای تجزیه کمی و کیفی مواد دارویی، شیمیایی، غذایی، صنایع سنگین (پلیمرها)، بیوشیمی (تجزیه پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک و...) و بکار می‌رود. بطور ساده جریانی از یک حلال (به نام فاز متحرک) از درون یک ستون پر شده (به نام فاز ساکن) عبور می‌کند و نمونه مورد آزمایش به قسمت بالای دستگاه، تزریق شده و وارد ستون می‌شود. اجزا نمونه بر اساس ماهیت شیمیایی، با فاصله زمانی متفاوتی از ستون عبور کرده و سپس به وسیله آشکارساز شناسایی می‌شوند و نتایج به صورت پیک‌هایی به ثبت می‌رسند. به طور معمول، جداسازی‌ها و تجزیه‌هایی که با دیگر روش‌های کروماتوگرافی سخت یا غیر ممکن است، با این روش به سادگی انجام می‌شود [۴۶].

اجزای دستگاه HPLC شامل موارد زیر است:

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

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

ج) سیستم تزریق نمونه: برای به دست آوردن حداکثر کارایی در کروماتوگرافی، نمونه باید به صورت نوار بسیار باریک از سر ستون وارد آن شود. سیستم تزریق نمونه، به همین منظور طراحی

⁴ High-Performance Liquid Chromatography

شده است، در این سیستم یک حلقه^۱ تزریق نمونه، در نظر گرفته شده است که می‌توان حجم نمونه تزریقی به ستون را توسط آن کنترل کرد.

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

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

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

۲-۲ مقدمه ای بر روش‌های آماده سازی نمونه

تجزیه بسیاری از نمونه‌ها بدون آماده‌سازی آن به‌علت پیچیده بودن بافت، حجم محدود نمونه و غلظت پایین ترکیبات مورد بررسی بسیار مشکل است. بنابراین انجام یک مرحله پیش‌تغلیظ و همچنین استخراج ترکیبات مورد نظر از بافت نمونه ضروری است [۴۷]. با وجود پیشرفت‌های زیادی که در زمینه تکنیک‌های اندازه‌گیری صورت گرفته است، هنوز در بسیاری از موارد امکان اندازه‌گیری مستقیم نمونه وجود ندارد، که این امر ناشی از پیچدگی بافت نمونه و نیز غلظت پایین آنالیت است. بنابراین انجام یک مرحله جداسازی و پیش‌تغلیظ قبل از اندازه‌گیری مقادیر کم آنالیت ضروری به نظر می‌رسد [۴۷].

^۱ Loop

^۲ Support

اهداف عمومی روش‌های آماده‌سازی به شرح زیر است:

- تغلیظ نمونه به منظور اندازه‌گیری مقادیر کم آنالیت
- حذف مزاحمت‌های موجود در نمونه در مراحل جداسازی و شناسایی آنالیت و در نتیجه افزایش گرینش‌پذیری
- فراهم کردن یک روش تکرارپذیر و کارآمد که مستقل از تغییرات بافت نمونه باشد.

۲-۲-۱ استخراج

در چند دهه اخیر با وجود پیشرفت‌های بسیار در توسعه دستگاه‌های تجزیه ای برای اندازه‌گیری آنالیت در نمونه‌های محیطی و بیولوژیکی و محصولات دارویی، آماده‌سازی نمونه به منظور استخراج و تغلیظ آنالیت‌ها از ماتریس‌های پیچیده معمولاً ضروری است، زیرا بسیاری از دستگاه‌های آنالیز نمی‌توانند به طور مستقیم بافت‌های پیچیده را آنالیز کنند [۴۸].

یکی از اساسی‌ترین مراحل آماده‌سازی نمونه در روش‌های تجزیه‌ای، مرحله استخراج است که منجر به تغلیظ گونه‌های مورد نظر و جداسازی آن‌ها از بافت نمونه می‌گردد. آماده‌سازی نمونه تأثیری مستقیمی بر روی صحت، دقت و حد کمی ترکیبات دارد [۴۹]. در واقع آماده‌سازی نمونه مهم‌ترین مرحله در فرآیندهای تجزیه‌ای محسوب می‌شود. امروزه نیز تحقیقات گسترده‌ای به منظور دستیابی به روش‌هایی با صحت و دقت بالا به همراه حدود کمی قابل قبول صورت می‌گیرد. استخراج مایع-مایع^۱، استخراج با فاز جامد^۲ و استخراج نقطه ابری از اولین روش‌های استخراج بودند، که برای جداسازی یک گونه از محلول مورد استفاده قرار گرفتند.

^۱-Liquid liquid extraction

^۲-Solid phase microextraction

۲-۲-۲ استخراج مایع مایع (LLE)

اغلب روش‌های به کار برده شده برای جداسازی گونه‌های شیمیایی از بافت نمونه و یا دیگر گونه‌های موجود شامل یک سیستم دوفازی می‌باشد که آنالیت و مزاحمت‌ها بین دو فاز توزیع شده است. استخراج مایع-مایع مربوط به توزیع حل‌شونده بین دو فاز مایع امتزاج ناپذیر در تماس با یکدیگر می‌باشد [۵۰]. این تکنیک، به عنوان روش پایه و قدرتمند سال‌های زیادی برای جداسازی و پیش‌تغلیظ آنالیت‌ها بکار رفته است. با این وجود، این روش زمان‌بر است و از مقدار زیادی حلال آلی و گران‌قیمت و سمی استفاده می‌کند. همچنین به روش‌های چند مرحله‌ای با خطر بالای از دست رفتن آنالیت نیاز دارد. علاوه بر معایب ذکر شده برای محیط زیست نیز مضر است.

توجه اخیر شیمیدانان به روش‌های استخراج باعث شده است که این روش‌ها دستخوش اصلاحات جدید گردند. امروزه تکنیک‌های متنوعی جایگزین روش‌های کلاسیک شده‌اند که یا عاری از حلال هستند و یا حجم حلال مصرفی آنقدر کم است که می‌توان آن‌ها را جزو 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 [۵۱].

۲-۲-۳ میکرواستخراج فاز مایع (LPME)

روش میکرواستخراج فاز مایع (LPME) ویژگی‌های منحصر به فردی مانند قابلیت پیش‌تغلیظ بالا، سادگی، هزینه پایین و خالص‌سازی نمونه را نشان می‌دهد. روش‌های LPME تقریباً امکان ترکیب با هر نوع تکنیک

^۱ Liquid Phase MicroExtraction

^۲ Solid Phase MicroExtraction

تجزیه‌ای را دارند [۵۲]. در این روش حجم فاز آلی بسیار کمتر از حجم حاوی نمونه است. در مواردی از میکرو استخراج که مقدار آنالیت استخراج شده نسبت به مقدار اولیه موجود در نمونه بسیار کم باشد تغییر مهمی در غلظت گونه در طی استخراج حاصل نشده و در این مورد مقدار استخراج مستقل از حجم نمونه می‌باشد.

از زمان ارائه اولیه میکرو استخراج فاز مایع، فرم‌های متفاوتی از آن به منظور بهبود عملکرد، ارائه شده است، که می‌توان انواع روش میکرو استخراج با فاز مایع را به سه دسته زیر تقسیم نمود:

۱- میکرو استخراج با فاز مایع با استفاده از فیبر تو خالی (HF-LPME)^۱

۲- میکرو استخراج با تک قطره (SDME)^۲

۳- میکرو استخراج مایع-مایع پخشی (DLLME)^۳

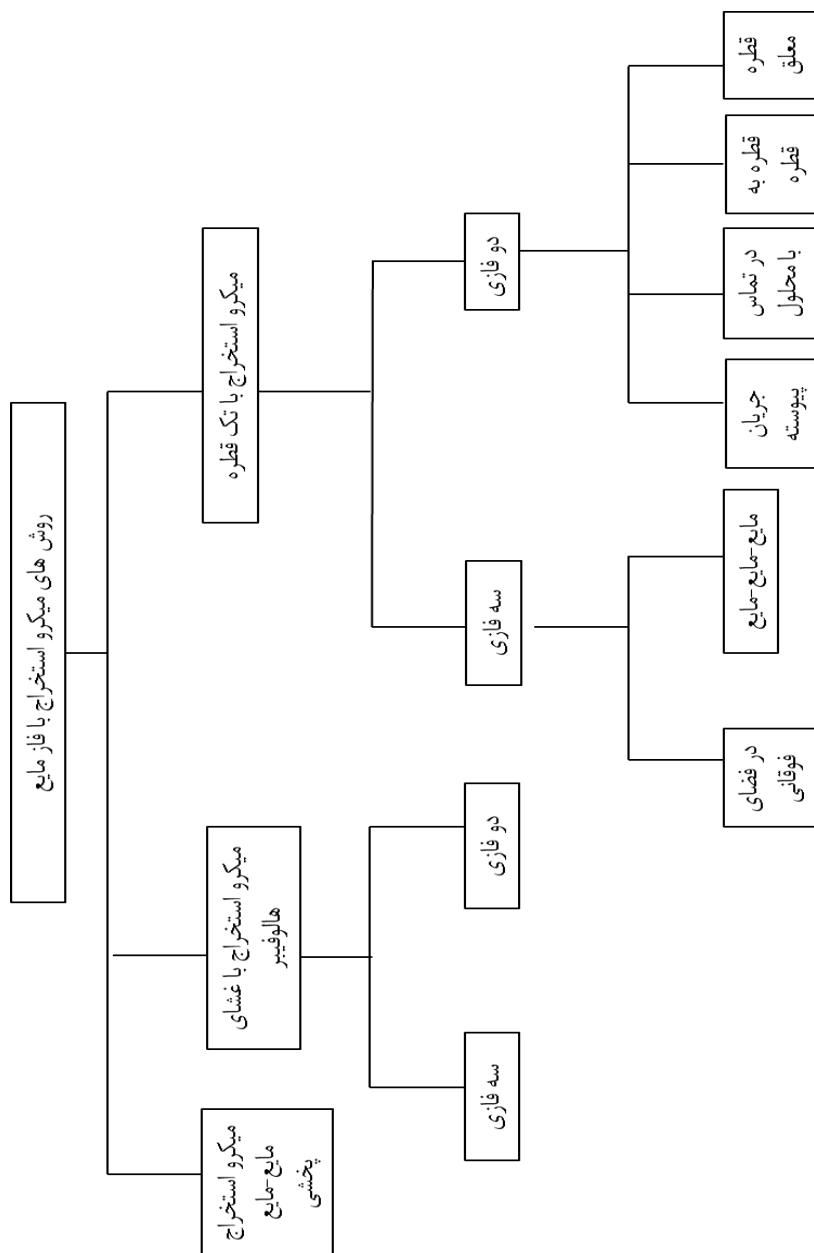
تقسیم بندی انواع روش‌های میکرو استخراج فاز مایع در شکل ۱-۲ نشان داده شده است [۵۳].

تفاوت اصلی دو دسته اول 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 آخر به دلیل استفاده از یک سیستم سه تایی حلال با دیگر روش‌های میکرو استخراج فاز مایع تفاوت اساسی دارد [۴۷].

¹ Hollow Fiber Liquid-Phase MicroExtraction

² Single Drop MicroExtraction

³ Dispersive-Liquid Liquid MicroExtraction



شکل (۱-۲) تقسیم‌بندی انواع میکرواستخراج فاز مایع

۴-۲-۲ میکرواستخراج مایع-مایع پخشی بر اساس جامدسازی قطره آلی شناور (DLLME-SFOD)^۱

میکرو استخراج مایع مایع پخشی (DLLME) توسط اسدی و همکاران در سال ۲۰۰۶ [۵۴] معرفی شد.

این تکنیک بدلیل سازگاری با محیط زیست، سریع، ارزان، آسان، با فاکتور غنی سازی بالا و مصرف حجم کم حلال‌های آلی به یک روش آماده سازی نمونه محبوب تبدیل شد [۵۴، ۵۵]. این روش قابلیت ترکیب با تکنیک‌های تحلیلی مختلف مانند کروماتوگرافی گازی (GC)، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)، پلاسما جفت شده القایی - طیف سنجی نشری نوری (ICP-OES) و... را دارد.

میکرو استخراج مایع مایع پخشی بر پایه سیستم‌های سه جزئی بنا شده است که معمولاً یک جزو آن را آب تشکیل می‌دهد. از دو جزو دیگر، یک جزو غیر قابل امتزاج با آب و دیگری کاملاً قابل امتزاج با دو جزو دیگر است. به طور کلی در روش میکرواستخراج مایع مایع پخشی، سه جز حلال آبی، حلال آلی استخراج کننده مانند کلروبنزن، کلروفرم یا کربن دی سولفید با چگالی بالا و حلال آلی پخش کننده مانند متانول، استونیتریل و یا استون با امتزاج بالا در هر دو حلال استخراج و آبی به گونه ای باهم مخلوط می‌شوند که حلال آلی استخراج کننده به صورت قطرات کوچک در حلال آبی پخش شده و نمی‌تواند بدون حضور یک نیروی خارجی به یکدیگر متصل شده و ته‌نشین شود. این امر سبب افزایش سطح تماس ملکول‌های آب و حلال آلی به میزان بسیار زیادی در مقایسه با استخراج مایع مایع معمولی می‌شود که زمان لازم برای رسیدن به تعادل گونه استخراج شونده از حلال آبی به حلال آلی کاهش یافته است.

بدین ترتیب ابتدا مقدار مشخصی از یک محلول همگن از حلال پخش کننده و حلال آلی استخراج کننده با کمک سرنگ به سرعت درون محلول آبی مورد نظر تزریق می‌گردد. به علت پخش ذرات ریز حلال

¹ Dispersive-Liquid Liquid MicroExtraction – Solidification of Floating Organic Droplet

استخراج کننده در درون حلال آبی سبب تشکیل محلول ابری شکل می‌شوند، که تا حد زیادی پایدار بوده و می‌توان ساعت‌ها به همین حالت باقی بماند. سپس این مخلوط سانتیفریوژ شده و در نتیجه ذرات ریز حلال استخراج کننده که دارای دانسیته بالاتری نسبت به آب هستند، ته نشین می‌گردند. این فاز ته نشین شونده جهت آنالیز با روش‌های دستگاهی مورد استفاده قرار می‌گیرد [۵۶].

در DLLME، عواملی که بازده استخراج را تحت تأثیر قرار می‌دهد به شرح زیر است:

۱- حلال استخراج مناسب

۲- حلال پخش مناسب

۳- حجم حلال استخراج کننده

۴- حجم حلال پخش کننده

در استخراج مایع مایع پخشی، زمان استخراج به عنوان یک فاصله زمانی بین تزریق مخلوطی از یک حلال پخش و حلال استخراج قبل از سانتیفریوژ تعریف می‌شود.

حلال استخراج کننده می‌بایست غیر قابل امتزاج با آب بوده و دانسیته بیشتری نسبت به آب داشته باشد. معمولاً حلال‌های هالوژن‌دار و سولفور ه مانند کلروفرم، کربن تترا کلرید، کلرو بنزن و یا حلال‌های غیرهالوژنی مانند کربن دی سولفید و نیترو بنزن دارای چنین شرایطی می‌باشند. این حلال‌ها شدیداً سمی و و از نظر زیست محیطی خطرناک هستند.

در سال ۲۰۰۷ یمینی و همکارانش روش میکرواستخراج مایع جدید بر اساس انجمادسازی قطره آلی شناور (LPME-SFO) معرفی کردند. در این روش، از حلال استخراج با چگالی کمتر از آب استفاده شده است، که سمیت کمتری نسبت به حلال‌های استخراج هالوژن‌دار دارند. این تکنیک به دلیل استفاده از حلال‌های آلی با چگالی کم و نقطه ذوب مناسب نیاز به هیچ نگهدارنده‌ای مانند نوک سوزن میکرو سرنگ، فیبرتوخالی یا لوله لاستیکی از جنس پلی کلروپرن برای نگهداشتن میکروقطره آلی ندارد. کاهش ناگهانی دما سبب انجماد قطره آلی در زمان کوتاه می‌شود. سپس قطره منجمد شده با استفاده از یک اسپاتول

کوچک به یک ویال مخروطی منتقل و در دما محیط ذوب شده و اندازه گیری آنالیت با روش تجزیه ای مناسب انجام می شود [۵۷،۵۸]. با این حال زمان استخراج تا حدودی طولانی بود و نیاز آنالیزهای تجزیه ای سریع را برآورده نمی کرد.

در سال ۲۰۰۸ هوانگ و همکاران، یک روش جدید بر اساس DLLME و LPME-SFO برای غلبه بر مشکل ذکر شده معرفی کردند. در این روش مخلوط حلال های استخراج کننده و پخش کننده سریعاً به محلول نمونه تزریق می شود. سپس همانند روش SFOD، ظرف حاوی محلول نمونه در داخل ظرفی حاوی قطعات یخ قرار داده شد تا فاز آلی منجمد شود. مزیت این روش نسبت به روش SFOD، سطح تماس زیاد بین نمونه و حلال استخراج کننده است که به طور مؤثر انتقال جرم را بهبود بخشیده و سریعاً حالت تعادل را ایجاد می کند [۵۹].

در سال ۲۰۱۵ فرج زاده و همکاران، یک روش استخراج جدید براساس استخراج مایع-مایع جریان مخالف هموزن با اثر نمک خارج کننده جفت شده با میکرو استخراج مایع-مایع پخشی معرفی کردند. در این روش ابتدا یک ستون کوچک با عامل جداکننده (نمک سدیم کلرید) پر شده و سپس مخلوطی از محلول هدف و حلال استخراج از ستون با سرعت جریان مشخص عبور داده شد. با عبور دادن مخلوط، سدیم کلرید حل می شود و به دلیل اثر نمک خارج کننده، قطرات ریز استونیتریل تشکیل می شود. قطرات تولید شده از طریق مخلوط باقی مانده بالا می آیند و به عنوان یک لایه جدا شده جمع آوری می شوند. سپس فاز آلی جمع آوری شده (استونیتریل) با یک سرنگ برداشته شده و با ۱،۱،۲-تتراکلرواتان (حلال استخراج در سطح μL) مخلوط می شود و با سرنگ به محلول نمک سدیم کلرید با غلظت مشخص تزریق شده و محلول ابری تشکیل می شود. در ادامه با سانتریفیوژ کردن محلول ابری قطرات ریز حلال استخراج در انتها لوله آزمایش جمع شده و برای تحلیل به (GC-FID) تزریق شدند [۶۰]. مزیت این روش می توان به استخراج

ترکیبات از بافت‌های پیچیده بدون نیاز به آماده سازی نمونه نام برد، ولی عیب این روش می‌توان به چند مرحله ای بودن مراحل استخراج اشاره کرد.

در این پروژه برای اولین بار از تلفیق روش استخراج جدید براساس استخراج مایع-مایع جریان مخالف هموژن با اثر نمک خارج کننده جفت شده با میکرو استخراج مایع-مایع پخشی بر اساس شناور سازی قطره آلی برای پیش تغلیظ و تعیین همزمان بنزودیازپین‌ها مورد استفاده قرار گرفت.

۳-۲ روش‌های بهینه سازی پارامترها

هر فرآیند تابع تعدادی از متغیرهای مؤثر و مقدار آن‌ها می‌باشد. این متغیرهای مؤثر بر فرآیند مانند، دما، زمان و ...، پارامتر یا عامل و مقدار این پارامترها سطح نامیده می‌شود. ممکن است محقق از روش قدیمی آزمون و خطا استفاده نماید، یعنی آزمایش‌های بسیار زیادی را در شرایط مختلف انجام دهد و پس از رد آزمایش‌های نامطلوب به آزمایش مطلوب برسد. اما روش‌های بهینه‌سازی روش‌هایی هستند که سطوحی از متغیرهای مؤثر در آزمایش را مشخص می‌نمایند، به طوری که در این سطوح از متغیرها، پاسخ بهینه ایجاد گردد. پاسخ تجزیه‌ای در فرآیندهای تجزیه‌ای مختلف، متفاوت است. در برخی از موارد، هدف به دست آوردن شرایطی است که در آن پاسخ دستگاه حداکثر (مثلاً بیشترین مقدار جذب، شدت نشر و ...) باشد و در موارد دیگر، هدف بهینه سازی، افزایش سیگنال به نوفه یا سیگنال به زمینه، ایجاد بهترین تفکیک و یا به دست آوردن حداقل پاسخ برای گونه‌های مزاحم می‌باشد. 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 جهت رسیدن به شرایط بهینه نیاز داشته باشد [۶۱]. روش‌های متفاوتی برای بهینه سازی متغیرها وجود دارد که از بین آن‌ها به موارد زیر می‌توان اشاره کرد:

۱- روش تک متغیره

۲- روش سیمپلکس

۳- روش طراحی آزمایش^۱

۴- روش مربعات لاتین

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

۲-۳-۱ روش تک متغیره

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

۲-۳-۲ طراحی آزمایش

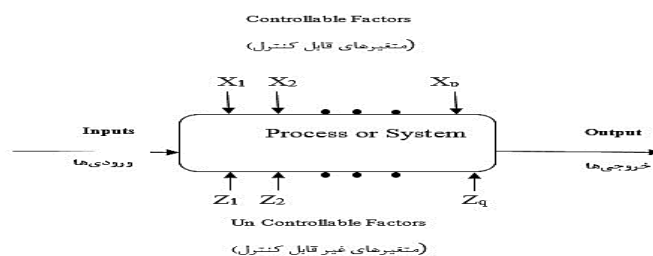
طرح‌های آزمایش الگوهایی هستند که برای انجام آزمایش‌ها و به منظور به‌دست آوردن اطلاعات دقیق و صحیح درباره مواد مورد مطالعه به‌کار می‌روند. به عبارت دیگر، طرح‌های آزمایشی، علم طرح ریزی، اجرا، تجزیه آماری و نتیجه‌گیری در مورد آزمایش‌ها است. با اجرای طرح‌های آزمایشی می‌توان مقدار بهینه نتایج اندازه‌گیری (پاسخ‌ها) را تعیین کرد. کاربرد طرح‌های آزمایشی در زمینه مختلف علم شیمی و علوم وابسته، از اهمیت زیادی برخوردارند. در شیمی آلی با اجرای طرح‌های آزمایشی مناسب می‌توان با افزایش

¹ Exprimental Design

راندمان یک سنتز، مقدار محصولات جانبی را به حداقل رساند. در شیمی تجزیه نیز با اجرای طرح‌های آزمایشی می‌توان روش‌های آماده‌سازی نمونه، پیش‌تغلیظ و استخراج و همچنین کیفیت و زمان جداسازی اجزای یک نمونه در کروماتوگرافی را بهینه‌سازی نمود [۴۴].

۳-۳-۲ اصول اولیه طراحی آزمایش

در هر بررسی تجربی، پاسخ‌ها و نتیجه‌گیری‌های حاصل به شدت به روش جمع‌آوری داده‌ها بستگی دارد و بنابراین آزمایش‌ها می‌بایست در شرایط یکسان انجام پذیرد. پس از جمع‌آوری داده‌ها، نتیجه‌گیری نهایی بسیار مهم است. آزمایش‌ها در یک پروژه تحقیقاتی جهت نمایش عملیاتی فرآیند با سیستم صورت می‌گیرد. همان‌طور که در شکل (۲-۲) نشان داده شده است فرآیند را می‌توان به صورت یک مدل عمومی که شامل ترکیبی از ماشین‌ها، روش‌ها، ... و سایر منابع به کار رفته جهت تبدیل ورودی‌ها (منظور مواد اولیه و انرژی است) به خروجی یا محصول است نمایش داد. در هر فرآیند همواره بعضی از متغیرهای فرآیند مانند $X_1, X_2, \dots, X_n$ قابل کنترل بوده، در حالی که تعداد دیگری از متغیرها همچون $Z_1, Z_2, \dots, Z_p$ غیر قابل کنترل می‌باشند.



شکل (۲-۲) مدل عمومی یک فرآیند [۶۲]

هدف از انجام یک آزمایش بیشتر شامل پی‌بردن به موارد زیر است:

- ۱- کدام متغیر بیش از سایر متغیرها بر پاسخ اثر می‌گذارد.
- ۲- تعیین مقادیر متغیرهای مؤثر به منظور کوچک شدن تغییرات در پاسخ (Y)

۳- مقادیر مؤثر X چنان تنظیم گردد تا اثر متغیرهای غیرقابل کنترل کمینه گردد.

در حقیقت هدف کسی که تحقیق را انجام می‌دهد تعیین اثر فاکتورهای مؤثر بر فرآیند بر مقدار پاسخ و بهینه‌سازی آن‌ها می‌باشد. چگونگی طراحی چنین آزمایش‌هایی به جهت رسیدن به هدف موردنظر را رهیافت آزمایش می‌نامند.

آزمایش بخشی از عملیات فرآیند بوده و راهی است که توسط آن درمی‌یابیم فرآیند یا سیستم موردنظر کارایی دارد یا خیر و به‌علاوه به وسیله انجام آزمایش، داده‌هایی به‌دست می‌آید که در نتیجه‌گیری به آن‌ها استناد می‌شود. اطلاعات به‌دست آمده از داده‌ها ممکن است آزمایش‌های دیگری را پیشنهاد نماید. کاربرد طراحی آزمایش ممکن است به موارد زیر منجر شود:

۱- بهبود راندمان فرآیند

۲- کاهش تغییرات پاسخ و مطابقت بیشتر با الزامات قراردادی مانند استانداردها

۳- کاهش زمان فرآیند

۴- کاهش هزینه‌های کلی مانند مواد مصرفی، تکرار آزمایش و نیروی انسانی

وقتی پارامترهای متعددی در سطوح مختلف در آزمایش دخیل باشند، آنگاه طراحی یک آزمایش تجربی مؤثر و کارا برای رسیدن به نتایج بهینه حائز اهمیت است. استفاده از آمار در طراحی آزمایش به منظور بررسی عوامل مختلف تاثیرگذار بر روی نتایج منجر به کاهش تعداد آزمایش‌های لازم برای دستیابی به شرایط بهینه و در نتیجه کاهش زمان و هزینه می‌گردد. متداول‌ترین روش بهینه‌سازی روش یک متغیر در زمان است. این روش گاهی اوقات منجر به یافتن نقاط بهینه نادرست می‌شود و این امر به دلیل برهم‌کنش احتمالی بین متغیرها بوده و علاوه بر این، برهم‌کنش بین متغیرها را نیز نمی‌توان مشخص کرد. در عوض طرح‌های آماری قادر به تعیین همزمان تأثیر فاکتورهای مختلف بر روی پاسخ‌ها بوده و همچنین در این

روش‌ها فاکتور داده شده در یک سطح چندین بار آزمایش شده و اطلاعات کمی زیادی در زمینه مهم بودن اثرات فاکتورهای مختلف و برهمکنش بین آن‌ها در اختیار ما قرار می‌دهد [۶۳].

۲-۳-۴ دسته بندی روش‌های طراحی آزمایش

بر اساس اهداف یک آزمایش، همه طرح‌ها می‌توانند در دو طبقه بزرگ دسته بندی شوند که عبارت‌اند از: طرح غربالگری^۱ و طرح بهینه سازی^۲ [۶۴].

۲-۳-۴-۱ طرح غربالگری

این طرح، برای تعیین عوامل مهم و اثر متقابل آن‌ها از تمام عوامل بالقوه استفاده می‌شود. این نوع طرح‌ها، عوامل کیفی، کمی و ترکیب آن‌ها را به طور همزمان بررسی می‌کند. در واقع در یک آزمایش غربالگری، معمولاً علاقه‌مند هستیم متغیرهای تأثیرگذار بر پاسخ فرآیند را شناسایی کنیم. اغلب برای مرحله‌ی غربالگری، از روش‌های فاکتوریال کامل دو سطحی^۳، فاکتوریال کسری دو سطحی^۴ و پلاکت برمن^۵ استفاده می‌شود [۶۵].

۲-۳-۴-۲ طرح فاکتوریال

یک طرح فاکتوریال زمانی استفاده می‌گردد که ارزیابی اثرات چندین عامل مورد نظر باشد. در بعضی از طرح‌ها، عامل‌های مورد مطالعه همگی با هم تغییر می‌کنند. در حقیقت منظور از آزمایش فاکتوریال، آزمایشی است که در هر تکرار کامل آن کلیه ترکیبات سطوح عامل‌های مورد نظر بررسی می‌گردند. از

^۱ - Screening design

^۲ - Optimization design

^۳ - Full factorial design

^۴ - Fractoinal factorial design

^۵ - Placket Burman design

محاسن این روش تعداد کم آزمایش‌ها برای به دست آوردن بیشترین اطلاعات است. از انواع اصلی می‌توان به طرح فاکتوریل کامل و فاکتوریل کسری اشاره نمود [۶۶].

الف) طرح فاکتوریل کامل

طرح‌های فاکتوریل کامل دو سطحی به منظور تعیین اثر فاکتورها و برهم‌کنش‌های آن‌ها بر پاسخ مورد استفاده قرار می‌گیرند. این طرح‌ها مستلزم آن هستند که در تمام ترکیبات ممکن از دو سطح هر یک از k فاکتور، آزمایشی انجام گیرد. به طور کلی تعداد آزمایشات لازم 2^k است که k تعداد فاکتورهاست. در نتیجه، یک طرح k فاکتوریل دو سطحی را می‌توان طرح فاکتوریل کامل 2^k نامید. متداول‌ترین روش برای نمایش سطوح فاکتورها، استفاده از علائم $+1$ و -1 به ترتیب برای سطوح بالاتر و پایین‌تر فاکتورهاست. این نحوه نمایش برای فاکتورهای کمی و کیفی مورد استفاده قرار می‌گیرد.

ب) طرح فاکتوریل کسری

در این طرح وقتی تعداد عوامل مورد بررسی از ۵ بیشتر می‌شود، به علت زیاد شدن تعداد آزمایش‌ها، کسری از آن‌ها انتخاب و مورد بررسی قرار می‌گیرد و معمولاً به صورت 2^{K-P} نمایش داده می‌شود که در آن k تعداد عوامل مورد بررسی و p کسری از طراحی فاکتوریل کامل به کار رفته است [۶۶].

۲-۳-۴ طرح پلاکت-برمن

طراحی پلاکت-برمن که در سال ۱۹۴۶ توسط پلاکت و برمن ابداع شد، یک طراحی فاکتوریل کسری دو سطحی است که برهم‌کنش‌های بین فاکتورها را در نظر نمی‌گیرد. این طراحی برای تعیین فاکتورهای مؤثر بر پاسخ آزمایش تأثیرگذار استفاده می‌گردد. با توجه به اطلاعات نرم افزار Minitab16 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 هم باشد. بطور مثال ۱۲، ۲۰، ۲۴، ۲۸، ۳۶، ۴۰، ۴۴، ۴۸ تعداد آزمایش‌های تعریف شده در

طرح پلاکت- برمن می باشد که در آن ماکزیمم فاکتورهایی که می توان در هر طراحی آزمایش بررسی کرد برابر است با:

$$f = N - 1 \quad (1-2)$$

f = حداکثر تعداد فاکتورهای مورد بررسی

N = تعداد آزمایش های تعریف شده نرم افزار

مهم ترین حسن این روش ها کاهش تعداد آزمایش ها برای ارزیابی متغیرهای چندتایی و برهم کنش بین آنها است. این تکنیک ها می توانند به طور موفقیت آمیزی با بررسی پارامترهای گوناگون برای فرآیند استخراج به کار برده شوند [۶۷].

۲-۳-۵ طراحی بهینه سازی

بعد از غربالگری مرحله بهینه سازی است که در آن از طرح هایی استفاده می شود که هدف آنها، توصیف روابط غیرخطی بین پاسخ و فاکتورهاست. در این صورت لازم است مرتبه دوم فاکتورها در مدل وارد شوند. بدین منظور حداقل سه سطح از هر فاکتور را باید در نظر گرفت. دلیل اصلی استفاده از این طرح ها، استخراج مدل و رویه پاسخ مربوطه است. معمولاً ابتدا طرح های دو فاکتوری جهت تعیین فاکتورهای مؤثر مورد استفاده قرار گرفته و سپس تنها فاکتورهای مهم در بیش از دو سطح، توسط این طرح ها مورد مطالعه قرار خواهند گرفت.

۲-۳-۵-۱ طرح‌های چندسطحی^۱

ترسیم رویه‌های پاسخ مستلزم مدل‌سازی پاسخ به صورت تابعی از فاکتورها و برهم‌کنش‌های مؤثر است. طراحی آزمایش با بیش از دو سطح، جهت ایجاد مدل‌های خمیده^۲ برای توصیف رابطه کمی پاسخ و فاکتورها به کار می‌روند. توصیف محدوده آزمایشی توسط طرح‌های چندسطحی ممکن است چرخش پذیر^۳ یا مکعبی باشد. طرح‌های فاکتوریل سه‌سطحی از جمله طرح‌های مکعبی است و از این طرح تنها در مواردی که تعداد فاکتورها کم باشد استفاده می‌گردد و زمانی که تعداد فاکتورها زیاد باشد، از طرح‌های مرکب مرکزی استفاده می‌شود. از انواع طرح‌های مرکب مرکزی می‌توان به، طرح‌های باکس-بنکن^۴ و دوهرلرت^۵ که از جمله طرح‌های چرخش‌پذیر نیز محسوب می‌شوند، اشاره نمود. که در این پروژه از نرم افزار Minitab برای استفاده از این طرح‌ها جهت غربالگری و بهینه سازی پارامترها استفاده شد که در ادامه این طرح‌ها به اختصار توضیح داده می‌شود.

۲-۳-۵-۲ طرح مرکب مرکزی

این طرح در سال ۱۹۵۱ توسط باکس و ویلسون^۶ ارائه شد. طرح‌های مرکب مرکزی طرح‌های فاکتوری کامل یا کسری دو سطحی هستند که بوسیله تعداد محدودی از متغیر انتخاب شده به منظور برآورد مدل رویه پاسخ درجه دوم کاربرد دارند. طرح مرکب مرکزی یک ابزار طراحی ایده آل برای آزمایش‌های متوالی بوده و امکان بررسی خطای مدل را زمانی که مقادیر مناسبی از آزمایش در دسترس باشد امکان پذیر می‌سازد [۶۸،۶۹].

^۱-Multi-level design

^۲-Curved models

^۳-Rotatable

^۴-Box-Benken

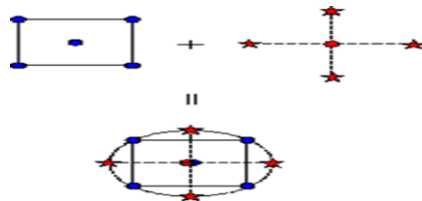
^۵-Doehlert

^۶-Wilson

تعداد آزمایش‌ها از معادله (۲-۲) به‌دست می‌آید.

$$N = 2^f + 2f + N_0 \quad (2-2)$$

در این معادله 2^f نقاط فاکتوریل $2f$ نقاط ستاره‌دار و N_0 نیز تعداد نقاط مرکزی است (شکل ۲-۳) [۷۰].



شکل (۲-۳) طراحی آزمایش در طرح مرکب مرکزی [۷۰]

در طرح‌های مرکب مرکزی اگرچه فاکتورها در سه یا پنج سطح مورد بررسی قرار می‌گیرند، اما تعداد آزمایش‌ها بسیار کمتر از طرح فاکتوریل سه‌سطحی است. طرح‌های مرکب مرکزی را به سه دسته طرح‌های مرکب مرکزی محدود شده (CCC)^۱، مرکب مرکزی محاط شده (CCI)^۲ و مرکب مرکزی وجوه مرکز پر (CCF)^۳ تقسیم می‌کنند. این تقسیم‌بندی براساس فاصله نقطه ستاره‌ای از مرکز طرح که با پارامتر α نمایش داده می‌شود، صورت می‌گیرد. در طرح CCF، $\alpha = 1$ در نظر گرفته می‌شود. در حالیکه در طرح‌های CCC و CCI مقدار این پارامتر به ترتیب بزرگ‌تر و کوچک‌تر از یک است. از بین طرح‌های مرکب مرکزی، طرح‌های CCC و CCI چرخش‌پذیر بوده و طرح CCF مکعبی نیز است.

^۱-Central composite circumscribed (CCC)

^۲-Central composite iinscribed (CCI)

^۳-Central composit face-centred(CCF)

۳-۵-۳-۲ طرح باکس-بنکن

این مدل 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 (N) در این طرح از رابطه زیر به دست می آید:

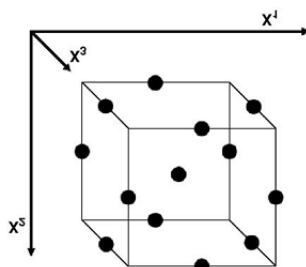
$$N = 2K(K - 1) + C_0 \quad (۳-۲)$$

که k تعداد فاکتورها و C_0 تعداد نقاط مرکزی می باشد. شکل کلی این مدل به صورت یک معادله چندجمله ای درجه دوم می باشد که در زیر نشان داده شده است:

$$y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j \quad (۴-۲)$$

که y پاسخ، X_i و X_j متغیرهای ورودی مؤثر بر پاسخ، β_0 مقدار ثابت، β_i ضریب خطی، β_{ii} ضریب برهم کنش دوتایی و β_{ij} ضریب برهم کنش بین X_i و X_j هستند.

در این طرح متغیرها در نقاط میانی یال ها و مرکز فضای طراحی قرار می گیرند و هیچ نقطه ای روی گوشه مکعب وجود ندارد [۶۶]، که در شکل (۴-۲) نمایی از طرح باکس-بنکن آورده شده است. از جمله فواید این طرح این است که نسبت به طرح مرکب مرکزی تعداد آزمایش کمتری دارد و همچنین این طرح از این جهت نسبت به طرح فاکتوریل سه سطحی بهتر است که عمدتاً برای تعداد متغیرهای بزرگ به کار می رود.



شکل (۴-۲) طراحی آزمایش در روش باکس-بنکن [۶۷]

فصل ۳

تجربی

۳-۱ مقدمه

با توجه به اهمیت و کاربردهای داروهای آرام‌بخش و نقش آن‌ها بر سلامتی انسان که در فصل اول اشاره شد، ارائه روش ساده، حساس و گزینش‌پذیر برای اندازه‌گیری مقادیر کم از آن‌ها ضروری به نظر می‌رسد. در این پژوهش، کاربرد استخراج مایع-مایع جریان مخالف هموزن با اثر نمک خارج کننده و میکرو استخراج مایع-مایع پخشی جفت شده با HPLC برای پیش تغلیظ و اندازه‌گیری همزمان آلپرازولام و کلرودیازپوکساید در نمونه‌های حقیقی مورد بررسی قرار گرفت.

۳-۲ مواد مورد استفاده و طرز تهیه محلول‌ها

مشخصات مواد شیمیایی مورد استفاده و شرکت سازنده آن‌ها در جدول ۳-۱ نمایش داده شده‌اند. برای تهیه تمام محلول‌ها از آب دو بار تقطیر استفاده گردید. ۰/۰۱۰۰ گرم از داروی کلرودیازپوکساید و آلپرازولام تهیه شده از شرکت دکتر عبیدی هرکدام جداگانه در متانول حل شده و به حجم ۱۰/۰ میلی لیتر رسانده و بدین صورت محلول مادر کلرودیازپوکساید و آلپرازولام با غلظت ۱۰۰۰/۰ میلی گرم بر لیتر از هر دارو تهیه شد. محلول ۱۰۰/۰ میلی گرم بر لیتر به صورت روزانه، از رقیق کردن محلول مادر که به وسیله متانول صورت می‌گرفت تهیه شد. محلول‌های رقیق‌تر به وسیله رقیق کردن این محلول توسط آب تهیه شد. محلول‌های بافر فسفاتی با pH ۳/۰۰ تا ۸/۰۰ از مخلوط کردن حجم‌های معینی از محلول‌های پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات دو آبه ۰/۰۶۷ مولار و سدیم هیدروژن فسفات ۰/۰۶۷ مولار تهیه شدند. برای تهیه محلول بافر فسفات با pH کمتر از ۳/۰۰ از محلول‌های سدیم دی‌هیدروژن فسفات دو آبه ۰/۰۶۷ مولار و فسفریک اسید ۰/۱۰۰ مولار و برای تهیه محلول بافر فسفات با pH بیشتر از ۸/۰۰ از محلول پتاسیم هیدروژن فسفات ۰/۰۶۷ مولار و سدیم هیدروکسید ۰/۱۰۰ مولار استفاده شد.

جدول (۱-۳) مواد شیمیایی مورد استفاده

نام ماده شیمیایی	فرمول شیمیایی	شرکت سازنده
سدیم کلرید	NaCl	مرک ^۱
پتاسیم دی هیدروژن فسفات دو آب	KH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	مرک
دی سدیم هیدروژن فسفات	Na ₂ HPO ₄	مرک
فسفریک اسید	H ₃ PO ₄	مرک
متانول	CH ₃ OH	مرک
استون	C ₃ H ₆ O	مرک
استونیتریل	CH ₃ CN	مرک
هیدروکلریک اسید	HCl	مرک
سدیم هیدروکسید	NaOH	مرک
۱-آندکانول	C ₁₁ H ₂₄ O	مرک
۱-دوکانول	C ₁₂ H ₂₆ O	مرک
۱، ۱۰-دی کلرو دکان	C ₁₀ H ₂₀ Cl ₂	مرک
دی متیل فرم آمید	C ₃ H ₇ NO	مرک
آلپرازولام، کلرودیازپوکساید		دکتر عبیدی

۳-۳ تجهیزات و دستگاه‌های مورد استفاده

جداسازی و اندازه‌گیری داروها با استفاده از سیستم HPLC ۱۱۰۰ Agilent مجهز به آشکارساز فرا بنفش چند طول موجی^۲ (UV-VWD) و یک لوپ ۵ میکرومتری انجام شد. همچنین از یک رایانه مجهز به برنامه نرم‌افزاری ChemStation Agilent برای پردازش داده‌های کروماتوگرافی استفاده شد. جداسازی با ستون از نوع C₁₈ (۱۵۰ × ۴/۵) میلی متر با اندازه ذرات ۵ میکرومتر و در دمای اتاق انجام شد. اندازه‌گیری‌ها در دو طول موج جذبی ۲۶۰ و ۲۲۲ نانومتر به ترتیب برای کلرودیازپوکساید و آلپرازولام، انجام شد. لازم به ذکر است که انتخاب طول موج‌ها با توجه به طیف جذبی این داروها (شکل ۱-۳) صورت گرفت، که در

^۱ Merck

^۲ Ultraviolet-Variable Wavelength Detector

اینجا $\lambda_{\max}$ به عنوان طول موج مورد اندازه‌گیری انتخاب شد، همچنین از حمام آب فرا صوت (BANDELIN الکترونیکی، آلمان) و یک دستگاه سانتریفیوژ (EBA Hettich ۲۰، آلمان) نیز در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفت. تنظیم و اندازه‌گیری pH محلول نمونه و فاز متحرک با استفاده از pH متر مترام ۷۸۰^۱ مجهز به الکترود ترکیبی شیشه‌ای-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 سارتریوس^۲ مدل A200S ساخت کشور آلمان استفاده شد. برای برداشتن حجم معینی از حلال آلی از میکروپیپت‌های ۱۰۰/۰ و ۱۰۰۰/۰ میکرولیتری با حجم قابل تنظیم ساخت شرکت اپندورف^۳ مدل Research 100 استفاده شد و همچنین برای تزریق نمونه‌ها از یک سرنگ اچیلنت ۵۰/۰ میکرولیتری استفاده گردید.

۳-۴ شرایط کروماتوگرافی

جداسازی کروماتوگرافی با استفاده از روش تک شویشی برای اندازه‌گیری همزمان آلپرازولام و کلرودیازپوکساید صورت پذیرفت. بدین منظور مخلوطی از متانول، آب و محلول دی سدیم هیدروژن فسفات (pH برابر ۷/۲۵، با غلظت M ۰/۱) به ترتیب با نسبت حجمی (۲۵:۲۵:۵۵) با سرعت جریان ۱/۰ میلی لیتر بر دقیقه به عنوان فاز متحرک مورد استفاده قرار گرفت [۷۱].

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

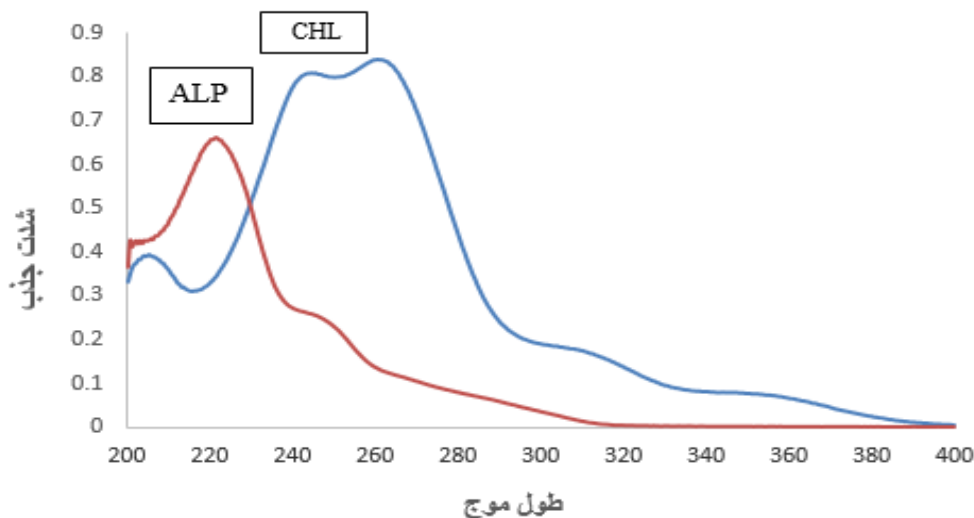
به منظور مشخص کردن بهترین طول موج برای آشکارسازی، طیف جذبی آنالیت‌ها در گستره ۴۰۰-۲۰۰ نانومتر ثبت شد. بدین منظور محلول‌های ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر آلپرازولام و کلرودیازپوکساید به صورت جداگانه در فاز متحرک تهیه گردید و سپس طیف جذبی هریک از آن‌ها نسبت به فاز متحرک ثبت

^۱ Metrohm

^۲ Sartorius

^۳ Eppendorf, model Research 100

شد (شکل ۳-۱). با توجه به طیف جذبی این داروها اندازه‌گیری‌ها در دو طول موج جذبی ۲۶۰ و ۲۲۲ نانومتر به ترتیب برای کلرودیازپوکساید و آلپرازولام، انجام شد.

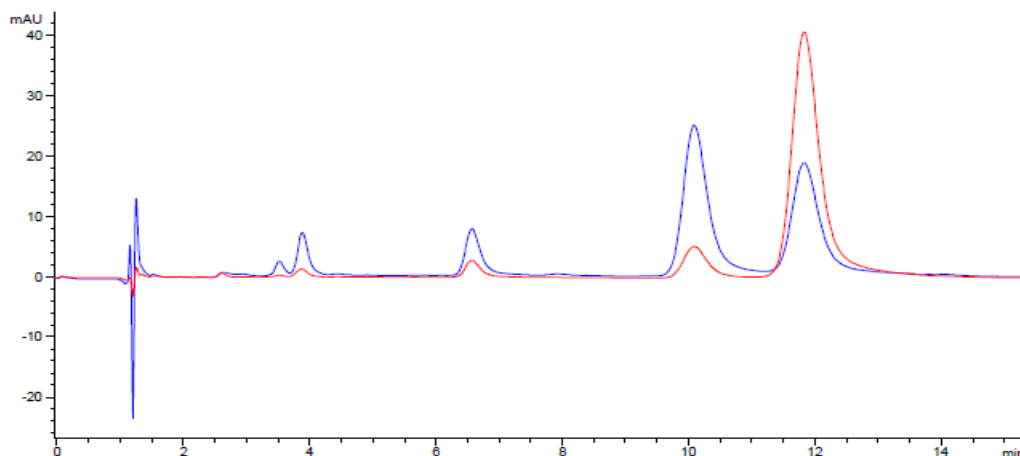


شکل (۳-۱) طیف جذبی آلپرازولام و کلرودیازپوکساید، شرایط آزمایش: غلظت آلپرازولام و کلرودیازپوکساید (۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر)، حلال فاز متحرک (مخلوطی از بافر فسفات pH برابر ۷/۲۵، با غلظت 0.1 M))، متانول و آب با نسبت ۲۵:۵۵:۲۰. طول موج ۲۲۲ نانومتر مربوط به دارو آلپرازولام و طول موج ۲۶۰ نانومتر مربوط به دارو کلرودیازپوکساید می‌باشد.

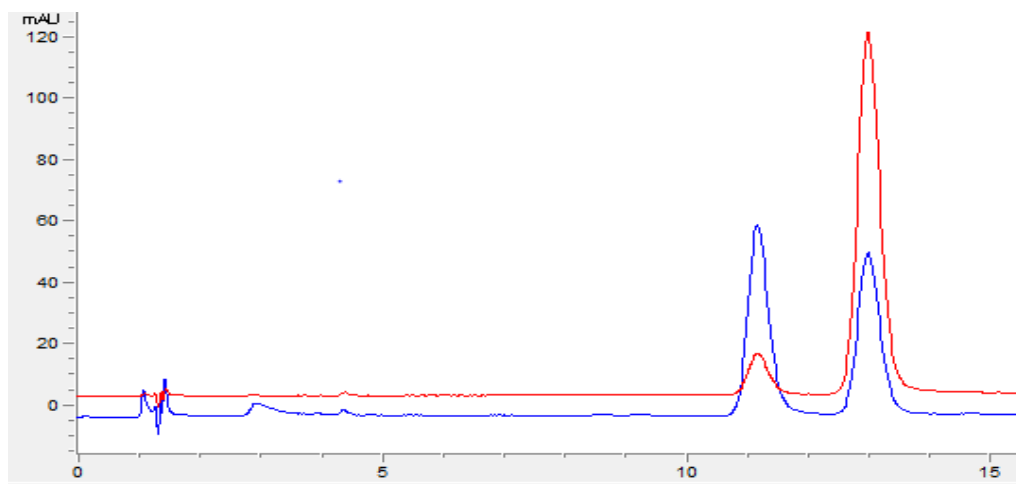
۳-۵ روش کار در بهینه سازی پارامترهای مؤثر در اندازه گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام

در این روش، ابتدا ۲/۰۰۰۰ گرم نمک سدیم کلرید به‌عنوان عامل جدا کننده فاز آلی از آبی درون یک ستون (از یک بورت با حجم ۲۵/۰ میلی لیتری که تا خط نشانه با پشم شیشه مسدود شده بود به‌عنوان ستون استخراج استفاده گردید). حاوی پشم شیشه ریخته شد. سپس در یک بالون ۵/۰ میلی لیتری، ۱/۰ میلی لیتر از محلول حاوی ۱۰/۰ میکروگرم بر میلی لیتر هر یک از داروهای آلپرازولام و کلرودیازپوکساید و ۱/۰ میلی لیتر از محلول بافر به آن اضافه و سپس به حجم رسانده شد. محلول درون

بالون به یک لوله آزمایش که حاوی ۱/۵۰ میلی لیتر استونیتریل به عنوان حلال استخراج مرحله اول بود اضافه شد. پس از اختلاط، محلول درون لوله آزمایش به ستون حاوی نمک انتقال داده شد. پس از بازکردن شیر بورت با سرعت جریان ۰/۵۰ میلی لیتر بر دقیقه، قطرات ریز استونیتریل به دلیل اثر نمک خارج کننده و جریان مخالف به سمت بالای محلول حرکت نموده، پس از گذشت ۱۰/۰ دقیقه شیر بورت بسته شد و محلول بالایی با حجم ۱/۵ میلی لیتر به درون ویال حاوی حجم مشخصی از حلال ۱-دودکانول منتقل شد. سپس مخلوط حلال استونیتریل که حاوی آنالیت‌ها و حلال استخراج مرحله دوم به وسیله یک سرنگ انسولین ۲/۰ میلی لیتری به محلول ۱/۰ درصد وزنی/حجمی از آب و نمک سدیم کلرید به سرعت تزریق شد که یک محلول ابری مانند تشکیل شد. پس از آن، لوله آزمایش را در حمام فراصوت با فرکانس مافوق صوت ۶۰ کیلوهرتز به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس محلول نمونه در ۳۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و قطرات مایع آلی (لایه ۱-دودکانول، به دلیل چگالی کمتر نسبت به آب) در بالای لوله آزمایش به صورت شناور تشکیل شد. پس از آن، لوله آزمایش به مدت ۱۰ دقیقه در حمام یخ منتقل و حلال آلی شناور به صورت قطره جامد درآمد. سپس قطره آلی منجمد شده به یک ویال مخروطی توسط یک قاشق پزشکی کوچک منتقل شد که در دمای اتاق ذوب شده و سپس ۵/۰ μL از آن به دستگاه HPLC تزریق شد. برای محلول شاهد نیز به طور مشابه عمل شد، با این تفاوت که محلول شاهد فاقد داروهای کلرودیازپوکساید و آلپرازولام بود. اختلاف سیگنال محلول نمونه (سیگنال نمونه برابر با سطح زیر منحنی کلرودیازپوکساید در طول موج ۲۶۰ نانومتر و آلپرازولام در ۲۲۲ نانومتر می‌باشد) و شاهد، به عنوان سیگنال تجزیه‌ای مورد استفاده قرار گرفت.



شکل (۲-۳) کروماتوگرام محلول استاندارد ۲۰/۱۰ میلی گرم بر لیتر آلپرازولام و کلرودیازپوکساید، ترکیب بافر فسفاتی با pH برابر با ۷/۲۵، آب و متانول با نسبت ۵۵:۲۵:۲۰ به عنوان فاز متحرک، سرعت جریان ۱/۰ میلی لیتر بر دقیقه، رنگ آبی مربوط به طول موج ۲۲۲ نانومتر و دارو آلپرازولام و رنگ قرمز مربوط به طول موج ۲۶۰ نانومتر و دارو کلرودیازپوکساید می باشد.



شکل (۳-۳) کروماتوگرام پیش تغلیظ محلول ۱/۵۰ میلی گرم بر لیتر آلپرازولام و کلرودیازپوکساید تحت شرایط بهینه، ترکیب بافر فسفاتی با pH برابر با ۷/۲۵، آب و متانول با نسبت ۵۵:۲۵:۲۰ به عنوان فاز متحرک، سرعت جریان ۱/۰ میلی لیتر بر دقیقه، رنگ آبی مربوط به طول موج ۲۲۲ نانومتر و دارو آلپرازولام و رنگ قرمز مربوط به طول موج ۲۶۰ نانومتر و دارو کلرودیازپوکساید می باشد.

۳-۶ منحنی کالیبراسیون مستقیم

محلول‌هایی با غلظت‌های متفاوت از کلرودیازپوکساید و آلپرازولام در محدوده غلظتی ۰/۰۵ تا ۵۰۰۰/۰ میلی گرم بر لیتر با رقیق‌سازی از محلول ۶۰۰۰/۰ میلی گرم بر لیتر با متانول هر کدام جداگانه تهیه شدند. پس از آماده‌سازی، ۰/۱ میلی لیتر از محلول هر یک از داروها و ۰/۹ میلی لیتر از حلال استخراج ۱- آندکانول برداشته به یک ویال ۱/۰ میلی لیتری منتقل شدند. پس از یکنواخت نمودن، ۵/۰ میکرولیتر از این محلول به دستگاه HPLC تزریق گردید و سیگنال حاصل که سطح زیر پیک نمونه‌ها بود، ثبت گردید. منحنی‌های کالیبراسیون مربوطه نیز از رسم تغییرات سیگنال آنالیت بر حسب غلظت آلپرازولام و کلرودیازپوکساید به دست آمد که نتایج حاصل شده در جداول (۲-۳) و (۳-۳) و شکل‌های (۳-۴) و (۳-۵) به ترتیب برای آلپرازولام و کلرودیازپوکساید نشان داده شده است. منحنی کالیبراسیون در غلظت ۳۰/۰ تا ۹۰۰/۰ میلی گرم بر لیتر برای آلپرازولام و غلظت ۳۰/۰ تا ۷۷۵/۰ میلی گرم بر لیتر برای کلرودیازپوکساید خطی می‌باشد.

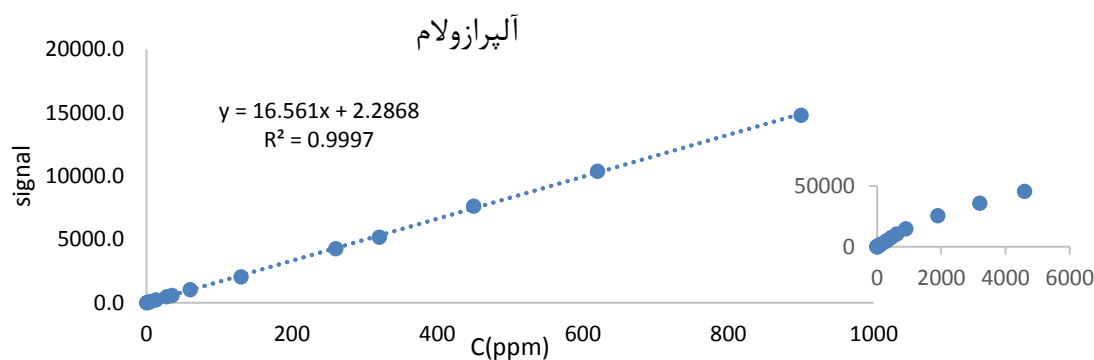
۳-۷ بررسی و بهینه‌سازی فاکتورهای مؤثر در پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام

به‌منظور فراهم نمودن بهترین شرایط جهت پیش‌تغلیظ و بهترین حساسیت، فاکتورهای مؤثر بر میکرواستخراج کلرودیازپوکساید و آلپرازولام، مورد بررسی قرار گرفتند. اصلی‌ترین عیب روش‌های بهینه سازی یک متغیر در یک زمان این است که برای نشان دادن برهم‌کنش بین فاکتورها کاملاً ناتوان بوده و زمان‌بر است. بنابراین می‌بایست استراتژی دیگری که شامل روش‌های آماری بوده و توانایی بیان این اثرات متقابل را داشته باشد، به کار برد و این یک دلیل اساسی برای استفاده از طراحی آزمایش است. در بررسی

فاکتورهای مؤثر، ابتدا از روش بهینه‌سازی یک متغیر در یک زمان جهت تعیین سطوح متغیرهای مؤثر بر روش استفاده گردید. فاکتورهای بررسی شده عبارت‌اند از:

جدول (۲-۳) سیگنال مستقیم به‌دست آمده برای داروی آلپرازولام با غلظت های متفاوت

سیگنال تجزیه ای	غلظت
۷/۵	۰/۳
۲۴/۵	۱/۲
۵۵/۰	۳/۰
۱۰۸/۶	۶/۰
۲۲۱/۲	۱۳/۰
۴۷۸/۸	۲۸/۰
۵۸۵/۳	۳۵/۰
۱۰۳۵/۷	۶۰/۰
۴۲۷۹/۹	۲۶۰/۰
۵۱۷۲/۸	۳۲۰/۰
۱۰۳۹۲/۵	۶۲۰/۰
۱۴۸۰۰/۸	۹۰۰

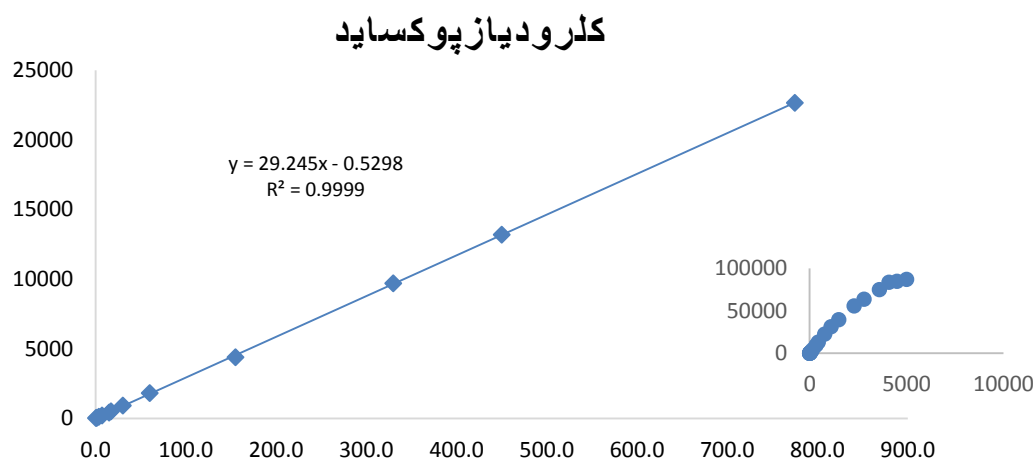


شکل (۴-۳) منحنی کالیبراسیون مستقیم آلپرازولام

غلظت‌های مختلفی از آنالیت در حجم ۱/۰ میلی‌لیتر در حلال ۱-آندکانول ترکیب بافر فسفات با pH برابر با ۷/۲۵، آب و متانول با نسبت ۵۵:۲۵:۲۰ به عنوان فاز متحرک، سرعت جریان ۱/۰ میلی‌لیتر بر دقیقه و طول موج ۲۲۲ نانومتر

جدول (۳-۳) سیگنال مستقیم به دست آمده برای داروی کلرودیازپوکساید با غظت های متفاوت

سیگنال تجزیه ای	غلظت
۸/۱	۰/۳
۴۸/۲	۱/۵
۱۰۷/۴	۳/۵
۲۰۹/۷	۷/۰
۴۱۲/۳	۱۵/۰
۴۹۹/۸	۱۷/۰
۹۰۷/۲	۳۰/۰
۱۸۰۹/۵	۶۰/۰
۴۳۹۰/۳	۱۵۵/۰
۹۶۹۹/۱	۳۳۰/۰
۱۳۱۹۰/۰	۴۵۰/۰
۲۲۶۵۰/۲	۷۷۵/۰



شکل (۳-۵) منحنی کالیبراسیون مستقیم کلرودیازپوکساید. غلظت های مختلفی از آنالیت در حجم ۱/۰ میلی لیتر در حلال ۱-آندکانول ترکیب بافر فسفاتی با pH برابر با ۷/۲۵، آب و متانول با نسبت ۵۵:۲۵:۲۰ به عنوان فاز متحرک، سرعت جریان ۱/۰ میلی لیتر بر دقیقه و طول موج ۲۶۰ نانومتر

۱- pH نمونه

۲- نوع بافر

۳- حجم بافر

۴- نوع حلال استخراج کننده مرحله اول

۵- حجم حلال استخراج مرحله اول

۶- نوع حلال استخراج مرحله دوم

۷- حجم حلال استخراج کننده مرحله دوم

۸- زمان اولتراسونیک

۹- زمان سانتریفیوژ

۱۰- دور سانتریفیوژ

۱۱- مطالعه سرعت جریان

۱۲- اثر نمک (قدرت یونی)

فاکتورهای ذکر شده به وسیله روش بهینه سازی 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 (نتایج و نمودارهای حاصل از روش بهینه سازی یک متغیر در یک زمان در پیوست آورده شده است).

جدول (۳-۴) نتایج حاصل از بهینه سازی یک متغیر در یک زمان در پیش تغلیظ و اندازه گیری آلپرازولام و کلرودیازپوکساید

فاکتور	محدوده مورد بررسی یا نوع فاکتور	مقدار بهینه
pH	۲/۰-۱۰/۰	۸/۰۰
نوع بافر	فسفاتی، بوراکسی، آمونیاکی	فسفاتی
حجم بافر	۰/۵-۲/۰ میلی لیتر	۱/۰ میلی لیتر
نوع حلال استخراج کننده مرحله اول	استون، استونیتریل، دی متیل فرم آمید	استونیتریل
حجم حلال استخراج کننده مرحله اول	۱-۲/۵ میلی لیتر	۲/۰ میلی لیتر
نوع حلال استخراج کننده مرحله دوم	۱-آندکانول، ۱-دودکانول، ۱ و ۱۰-دی کلرودکان	۱-آندکانول
حجم حلال استخراج کننده مرحله دوم	۱۵/۰-۵۵/۰ میکرولیتر	۳۵/۰ میکرولیتر
زمان اولتراسونیک	۴-۱۶ دقیقه	۱۰ دقیقه
زمان سانتریفیوژ	۵ تا ۱۵ دقیقه	۱۰ دقیقه
دور سانتریفیوژ	۳۰۰۰-۴۷۰۰ دور بر دقیقه	۴۵۰۰ دور بر دقیقه
مطالعه سرعت جریان	۰/۲۵ تا ۲ میلی لیتر بر دقیقه	۰/۵ میلی لیتر بر دقیقه
قدرت یونی (سدیم کلرید)	٪۰ تا ٪۱۲	٪۱۰/۰ وزنی / حجمی

۳-۸ بررسی و بهینه سازی فاکتورهای مؤثر بر پیش تغلیظ و اندازه گیری کلرودیازپوکساید

و آلپرازولام با استفاده از طراحی آزمایش

هدف از به کارگیری تکنیک های مختلف طراحی آزمایش، شناسایی عوامل مؤثر در فرآیند و تعیین مقادیر بهینه ی آنها می باشد. با کمک تکنیک های طراحی آزمایش می توان اولاً متغیرهایی که بیشترین تأثیر را در خروجی دارند، تعیین کرد و ثانیاً متغیرهای ورودی مؤثر را به گونه ای تعیین کرد که مقادیر پاسخ را به مقدار بهینه واقعی خود نزدیک نماید. همانطور که در بخش قبل دیده شد، پارامترهایی نظیر pH، نوع

و حجم حلال استخراج کننده مرحله اول و دوم، قدرت یونی، نوع بافر، حجم بافر، سرعت جریان، زمان اولتراسونیک، زمان و دور سانتریفیوژ در میزان پاسخ آشکارساز و حساسیت روش مؤثر هستند. از طرف دیگر احتمال برهم کنش متغیرها وجود دارد و در نتیجه شرایط حاصل از بهینه سازی یک متغیر در یک زمان نمی تواند شرایط بهینه واقعی باشد و از طرفی نیاز به تعداد آزمایش های زیاد و وقت گیر آزمایشگاهی است، بنابراین لازم است اثر فاکتورهای مؤثر بر حساسیت با استفاده از روش های طراحی آزمایش مورد بررسی قرار گیرد. به این منظور برای تعیین فاکتورهای مؤثر بر راندمان استخراج و مشخص نمودن اثر هر یک از این فاکتورها، طرح غربالگری پلاکت- برمن دو سطحی طراحی و اجرا شد. پس از مشخص شدن پارامترهای مؤثر، طرح آزمایشی باکس- بنکن نیز برای یافتن شرایط بهینه واقعی با استفاده از فاکتورهای مهم تعیین شده توسط طرح پلاکت- برمن به کار برده شد.

۳-۸-۱ تعیین سطح فاکتورها

به منظور تشخیص فاکتورهای مهم و تاثیرگذار بر پاسخ، طرح پلاکت-برمن انتخاب گردید. مقدار سطوح بعضی از فاکتورها مانند pH، حجم حلال استخراج مرحله اول، حجم حلال استخراج مرحله دوم، اثر نمک، سرعت جریان، زمان اولتراسونیک، زمان و دور سانتریفیوژ بر اساس نتایج حاصل از روش یک متغیر در زمان برای بررسی در طرح پلاکت-برمن انتخاب گردید. مقدار بهینه سایر فاکتورهای باقی مانده بر مبنای اطلاعات به دست آمده از روش بهینه سازی یک متغیر در یک زمان مشخص شد. سطوح انتخاب شده برای این فاکتورها در جدول (۳-۵) آورده شده است.

جدول (۳-۵): نام، علامت و سطوح فاکتورهای مؤثر بر پیش تغلیظ و اندازه‌گیری آلپرازولام و کلرودیازپوکساید

فاکتور	اسم و علامت	سطح پایین (-)	سطح بالا (+)
pH	pH	۳/۰	۸/۵
حجم حلال استخراج کننده مرحله اول (حجم استونیتریل) (میلی لیتر)	V-acn	۱/۲	۲/۳
حجم حلال استخراج کننده مرحله دوم (حجم ۱-آندکانول) (میکرولیتر)	V-und	۱۵/۰	۴۵/۰
اثر نمک (درصد وزنی حجمی)	S	۵/۰	۱۱/۰
سرعت جریان (میلی لیتر بر دقیقه)	Fr	۰/۳	۱/۰
زمان اولتراسونیک (دقیقه)	t.u	۷/۰	۱۲/۰
زمان سانتریفیوژ (دقیقه)	t.s	۷/۰	۱۵/۰
دور سانتریفیوژ (دور بر دقیقه)	rpm	۳۰۰۰	۴۷۰۰

۳-۸-۱-۱ طراحی آزمایش در طرح پلاکت-برمن جهت تعیین فاکتورهای مهم

برای طراحی آزمایش‌ها جهت غربال کردن فاکتورها و تعیین فاکتورهای مؤثر بر اندازه‌گیری آلپرازولام و کلرودیازپوکساید از نرم افزار Minitab 16 برای انجام طرح پلاکت-برمن و پردازش داده‌ها استفاده شد. همانطور که در بخش ۲-۳-۴-۳ بیان شد، تعداد آزمایش‌ها هنگامی که ۸ فاکتور مورد بررسی و دو تکرار وجود داشته باشد، ۲۴ آزمایش می‌باشد. طرح آزمایش برای تمام فاکتورها که شامل pH، حجم حلال استخراج کننده مرحله اول، حجم حلال استخراج کننده مرحله دوم، قدرت یونی (اثر نمک)، سرعت جریان، زمان اولتراسونیک، زمان و دور سانتریفیوژ هستند، در دو سطح و با دو تکرار انجام شدند. در تمامی ۲۴ آزمایش، میکرواستخراج بر اساس روش کار زیر انجام گردید.

در یک بالون با حجم ۵/۰ میلی لیتر، ۱/۰ میلی لیتر از محلول کلرودیازپوکساید و آلپرازولام با غلظت ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر، ۱/۰ میلی لیتر بافر در pH مورد نظر افزوده شد و سپس با آب مقطر به حجم رسانده شد. محلول آنالیت ها به همراه حجم مشخصی از حلال استونیتریل به درون ستون با سرعت جریان مناسب برای

هر استخراج منتقل شد. پس از پایان استخراج (باقی ماندن حجم استونیتریل در بالای نمک) شیر ستون بسته شد و حجم مورد نظر از حلال استونیتریل حاوی آنالیت به ویال با حجم مورد نظر ۱-آندکانول مخلوط گردید و توسط سرنگ انسولین با سرعت به درون لوله آزمایش حاوی غلظت مشخصی از نمک سدیم کلرید تزریق شد. سپس لوله آزمایش با زمان مشخص در هر استخراج درون حمام فراصوت با فرکانس مافوق صوت ۶۰ کیلو هرتز قرار داده شد، در ادامه با زمان و دور مورد نظر سانتریفیوژ گردید. در ادامه، قطره آلی منجمد شده به یک ویال مخروطی توسط یک قاشق پزشکی کوچک منتقل شد که در دمای اتاق ذوب شده و سپس ۵/۰ میکرو لیتر از آن به دستگاه HPLC تزریق شد. برای محلول شاهد نیز به طور مشابه عمل شد با این تفاوت که محلول شاهد فاقد داروهای کلرودیازپوکساید و آلپرازولام بود. اختلاف سیگنال محلول نمونه و شاهد به عنوان سیگنال تجزیه‌ای مورد استفاده قرار گرفت که نتایج حاصله نیز در جدول (۳-۶) آورده شده است.

۳-۸-۱-۲ تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از طرح پلاکت-برمن و تعیین عوامل مهم

پس از انجام آزمایش‌های طراحی شده، نتایج حاصل با استفاده از نرم‌افزار Minitab ۱۶ جهت ارزیابی فاکتورهای مهم، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نتایج حاصل از این طراحی در جدول (۳-۷) آورده شده است. در این جدول ضرایب رگرسیونی نیز آورده شده است که به‌طور خلاصه پارامترهای حاصل از این بررسی توضیح داده خواهد شد.

جدول (۳-۶): طرح پلاکت-برمن و نتایج به دست آمده با ۸ فاکتور و ۲ بار تکرار برای پاسخ پیش تغلیظ و اندازه گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام

شماره آزمایش	pH	V-Acn	V-und	S	Fr	t.u	t.s	rpm	میانگین سیگنال ها
۱	-	-	+	+	+	-	+	+	۹۸۹/۸
۲	+	+	+	-	+	+	-	+	۲۳۱۷/۱
۳	+	-	+	-	-	-	+	+	۱۴۸۴/۲
۴	+	-	+	-	-	-	+	+	۱۵۵۰/۰
۵	-	+	+	+	-	+	+	-	۱۷۲۱/۲
۶	+	+	-	+	+	-	+	-	۳۷۷۲/۵
۷	+	+	-	+	+	-	+	-	۳۷۸۷/۳
۸	-	+	+	+	-	+	+	-	۱۶۳۴/۱
۹	+	-	-	-	+	+	+	-	۳۸۲/۶
۱۰	+	+	-	+	-	-	-	+	۲۹۵۰/۸
۱۱	+	+	-	+	-	-	-	+	۳۲۶۶/۹
۱۲	+	-	+	+	-	+	-	-	۲۷۱۲/۵
۱۳	-	-	-	-	-	-	-	-	۴۸/۹
۱۴	-	+	+	-	+	-	-	-	۷۶۸/۹
۱۵	-	+	-	-	-	+	+	+	۸۴۷/۴
۱۶	+	-	-	-	+	+	+	-	۳۷۶/۸
۱۷	-	-	-	+	+	+	-	+	۹۱۳/۸
۱۸	-	-	-	-	-	-	-	-	۴۷/۴
۱۹	+	-	+	+	-	+	-	-	۲۵۶۴/۱
۲۰	-	+	+	-	+	-	-	-	۸۰۱/۱
۲۱	+	+	+	-	+	+	-	+	۲۳۳۶/۷
۲۲	-	+	-	-	-	+	+	+	۸۲۶/۹
۲۳	-	-	-	+	+	+	-	+	۹۱۸/۷
۲۴	-	-	+	+	+	-	+	+	۹۲۰/۵

جدول (۷-۳): جدول ضرایب حاصل از طرح پلاکت- برمن

عبارت	اثر ^۱	ضریب ^۲	ضریب خطای استاندارد ^۳	*T	P ^۴
pH	۱۴۱۸/۶	۷۰۹/۳	۷۳/۸	۹/۶	۰/۰۰۰
V-Acn	۱۰۰۶/۸	۵۰۳/۴	۷۳/۸	۶/۸	۰/۰۰۰
V-und	۱۴۱/۷	۷۰/۸	۷۳/۸	۱/۰	۰/۳۵۳
S	۱۱۹۳/۷	۵۹۶/۸	۷۳/۸	۸/۱	۰/۰۰۰
Fr	-۱۱۰/۷	-۵۵/۴	۷۳/۸	-۰/۷	۰/۴۶۵
t.u	-۲۳۳/۰	-۱۱۶/۵	۷۳/۸	-۱/۶	۰/۱۳۵
t.s	-۱۰۹/۵	-۵۴/۷	۷۳/۸	-۰/۷	۰/۴۷۰
rpm	۵۵/۴	۲۷/۷	۷۳/۸	۰/۴	۰/۷۱۳

اثر: مقدار اثر هر متغیر از رابطه زیر به دست می‌آید [۷۲].

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

که در آن N تعداد کل آزمایش‌ها، y^+ پاسخ‌هایی که در آن متغیر مورد بررسی در سطح بالا و y^- پاسخ‌هایی که در آن متغیر مورد بررسی در سطح پایین خود می‌باشند. مقدار مثبت هر اثر نشان‌دهنده آن است که با افزایش سطح یک متغیر از پایین به بالا مقدار پاسخ افزایش یافته و همچنین مقدار منفی یک اثر نشان‌دهنده آن است که با افزایش سطح یک متغیر از پایین به بالا مقدار پاسخ کاهش می‌یابد. مقدار اثر برای pH بیشترین است، به عبارتی افزایش pH از پایین به بالا باعث افزایش پاسخ می‌شود. مقدار اثر برای فاکتورهای سرعت جریان، زمان اولتراسونیک و زمان سانتریفیوژ به صورت منفی و برای سایر فاکتورها نیز به صورت مثبت می‌باشند.

^۱ Effect

^۲ Coefficient

^۳ Standard error coefficient

^۴ P- value

ضریب: تغییر در میانگین پاسخ را به ازاء هر واحد افزایش در X، وقتی که سایر فاکتورها ثابت نگه داشته شوند، برآورد می‌کند و مطابق با رابطه (۲-۳) محاسبه می‌گردد. با توجه به ضرایب نشان داده شده در جدول (۷-۳)، هر چه مقدار ضریب بیشتر باشد تأثیر آن اثر بر روی پاسخ بیشتر است. با توجه به ضرایب نشان داده شده در جدول (۷-۳)، pH بالاترین ضریب را دارد در نتیجه تأثیر آن بر روی پاسخ بیشتر است.

$$\text{اثر} = \frac{\text{ضریب}}{2} \quad (۲-۳)$$

خطای استاندارد ضریب: برای هر ضریب یک انحراف استاندارد گزارش شده که نشان‌دهنده اندازه خطای تجربی (تصادفی) است که بر روی ضریب تأثیر گذاشته و مقدار آن مثبت است و همچنین مقدار کوچک‌تر آن نشان‌دهنده برآورد دقیق‌تر است [۷۳].

آماره t: برای بررسی معنی دار بودن یک فاکتور به کار می‌رود، بدین صورت که هر چه مقدار قدر مطلق t مربوط به یک فاکتور بزرگ‌تر باشد، با احتمال زیاد فاکتور معنی دار است. مقدار t گزارش شده در جدول نشان می‌دهد که ضریب در برابر خطای استاندارد چقدر بزرگ است و مفهوم آن چیزی شبیه نسبت سیگنال به نویز می‌باشد. مقدار t از تقسیم کردن هر ضریب بر خطای استاندارد طبق رابطه (۳-۳) به دست می‌آید (نتایج در جدول توسط نرم‌افزار گرد شده‌اند. * [۷۳]). با توجه به نتایج در جدول (۷-۳) مقدار t مربوط به pH بیشتر، در نتیجه تأثیر آن بر روی پاسخ بیشتر است.

$$t = \frac{\text{ضریب}}{\text{خطای استاندارد}} \quad (۳-۳)$$

ارزش P: برای تصمیم‌گیری در مورد رد یا عدم رد فرضیه صفر در آزمون فرض‌ها به کار می‌رود. اگر مقدار احتمال یک ضریب، از سطح α مورد نظر کمتر باشد آنگاه رابطه معنی داری بین فاکتور و متغیر پاسخ وجود دارد. برای تعیین اهمیت فاکتورها، میزان احتمال (ارزش P) کمتر از ۰/۰۵ ($P < ۰/۰۵$) به عنوان نقطه حد در نظر گرفته می‌شود. بنابراین برای فاکتورهای با ارزش P کمتر ۰/۰۵ فرضیه صفر رد شده و به عنوان

فاکتور مؤثر در پاسخ شناخته می‌شوند، در حالی که فاکتورهای با ارزش P بیشتر از ۰/۰۵ به عنوان فاکتور غیرمؤثر بر پاسخ شناخته می‌شوند. بنابراین با توجه به مقدار P در جدول (۷-۳)، pH، حجم حلال استخراج استونیتریل و اثر نمک به عنوان فاکتورهای مؤثر و حجم حلال استونیتریل، سرعت جریان، زمان اولتراسونیک، زمان و دور سانتریفیوژ به عنوان فاکتور غیرمؤثر شناخته شدند.

همچنین نمودارهایی که می‌توانند در تعیین فاکتورهای اصلی کمک کنند، نمودارهای پارتو^۱، نمودار احتمال نرمال^۲ و نمودار نیمه نرمال^۳ می‌باشند.

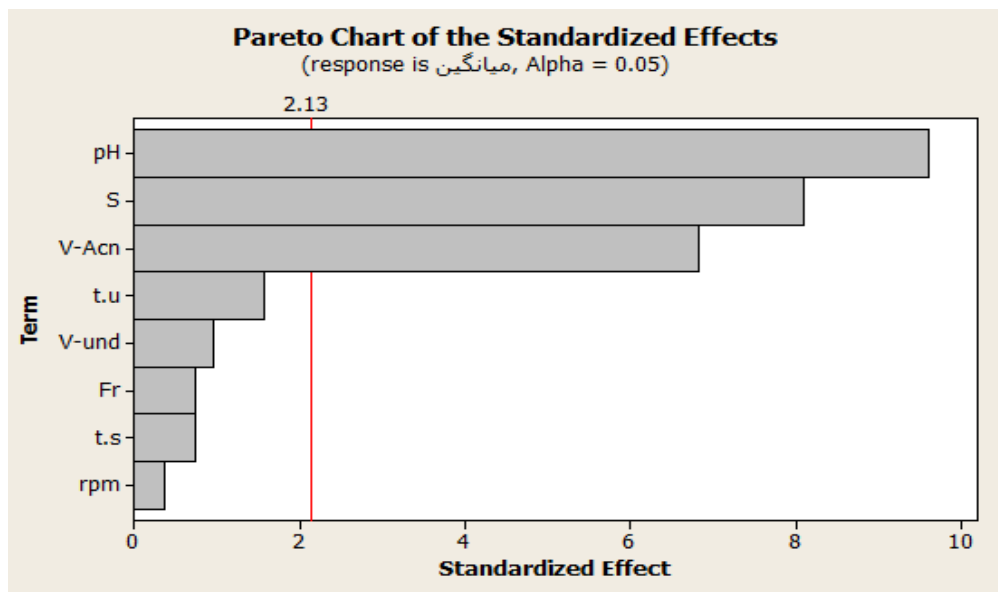
نمودار پارتو: نموداری است برای تعیین اهمیت اثرات که در آن از آزمون t استفاده شده است تا اختلاف معنی‌دار اثرات با صفر تعیین گردد. در این نمودار یک خط مبنا وجود دارد که همان t بحرانی جدول می‌باشد. مقدار عددی این خط مبنا براساس درجه آزادی در سطح اطمینان ۹۵٪ از جدول t محاسبه می‌شود. فاکتورهایی که مقدار t آن‌ها سمت راست خط مبنا قرار گرفته‌اند دارای اثر معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵٪ می‌باشند. نمودار پارتو برای هشت فاکتور مورد بررسی در طرح پلاکت-برمن در شکل (۳-۶) نشان داده شده است. همانطور که نمودار نشان می‌دهد، متغیرهای pH، حجم حلال استخراج استونیتریل و اثر نمک به عنوان فاکتورهای مؤثر بر راندمان استخراج مشخص شدند. در حالی که فاکتورهای دیگر، کوچک‌تر از این حد بوده و در نتیجه اثر معنی‌دار بر پاسخ ندارند.

$$\text{تعداد کل برهمکنش‌ها} - (۱ - \text{تعداد کل آزمایش‌ها در طرح}) = \text{درجه آزادی} \quad (۳-۴)$$

^۱-Pareto chart

^۲-Normal Probability Plot

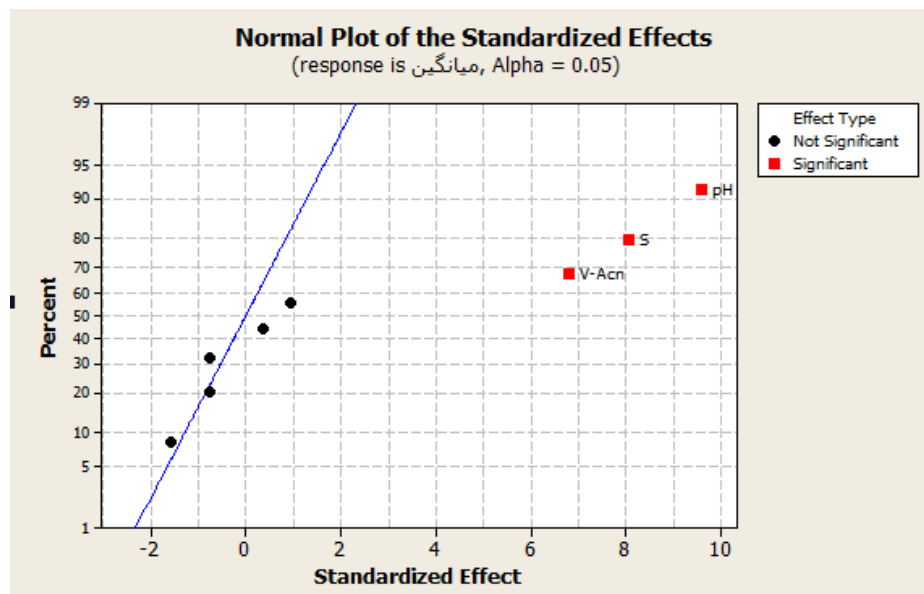
^۳-Half Normal Plot



شکل (۳-۶): نمودار پارتو اثر فاکتورها بر پیش تغلیظ و اندازه گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام

نمودار احتمال نرمال: برای مقایسه اثرات اصلی و برهم کنش آن‌هاست. در این نمودار نقاطی مشاهده

می‌شوند که نشان‌دهنده اثر هر متغیر بوده، به طوری که هر چه این نقاط از خط مبنا فاصله بیشتری داشته باشند دارای اثر بزرگ‌تری بوده و میزان اهمیت آن‌ها نیز بیشتر است. نمودار احتمال نرمال علاوه بر مشخص کردن میزان اهمیت متغیرها، مثبت یا منفی بودن اثر هر متغیر را نیز نشان می‌دهند به این صورت که نقاطی که در سمت راست خط برازش قرار دارند دارای اثر مثبت و نقاطی که در سمت چپ آن قرار دارند دارای اثر منفی می‌باشند [۷۳]. همانطور که در شکل (۳-۷) مشاهده می‌شود متغیرهای pH، حجم حلال استخراج استونیتریل و اثر نمک به عنوان فاکتورهای مهم شناسایی شدند که هر سه فاکتور دارای اثر مثبت می‌باشند.



شکل (۷-۳): نمودار احتمال نرمال اثر فاکتورها بر پیش تغلیظ و اندازه گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام

۳-۸-۲ کاربرد طرح باکس-بنکن جهت به دست آوردن شرایط بهینه فاکتورهای مؤثر بر

پیش تغلیظ و اندازه گیری آلپرازولام و کلرودیازپوکساید

با توجه به نتایج مشاهده شده در طراحی آزمایش توسط طرح پلاکت برمن سه فاکتور pH، حجم حلال استخراج استونیتریل و اثر نمک به عنوان مهم ترین فاکتورهای مؤثر بر میزان پاسخ اندازه گیری شده برای آلپرازولام و کلرودیازپوکساید تعیین شدند. در ادامه برای تعیین مقادیر بهینه هر کدام از این فاکتورها از روش بهینه سازی باکس-بنکن استفاده شد، که مطالعه هر یک از فاکتورها در بیش از دو سطح لازم است. تنها فاکتورهای مؤثر مشخص شده از طرح پلاکت-برمن در سه سطح بالا، میانی و پایین مورد بررسی قرار می گیرند. درجدول (۸-۳) مقادیر سطوح بالا، میانی و پایینی برای هر یک از فاکتورها نشان داده شده است. انتخاب این سطوح با توجه به نتایج حاصل از بهینه سازی یک متغیر در یک زمان انتخاب گردید.

جدول (۳-۸): سطوح فاکتورهای مؤثر در طرح باکس- بنکن

فاکتور	سطح پایین (۱-)	سطح میانی (۰)	سطح بالا (۱+)
pH	۳/۰۰	۵/۷۵	۸/۵۰
حجم حلال استخراج کننده	۱/۲۰	۱/۷۵	۲/۳۰
استونیتریل			
اثر نمک (قدرت یونی)	%۵/۰	%۸/۰	%۱۱/۰

لازم به ذکر است در تمام آزمایش‌هایی که بر اساس طرح باکس- بنکن انجام می‌شود، سایر فاکتورهای غیرمؤثر در مقدارهایی که با توجه به علامت اثرشان (۱+ نشان دهنده سطح بالا و ۱- نشان دهنده سطح پایین) در طرح پلاکت برمن به دست آمده‌اند، در سطح مناسب خود، ثابت باقی می‌مانند. بنابراین در تمام آزمایش‌هایی که بر اساس طرح باکس-بنکن انجام می‌شود، فاکتورهای غیرمهم شامل حجم حلال استخراج ۱-آندکانول ۴۵/۰ میکرولیتر، دور سانتریفیوژ ۴۷۰۰ دور بر دقیقه به دلیل اثر این فاکتورها در نمودار احتمال نرمال در سطح مثبت خود و فاکتورهای سرعت جریان ۰/۳ میلی لیتر بر دقیقه، زمان اولتراسونیک ۷ دقیقه و زمان سانتریفیوژ ۷ دقیقه با اثر منفی در سطح پایین خود در نظر گرفته شدند.

۳-۸-۲-۱ اجرای طرح باکس-بنکن (BBD)

برای طراحی آزمایش‌ها به منظور بررسی برهم‌کنش بین فاکتورها و همچنین برای تعیین مقدار بهینه هر فاکتور در اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام از نرم افزار Minitab 16 برای ایجاد طرح باکس- بنکن و پردازش داده‌ها استفاده شد. همانطور که در بخش ۲-۳-۵-۳ بیان شد، تعداد آزمایش‌ها هنگامی که در طرح باکس- بنکن، ۳ فاکتور در یک بلوک با ۲ بار تکرار و ۲ نقطه مرکزی مورد بررسی قرار گیرد برابر با ۲۸ آزمایش می‌باشد. در جدول (۳-۹) طرح مورد نظر و سیگنال‌های ثبت شده در آزمایش‌های انجام شده مطابق با طرح باکس- بنکن آمده است. آزمایش‌های پیش تغلیظ بر اساس روش کار زیر انجام گردید.

در یک ظرف نمونه، ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول ۱۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر کلرودیازپوکساید و ۱/۰ میلی لیتر محلول آلپرازولام ۱۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر، ۱/۰ میلی‌لیتر بافر فسفاتی با pH مورد نظر افزوده شد و سپس با آب تقطیر به حجم ۵/۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس، حجم مشخصی از استونیتریل همراه به نمونه به ستون استخراج منتقل شد و با سرعت جریان ۰/۳ میلی لیتر بر دقیقه، استخراج تحت اثر نمک خارج کننده انجام شد. در ادامه محلول بالایی شامل آنالیت‌ها درون حلال استونیتریل پس از اختلاط در حجم ۴۵/۰ میکرولیتر از ۱-آندکانول، توسط سرنگ انسولین به محلول نمک سدیم کلرید با غلظت مشخص تزریق گردید. پس از آن، لوله آزمایش حاوی محلول ابری تشکیل شده در حمام فراصوت با فرکانس مافوق صوت ۶۰ کیلو هرتز به مدت ۷/۰ دقیقه در ۲۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد که در این مرحله آنالیت‌ها در قطرات ریز حلال آلی استخراج شدند. سپس محلول نمونه با دور ۴۷۰۰ دور در دقیقه به مدت ۷/۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس، لوله آزمایش به حمام یخ منتقل و حلال آلی شناور به صورت قطره جامد درآمد. قطره آلی منجمد شده به یک ویال مخروطی توسط یک قاشق پزشکی کوچک منتقل شد که در دمای اتاق ذوب شده و مقداری از آن به دستگاه HPLC تزریق شد. برای محلول شاهد نیز به طور مشابه عمل شد با این تفاوت که محلول شاهد فاقد داروهای کلرودیازپوکساید و آلپرازولام بود. در این مرحله محلول به دستگاه HPLC تزریق شد. اختلاف سیگنال محلول نمونه و شاهد به عنوان سیگنال تجزیه‌ای مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج تجربی به‌دست آمده از انجام آزمایش‌ها با روش ANOVA تحلیل و بررسی شدند، که در این بررسی اثرات خطی، درجه دوم و برهمکنش‌ها نیز در نظر گرفته شدند. جدول (۳-۱۰) ضرایب رگرسیون و سایر پارامترهای آماری مربوط به فاکتورهای داده شده در مدل که شامل خود فاکتورها و برهم‌کنش‌های آن‌ها می‌باشد را نشان می‌دهد. همانطور که قبلاً اشاره شد ضرایب با ارزش P کوچک‌تر از ۰/۰۵ (در سطح $\alpha=0/05$) معنی‌دار بوده و متناظر با سطح اطمینان ۹۵ درصد برای این آزمون است.

جدول (۳-۹): طرح باکس- بنکن با ۳ فاکتور، ۲ بار تکرار و ۲ نقطه مرکزی برای اندازه گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام

شماره آزمایش	pH	قدرت یونی (درصد وزنی حجمی)	حجم حلال استخراج (μl)	پاسخ آلپرازولام	پاسخ کلرودیازپوکساید
۱	+۱	۰	+۱	۲۱۲۱/۳۷	۳۳۷۹/۵۱
۲	+۱	+۱	۰	۲۰۰۰/۳۴	۳۷۵۹/۰۷
۳	-۱	-۱	۰	۱۳۱۶/۷۹	۸۰۷/۹۹
۴	۰	۰	۰	۲۰۴۸/۵	۳۱۶۹/۲۴
۵	+۱	۰	-۱	۲۰۱۸/۵۹	۳۸۲۲/۵۷
۶	-۱	۰	-۱	۱۶۶۵/۵۲	۱۱۵۸/۴۵
۷	-۱	+۱	۰	۱۵۲۲/۷۹	۱۶۵۹/۷۶
۸	-۱	۰	+۱	۲۳۶۸/۶۶	۱۵۷۸/۸۸
۹	۰	+۱	-۱	۱۳۳۸/۷۵	۲۸۳۳/۳۹
۱۰	۰	۰	۰	۱۹۷۱/۵۱	۳۰۱۰/۵۲
۱۱	+۱	-۱	۰	۱۸۵۶/۰	۲۹۰۰/۰۰
۱۲	+۱	+۱	۰	۲۰۸۱/۰	۳۷۲۳/۹۲
۱۳	۰	۰	۰	۱۹۲۶/۸۷	۳۱۶۰/۷۵
۱۴	-۱	+۱	۰	۱۶۲۶/۴۹	۱۶۷۶/۳۷
۱۵	۰	-۱	+۱	۱۶۳۸/۶۲	۲۲۲۸/۸۰
۱۶	۰	+۱	-۱	۱۳۷۷/۲۱	۲۸۴۶/۱۷
۱۷	۰	-۱	-۱	۱۵۳۷/۲۱	۲۱۱۷/۱۹
۱۸	۰	+۱	+۱	۲۰۰۲/۲۹	۳۱۳۲/۲۳
۱۹	+۱	-۱	۰	۱۸۷۶/۴۶	۲۸۵۸/۸۱
۲۰	-۱	-۱	۰	۱۳۱۰/۰۷	۷۷۲/۴۹
۲۱	+۱	۰	-۱	۲۰۱۴/۴۶	۳۷۵۱/۷۵
۲۲	۰	۰	۰	۱۹۷۷/۲۳	۳۱۱۱/۳۹
۲۳	۰	-۱	-۱	۱۵۲۴/۲۰	۲۱۷۵/۸۴
۲۴	+۱	۰	+۱	۲۱۸۹/۶۴	۳۴۴۶/۹۴
۲۵	۰	-۱	+۱	۱۷۷۲/۵۰	۲۲۲۸/۸۰
۲۶	-۱	۰	-۱	۱۶۱۷/۶۵	۱۲۱۳/۱۱
۲۷	۰	+۱	+۱	۲۰۰۹/۳۶	۳۱۷۹/۹۰
۲۸	-۱	۰	+۱	۲۳۰۶/۵۰	۱۶۷۷/۸۵

جدول (۳-۱۰): پارامترهای آماری برای طرح باکس بنکن انجام شده برای پاسخ پیش تغلیظ و اندازه‌گیری آلپرازولام

عبارت	ضریب	خطای استاندارد ضریب	T	P
Constant	۱۹۳۵/۳۶	۴۸/۲۸	۴۰/۰۸۴	۰/۰۰۰
pH	۱۳۲/۶۰	۳۱/۱۷	۴/۲۵۵	۰/۰۰۰
V	۷۰/۴۰	۳۱/۱۷	۲/۲۵۹	۰/۰۳۵
S	۱۸۵/۸۴	۳۱/۱۷	۵/۹۶۳	۰/۰۰۰
pH*pH	۱۱۳/۰۲	۴۸/۲۸	۲/۳۴۱	۰/۰۳۰
V*V	-۳۱۷/۴۹	۴۸/۲۸	-۶/۵۷۶	۰/۰۰۰
S*S	-۲۰/۲۱	۵۱/۴۹	-۰/۳۹۲	۰/۶۹۹
PH*V	۱۸/۵۴	۴۶/۹۶	-۰/۴۰۲	۰/۶۹۲
pH*S	-۱۴۱/۷۵	۴۴/۰۸	-۳/۲۱۶	۰/۰۰۴
V*S	۱۵۸/۴۸	۴۴/۰۸	۳/۵۹۶	۰/۰۰۲

همانطور که مشاهده شد عبارات pH، اثر نمک، حجم حلال استخراج، برهمکنش‌های pH*pH، V*V،

pH*S و V*S دارای مقدار P کمتر از ۰/۰۵ بوده و به طور آماری معنی دار می‌باشند و برهمکنش‌های

pH*V و S*S به دلیل دارا بودن p بالاتر از ۰/۰۵ معنی دار نبوده و لذا عبارت‌هایی که معنی دار نیستند از

مدل حذف شده و مدل رویه پاسخ آزمایش با استفاده از برهمکنش‌های معنی دار و ضرایب داده شده در

جدول (۳-۱۰) برای اندازه‌گیری آلپرازولام به صورت زیر پیشنهاد می‌شود.

$$\text{Response} = ۱۹۳۵/۳۶ + ۱۳۲/۶۰ \text{ pH} + ۱۸۵/۸۴ \text{ S} + ۷۰/۴۰ \text{ V} + ۱۱۳/۰۲ \text{ pH} \times \text{pH} - ۳۱۷/۴۹ \text{ V} \times \text{V} - ۱۴۱/۷۵$$

$$\text{pH} \times \text{S} + ۱۵۸/۴۸ \text{ S} \times \text{V}$$

$$R^2 = \%. ۸۷/۳۰$$

$$R^2_{\text{adj}} = \%. ۸۲/۸۵$$

(۵-۳)

جدول (۱۱-۳): پارامترهای آماری برای طرح باکس بنکن انجام شده برای پاسخ پیش تغلیظ و اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید

عبارت	ضریب	خطای استاندارد ضریب	T	P
Constant	۳۱۱۲/۹۸	۳۵/۸۹	۸۶/۷۲۷	۰/۰۰۰
pH	۱۰۷۳/۶۱	۱۷/۹۵	۵۹/۸۲۱	۰/۰۰۰
V	۴۱۹/۴۳	۱۷/۹۵	۲۳/۳۷۱	۰/۰۰۰
S	۷۶/۵۳	۱۷/۹۵	۴/۲۶۴	۰/۰۰۰
pH*pH	-۴۵۸/۶۷	۲۸/۳۸	-۱۶/۱۶۳	۰/۰۰۰
V*V	-۳۸۳/۲۶	۲۸/۳۸	-۱۳/۵۰۶	۰/۰۰۰
S*S	-۱۳۶/۹۳	۲۸/۳۸	-۴/۸۲۵	۰/۰۰۰
pH*S	-۱۶۵/۳۸	۲۵/۳۸	-۶/۵۱۶	۰/۰۰۰
V*S	۵۸/۵۰	۲۵/۳۸	۲/۳۰۵	۰/۰۳۳
PH*V	-۲/۶۸	۲۶/۰۷	-۰/۱۰۳	۰/۹۱۹

همچنین تمامی عبارات دارای مقدار P کمتر از ۰/۰۵ بوده و به طور آماری معنی دار می‌باشند به غیر از برهمکنش pH*V به دلیل دارا بودن p بالاتر از ۰/۰۵ معنی دار نبوده و لذا عبارتی که معنی دار نیست از مدل حذف شده و مدل رویه پاسخ آزمایش با استفاده از برهمکنش‌های معنی دار و ضرایب داده شده در جدول (۱۱-۳) برای اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید به صورت زیر پیشنهاد می‌شود.

$$\text{Response} = 3112.98 + 1073.61 \text{ pH} + 419.43 \text{ V} + 76.53 \text{ S} - 458.67 \text{ pH} \times \text{pH} - 136.93 \text{ S} \times \text{S} - 383.26 \text{ V} \times \text{V} - 165.38 \text{ pH} \times \text{S} + 58.50 \text{ S} \times \text{V}$$

$$R^2 = 99.59\%$$

$$R^2_{\text{adj}} = 99.41\%$$

(۶-۳)

ضریب تعیین^۱: ضریب تعیین بیانگر نسبت مجموع مربعات رگرسیون به مجموع مربعات کل که شامل رگرسیون و باقی‌مانده است، می‌باشد و R^2 می‌تواند بین صفر و یک متغیر باشد که نزدیکی آن به یک بیانگر برازش بهتر داده‌ها توسط مدل می‌باشد.

رابطه ریاضی مربوط به ضریب تعیین به صورت زیر است.

$$R^2 = 1 - \left[\frac{SS_{\text{Residual}}}{SS_{\text{Residual}} + SS_{\text{model}}} \right] = \frac{SS_{\text{model}}}{SS_{\text{total}}} \quad (۷-۳)$$

$SST = \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2$ که در این رابطه SS_{Residual} مجموع مربعات باقی مانده، SS_{model} مجموع مربعات مدل و SS_{total} مجموع مربعات کل می‌باشد. مقدار ضریب تعیین (R^2) برای پاسخ اندازه‌گیری آلپرازولام $۸۷/۳۰$ و برای پاسخ اندازه‌گیری کلرودیازپوساید $۹۹/۵۹$ درصد می‌باشد که نشان می‌دهد $۸۷/۳۰$ و $۹۹/۵۹$ درصد تغییرات در متغیر وابسته می‌تواند توسط متغیر مستقل توضیح داده شود.

ضریب تعیین تعدیل شده^۲: ضریب تعیین تعدیل شده پارامتری است که در ارزیابی و مقایسه مدل‌های مختلف با تعداد متفاوت متغیر پیش بینی شده استفاده می‌شود. اما از آنجایی که R^2 (ضریب تعیین) تعداد پارامترهای موجود در مدل را به حساب نمی‌آورد، مقدار R^2 تعدیل شده محاسبه می‌شود که سعی دارد مربع R را تصحیح نماید تا بیشترین میزان انطباق مدل را در جمعیت انعکاس دهد. لذا بدین منظور از ضریب تعیین تعدیل شده طبق رابطه زیر برای انتخاب مدل برتر استفاده می‌شود [۷۴].

^۱-Determinaton coefficient

^۲-Adjusted R sward

$$Adjusted R^2 = 1 - \left[\frac{\left(\frac{SS_{Residual}}{D.F_{Residual}} \right)}{\left(\frac{SS_{Residual} + SS_{model}}{D.F_{Residual} + D.F_{model}} \right)} \right] \quad (۸-۳)$$

که در این رابطه $DF_{Residual}$ درجه آزادی باقی مانده و DF_{model} درجه آزادی مدل می باشد. برخلاف R^2 ، مقدار R^2 تعدیل شده (که مقدار آن برای پاسخ کلرودیازپوکساید برابر با ۹۹/۴۱٪ و برای پاسخ آلپرازولام برابر با ۸۲/۸۵٪ می باشد) ممکن است با اضافه شدن پارامتر کوچک تر شود.

۳-۲-۸-۳ ارزیابی مدل

برای اطمینان از اینکه مدل به دست آمده، مدل مناسبی است که توانایی پیش بینی نمونه های مختلفی از یک جمعیت را داراست، باید مدل را ارزیابی کرد. در این پروژه، برای ارزیابی مدل به دست آمده از روش تحلیل واریانس و بررسی باقی مانده ها استفاده گردید که در این ارزیابی ها از طریق شاخص های کمی، صحت نتایج ارائه شده توسط مدل مورد سنجش قرار می گیرند.

۳-۲-۸-۳ تحلیل واریانس

با در نظر گرفتن عوامل اصلی، مدل ریاضی برای پاسخ مربوط به پیش تغلیظ و اندازه گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام طبق معادله (۳-۵) و (۳-۶) پیشنهاد شده است. برای بررسی صحت مدل ارائه شده به صورت معادله درجه دوم، تحلیل واریانس انجام شد که نتایج در جدول (۳-۱۲) برای آلپرازولام و جدول (۳-۱۳) برای کلرودیازپوکساید نشان داده شده است

جدول (۱۲-۳): تحلیل واریانس برای مدل پیشنهادی مربوط به پیش تغلیظ و اندازه‌گیری آلپرازولام

Source	DF ^۱	Adj SS ^۲	Adj MS ^۳	F	P
Regression	۷	۲۱۳۵۷۰۵	۳۰۵۱۰۱	۱۹/۶۳	۰/۰۰۰
Linear	۳	۹۱۳۲۲۳	۳۰۴۴۰۸	۱۹/۵۹	۰/۰۰۰
Square	۲	۸۶۰۸۱۱	۴۳۰۴۰۶	۲۷/۶۹	۰/۰۰۰
Interaction	۲	۳۶۱۶۷۱	۱۸۰۸۳۵	۱۱/۶۴	۰/۰۰۰
Residual Error	۲۰	۳۱۰۸۲۲	۱۵۵۴۱	–	–
Lack-of-Fit	۵	۱۱۹۳۳۹	۲۳۸۶۸	۱/۸۷	۰/۱۶۰
Pure Error	۱۵	۱۹۱۴۸۳	۱۲۷۶۶	–	–
Total	۲۷	–	–	–	–

جدول (۱۳-۳): تحلیل واریانس برای مدل پیشنهادی مربوط به پیش تغلیظ و اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	۸	۲۳۵۰۹۷۳۹	۲۹۳۸۷۱۷	۵۷۰/۲۴	۰/۰۰۰
Linear	۳	۲۱۳۵۰۵۰۱	۷۱۱۶۸۳۴	۱۳۸۰/۹۷	۰/۰۰۰
Square	۳	۱۹۱۳۰۵۲	۶۳۷۶۸۴	۱۲۳/۷۴	۰/۰۰۰
Interaction	۲	۲۴۶۱۸۶	۱۲۳۰۹۳	۲۳/۸۹	۰/۰۰۰
Residual Error	۱۹	۹۷۹۱۷	۵۱۵۴	–	–
Lack-of-Fit	۴	۳۰۵۹۹	۷۶۵۰	۱/۷۰	۰/۲۰۱
Pure Error	۱۵	۶۷۳۱۸	۴۴۸۸	–	–
Total	۲۷	–	–	–	–

^۱- Degrees of Freedom

^۲ Adjusted Sum of Square

^۳- Adjusted Mean Square

عدم برازش^۱: ارتباط بین فاکتورها و پاسخ را نشان می‌دهد. با توجه به نتایج به دست آمده، مقدار

P مربوط به عدم برازش مدل برای کلرودیازپوکساید ($p=0/201$) و آلپرازولام ($p=0/160$) بیشتر از $0/05$ می‌باشد که نشان می‌دهد بین مدل و داده‌های تجربی تطابق خوبی 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. بیان ریاضی آن به صورت زیر می‌باشد:

$$F = \frac{MSR}{MSE} = \frac{SSR/df_m}{SSE/df_{res}} \quad (9-3)$$

df_m درجه آزادی مدل و df_{res} نیز درجه آزادی باقیمانده‌ها است. SSR و SSE نیز در روابط (۸-۳) و (۷-۳) توضیح داده شدند. هر چه مقدار میانگین مربع فاکتور به باقی مانده بیشتر باشد، مقدار F بیشتر است. با توجه به مقادیر به دست آمده در جدول (۱۲-۳) و (۱۳-۳) مقدار F مربوط به اثرات مربع پارامترها برای آلپرازولام و مقدار F مربوط به اثرات خطی پارامترها برای کلرودیازپوکساید بیشتر و در نتیجه تأثیر آن فاکتورها بر پاسخ بیشتر است.

مقدار Adj MS، از تقسیم Adj SS بر درجه آزادی به دست می‌آید که در محاسبه آماره F بکار می‌رود. همچنین خطای خالص^۲، برای یک سری داده‌های تکراری به کار می‌رود، که مقدار کوچکتر آن نشان‌دهنده برآورد دقیق‌تر است.

^۱ -Lack-of-fit

^۲ -Pure Error

۳-۸-۲-۴ نمودار احتمال نرمال باقی مانده‌ها^۱

از آنجایی که در محاسبه آماره‌های t و F برای آزمون‌های رگرسیون و همچنین در محاسبه فواصل اطمینان، از فرض نرمال بودن خطاها استفاده می‌کنیم، لذا انحراف‌های بزرگ از توزیع نرمال می‌تواند روی صحت و اعتبار نتایج به‌دست آمده تأثیر زیادی بگذارد. یک روش ساده برای بررسی فرض نرمال بودن رسم نمودار احتمال نرمال باقی مانده‌ها است. زیرا این نمودار الگوی تقریباً خطی سازگار با توزیع نرمال را نشان می‌دهد.

باقیمانده‌ها به صورت زیر تعریف شده اند:

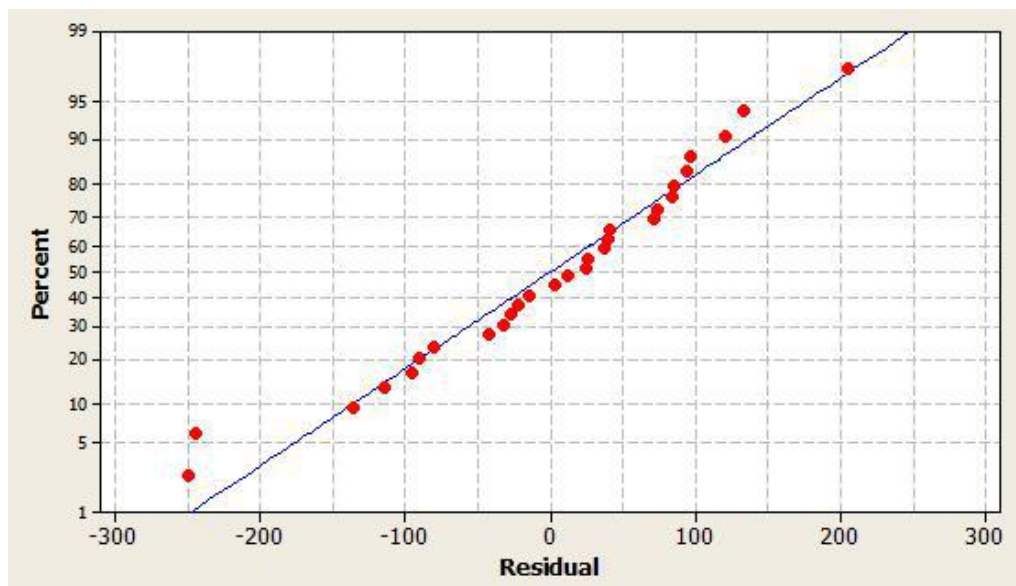
$$e_i = y_i - \hat{y}_i, \quad i = 1, 2, \dots, n$$

مقدار برازش شده متناظر آن است. چون تلقی از $\hat{y}_i$ مقدار مشاهده شده و y_i (۳-۱۰) که در آن باقیمانده به صورت انحراف بین مقدار مشاهده شده و مقدار برازش شده می‌باشد، لذا یک معیار یا اندازه از باقی مانده‌ها دارای توزیع نرمال تغییراتی است که به‌وسیله مدل رگرسیون توضیح داده نشده است. اگر باشند، عموماً نقاط باید روی یک خط راست قرار گیرند و در صورتی که نقاط از خط راست منحرف شده باشند ممکن است فرض نرمال بودن معتبر نباشد. نمودار احتمال و آزمون‌های برازش مانند آماره اندرسن-دارلینگ^۲ را می‌توان برای تعیین نرمال بودن باقی مانده‌ها به‌کار برد، در صورتی که مقدار احتمال از سطح α مورد نظر کمتر باشد داده‌ها از توزیع نرمال پیروی نمی‌کنند.

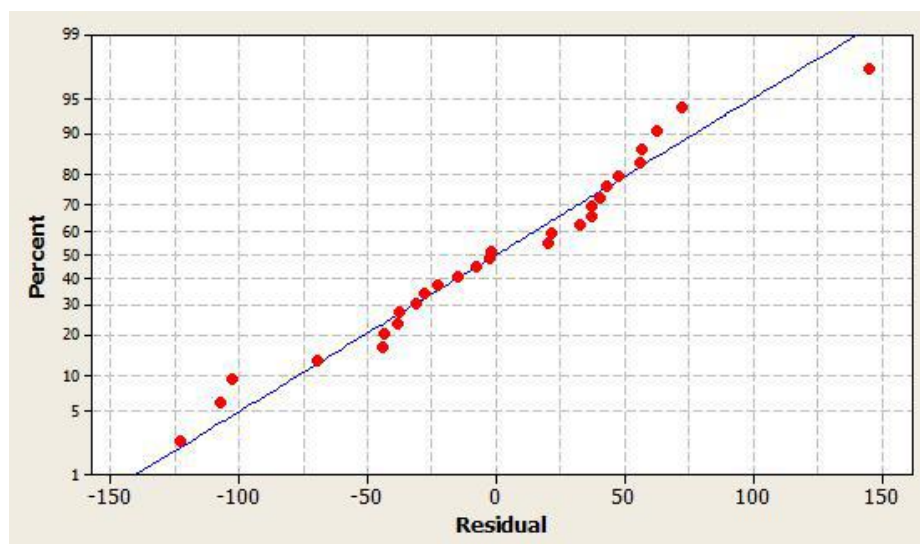
نمودار مربوط به توزیع باقی‌مانده‌ها و بررسی نرمال بودن این توزیع در شکل (۳-۸) و (۳-۹) نشان داده شده است. در اینجا مقدار P بزرگ‌تر از ۰/۰۵ است که نشان می‌دهد توزیع باقی‌مانده‌ها نرمال است [۷۵ و ۷۶].

^۱-Normal probability of plot

^۲-Anderson-Darling



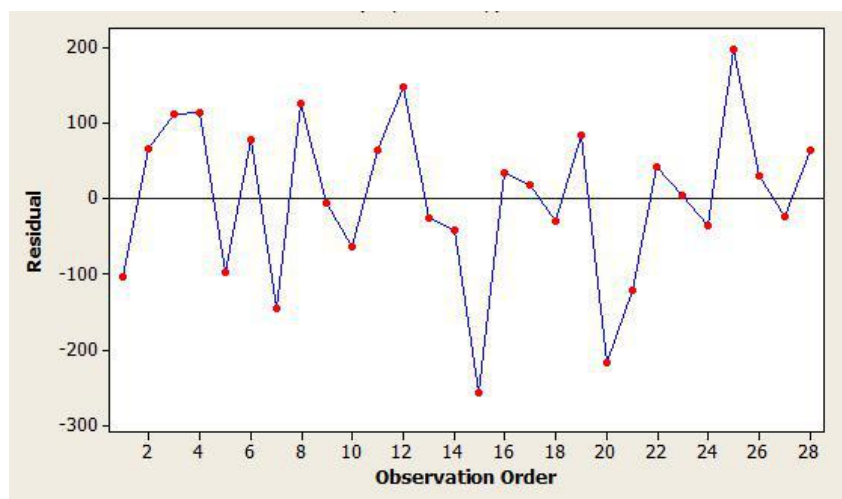
شکل (۸-۳): نمودار باقی مانده‌ها برای پیش تغلیظ و اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام در طراحی باکس- بنکن
مربوط به پاسخ آلپرازولام



شکل (۹-۳): نمودار باقی مانده‌ها برای پیش تغلیظ و اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام در طراحی باکس- بنکن
مربوط به پاسخ کلرودیازپوکساید

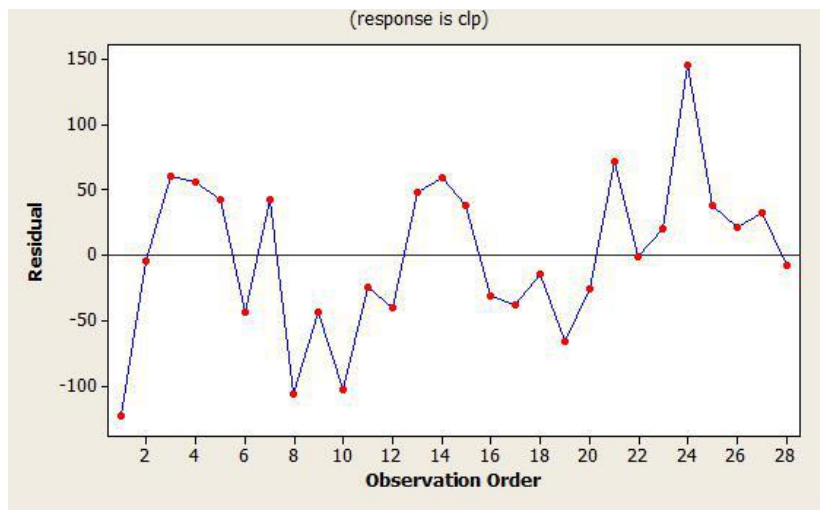
۳-۸-۲-۵ نمودار باقی مانده در برابر ترتیب زمان^۱

در بررسی همبستگی بین باقی مانده‌ها، رسم نمودار باقی مانده‌ها نسبت به ترتیب زمان جمع‌آوری داده‌ها مفید است. از این نمودار برای یافتن خطای غیر تصادفی استفاده می‌شود. یک همبستگی مثبت توسط دسته‌ای از باقی مانده‌ها که هم علامت هستند تعیین می‌شود و یک همبستگی منفی نیز توسط تغییرات سریع در علامت باقی مانده‌های متوالی مشخص می‌گردد. که این موضوع اغلب نتیجه تغییر در واریانس خطای تصادفی نسبت به زمان است و غالباً منتهی به نموداری برای باقی مانده‌ها نسبت به زمان می‌شود، که در یک طرف پراکندگی بیشتری از به طرف دیگر نشان می‌دهد. اگر این نمودار طرح خاصی نداشته باشد، مبین فرض وجود استقلال خطا است [۷۵ و ۷۶]. با توجه به شکل (۳-۱۰) و (۳-۱۱) همبستگی کمی بین داده‌ها مشاهده می‌شود که نشان‌دهنده استقلال میان خطاهاست [۷۵].



شکل (۳-۱۰): نمودار باقی مانده‌ها به ترتیب زمان جمع‌آوری برای پیش تغلیظ و اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام در طراحی باکس- بنکن مربوط به پاسخ آلپرازولام

^۱-Residuals versus order of time



شکل (۳-۱۱): نمودار باقی‌مانده‌ها به ترتیب زمان جمع‌آوری برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام در طراحی باکس-بنکن مربوط به پاسخ کلرودیازپوکساید

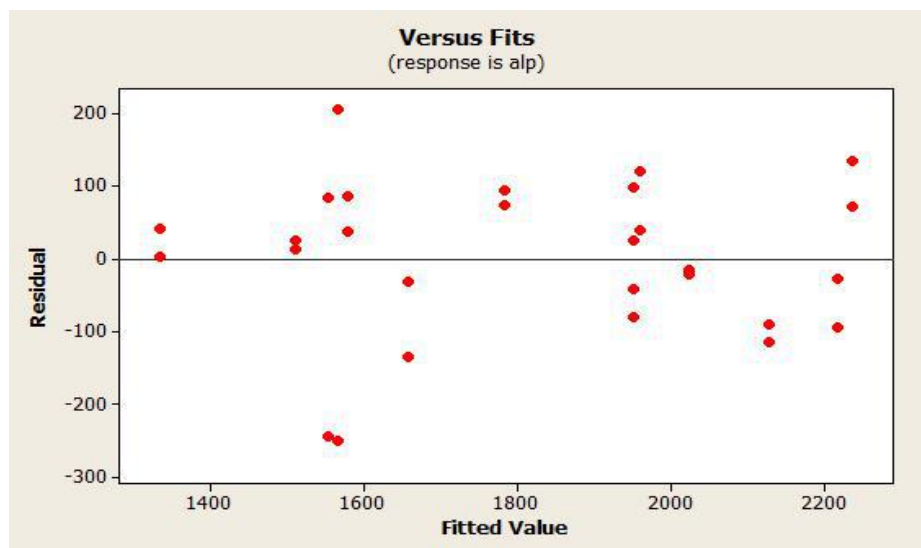
۳-۸-۲-۶ نمودار باقی‌مانده‌ها در مقابل مقادیر برازش شده^۱

رسم نمودار باقی‌مانده‌ها R_i ها ($i=1,2,\dots,n$) در مقابل مقادیر برازش شده متناظر یعنی $\hat{y}_i$ ها نمایشگر یک الگوی تصادفی باقی‌مانده‌ها در طرفین خط صفر است. اگر مدل برازش شده مناسب باشد این نمودار بایستی نسبت به خط باقی‌مانده صفر متقارن بوده و نقاط حول این خط به طور 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 خط صفر است. اگر نقطه‌ای دورتر 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. موارد زیر مشخص‌کننده خطای غیر تصادفی هستند:

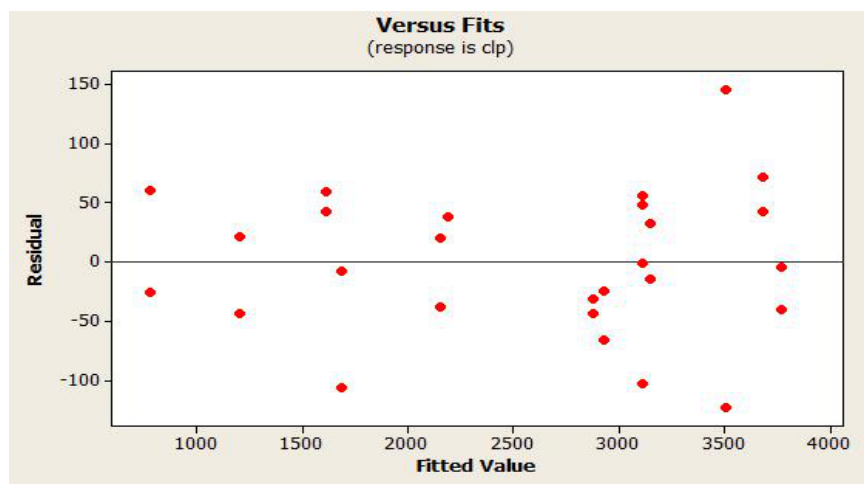
- یکسری از نقاط صعودی یا نزولی باشند.
- اکثر داده‌ها مثبت یا اکثر آن‌ها منفی باشند.
- وجود الگویی مانند باقی‌مانده‌های افزایشی با برازش‌های وجود داشته باشد.

^۱-Residuals versus fits

شکل (۱۲-۳) و (۱۳-۳) نشان می‌دهد که پراکندگی دو طرف خط صفر تقریباً یکسان است.



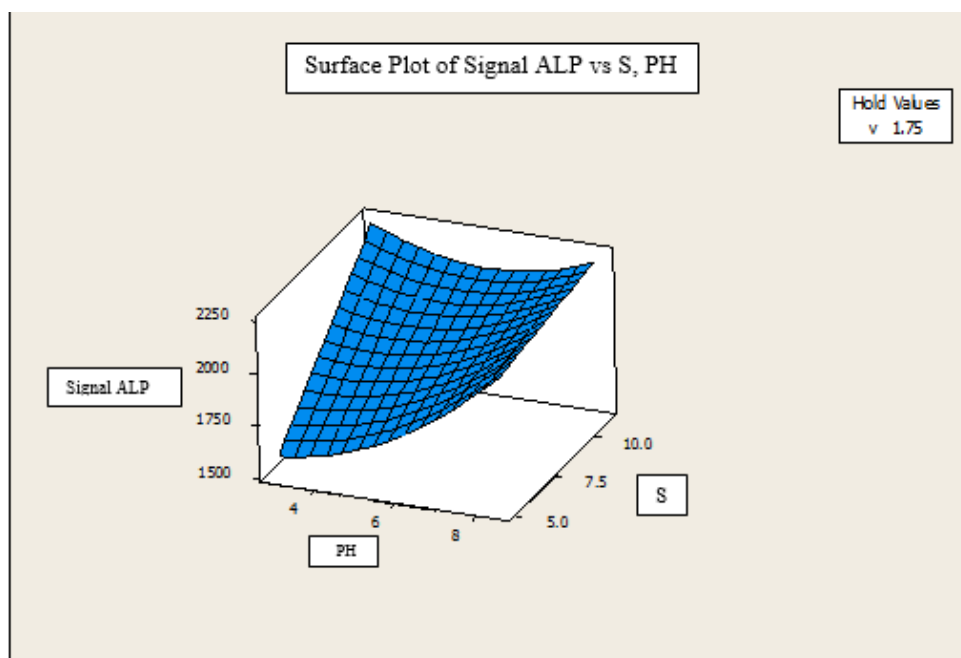
شکل (۱۲-۳): نمودار باقیمانده در مقابل مقدار برازش برای پیش تغلیظ و اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام در طراحی باکس- بنکن مربوط به پاسخ آلپرازولام



شکل (۱۳-۳): نمودار باقیمانده در مقابل مقدار برازش برای پیش تغلیظ و اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام در طراحی باکس- بنکن مربوط به پاسخ کلرودیازپوکساید

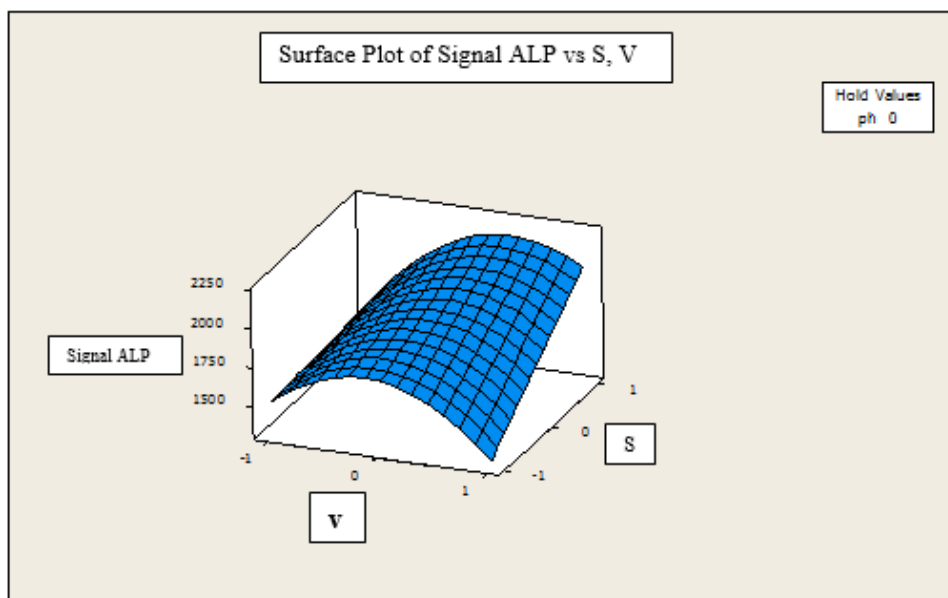
۷-۲-۸-۳ منحنی‌های رویه پاسخ^۱

تجسم فضایی معادله پیش‌بینی شده می‌تواند بوسیله منحنی رویه پاسخ به‌دست آید. این نمایش گرافیکی، یک سطح n بعدی در فضای $(n+1)$ بعد است و معمولاً نمایش ۲ بعدی یک طرح ۳ بعدی را می‌توان رسم کرد. بنابراین اگر ۳ یا تعداد بیشتری متغیر وجود داشته باشد، تنها اگر یک یا تعداد بیشتری از متغیرها ثابت نگه داشته شوند، رسم منحنی پاسخ ممکن می‌شود. شکل‌های (۳-۱۴) تا (۳-۱۷) این منحنی‌ها را برای اندازه‌گیری آلپرازولام و کلرودیازپوساید نشان می‌دهند.

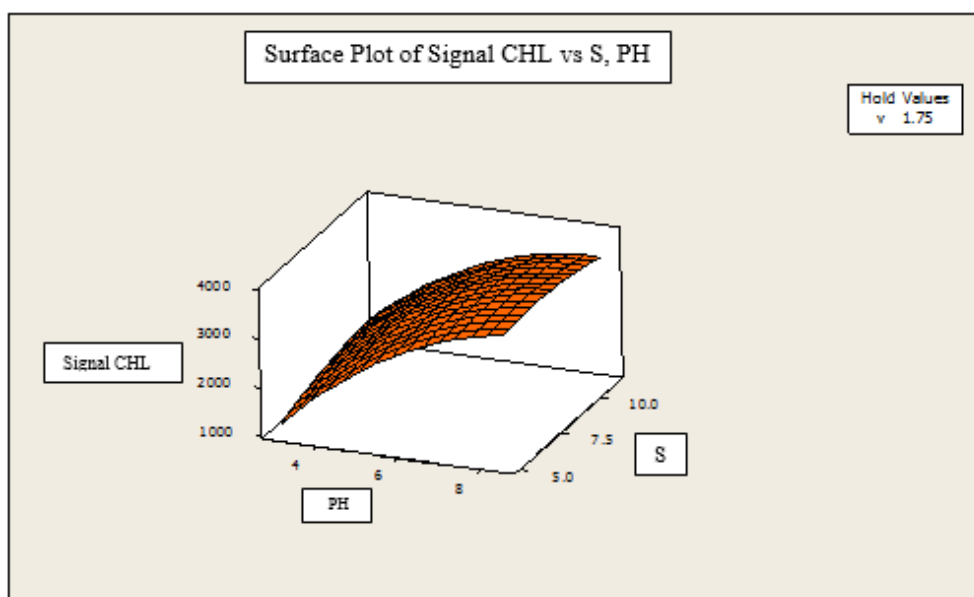


شکل (۳-۱۴): منحنی رویه پاسخ پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری آلپرازولام در مقابل اثر نمک (S) و pH

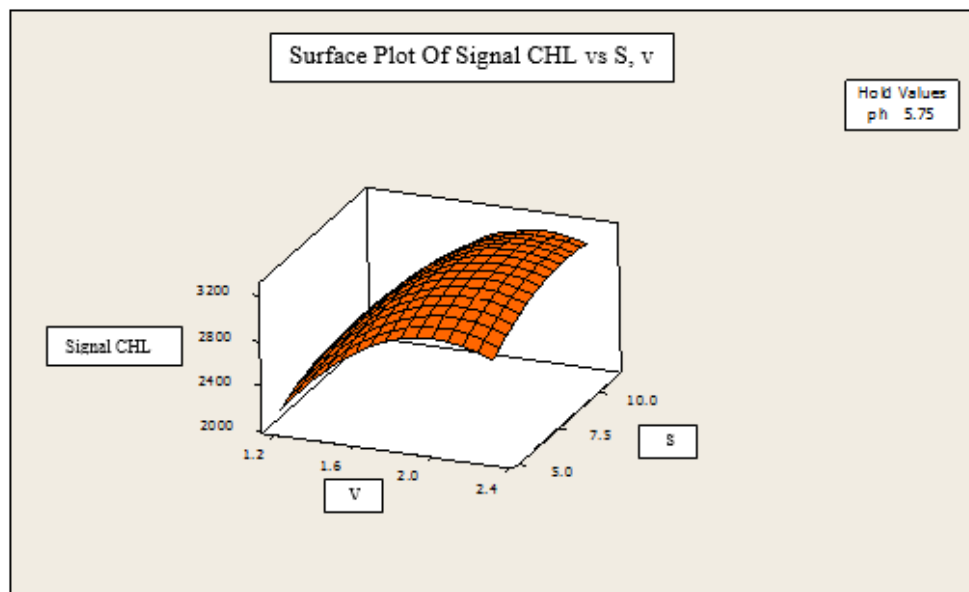
^۱-Surface response plot



شکل (۳-۱۵): منحنی رویه پاسخ پیش تغلیظ و اندازه‌گیری آلپرازولام در مقابل حجم حلال استخراج و اثر نمک



شکل (۳-۱۶): منحنی رویه پاسخ پیش تغلیظ و اندازه‌گیری کلرودیازپوساید در مقابل اثر نمک و pH



شکل (۳-۱۷): منحنی رویه پاسخ پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید در مقابل حجم حلال استخراج و اثر نمک

با توجه به مدل ریاضی پیشنهادی، شرایط بهینه اندازه‌گیری کلرودیازپوساید و آلپرازولام با استفاده از نرم‌افزار Minitab ۱۶ محاسبه و نتایج آن در جدول (۳-۱۴) گزارش شده است. لازم به ذکر است که تعدادی از فاکتورها را به همان صورت یک متغیر در زمان بهینه شدند که می‌توان به نوع حلال استخراج کننده مرحله اول و دوم، نوع بافر و حجم بافر اشاره نمود. مقایسه نتایج حاصل از این دو روش نشان می‌دهد که شرایط بهینه به‌دست آمده از روش طراحی آزمایش با استفاده از مدل باکس-بنکن، با نتایج حاصل از یک متغیر در زمان تا حدودی تفاوت دارد. علت این تفاوت را نیز می‌توان بر هم‌کنش بین فاکتورهای مؤثر بر پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری کلرودیازپوساید و آلپرازولام نسبت داد.

جدول (۳-۱۴): مقایسه شرایط بهینه‌سازی یک متغیر در زمان و طراحی آزمایش

عامل	مقادیر بهینه با روش	مقادیر بهینه با روش
	یک متغیر در زمان	طراحی آزمایش
pH	۸/۰۰	۸/۵۰
اثر نمک (قدرت یونی)	٪۱۰	٪۸/۶
حجم حلال استخراج‌کننده استونیتریل	۲/۰ میلی‌ولتر	۱/۹ میلی‌لیتر
دور سانتریفیوژ	۴۵۰۰ دور بر دقیقه	۴۷۰۰ دور بر دقیقه
سرعت جریان	۰/۵ میلی‌لیتر بر دقیقه	۰/۳ میلی‌لیتر بر دقیقه
زمان اولتراسونیک	۱۰ دقیقه	۷ دقیقه
زمان سانتریفیوژ	۱۰ دقیقه	۷ دقیقه
حجم حلال استخراج‌کننده ۱-آندکانول	۳۵/۰ میکرولیتر	۴۵/۰ میکرولیتر
حجم بافر	۱/۰ میلی‌لیتر	-
نوع بافر	بافر فسفاتی	-

۳-۸-۳ توجیه فاکتورهای مؤثر بر پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام

۳-۸-۳-۱ بررسی اثر pH فاز آبی بر میزان استخراج

۱/۰ میلی‌لیتر محلول ۱۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر کلرودیازپوکساید و ۱/۰ میلی‌لیتر محلول ۱۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر آلپرازولام، ۱/۰ میلی‌لیتر محلول بافر فسفاتی بین pH ۲/۰۰ تا ۱۰/۰۰ به یک لوله آزمایش منتقل گردید و با آب به حجم رسید. برای انجام استخراج محلول نمونه حاوی آنالیت‌ها با ۱/۵ میلی‌لیتر استونیتریل مخلوط شد و به ستون استخراج حاوی ۲/۰ گرم نمک سدیم کلرید منتقل شد. با استفاده از اثر salting-out و جریان مخالف در سرعت جریان ۰/۵ میلی‌لیتر بر دقیقه آنالیت‌ها از فاز آبی به استونیتریل استخراج شدند. در ادامه محلول بالایی به ویال حاوی ۳۵/۰ میکرولیتر ۱-دودکانول منتقل و توسط سرنگ انسولین به محلول ۱۰٪ وزنی/حجمی نمک سدیم کلرید به سرعت تزریق شد تا محلول ابری شکل و کدر (به دلیل پخش ذرات ۱-آندکانول در محلول آبی توسط حلال پخش‌کننده استونیتریل) تشکیل گردد. سپس به مدت ۱۰/۰ دقیقه در حمام فراصوت با فرکانس ۶۰/۰ کیلوهرتز قرار داده شد. در مرحله بعد لوله آزمایش حاوی محلول

ابری شکل به مدت ۱۰ دقیقه سانتیریفیوژ با (۳۵۰۰ دور در دقیقه) گردید و فاز آلی در سطح محلول جمع گردید. سپس ظرف نمونه را در یخچال قرار داده و بعد از ۱۰ دقیقه قطره آلی منجمد با اسپاتول برداشته شد و به ویال انتقال داده شد (در دمای محیط به حالت مذاب است). در پایان ۵/۰ µl از حلال استخراج به دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا تزریق گردید. سیگنال محلول شاهد نیز در غیاب آنالیت ها اندازه گیری شد و اختلاف سیگنال محلول نمونه و شاهد به عنوان سیگنال تجزیه ای در نظر گرفته شد.

نتایج حاصل در جدول (۱-پیوست) و شکل (۱-پیوست) نشان می دهد که در بهینه سازی یک متغیر در زمان بیشترین سیگنال تجزیه ای در $pH=8/0$ مشاهده می گردد. نتایج مشاهده شده به ساختار داروهای مورد بررسی مربوط می شود که در PH های بازی به فرم ملکولی خود حضور دارند و به آسانی وارد فاز آلی (استونیتریل) می شوند.

۳-۸-۳-۲ بررسی اثر نوع بافر

با توجه به pH بهینه برای دستیابی به حساسیت بیشتر، سه نوع بافر شامل بافر فسفاتی، بوراکسی و آمونیایی مورد بررسی قرار گرفت. در این بررسی روش کار مطابق با بخش بررسی اثر pH و فقط هر بار ۱/۰ میلی لیتر محلول بافر از نوع فسفاتی، بوراکسی و آمونیایی با $pH=8/0$ به آن اضافه شد و پس از انجام میکرو استخراج، سیگنال تجزیه ای با HPLC به دست آمد. سیگنال محلول شاهد هم اندازه گیری شد و اختلاف سیگنال محلول نمونه و شاهد به عنوان سیگنال تجزیه ای در نظر گرفته شد. نتایج به دست آمده در جدول (۲-پیوست) و شکل (۲-پیوست) بیانگر آن است که بیشترین سیگنال تجزیه ای در بافر فسفاتی و کمترین سیگنال در حضور بافر بوراکسی به دست آمد و لذا از بافر فسفاتی در آزمایش ها استفاده گردید.

۳-۳-۸-۳ بررسی اثر حجم بافر

بعد از بررسی نوع بافر، اثر حجم بافر فسفاتی با $\text{pH}=8/0$ در محدوده $0/5-2/0$ میلی لیتر از بافر مورد بررسی قرار گرفت. روش کار جهت انجام آزمایش مطابق با روش ارائه شده در بخش بررسی اثر pH است و اختلاف سیگنال محلول نمونه و شاهد به عنوان سیگنال تجزیه ای در نظر گرفته شد. نتایج به دست آمده در جدول (۳-پیوست) و شکل (۳-پیوست) حجم $1/0$ میلی لیتر از بافر فسفاتی با $\text{pH}=8/0$ به عنوان حجم بهینه انتخاب گردید، تا برای بافری نمودن نمونه ها، ظرفیت کافی داشته باشد و لذا در بررسی های بعدی حجم $1/0$ میلی لیتر از بافر فسفاتی با $\text{pH}=8/0$ استفاده گردید.

۳-۳-۸-۴ بررسی اثر نوع حلال استخراج کننده مرحله اول

انتخاب حلال استخراج مناسب اهمیت اساسی در فرآیند پیش تغلیظ دارد. در این پروژه، یک حلال استخراج نقش مضاعفی دارد: (۱) به عنوان یک استخراج کننده در مرحله اول استخراج (CCSHLLE)^۱، و (۲) به عنوان یک حلال پخش کننده در مرحله پیش تغلیظ بعدی (DLLME). این حلال بر اساس امتزاج آن با فاز آلی (حلال استخراج DLLME) و فاز آبی انتخاب می شود. بر این اساس، استونیتریل، استون و DMF ($1/5$ میلی لیتر از هر حلال) مورد آزمایش قرار گرفتند. نتایج به دست آمده نشان داد که تنها استونیتریل توانایی تشکیل یک سیستم دو فازی در اثر عبور محلول نمونه از نمک سدیم کلرید درون ستون استخراج را دارد، در حالی که حلال ها دیگر از محلول آبی جدا نمی شوند. بنابراین استونیتریل به عنوان حلال استخراج برای مطالعات بیشتر انتخاب شد.

¹ Counter Current Salting-Out Homogenous Liquid-Liquid Extraction

۳-۸-۳ بررسی اثر حجم حلال استخراج کننده

برای بهینه سازی حجم حلال استخراج، حجم های مختلف استونیتریل ۲/۵-۱/۰ میلی لیتر در فواصل ۰/۵ میلی لیتری مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به نتایج در شکل (۴ پیوست)، با افزایش حجم حلال استخراج، سیگنال تجزیه ای تا ۲/۰ میلی لیتر افزایش یافت، زیرا با افزایش حجم حلال استخراج، با توجه به ثابت بودن مقدار آنالیت در فاز آبی، با افزایش حجم فاز آلی غلظت آنالیت ها کاهش یافته، لذا سیگنال تجزیه ای کاهش می یابد. لازم به ذکر است، در حجم ۱/۰ میلی لیتر استونیتریل، حالت ابری درستی در روش DLLME بعدی تشکیل نمی شد. با این حال، حالت ابری مطلوب در حجم ۲/۰-۱/۵ میلی لیتر استونیتریل بود. بنابراین، حجم ۲/۰ میلی لیتر از استونیتریل به دلیل داشتن سیگنال تجزیه ای بیشتر به منظور حجم بهینه انتخاب شد.

۳-۸-۳ بررسی اثر نوع حلال استخراج کننده مرحله دوم

در این روش، انتخاب یک حلال پیش تغلیظ مناسب نقش اصلی به منظور دستیابی به فاکتور پیش تغلیظ بالا ایفا می کند. حلال پیش تغلیظ باید: (الف) رفتار خوب کروماتوگرافی، (ب) حلالیت بالا از آنالیت هدف، (ج) حلالیت کم در آب، (د) چگالی بالاتر از آب (ترجیحاً)، (ه) تشکیل یک محلول ابری در حضور استونیتریل زمانی که به محلول آبی تزریق می شود، نشان دهد.

بر این اساس، چند حلال از جمله ۱-آندکانول، ۱-دودکانول، ۱-دکانول و ۱،۱۰-دی کلرودکان مورد بررسی قرار گرفتند. همانطور که مشاهده شد از حلال ۱،۱۰-دی کلرودکان به دلیل عدم تشکیل قطره جامد منسجم و خروج پیک در زمان بازداری آنالیت ها، صرف نظر شد. همان طور که در شکل (۵ پیوست) مشاهده شد، با کاهش طول زنجیر حلال آلی میزان سیگنال های تجزیه ای افزایش می یابد، ولی به دلیل نقطه ذوب نامناسب حلال ۱-دکانول (۶ درجه سانتی گراد) شرایط کار را سخت کرده و تشکیل قطره را با مشکل مواجه می شد. به همین دلیل تکرارپذیری نامناسب و کاهش سیگنال تجزیه ای مشاهده شد. حلال

۱-آندکانول به دلیل داشتن بهترین سیگنال، تکرارپذیری خوب و داشتن شرایط کار آسان به عنوان حلال پیش تغلیظ مرحله دوم انتخاب شد.

۳-۸-۷ بررسی اثر حجم حلال استخراج کننده مرحله دوم

به منظور مطالعه اثر حجم حلال پیش تغلیظ بر عملکرد مرحله DLLME، حجم‌های ۵۵/۰-۱۵/۰ میکرولیتر از حلال مورد نظر مورد آزمایش قرار گرفت (حجم های نهایی پس از ذوب قطره آلی). با توجه به نتایج نشان داده شده در شکل (۶ پیوست) با افزایش حجم از ۱۵ میکرولیتر تا ۳۵ میکرولیتر، سیگنال تجزیه ای آنالیت افزایش یافته است زیرا با افزایش حجم حلال استخراج، با توجه به ثابت بودن حجم فازآبی، امکان تماس دو فاز بیشتر شده و لذا راندمان استخراج افزایش می‌یابد. بنابراین، سیگنال تجزیه‌ای نیز به تدریج افزایش می‌یابند. این روند تا حجم ۳۵/۰ میکرولیتر از حلال استخراج مشاهده شد و پس از آن با افزایش حجم حلال پیش تغلیظ مقدار سیگنال تجزیه ای کاهش یافته است که با توجه به افزایش حجم حلال آلی و عدم تغییر مقدار آنالیت استخراج شده، آنالیت ها رقیق شده‌اند و سیگنال تجزیه ای کاهش یافته است.

۳-۸-۸ بررسی اثر قدرت یونی (اثر نمک)

پس از انتخاب حجم ۳۵/۰ میکرولیتر برای ۱-آندکانول، اثر قدرت یونی بر بازدهی استخراج مورد بررسی قرار گرفت. معمولاً حضور یک نمک در محلول آبی حلالیت املاح آلی تأثیر می‌گذارد. در کار حاضر، بازده استخراج با اضافه کردن نمک طعام در محدوده غلظت ۰/۰-۱۲/۰٪ (وزنی/حجمی) مورد مطالعه قرار گرفت. تغییرات سیگنال در مقابل غلظت سدیم کلرید در شکل ۷ پیوست رسم شده است. با افزایش غلظت NaCl تا ۱۰/۰ درصد (وزنی/حجمی) بازده استخراج با تغییرات ملایم بهبود یافته است و پس از آن به دلیل افزایش ویسکوزیته محلول آبی که منجر به کاهش در انتقال جرم آنالیت از محلول آبی به حلال آلی می‌شود، منجر به کاهش سیگنال تجزیه ای شده است. در نهایت غلظت ۱۰/۰٪ (وزنی/حجمی) سدیم کلرید به دلیل داشتن بیشترین سیگنال تجزیه ای به عنوان قدرت یونی بهینه انتخاب گردید.

۳-۸-۳-۹ بررسی اثر سرعت جریان

سرعت جریان نمونه یکی از پارامترهای مهم است که می‌تواند بازیابی استخراج روش ارائه شده را تحت تأثیر قرار دهد. بنابراین، در طیف وسیعی از $2/0-0/3$ میلی لیتر بر دقیقه مورد بررسی قرار گرفت. همانطور که در شکل (۸ پیوست) نشان داده شده است با افزایش سرعت جریان تا $0/5$ میلی لیتر بر دقیقه میزان استخراج افزایش یافته است. سپس با افزایش سرعت جریان، استخراج ناکافی آنالیت از فاز آبی مشاهده شد که این رفتار را می‌توان توضیح داد، چرا که میزان نمک محلول در فاز آبی در سرعت جریان‌های بالا کاهش یافته و منجر به کاهش در سیگنال تجزیه‌ای شده و در سرعت جریان‌های پایین به دلیل افزایش غلظت نمک و ویسکوزیته محلول آبی مقداری از آنالیت در فاز آبی باقی مانده و سبب کاهش راندمان استخراج می‌شود. بنابراین، سرعت جریان $0/5$ میلی لیتر بر دقیقه برای ادامه بررسی‌ها با توجه به زمان استخراج نسبتاً کوتاه ۱۰ دقیقه انتخاب شد.

۳-۸-۳-۱۰ بررسی اثر زمان اولتراسونیک (حمام فراصوت با فرکانس $60/0$ کیلوهرتز)

پس از بررسی پارامتر مهم سرعت جریان به منظور بررسی اثر زمان اولتراسونیک و تأثیر آن به عنوان یکی از مراحل استخراج، زمان‌های ۴-۱۶ دقیقه مورد بررسی قرار گرفت. همانند مراحل قبلی تمامی پارامترها در مقدار ثابت خود در نظر گرفته شدند و زمان اولتراسونیک بر میزان استخراج بررسی شد. همان طور که در جدول و شکل ۹ پیوست مشاهده می‌شود، مقدار آنالیت آلپرازولام تا زمان ۱۰ دقیقه رو به افزایش بود و پس از آن تقریباً ثابت شد. برای نمونه کلرودیازپوکساید نیز با افزایش زمان اولتراسونیک سیگنال تجزیه‌ای افزایش یافته و با بیشتر شدن زمان اولتراسونیک روند کاهشی مشاهده شد. با قرار دادن لوله آزمایش درون حمام فراصوت، امواج ارتعاش شده موجب بهبود فرآیند مهاجرت آنالیت‌ها از فاز آبی به فاز آلی شدند. با افزایش زمان به دلیل افزایش دما حمام فراصوت، احتمالاً با تأثیر بر ساختار آنالیت‌ها سبب کاهش سیگنال تجزیه‌ای شده است.

۳-۸-۳ بررسی اثر زمان سانتریفیوژ

یکی دیگر از پارامترهای مؤثر بر بازده استخراج زمان سانتریفیوژ است. روش کار جهت انجام آزمایش مطابق روش ارائه شده در بخش بررسی اثر pH است به طوری که زمان سانتریفیوژ در محدوده ۵/۰-۱۵/۰ دقیقه مورد بررسی قرار گرفت. سانتریفیوژ موجب شکستن امولسیون و سرعت بخشیدن به جدایی فاز می‌شود. نتایج حاصله در جدول (۱۰-پیوست) و شکل (۱۰-پیوست) نشان داد که سیگنال تجزیه‌ای با افزایش زمان سانتریفیوژ تا ۱۰/۰ دقیقه بسیار اندک افزایش یافته، و در زمان‌های بیشتر از ۱۰/۰ دقیقه، تقریباً تغییر قابل توجهی در سیگنال‌های تجزیه‌ای حاصله رخ نداد. افزایش بسیار اندک در سیگنال به کیفیت قطره آلی تشکیل شده و تکرارپذیری نسبی بهتر در دوره‌های سانتریفیوژ بالاتر مربوط شده. بنابراین ۱۰/۰ دقیقه سانتریفیوژ به عنوان زمان بهینه سانتریفیوژ در نظر گرفته شد.

۳-۸-۳ بررسی اثر دور سانتریفیوژ

یکی دیگر از پارامترهای مؤثر دور سانتریفیوژ است که طبق روش ارائه شده در بخش (۳-۴-۳-۱) دور سانتریفیوژ در هر دقیقه در محدوده ۳۰۰۰-۴۷۰۰ مورد بررسی قرار گرفت که با توجه به نتایج نشان داده شده در جدول (۱۱-پیوست) و شکل (۱۱-پیوست)، ۴۵۰۰ به عنوان بهینه انتخاب شد و علت نیز این است که در دوره‌های کمتر از ۴۵۰۰، قطره حلال آلی در سطح محلول آبی پخش شده و امکان جدایی دو فاز و جمع آوری تمام آن وجود نداشت، همچنین در دوره‌های بالاتر از ۴۵۰۰ سیگنال تجزیه‌ای تقریباً ثابت است. بنابراین دور ۴۵۰۰ به عنوان مقدار بهینه انتخاب شد.

۳-۹ رسم منحنی‌های کالیبراسیون پیش تغلیظ

۳-۹-۱ رسم منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ کلرودیازپوکساید

به منظور رسم منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ، محلول‌های نمونه با غلظت‌های متفاوت از کلرودیازپوکساید و آلپرازولام تحت شرایط بهینه حاصل از طراحی آزمایش تهیه شد. بدین ترتیب که در یک بالن با حجم ۵/۰ میلی لیتر حجم مشخصی از داروها با غلظت معین برای مثال ۱/۰ میلی لیتر از غلظت ۱۰/۰۰ میلی گرم بر لیتر همراه ۱/۰ میلی لیتر بافر فسفاتی در pH برابر با ۸/۵۰ اضافه شد و با استفاده از آب مقطر به حجم رسانیده شد. سپس عمل استخراج تحت شرایط بهینه بر روی این محلول‌ها انجام گرفت. پس از جداسازی، قطره استخراج شناور با دستگاه HPLC اندازه‌گیری شد نتایج حاصل از این بررسی در جدول (۳-۱۵) و شکل (۳-۱۸) نشان داده شده است.

۳-۹-۲ رسم منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ آلپرازولام

به منظور رسم منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ آلپرازولام، محلول‌های نمونه با غلظت‌های متفاوت تهیه شد. مشابه روش بالا رسم منحنی کالیبراسیون آلپرازولام صورت گرفت. نتایج حاصل از این بررسی در جدول (۳-۱۶) و شکل (۳-۱۹) نشان داده شده است.

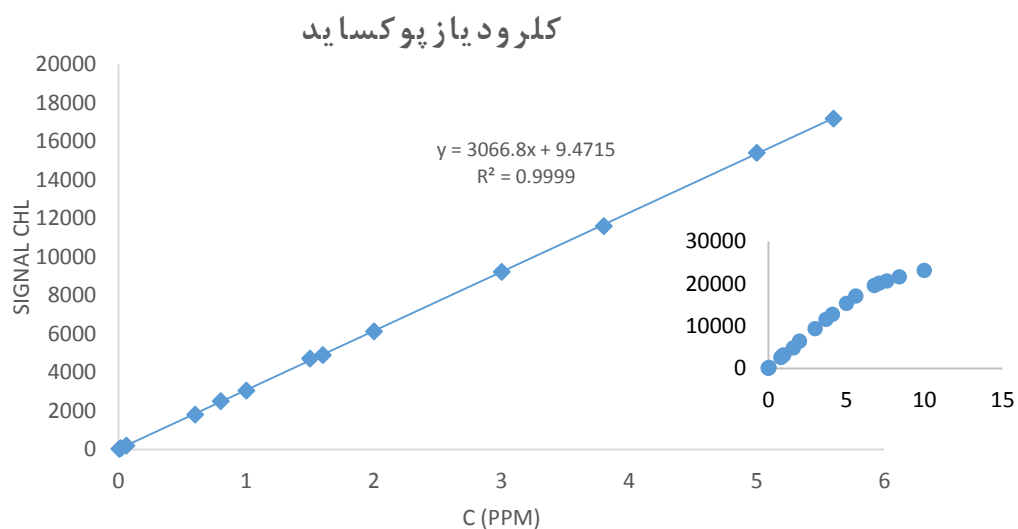
همانطور که مشاهده می‌شود منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ دارای دامنه خطی در محدوده ۰/۰۱۷ تا ۵/۶ میلی گرم بر لیتر با ضریب تعیین $R^2 = 0/9999$ برای کلرودیازپوکساید و دامنه خطی در محدوده ۰/۰۱ تا ۵/۵ میلی گرم بر لیتر با ضریب تعیین $R^2 = 0/9992$ برای آلپرازولام می‌باشد. معادله بهترین خط برای غلظت و سیگنال مربوط به استخراج کلرودیازپوکساید و آلپرازولام به صورت روابط (۳-۱۱) و (۳-۱۲) به دست آمد.

$$Y = 30.66/8 C_{CHL} + 9/47 \quad (3-11)$$

$$Y = 1644/6 C_{ALP} - 1/88 \quad (3-12)$$

جدول (۳-۱۵): داده‌های مربوط به منحنی کالیبراسیون کلرودیازپوکساید

غلظت	سیگنال تجزیه ای
۰/۰۱۷	۵۹/۱
۰/۰۶	۱۹۷/۶
۰/۶	۱۸۰۷/۵
۰/۸	۲۵۰۴/۴
۱/۰	۳۰۴۹/۹
۱/۵	۴۷۱۵/۶
۱/۶	۴۸۹۰/۷
۲/۰	۶۱۲۱/۱
۳/۰	۹۲۱۶/۷
۳/۸	۱۱۵۸۶/۳
۵/۰	۱۵۴۰۱/۱
۵/۶	۱۷۱۷۱/۳

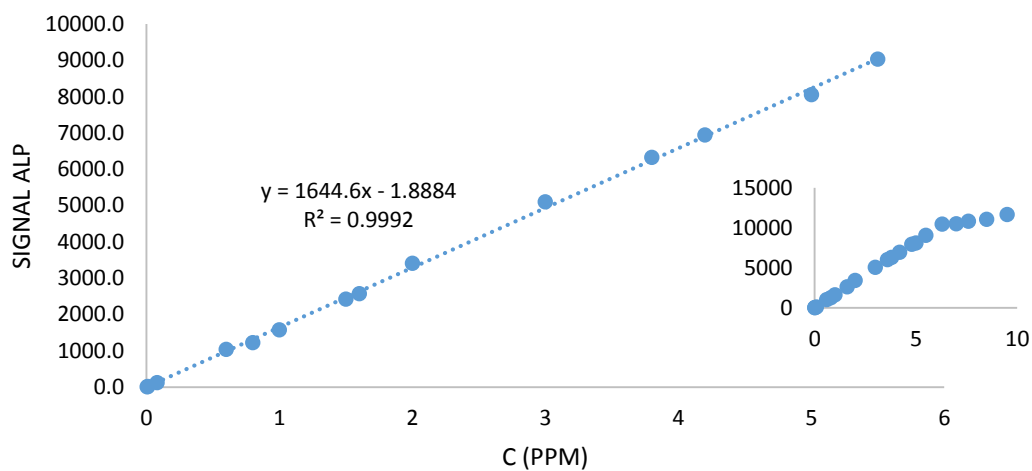


شکل (۳-۱۸): منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ کلرودیازپوکساید در شرایط بهینه

جدول (۳-۱۶): داده‌های مربوط به منحنی کالیبراسیون آلپرازولام

غلظت	سیگنال تجزیه ای
۰/۰۱	۱۴/۴۴
۰/۰۸	۱۲۲/۵۷
۰/۶	۱۰۳۹/۷۰
۰/۸	۱۲۲۳/۸۶
۱/۰	۱۵۷۳/۸۱
۱/۵	۲۴۲۱/۶۹
۱/۶	۲۵۷۳/۶۰
۲/۰	۳۴۰۵/۱۰
۳/۰	۵۱۰۲/۶۷
۳/۸	۶۳۲۴/۶۸
۴/۲	۶۹۴۴/۲۵
۵/۰	۸۰۴۹/۳۹
۵/۵	۹۰۲۸/۹۰

آلپرازولام



شکل (۳-۱۹): منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ آلپرازولام در شرایط بهینه

۳-۱۰ بررسی اثر گونه‌های مزاحم

برای بررسی قابلیت کاربرد روش استخراج مایع-مایع جریان مخالف هموژن با اثر نمک خارج کننده و میکرواستخراج مایع-مایع پخشی برای اندازه‌گیری آلپرازولام و کلرودیازپوکساید در نمونه‌های حقیقی، اثر مزاحمت‌های احتمالی در پیش‌تغلیظ این داروها و اندازه‌گیری آن‌ها با استفاده از HPLC در طول موج ۲۶۰ و ۲۲۲ نانومتر مورد استفاده قرار گرفت.

ابتدا سیگنال محلول نمونه حاوی ۲/۰ میلی گرم برلیتر از آلپرازولام و کلرودیازپوکساید تحت شرایط بهینه و در غیاب گونه‌های مزاحم اندازه‌گیری شد. این کار ۳ بار تکرار شد و میانگین سیگنال‌ها و انحراف استاندارد آن‌ها محاسبه شد. محدوده قابل قبول برای نوسان سیگنال تجزیه‌ای، با توجه به رابطه $\bar{A} \pm 3S_A$ که در این رابطه $\bar{A}$ میانگین و S_A انحراف استانداردهای سیگنال‌های تجزیه‌ای اندازه‌گیری شده به دست آمد. برای بررسی اثر مزاحمت احتمالی هر گونه با نسبت ۱۰۰۰ برابر وزنی-حجمی نسبت به کلرودیازپوکساید و آلپرازولام به محلول اولیه اضافه شد، سپس عمل استخراج انجام گرفت و سیگنال تجزیه‌ای مربوط به هر دارو به دست آمد. اگر سیگنال تجزیه‌ای به دست آمده در حضور گونه مورد بررسی در دامنه $\bar{A} \pm 3S_A$ قرار می‌گرفت به این معنا بود که گونه مورد بررسی 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 در این بررسی در جدول (۳-۱۷) و جدول (۳-۱۸) نشان داده شده است. با توجه به نتایج این جدول مشخص گردید که بسیاری از گونه‌های مورد بررسی حتی هنگامی که به میزان هزار برابر کلرودیازپوکساید و آلپرازولام حضور داشتند مزاحم نبودند.

جدول (۳-۱۷): نتایج حاصل از بررسی اثر گونه‌های مزاحم در پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید با غلظت ۲/۰ میلی گرم بر لیتر

نسبت غلظت گونه به غلظت کلرودیازپوکساید	گونه‌های مورد بررسی
۱۰۰۰	گلوکز، لاکتوز، اوره، تیواوره، ساکارز استامینوفن، اگزالات، ویتامین B ₁
۷۰۰	کافیین، ویتامین B ₆
۱۶۰	اوریک اسید

جدول (۳-۱۸): نتایج حاصل از بررسی اثر گونه‌های مزاحم در پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری آلپرازولام با غلظت ۱/۰ میلی گرم بر لیتر

نسبت غلظت گونه به غلظت آلپرازولام	گونه‌های مورد بررسی
۱۰۰۰	گلوکز، لاکتوز، اوره، تیواوره، ساکارز اگزالات، ویتامین B ₁ و B ₆
۷۰۰	کافیین، استامینوفن
۱۶۰	اوریک اسید

۳-۱۱ ارقام شایستگی روش

حد تشخیص یک روش، حداقل غلظت یا وزنی از آنالیت است که می‌تواند با سطح اطمینان مشخص آشکارسازی شود. برای محاسبه حد تشخیص از رابطه (۳-۱۳) استفاده شد:

$$LOD = \frac{KS_{bl}}{m} \quad (۳-۱۳)$$

S_b = انحراف استاندارد شاهد

m = شیب منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ

K = ضریب اطمینان

بر طبق استدلال کیزر، مقدار منطقی و قابل قبول برای این ضریب ثابت عدد $k = 3/0$ است [۴۵].

با ۶ بار اندازه‌گیری تکراری روی محلول شاهد (فاقد کلرودیازپوکساید و آلپرازولام) طبق شرایط بهینه و با قرار دادن مقادیر، در رابطه (۳-۱۲) مقدار حد تشخیص روش برای کلرودیازپوکساید در نظر گرفتن انحراف استاندارد شاهد برابر با $1/292$ و شیب منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ، حد آشکارسازی $1/3$ میکروگرم بر لیتر به دست آمد. به طور مشابه برای داروی آلپرازولام با S_{bl} برابر با $1/066$ و شیب منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ، حد آشکارسازی به دست آمده برابر با $1/9$ میکروگرم بر لیتر می‌باشد.

۳-۱۱-۱ دقت و صحت

دقت نشان دهنده میزان تکرار پذیری 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:

$$\%RSD = \frac{S_c}{C} \times 100 \quad (3-14)$$

$\%RSD$ = درصد انحراف استاندارد نسبی غلظت

S_c = انحراف استاندارد غلظت

C = میانگین غلظت

برای بررسی دقت و صحت روش، غلظت‌های متفاوتی از کلرودیازپوکساید و آلپرازولام در دامنه خطی منحنی کالیبراسیون انتخاب و در شرایط بهینه، عمل استخراج بر روی آن‌ها انجام گرفت. برای هر یک از

غلطت‌های انتخاب شده، ۳ بار اندازه‌گیری تکراری انجام گرفت و با استفاده از سیگنال‌های به‌دست آمده برای هر نمونه و منحنی‌های کالیبراسیون مقدار کلرودیازپوکساید و آلپرازولام معادل با هر سیگنال محاسبه شد. همانطور که در جدول (۳-۱۹) و (۳-۲۰) نشان داده شده است مقادیر t و درصد انحراف نسبی به‌ترتیب نشان دهنده صحت و دقت خوب روش است. لازم به ذکر است که در سطح اطمینان ۹۵٪ مقدار t بحرانی برای ۲ درجه آزادی برابر ۴/۳۰ است.

جدول (۳-۱۹) بررسی دقت و صحت در شرایط منحنی کالیبراسیون کلرودیازپوکساید

درصد بازیابی	مقدار t	RSD% (n=3)	مقدار اندازه‌گیری شده کلرودیازپوکساید (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	کلرودیازپوکساید موجود در محلول آبی (میکروگرم بر میلی‌لیتر)
۹۸/۸	۱/۷۳	۱/۹	۰/۵۹	۰/۶۰
۱۰۲/۸	۳/۴۶	۱/۵	۱/۵۴	۱/۵۰
۹۹/۲	۰/۹۹	۱/۵	۴/۹۶	۵/۰۰

جدول (۳-۲۰) بررسی دقت و صحت در شرایط منحنی کالیبراسیون آلپرازولام

درصد بازیابی	مقدار t	RSD% (n=3)	مقدار اندازه‌گیری شده آلپرازولام (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	آلپرازولام موجود در محلول آبی (میکروگرم بر میلی‌لیتر)
۱۰۱/۷	۰/۸۷	۳/۳	۰/۶۱	۰/۶۰
۹۹/۳	۰/۵۷	۲/۰	۱/۴۹	۱/۵۰
۹۸/۸	۱/۲۹	۱/۷	۴/۹۴	۵/۰۰

۳-۱۲ فاکتور پیش تغلیظ^۱

فاکتور پیش تغلیظ (PF)، به صورت نسبت شیب منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ بر شیب منحنی کالیبراسیون مستقیم تعریف می‌شود [۷۷] که در رابطه (۳-۱۵)، m_1 شیب منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ و m_2 شیب منحنی کالیبراسیون مستقیم است. مقدار فاکتور پیش تغلیظ برای کلرودیازپوکساید و آلپرازولام، براساس نتایج به ترتیب ۱۰۴/۹ و ۹۹/۳ به دست آمد.

$$PF = \frac{m_1}{m_2} \quad (۳-۱۵)$$

۳-۱۳ اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام در نمونه‌های حقیقی

برای بررسی کارایی روش پیشنهادی به منظور استفاده در نمونه‌های حقیقی با بافت‌های مختلف، این روش برای جداسازی، پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام در قرص کلرودیازپوکساید و آلپرازولام، نمونه سرم و ادرار با اعمال شرایط بهینه به کار گرفته شد.

۳-۱۳-۱ نحوه آماده‌سازی نمونه قرص آلپرازولام و کلرودیازپوکساید

ابتدا ۴ عدد قرص کلرودیازپوکساید ۵/۰ میلی گرمی شرکت سبحان توزین و به منظور همگن سازی در هاون عقیق پودر شد، سپس یک چهارم این مقدار معادل ۵/۰ میلی گرم ماده مؤثره کلرودیازپوکساید با متانول حل و پس از صاف کردن در بالن حجمی ۱۰۰/۰ میلی لیتری به حجم رسانیده شد. سپس ۱/۰ میلی لیتر از این محلول به بالن ۱۰/۰ میلی لیتری منتقل و به حجم رسانده شد. یک میلی لیتر از محلول حاصل به روش افزایش استاندارد مورد آنالیز قرار گرفت، به این صورت که ابتدا به محلول نمونه حاوی یک میلی لیتر نمونه قرص هیچ ماده‌ی استاندارد اضافه نشد و سیگنال به دست آمد. در مراحل بعدی، به ترتیب

^۱-Preconcentration factor

۰/۳، ۰/۵ و ۱/۰ میلی‌لیتر از محلول استاندارد ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر به محلول نمونه اضافه شد و پس از انجام پیش‌تغلیظ سیگنال تجزیه‌ای محاسبه شد. هر اندازه‌گیری ۳ بار تکرار گردید که نتایج آن در جدول (۲۱-۳) آمده است. نتایج نشان می‌دهد که درصد بازیابی برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید در نمونه قرص کلرودیازپوکساید ۱۰۴/۰-۹۸/۳٪ با انحراف استاندارد نسبی قابل قبول ۲/۳-۱/۲۶ می‌باشد، همچنین با توجه به نتایج، هنگام اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید در حضور آلپرازولام تغییری در سیگنال کلرودیازپوکساید ایجاد نشد، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که اندازه‌گیری هم‌زمان این داروها در نمونه حقیقی مزاحمتی ندارند.

آماده سازی قرص آلپرازولام نیز به همین ترتیب صورت گرفت، ابتدا ۶ عدد قرص آلپرازولام ۰/۵ میلی‌گرمی از شرکت سبحان را توزین و سپس همگن شد، سپس یک سوم این مقدار معادل ۱/۰ میلی‌گرم ماده مؤثره آلپرازولام با متانول حل شد و پس از صاف کردن در بالن حجمی ۱۰۰/۰ میلی‌لیتری به حجم رسانیده شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از این محلول به روش افزایش استاندارد مورد آنالیز قرار گرفت به این صورت که ابتدا محلول نمونه حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر نمونه قرص هیچ ماده استاندارد اضافه نشد و سیگنال به دست آمد. در مراحل بعدی، به ترتیب ۰/۳، ۰/۵ و ۱/۰ میلی‌لیتر از محلول استاندارد ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر به محلول نمونه اضافه شد و پس از انجام پیش‌تغلیظ سیگنال تجزیه‌ای محاسبه شد. هر اندازه‌گیری ۳ بار تکرار گردید که نتایج آن در جدول (۲۲-۳) آمده است. نتایج نشان می‌دهد که درصد بازیابی پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری آلپرازولام در نمونه قرص آلپرازولام ۱۰۳/۰-۹۸/۳٪ با انحراف استاندارد نسبی قابل قبول ۴/۲-۰/۹۹ می‌باشد.

نمونه پیش‌تغلیظ شده حاوی نمونه قرص با غلظت نامشخص با افزایش محلول استاندارد داروها با غلظت ۱/۰ میلی‌گرم بر لیتر در شکل (۴-۲۰) (که رنگ آبی مربوط به طول موج ۲۲۲ نانومتر و رنگ قرمز مربوط به طول موج ۲۶۰ نانومتر می‌باشد) نشان داده شده است.

۳-۱۳-۲ نحوه آماده سازی سرم خون

نحوه آماده سازی سرم به این صورت بود که ابتدا ۲/۴ میلی لیتر استونیتریل به ۴/۰ میلی لیتر سرم به منظور جدا کردن پروتئین های موجود در آن اضافه گردید. سپس به مدت ۱۰/۰ دقیقه در سانتریفیوژ با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد [۷۸]. سپس محلول رویی آن برداشته و در بالن حجمی ۲۵/۰ میلی لیتری منتقل کرده و به حجم رسانیده شد. در انتها یک میلی لیتر از این محلول به بالن ۵/۰ میلی لیتری انتقال داده شد و آنالیز نمونه با روش افزایش استاندارد در سه غلظت متفاوت از استاندارد داروهای کلرودیازپوکساید و آلپرازولام انجام شد که نتایج آن در جدول (۳-۲۳) و (۳-۲۴) آورده شده است. نتایج نشان می دهد که درصد بازیابی برای پیش تغلیظ و اندازه گیری کلرودیازپوکساید در نمونه سرم ۱۰۱/۳-۹۷/۵٪ با انحراف استاندارد نسبی قابل قبول ۲/۴۶-۰/۶۷ بوده و نیز درصد بازیابی روش برای پیش تغلیظ و اندازه گیری آلپرازولام در نمونه سرم ۱۰۰/۶-۹۶/۳٪ با انحراف استاندارد نسبی قابل قبول ۳/۸۹-۰/۳۳ می باشد. همچنین با توجه به نتایج اندازه گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام در حضور هم تغییری در سیگنال یکدیگر ایجاد نمی کنند، بنابراین می توان نتیجه گرفت که اندازه گیری هم زمان این داروها در نمونه حقیقی سرم مزاحمتی بر روی یکدیگر ندارند.

کروماتوگرام نمونه سرم شاهد (شکل (۳-۲۱)) که در آن هیچ یک از داروهای مذکور در نمونه سرم وجود نداشته است و نمونه سرم حاوی ۲/۰ میلی گرم بر لیتر از کلرودیازپوکساید و آلپرازولام در شکل (۳-۲۳) (که رنگ آبی مربوط به طول موج ۲۶۰ نانومتر و رنگ قرمز، طول موج ۲۲۲ نانومتر می باشد) نشان داده شده است.

۳-۱۳-۳ نحوه آماده سازی ادرار

نحوه آماده سازی ادرار به این صورت بود که ابتدا به ۵/۰ میلی لیتر ادرار، ۱/۰ میلی لیتر استونیتریل در لوله آزمایش افزوده و با آب مقطر به حجم ۱۰/۰ میلی لیتر رسانده شد و به مدت ۱۰ دقیقه در سانتریفیوژ

با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه قرار گرفت تا ناخالصی‌های آن جدا گردد. سپس محلول رویی آن برداشته شد و به روش افزایش استاندارد در ظرف نمونه ۵/۰ میلی‌لیتری در شرایط بهینه به روش پیشنهادی مورد بررسی قرار گرفت. در مراحل بعدی غلظت‌های متفاوتی از محلول استاندارد به ظرف نمونه حاوی ۱/۰ میلی‌لیتر ادرار افزوده و عمل استخراج روی آن‌ها صورت گرفت. هر اندازه‌گیری نیز سه بار تکرار گردید. نتایج به دست آمده در جدول (۳-۲۵) و (۳-۲۶) آورده شده است. نتایج نشان می‌دهد که درصد بازیابی برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید در نمونه ادرار ۱۰۱/۰-۹۹/۵٪ با انحراف استاندارد نسبی قابل قبول ۲/۹۷-۰/۳۳ بوده و نیز درصد بازیابی روش برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری آلپرازولام در نمونه ادرار ۱۰۳/۰-۱۰۰/۰٪ با انحراف استاندارد نسبی قابل قبول ۳/۰۳-۰/۹۸ می‌باشد. همچنین با توجه به نتایج اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام در حضور هم تغییری در سیگنال یکدیگر ایجاد نمی‌کنند، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که اندازه‌گیری هم‌زمان این داروها در نمونه حقیقی ادرار مزاحمتی بر روی یکدیگر ندارند.

شکل (۳-۲۳) کروماتوگرام مربوط به نمونه ادرار بدون افزودن آنالیت و شکل (۳-۲۴) کروماتوگرام مربوط به پیش‌تغلیظ نمونه ادرار با افزودن ۳/۰ میلی‌گرم بر لیتر از محلول استاندارد آلپرازولام و کلرودیازپوکساید است.

جدول (۳-۲۱): نتایج حاصل از پیش تغلیظ و اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید در نمونه قرص کلرودیازپوکساید

کلرودیازپوکساید اضافه شده (میلی گرم بر لیتر)	کلرودیازپوکساید اندازه‌گیری شده (میلی گرم بر لیتر)	%RSD (n=3)	مقدار تجربی t	درصد بازیابی
کلرودیازپوکساید (۰/۰۰)	آلپرازولام (۰/۰۰)	۲/۳	-	-
کلرودیازپوکساید (۰/۶۰)	آلپرازولام (۰/۶۰)	۱/۲۶	۰/۸۶	۹۸/۳
کلرودیازپوکساید (۱/۰۰)	آلپرازولام (۱/۰۰)	۱/۹۷	۱/۷۳	۱۰۴/۰
کلرودیازپوکساید (۲/۰۰)	آلپرازولام (۲/۰۰)	۱/۹۶	۱/۷۳	۱۰۳/۰

جدول (۳-۲۲): نتایج حاصل از پیش تغلیظ و اندازه‌گیری آلپرازولام در نمونه قرص آلپرازولام

آلپرازولام اضافه شده (میلی گرم بر لیتر)	آلپرازولام اندازه‌گیری شده (میلی گرم بر لیتر)	%RSD (n=3)	مقدار تجربی t	درصد بازیابی
کلرودیازپوکساید (۰/۰۰)	آلپرازولام (۰/۰۰)	۴/۲	-	-
کلرودیازپوکساید (۰/۶۰)	آلپرازولام (۰/۶۰)	۳/۱۶	۰/۳۵	۹۸/۳
کلرودیازپوکساید (۱/۰۰)	آلپرازولام (۱/۰۰)	۰/۹۹	۲/۵۹	۱۰۳/۰
کلرودیازپوکساید (۲/۰۰)	آلپرازولام (۲/۰۰)	۲/۶۶	۰/۳۴	۹۹/۳

جدول (۳-۲۳): نتایج حاصل از پیش تغلیظ و اندازه‌گیری آلپرازولام در نمونه سرم خون

آلپرازولام اضافه شده (میلی گرم بر لیتر)	آلپرازولام اندازه‌گیری شده (میلی گرم بر لیتر)	%RSD (n=3)	نتایج آزمون t	درصد بازیابی
کلرودیازپوکساید (۰/۰۰)	آلپرازولام (۰/۰۰)	-	-	-
کلرودیازپوکساید (۰/۸۰)	آلپرازولام (۰/۸۰)	۳/۸۹	۱/۷۳	۹۶/۳
کلرودیازپوکساید (۲/۰۰)	آلپرازولام (۲/۰۰)	۱/۰۰	۰/۸۶	۹۹/۵
کلرودیازپوکساید (۳/۰۰)	آلپرازولام (۳/۰۰)	۰/۳۳	۳/۴۶	۱۰۰/۶

جدول (۳-۲۴): نتایج حاصل از پیش تغلیظ و اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید در نمونه سرم خون

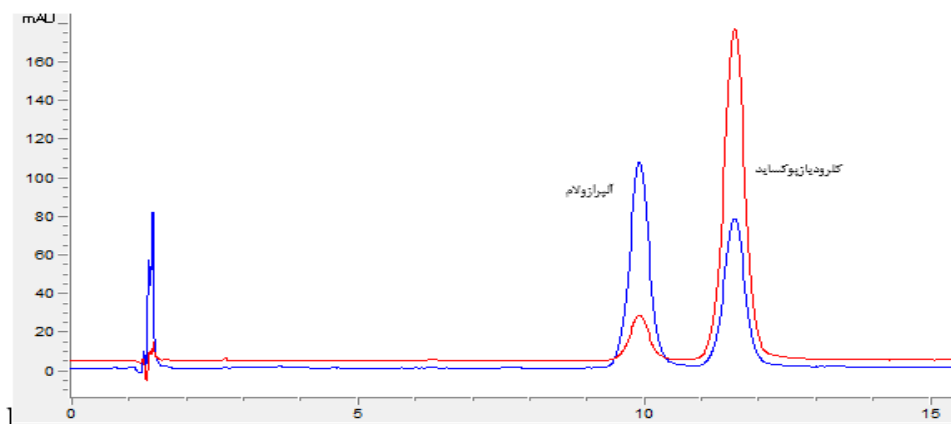
درصد بازیابی	نتایج آزمون t	%RSD (n=3)	کلرودیازپوکساید اندازه‌گیری شده (میلی گرم بر لیتر)	کلرودیازپوکساید اضافه شده (میلی گرم بر لیتر)	
-	-	-	<LOD	آلپرازولام (۰/۰۰)	کلرودیازپوکساید (۰/۰۰)
۱۰۱/۳	۰/۸۶	۲/۴۶	۰/۸۱	آلپرازولام (۰/۸۰)	کلرودیازپوکساید (۰/۸۰)
۹۷/۵	۲/۸۶	۱/۵۳	۱/۹۵	آلپرازولام (۲/۰۰)	کلرودیازپوکساید (۲/۰۰)
۹۹/۰	۲/۶۰	۰/۶۷	۲/۹۷	آلپرازولام (۳/۰۰)	کلرودیازپوکساید (۳/۰۰)

جدول (۳-۲۵): نتایج حاصل از پیش تغلیظ و اندازه‌گیری آلپرازولام در نمونه ادرار

درصد بازیابی	نتایج آزمون t	%RSD (n=3)	آلپرازولام اندازه‌گیری شده (میلی گرم بر لیتر)	آلپرازولام اضافه شده (میلی گرم بر لیتر)	
-	-	-	<LOD	آلپرازولام (۰/۰۰)	کلرودیازپوکساید (۰/۰۰)
۱۰۰/۰	۰/۵۶	۳/۰۳	۱/۰۱	آلپرازولام (۱/۰۰)	کلرودیازپوکساید (۱/۰۰)
۱۰۳/۰	۳/۴۶	۱/۴۵	۲/۰۶	آلپرازولام (۲/۰۰)	کلرودیازپوکساید (۲/۰۰)
۱۰۱/۳	۲/۳۱	۰/۹۸	۳/۰۴	آلپرازولام (۳/۰۰)	کلرودیازپوکساید (۳/۰۰)

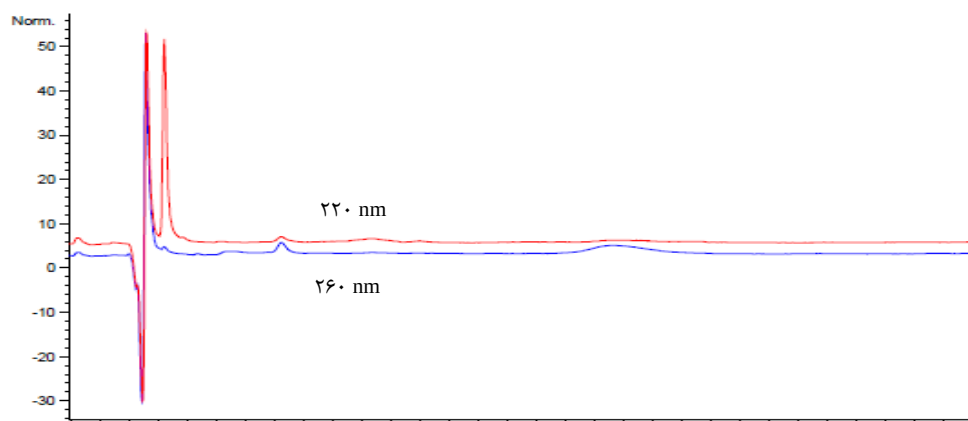
جدول (۳-۲۶): نتایج حاصل از پیش تغلیظ و اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید در نمونه ادرار

درصد بازیابی	نتایج آزمون t	%RSD (n=3)	کلرودیازپوکساید اندازه‌گیری شده (میلی گرم بر لیتر)	کلرودیازپوکساید اضافه شده (میلی گرم بر لیتر)	
-	-	-	<LOD	آلپرازولام (۰)	کلرودیازپوکساید (۰)
۱۰۱/۰	۰/۵۷	۲/۹۷	۱/۰۱	آلپرازولام (۱/۰۰)	کلرودیازپوکساید (۱/۰۰)
۹۹/۵	۰/۸۶	۱/۰۱	۱/۹۹	آلپرازولام (۲/۰۰)	کلرودیازپوکساید (۲/۰۰)
۹۹/۶	۱/۷۳	۰/۳۳	۲/۹۹	آلپرازولام (۳/۰۰)	کلرودیازپوکساید (۳/۰۰)



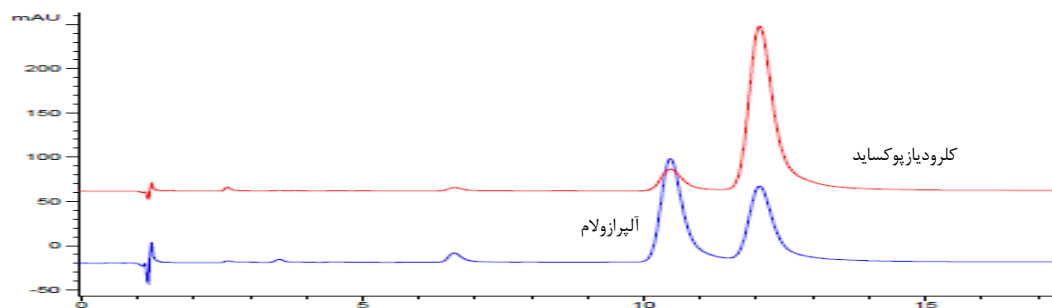
شکل (۳-۲۰): کروماتوگرام پیش تغلیظ محلول نمونه قرص همراه با محلول استاندارد داروها حاوی ۱/۰ میلی گرم بر لیتر کلرودیازپوکساید و آلپرازولام

شرایط آزمایش: غلظت کلرودیازپوکساید و آلپرازولام ۱/۰ میلی گرم بر لیتر، حجم محلول نمونه ۵/۰ میلی لیتر، حجم حلال استخراج کننده (۱-آندکانول) ۴۵ میکرولیتر، رنگ آبی مربوط به طول موج ۲۲۲ نانومتر مربوط به آلپرازولام و طول موج ۲۶۰ نانومتر با رنگ قرمز مربوط به کلرودیازپوکساید می باشد.



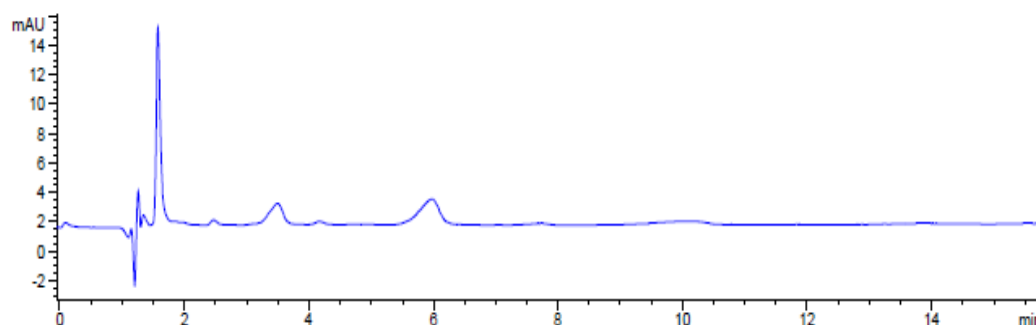
شکل (۳-۲۱): کروماتوگرام حاصل از نمونه سرم شاهد

شرایط آزمایش: حجم محلول نمونه ۵/۰ میلی لیتر، حجم حلال استخراج کننده (۱-آندکانول) ۴۵ میکرولیتر، سرعت جریان ۰/۳ میلی لیتر بر دقیقه، pH فاز آبی برابر با ۸/۵، طول موج ۲۶۰ نانومتر مربوط به کلرودیازپوکساید و ، طول موج ۲۲۲ نانومتر مربوط به آلپرازولام می باشد.



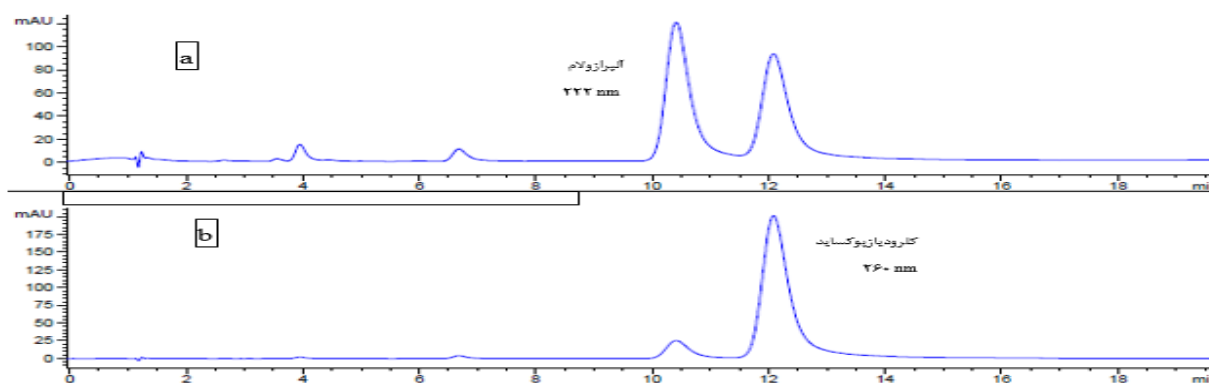
شکل (۲۲-۳): کروماتوگرام نمونه سرم حاوی ۲/۰ میلی گرم بر لیتر کلرودیازپوکساید و آلپرازولام

شرایط آزمایش: غلظت کلرودیازپوکساید و آلپرازولام ۲/۰ میلی گرم بر لیتر، حجم محلول نمونه ۱۰/۰ میلی لیتر، حجم حلال استخراج کننده (۱-آندکانول) ۴۵ میکرولیتر، طول موج ۲۲۲ نانومتر مربوط به آلپرازولام، طول موج ۲۶۰ نانومتر مربوط به کلرودیازپوکساید می باشد.



شکل (۲۳-۳): کروماتوگرام نمونه ادرار شاهد بدون حضور داروهای کلرودیازپوکساید و آلپرازولام

شرایط آزمایش: نمونه ادرار بدون حضور داروهای آلپرازولام و کلرودیازپوکساید، حجم محلول نمونه ۵/۰ میلی لیتر، حجم حلال استخراج کننده (۱-آندکانول) ۴۵ میکرولیتر.



شکل (۲۴-۳): کروماتوگرام نمونه ادرار حاوی ۲/۰ میلی گرم بر لیتر کلرودیازپوکساید و آلپرازولام

شرایط آزمایش: غلظت کلرودیازپوکساید و آلپرازولام ۳/۰ میلی گرم بر لیتر، حجم محلول نمونه ۵/۰ میلی لیتر، حجم حلال استخراج کننده (۱-آندکانول) ۴۵ میکرولیتر، (a) مربوط به طول موج ۲۲۲ نانومتر مربوط به آلپرازولام و (b) طول موج ۲۶۰ نانومتر مربوط به کلرودیازپوکساید می باشد.

فصل ۴

بحث و نتیجه گیری

۴-۱ ارقام شایستگی روش

بررسی‌های انجام شده، ناحیه خطی غلظت برای آلپرازولام و کلرودیازپوکساید را به ترتیب ۰/۰۱ تا ۵/۵ و ۰/۰۱۷ تا ۵/۶ میلی گرم بر لیتر را نشان داد. معادله بهترین خط مربوط به استخراج آلپرازولام و کلرودیازپوکساید در روابط (۳-۱۱) و (۳-۱۲) آمده است. مقادیر انحراف استاندارد نسبی برای ۳ اندازه‌گیری تکراری مطابق جدول (۳-۲۰) و (۳-۲۱) در غلظت‌های ۰/۶۰، ۱/۵۰ و ۵/۰۰ میلی گرم بر لیتر به ترتیب برابر با ۱/۹، ۱/۵ و ۱/۵ برای کلرودیازپوکساید و برابر ۳/۳، ۲/۰ و ۱/۷ برای آلپرازولام می‌باشد، که نشان‌دهنده دقت خوب روش است. همچنین، مقادیر درصد بازیابی نشان داده شده برای غلظت‌های ذکر شده در جدول (۳-۲۰) و (۳-۲۱) بیانگر صحت خوب روش است.

مقدار حد تشخیص روش برای کلرودیازپوکساید و آلپرازولام به ترتیب ۱/۳۰ و ۱/۹ میکروگرم بر لیتر و فاکتور پیش‌تغلیظ تحت شرایط بهینه به ترتیب ۱۰۴/۹ و ۹۹/۳ به دست آمد. بر اساس نتایج ارائه شده در جدول (۳-۱۸) و (۳-۱۹) بیشتر گونه‌ها در اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام مزاحم نیستند و روش از گزینش‌پذیری بالایی برخوردار است.

نتایج حاصل از اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام در نمونه‌های قرص کلرودیازپوکساید و آلپرازولام و سرم خون و ادرار در جدول (۳-۲۱) تا (۳-۲۶) آمده است. این نتایج نشان می‌دهد که روش پیشنهادی، برای اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام در نمونه‌های حقیقی با دقت و صحت خوبی قابل کاربرد است.

۴-۲ مقایسه روش پیشنهادی با برخی روش‌های موجود

با توجه به اینکه پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری همزمان این دو دارو در این پژوهش انجام گرفته است، لذا در جدول (۴-۱) فهرستی از برخی روش‌های پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری برای اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام آورده شده است. در این جدول پارامترهای مختلف، مانند حد تشخیص (LOD)، دامنه خطی

(LDR) و بازده استخراج (ER) برای مقایسه آورده شده است. مقایسه ارقام شایستگی گزارش شده برای این روش‌ها در اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام با روش پیشنهادی نشان می‌دهد که روش ارائه شده در این پروژه در برخی از ارقام شایستگی مانند حد تشخیص، فاکتور پیش‌تغلیظ مطلوب‌تر از سایر روش‌ها است. همچنین دارای گستره خطی خوب ۵/۶-۰/۰۰۵ میلی گرم بر لیتر می‌باشد. حجم حلال آلی مصرف شده در این روش بسیار کم است. بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری کرد که CSHLE-DLLME-SFOD یک روش بسیار مؤثر، نسبتاً سریع، دقیق و سازگار با محیط زیست می‌باشد.

جدول (۴-۱): مقایسه روش پیشنهادی با برخی از روش‌های گزارش شده برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام

روش پیشنهادی	روش اندازه‌گیری	حد تشخیص (میکروگرم بر لیتر)	دامنه خطی (میلی گرم بر لیتر)	بازده استخراج	آنالیت‌ها	مرجع
'UA-DLLME	'UPLC	۳/۵	-	۹۵-۱۰۸	ALP	[۳۸]
-	LC-MS	۱۴/۰۸	۰/۰۵-۱/۰۰	۹۹-۱۰۱	ALP	[۷۹]
		۰/۰۲۱	۰/۰۱-۳/۵	۹۶-۱۰۴	ALP	[۴۲]
UASEME-SFO ^۲	HPLC	۰/۰۲۰	۰/۰۱-۳/۵	۱۰۲-۱۰۶	CHL	
SPE	HPLC	۲/۲	۰/۰۱-۵/۰۰	۱۰۰-۱۰۲	ALP	[۴۳]
		۳/۰۱	۰/۰۱-۶/۰۰	۹۸-۱۰۰	CHL	
CCSHLE-DLLME-SFOD ^۶	HPLC	۱/۳	۰/۰۱۰-۵/۵	۹۹-۱۰۲	ALP	کار حاضر
		۱/۹	۰/۰۱۷-۵/۶	۹۹-۱۰۳	CHL	

¹ -Ultra-performance liquid chromatography, Ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction

² -Ultrasound-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction with solidification of floating organic droplet

⁶ -counter current salting-out homogenous liquid-liquid extraction joined with the disper-sive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic drop

۳-۴ نتیجه‌گیری

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

استفاده از روش استخراج مایع-مایع جریان مخالف به کمک اثر نمک خارج کننده با روش میکرو استخراج مایع-مایع پخشی بر اساس انجماد قطره آلی شناور برای جداسازی و پیش‌تغلیظ داروهای آلپرازولام و کلرودیازپوکساید و اندازه‌گیری به وسیله HPLC به طور همزمان برای اولین بار در این پروژه تحقیقاتی مورد بررسی قرار گرفته است.

از جمله مزایای روش پیشنهادی می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

- زمان آنالیز نسبتاً کوتاه است.
- در روش پیشنهادی، فاکتور پیش‌تغلیظ برای داروهای کلرودیازپوکساید و آلپرازولام بالا است.
- این روش دارای دامنه خطی وسیع و حد تشخیص پایین است.
- نتایج درصد بازیابی و آزمون t حاصل از اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام در نمونه‌های مختلف قرص، ادرار و سرم نشان دهنده صحت بالای روش است.
- مصرف کم حلال استخراج در حد چند میکرو لیتر با استفاده از روش میکرو استخراج فاز مایع به وسیله قطره آلی شناور جامد از مزایای این روش می‌باشد.
- استفاده از این روش هزینه کمی دارد.
- این روش از گزینش پذیری بالایی برخوردار است.

۴-۴ آینده نگری

- کاربرد این روش در پیش تغلیظ دیگر جفت ترکیبات دارویی مانند دیازپام با کلرودیازپوکساید و یا دسته دیگر ترکیبات دارویی مانند آمیل نیتريت
- تغییر فرآیند استخراج مانند استفاده از ورتکس به جای امواج مافوق صوت
- استخراج آلاینده های محیط زیست مانند حشره کش ها از بافت های پیچیده مانند آب میوه ها و ...
- بررسی سایر پارامترها مانند دما یا شرایط ستون (ارتفاع ستون، قطر ستون و ...) به منظور بررسی اثرات آنها بر نتایج استخراج

پیوست

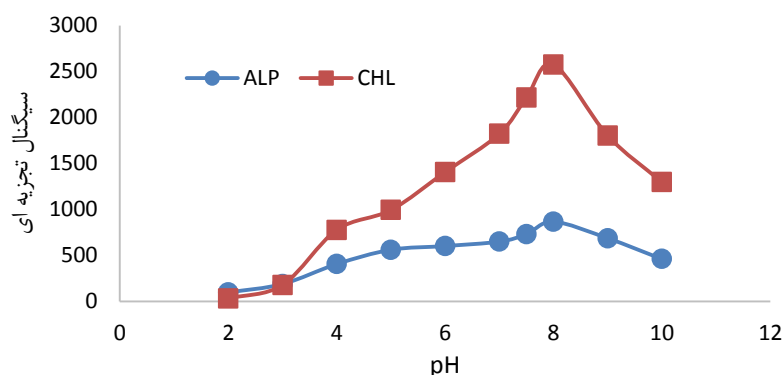
نمودارها و نتایج بررسی یک متغیر در زمان برای اندازه گیری آلپرازولام و کلرودیازپوکساید روش کار:

در یک بالون ۵/۰ میلی لیتر، ۱/۰ میلی لیتر از محلول ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر کلرودیازپوکساید و ۱/۰ میلی لیتر محلول ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر آلپرازولام، مقداری بافر با pH مورد نظر افزوده شد و با آب مقطر به حجم رسید، سپس محلول داروها با ۲/۰ میلی لیتر استونیتریل مخلوط شد و به ستون استخراج حاوی نمک سدیم کلرید منتقل گردید و با سرعت جریان ۰/۵۰ میلی لیتر بر دقیقه از ستون عبور داده شد. در انتها حجم ۲/۰ میلی لیتر استونیتریل محلول بالایی به ویال حاوی ۳۵/۰ میکرولیتر حلال استخراج ۱-دودکانول منتقل شد و توسط سرنگ انسولین به لوله حاوی ۱۰/۰ میلی لیتر محلول ۱/۰٪ وزنی/حجمی نمک سدیم کلرید به سرعت تزریق شد. این عمل باعث ایجاد محلول ابری شکل به دلیل پخش شدن ذرات حلال استخراج توسط حلال پخش کننده در محلول آبی است که موجب انتقال بهتر دارو به حلال استخراج می شود. سپس لوله آزمایش را در حمام فراصوت با فرکانس مافوق صوت ۶۰ کیلو هرتز به مدت مشخصی در ۲۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد که در این مرحله آنالیت ها در قطرات ریز حلال آلی استخراج شدند. سپس محلول نمونه با دور مشخصی در مدت زمان معینی سانتریفیوژ گردید. پس از آن، لوله آزمایش به حمام یخ منتقل و حلال آلی شناور به صورت قطره جامد درآمد. سپس قطره آلی منجمد شده به یک ویال مخروطی توسط یک قاشق پزشکی کوچک منتقل شد (حجم گزارش شده در تمامی پروژه به صورت حجم باقی مانده پس از استخراج می باشد) و در دمای اتاق ذوب شده و سپس مقدار ۵/۰ میکرولیتر از آن به دستگاه HPLC تزریق شد. برای محلول شاهد نیز به طور مشابه عمل شد با این تفاوت که محلول شاهد فاقد

داروهای کلرودیازپوکساید و آلپرازولام بود. اختلاف سیگنال محلول نمونه و شاهد به عنوان سیگنال تجزیه‌ای مورد استفاده قرار گرفت.

جدول ۱ پ): نتایج حاصل از بررسی اثر pH فاز آبی بر میزان استخراج

pH	آلپرازولام	کلرودیازپوکساید	مجموع سیگنال
۲/۰	۹۸/۴	۳۲/۴	۱۳۰/۸
۳/۰	۱۸۹/۵	۱۷۹/۶	۳۶۹/۱
۴/۰	۴۰۶/۶	۷۷۷/۸	۱۱۸۴/۴
۵/۰	۵۶۲/۲	۱۴۰۶/۳	۱۵۵۶/۴
۶/۰	۶۰۲/۸	۱۴۰۶/۳	۲۰۰۹/۱
۷/۰	۶۵۰/۵	۱۸۲۱/۵	۲۴۷۲/۱
۷/۵	۷۳۰/۸	۲۲۱۴/۸	۲۹۴۵/۶
۸/۰	۸۶۶/۹	۲۵۷۵/۹	۳۴۴۲/۸
۹/۰	۶۸۷/۲	۱۸۰۴/۶	۲۴۹۰/۹
۱۰/۰	۴۶۱/۶	۱۲۹۶/۳	۱۷۵۷/۹

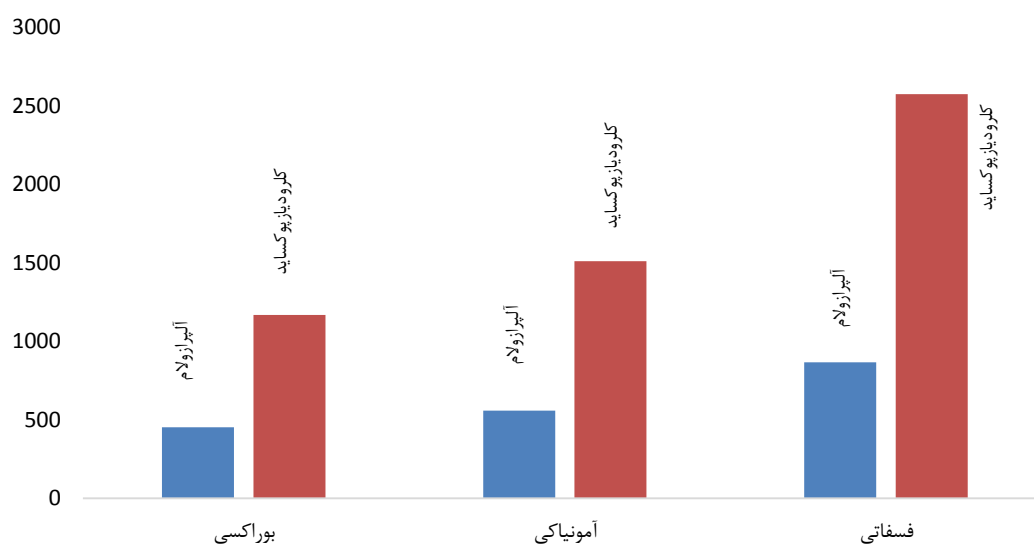


شکل ۱ پ): نمودار تأثیر pH فاز آبی بر میزان استخراج

شرایط آزمایش: غلظت کلرودیازپوکساید و آلپرازولام ۲/۰ میلی گرم بر لیتر، حجم محلول نمونه ۵/۰ میلی لیتر، ۱/۰ میلی لیتر بافر فسفاتی، حجم حلال استخراج کننده (۱-دودکانول) ۳۵/۰ میکرولیتر، سرعت جریان استخراج ۰/۵۰ میلی لیتر بر دقیقه، زمان سانتریفیوژ و اولتراسونیک کردن ۱۰/۰ دقیقه، دور سانتریفیوژ ۳۵۰۰ دور در دقیقه.

جدول ۲ پ): نتایج حاصل از بررسی نوع بافر بر میزان استخراج

نوع بافر	آلپرازولام	کلرودیازپوکساید	مجموع سیگنال
بوراکسی	۴۵۲/۸	۱۱۶۹/۰	۱۶۲۱/۸
آمونیاکی	۵۵۸/۴	۱۵۱۰/۲	۲۰۶۸/۵
فسفاتی	۸۶۶/۹	۲۵۷۵/۹	۳۴۴۲/۸

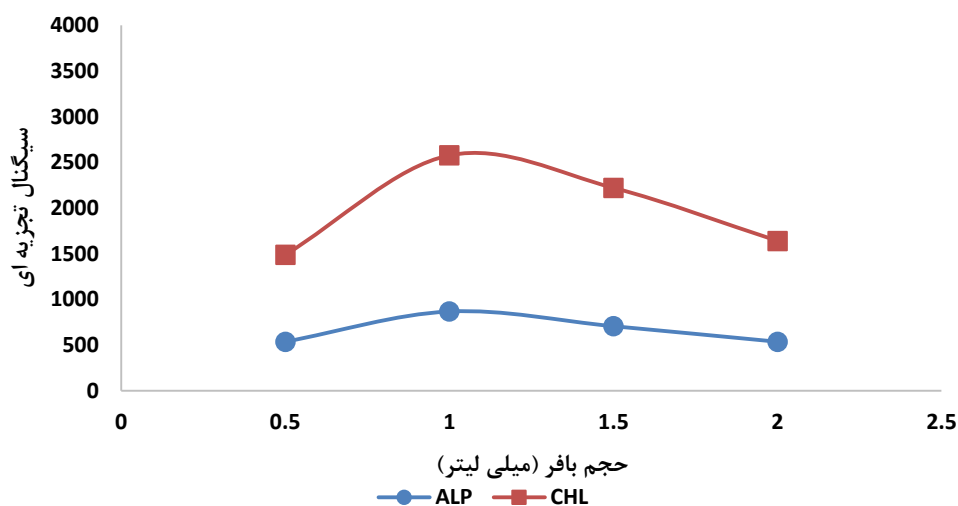


شکل ۲ پ): نمودار تأثیر نوع بافر بر میزان استخراج

شرایط آزمایش: غلظت کلرودیازپوکساید و آلپرازولام ۲/۰ میلی گرم بر لیتر، حجم محلول نمونه ۵/۰ میلی لیتر، ۱/۰ میلی لیتر بافر با pH=۸/۰، حجم حلال استخراج کننده (۱-دودکانول) ۳۵/۰ میکرولیتر، زمان سانتریفیوژ کردن ۱۰/۰ دقیقه، دور سانتریفیوژ ۳۵۰۰ دور در دقیقه.

جدول ۳ پ): نتایج حاصل از بررسی اثر حجم بافر بر میزان استخراج

مجموع سیگنال	کلرودیازپوکساید	آلپرازولام	حجم بافر (میلی لیتر)
۲۰۲۴/۵	۱۴۸۷/۹	۵۳۶/۶	۰/۵
۳۴۴۲/۸	۲۵۷۵/۹	۸۸۶/۹	۱/۰
۲۹۲۶/۳	۲۲۲۰/۳	۷۰۶/۰	۱/۵
۲۱۷۶/۴	۱۶۴۴/۴	۵۳۶/۰	۲/۰

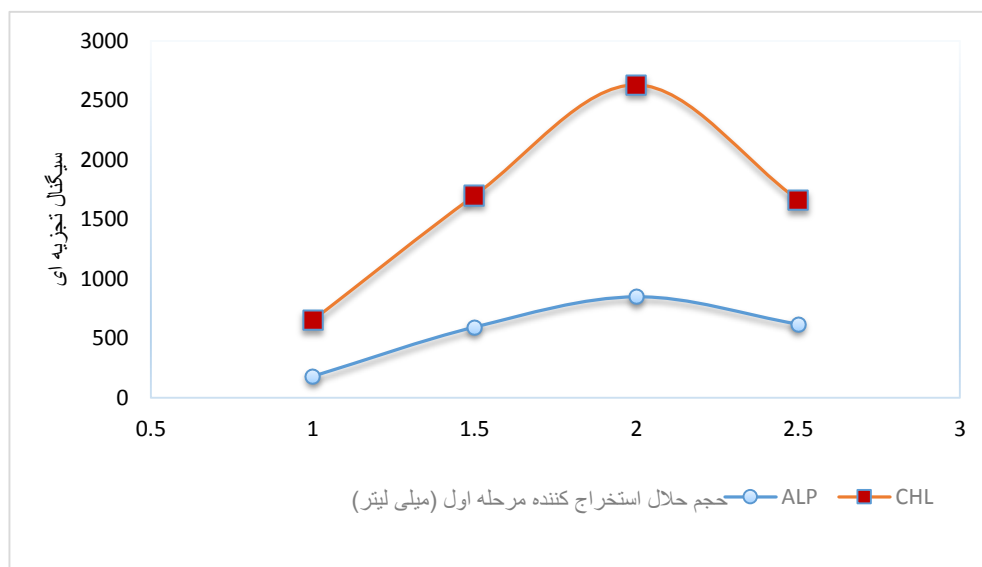


شکل ۳ پ): نمودار تاثیر حجم بافر بر میزان استخراج

شرایط آزمایش: غلظت کلرودیازپوکساید و آلپرازولام ۲/۰ میلی گرم بر لیتر، حجم محلول نمونه ۵/۰ میلی لیتر، بافر فسفاتی با pH=۸/۰، حجم حلال استخراج کننده (۱-دودکانول) ۳۵/۰ میکرولیتر، زمان سانتریفیوژ کردن ۱۰/۰ دقیقه، دور سانتریفیوژ ۳۵۰۰ دور در دقیقه

جدول ۴ پ): نتایج حاصل از بررسی اثر حجم حلال استخراج کننده مرحله اول بر میزان استخراج

مجموع سیگنال	کلرودیازپوکساید	آلپرازولام	حجم حلال استخراج کننده (میلی لیتر)
۸۲۸/۴	۶۴۹/۴	۱۷۹/۰	۱/۰
۳۴۴۱/۰	۲۵۷۵/۰	۸۶۶/۰	۱/۵
۳۵۷۹/۰	۲۶۸۰/۵	۸۹۸/۵	۲/۰
۲۲۸۰/۶	۱۶۶۲/۹	۶۱۷/۷	۲/۵

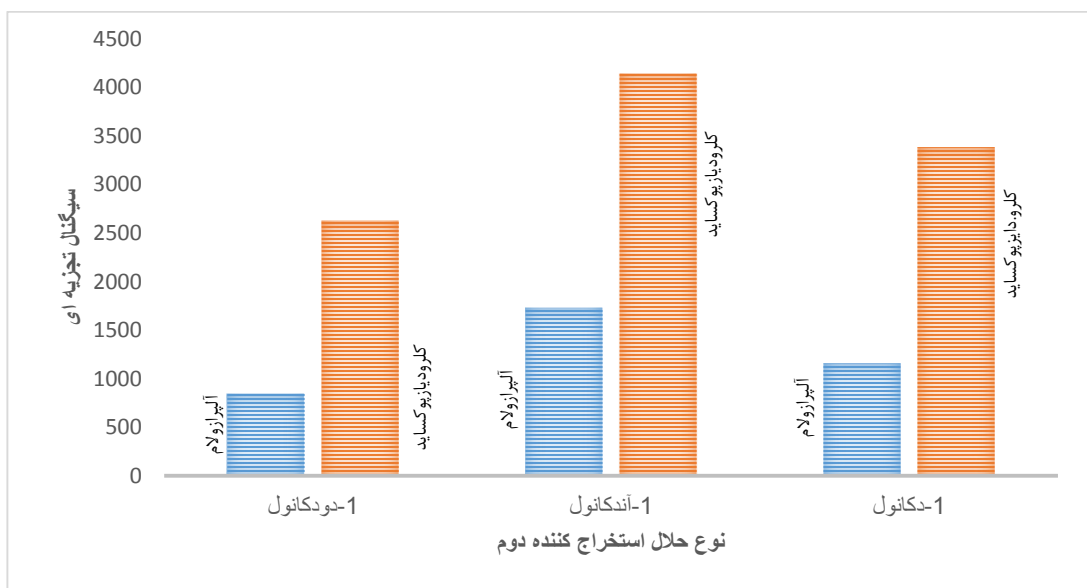


شکل ۴ پ): نمودار تأثیر حجم حلال استخراج کننده مرحله اول بر میزان استخراج

شرایط آزمایش: غلظت کلرودیازپوکساید و آلپرازولام ۲/۰ میلی گرم بر لیتر، حجم محلول نمونه ۵/۰ میلی لیتر، ۱/۰ میلی لیتر بافر فسفاتی با pH=۸/۰، حجم حلال استخراج کننده ۳۵/۰ میکرولیتر، زمان سانتریفیوژ کردن ۱۰/۰ دقیقه، دور سانتریفیوژ ۳۵۰۰ دور در دقیقه.

جدول ۵ پ): نتایج حاصل از بررسی اثر نوع حلال استخراج کننده مرحله دوم بر میزان استخراج

مجموع سیگنال	کلرودیازپوکساید	آلپرازولام	نوع حلال استخراج کننده
۴۵۴۱/۷	۳۳۸۵/۵	۱۱۵۶/۲	۱-دکانول
۳۴۷۹/۶	۲۶۳۱/۷	۸۴۸/۲	۱-دودکانول
۵۸۷۱/۲	۴۱۴۲/۸	۱۷۲۸/۴	۱-آندکانول

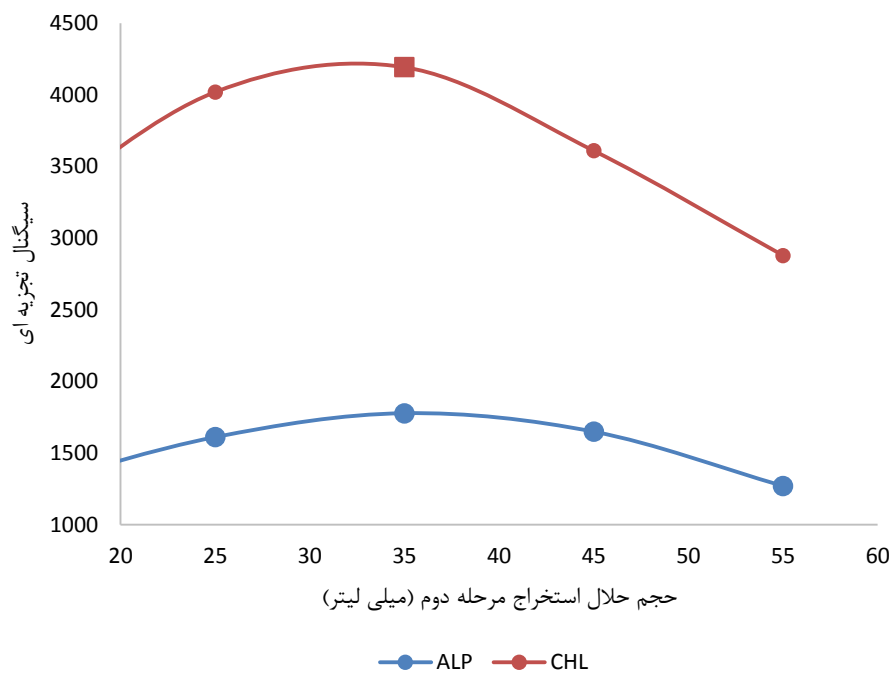


شکل ۵ پ): نمودار تأثیر نوع حلال استخراج کننده مرحله دوم بر میزان استخراج

شرایط آزمایش: غلظت کلرودیازپوکساید و آلپرازولام ۲/۰ میلی گرم بر لیتر، حجم محلول نمونه ۵/۰ میلی لیتر، ۱/۰ میلی لیتر بافر فسفاتی با $pH=۸/۰$ ، حجم حلال استخراج کننده ۳۵/۰ میکرولیتر، زمان سانتریفیوژ کردن ۱۰/۰ دقیقه، دور سانتریفیوژ ۳۵۰۰ دور در دقیقه.

جدول ۶ پ): نتایج حاصل از بررسی حجم حلال استخراج کننده مرحله دوم بر میزان استخراج

مجموع سیگنال	کلرودیازپوکساید	آلپرازولام	حجم حلال استخراج کننده (میلی لیتر)
۴۴۳۵/۰	۳۱۷۱/۹	۱۲۶۳/۰	۱۵/۰
۵۶۸۱/۴	۴۰۱۹/۷	۱۶۶۱/۷	۲۵/۰
۵۸۷۱/۲	۴۱۴۲/۸	۱۷۲۸/۴	۳۵/۰
۵۳۵۹/۶	۳۶۶۰/۰	۱۶۹۹/۶	۴۵/۰
۴۱۵۰/۲	۲۸۷۹/۵	۱۲۷۰/۷	۵۵/۰

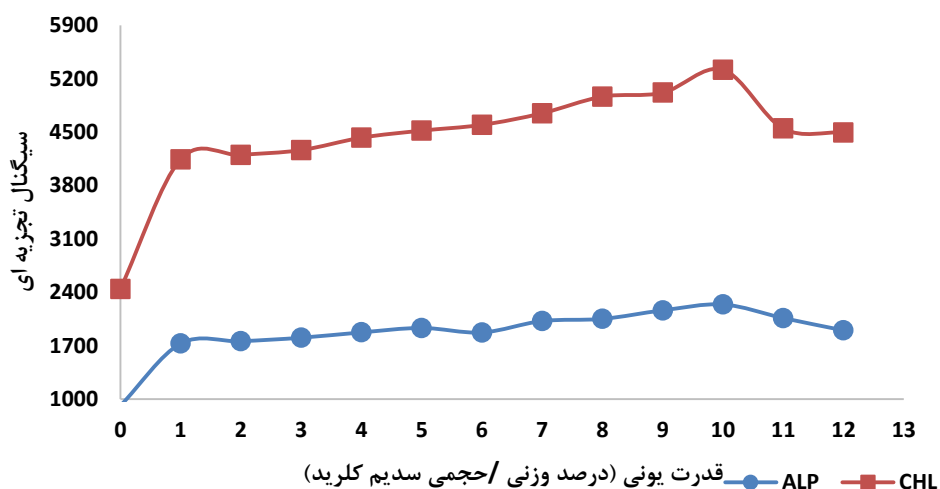


شکل ۶ پ): نمودار تأثیر حجم حلال استخراج کننده مرحله دوم بر میزان استخراج

شرایط آزمایش: غلظت کلرودیازپوکساید و آلپرازولام ۲/۰ میلی گرم بر لیتر، حجم محلول نمونه ۵/۰ میلی لیتر، ۱/۰ میلی لیتر بافر فسفاتی با pH=۸/۰، زمان سانتریفیوژ کردن ۱۰/۰ دقیقه، دور سانتریفیوژ ۳۵۰۰ دور در دقیقه.

جدول ۷ پ): نتایج حاصل از بررسی اثر نمک (قدرت یونی) بر میزان استخراج

مجموع سیگنال	کلرودیازپوکساید	آلپرازولام	اثر نمک (وزنی / حجمی)
۳۳۵۶/۵	۲۴۴۶/۶	۹۱۲/۹	٪۰/۰
۵۸۷۱/۲	۴۱۴۲/۸	۱۷۲۸/۴	٪۱/۰
۵۹۶۰/۴	۴۲۰۱/۵	۱۷۵۹/۰	٪۲/۰
۶۰۶۸/۹	۴۲۶۳/۷	۱۸۰۵/۲	٪۳/۰
۶۳۰۲/۲	۴۴۲۷/۰	۱۸۷۵/۲	٪۴/۰
۶۴۵۲/۳	۴۵۱۹/۲	۱۹۳۳/۲	٪۵/۰
۶۴۶۹/۱	۴۵۹۴/۵	۱۸۷۴/۶	٪۶/۰
۶۷۷۰/۸	۴۷۴۶/۹	۲۰۲۳/۹	٪۷/۰
۷۰۱۷/۰	۴۹۶۵/۱	۲۰۵۱/۹	٪۸/۰
۷۱۸۰/۱	۵۰۱۶/۲	۲۱۶۳/۹	٪۹/۰
۷۵۵۷/۷	۵۳۱۷/۱	۲۲۴۰/۷	٪۱۰/۰
۶۶۰۹/۷	۴۵۴۶/۷	۲۰۶۲/۹	٪۱۱/۰
۶۳۹۵/۹	۴۴۹۴/۲	۱۹۰۱/۶	٪۱۲/۰

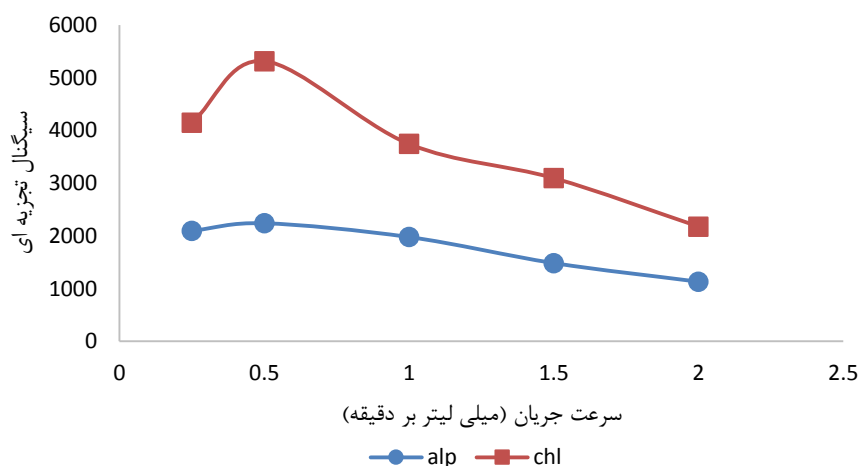


شکل ۷ پ): نمودار اثر نمک (قدرت یونی) بر میزان استخراج

شرایط آزمایش: غلظت کلرودیازپوکساید و آلپرازولام ۲/۰ میلی گرم بر لیتر، حجم محلول نمونه ۵/۰ میلی لیتر، ۱/۰ میلی لیتر بافر فسفاتی با pH=۸/۰، حجم حلال استخراج کننده (۱-آندکانول) ۳۵ میکرولیتر، زمان سانتریفیوژ کردن ۱۰/۰ دقیقه، دور سانتریفیوژ ۳۵۰۰ دور در دقیقه.

جدول ۸ پ): نتایج حاصل از بررسی سرعت جریان (میلی لیتر بر دقیقه) بر میزان استخراج

مجموع سیگنال	کلرودیازپوکساید	آلپرازولام	سرعت جریان (میلی لیتر بر دقیقه)
۶۲۴۷/۴	۴۱۴۹/۸	۲۰۹۷/۷	۰/۳
۷۵۵۷/۷	۵۳۱۷/۱	۲۲۴۰/۷	۰/۵
۵۷۲۵/۳	۳۷۴۵/۶	۱۹۷۹/۷	۱/۰
۴۵۸۲/۴	۳۰۹۷/۲	۱۴۸۵/۲	۱/۵
۳۳۱۰/۴	۲۱۷۸/۸	۱۱۳۱/۶	۲/۰

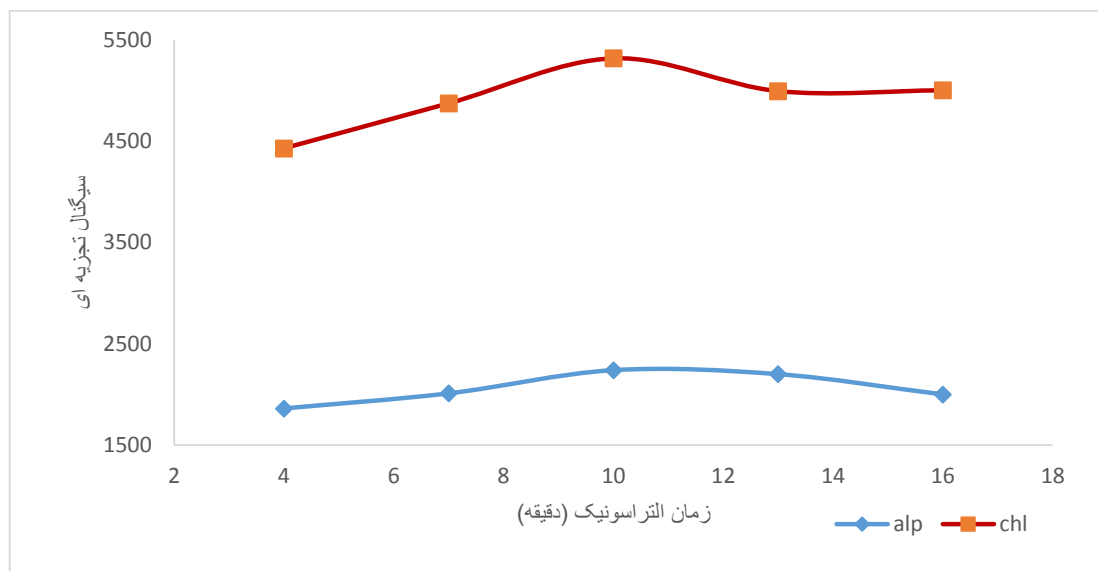


شکل ۸ پ): نمودار تأثیر سرعت جریان بر میزان استخراج

شرایط آزمایش: غلظت کلرودیازپوکساید و آلپرازولام ۲/۰ میلی گرم بر لیتر، حجم محلول نمونه ۵/۰ میلی لیتر، ۱/۰ میلی لیتر بافر فسفاتی با pH=۸/۰، حجم حلال استخراج کننده (۱-آندکانول) ۳۵ میکرولیتر، زمان سانتریفیوژ کردن ۱۰/۰ دقیقه، دور سانتریفیوژ ۳۵۰۰ دور در دقیقه.

جدول ۹ پ): نتایج حاصل از بررسی اثر زمان اولتراسونیک بر میزان استخراج

مجموع سیگنال	کلرودیازپوکساید	آلپرازولام	زمان اولتراسونیک (دقیقه)
۶۲۹۲/۱	۴۴۲۹/۲	۱۸۶۲/۹	۴
۶۸۸۵/۱	۴۸۷۳/۴	۲۰۱۱/۷	۷
۷۵۵۷/۷	۵۳۱۷/۱	۲۲۴۰/۷	۱۰
۷۱۷۵/۲	۴۹۷۳/۸	۲۲۰۱/۴	۱۳
۷۰۵۳/۰	۵۰۵۱/۷	۲۰۰۱/۳	۱۶

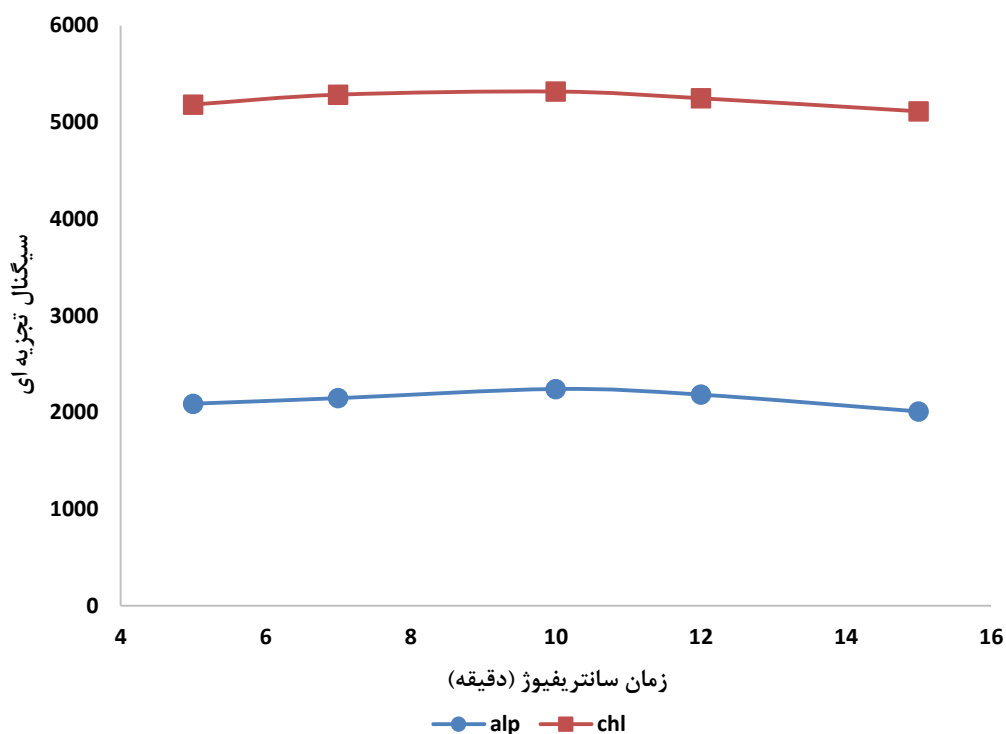


شکل ۹ پ): نمودار تأثیر زمان اولتراسونیک بر میزان استخراج

شرایط آزمایش: غلظت کلرودیازپوکساید و آلپرازولام ۲/۰ میلی گرم بر لیتر، حجم محلول نمونه ۵/۰ میلی لیتر، ۱/۰ میلی لیتر بافر فسفاتی با $\text{pH}=8/0$ ، زمان استخراج ۱۰ دقیقه، حجم حلال استخراج کننده (۱-آندکانول) ۳۵ میکرولیتر، زمان سانتریفیوژ کردن ۱۰/۰ دقیقه، دور سانتریفیوژ ۳۵۰۰ دور در دقیقه.

جدول ۱۰ پ): نتایج حاصل از بررسی اثر زمان سانتریفیوژ بر میزان استخراج

مجموع سیگنال	کلرودیازپوکساید	آلپرازولام	زمان سانتریفیوژ (دقیقه)
۷۲۷۱/۴	۵۱۸۲/۸	۲۰۸۸/۶	۵
۷۴۳۰/۹	۵۲۸۴/۷	۲۱۴۶/۲	۷
۷۵۵۷/۷	۵۳۱۷/۱	۲۲۴۰/۷	۱۰
۷۴۲۹/۵	۵۲۴۷/۳	۲۱۸۲/۲	۱۲
۷۱۲۰/۸	۵۱۱۲/۳	۲۰۰۸/۵	۱۵

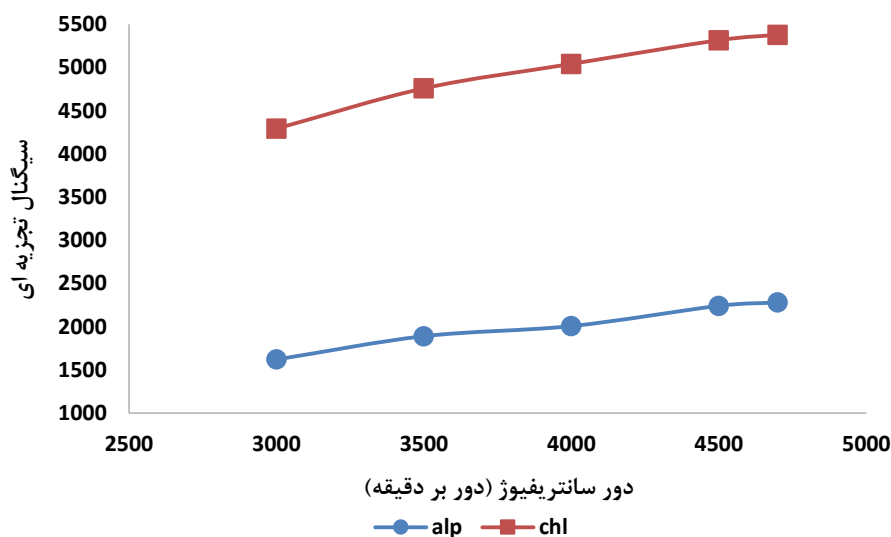


شکل ۱۰ پ): نمودار تأثیر اثر زمان سانتریفیوژ بر میزان استخراج

شرایط آزمایش: غلظت کلرودیازپوکساید و آلپرازولام ۲/۰ میلی گرم بر لیتر، حجم محلول نمونه ۵/۰ میلی لیتر، ۱/۰ میلی لیتر بافر فسفات با $pH=8.0$ ، زمان استخراج ۱۰ دقیقه، حجم حلال استخراج کننده (۱-آندکانول) ۳۵ میکرولیتر، زمان سانتریفیوژ کردن ۱۰/۰ دقیقه، دور سانتریفیوژ ۳۵۰۰ دور در دقیقه.

جدول ۱۱ پ): نتایج حاصل از بررسی اثر دور سانتریفیوژ بر میزان استخراج

مجموع سیگنال	کلرودیازپوکساید	آلپرازولام	دور سانتریفیوژ (دور بر دقیقه)
۵۹۱۲/۷	۴۲۹۳/۰	۱۶۱۹/۷	۳۰۰۰
۶۶۴۸/۶	۴۷۵۹/۴	۱۸۸۹/۲	۳۵۰۰
۷۳۸۲/۷	۵۱۴۲/۲	۲۲۴۰/۵	۴۰۰۰
۷۵۰۷/۷	۵۲۶۷/۱	۲۲۵۰/۷	۴۵۰۰
۷۵۰۸/۶	۵۲۲۹/۸	۲۲۷۹/۹	۴۷۰۰



شکل ۱۱ پ): نمودار تأثیر اثر دور سانتریفیوژ بر میزان استخراج

شرایط آزمایش: غلظت کلرودیازپوکساید و آلپرازولام ۲/۰ میلی گرم بر لیتر، حجم محلول نمونه ۵/۰ میلی لیتر، ۱/۰ میلی لیتر بافر فسفاتی با $\text{pH}=۸/۰$ ، مقدار نمک ۱۰/۰٪ وزنی حجمی، حجم حلال استخراج کننده (۱-آندکانول) ۳۵ میکرولیتر.

- [1] Shorter E., (2005), "A Historical Dictionary of Psychiatry", Ph.D. Oxford University Press, New York.
- [2] Baldwin D., (2005), "Short-term treatment with hyponotic drugs for insomina" *psychopharma.*, **19**, 134-135.
- [3] Ramakrishnan K, Scheid DC. , (2007), "Treatment options for insomnia", *Am Fam Physician.*, **76**, 517–26.
- [4] Haynes A.B., Weiser T.G., Berry W.R., Lipsitz S.R., Breizat A-H.S., Dellinger E.P., et al, (2009), "A surgical safety checklist to reduce morbidity and mortality in a global population.", *New Eng. J. of Med.*, **360**, 491-499.
- [5] Ashton CH., (1994), "Guidelines for the Rational Use of Benzodiazepines", *RVI.*, **48**, 25-40.
- [6] McIntosh A., Cohen A., Turnbull N., (2004), "Clinical guidelines and evidence review for panic disorder and generalized anxiety disorder", National Collaborating Centre for Primary Care, London.
- [7] Bandelow B., Zohar J., Hollander E., Kasper S., Möller HJ., (2002), "World Federation of Societies of Biological Psychiatry (WFSBP) Guidelines for the Pharmacological Treatment of Anxiety, Obsessive-Compulsive and Posttraumatic Stress Disorders"., *WORLD J BIOL PSYCHIA.*, **3**, 171-199.
- [8] Murray B., Marcia K., (2009), "APA Practice Guideline for the Treatment of Patients With Panic Disorder, Second Edition", Second Edition.
- [9] Scottish Intercollegiate Guidelines Network., (2005), "Diagnosis and management of epilepsy in adults", 17–9.
- [10] Stokes T., Shaw EJ., Juarez-Garcia A., Camosso-Stefinovic J., Baker R., (2004), "Clinical Guidelines and Evidence Review for the Epilepsies: diagnosis and management in adults and children in primary and secondary care"., Royal College of General Practitioners, London

- [11] Shorvon SD., (2009), "Drug treatment of epilepsy in the century of the ILAE: the second 50 years, 1959–2009", *Epilepsia*, **50**, 69-92.
- [12] Ashworth M., Gerada C., (1997), "ABC of mental health. Addiction and dependence II: Alcohol", *BMJ*, **315**, 358-360.
- [13] Kraemer KL., Conigliaro J., Saitz R., (1999), "Managing alcohol withdrawal in the elderly". *Drugs Aging*, **14**, 409–425.
- [14] Calcaterra N.E., Barrow J.C., (2014), "Classics in chemical neuroscience: Diazepam (Valium).", *ACS chem. Neurosci.*, **5**, 253-260.
- [15] Miller RL., (2002), "The Encyclopedia of Addictive Drugs", Greenwood, London
- [16] Salomone A., Gerace E., Brizio B., Gennaro M. C., Vincenti M., (2011), "A fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determining benzodiazepines and analogues in urine. Validation and application to real cases of forensic interest.", *J. of pharma. and biomed. Ana.*, **56(3)**, 582-591.
- [17] Saïas T., Gallarda T., (2008), "Paradoxical aggressive reactions to benzodiazepine use: a review", *Encephale, French*. **34**, 330-336.
- [18] Lader M., (2008), "Effectiveness of benzodiazepines: do they work or not?", *Expert Rev Neurother.*, **8**, 1189-1191.
- [19] Lader M., Tylee A., Donoghue J., (2009), "Withdrawing benzodiazepines in primary care", *CNS Drugs.*, **23**, 19-34.
- [20] Billioti de., Gage S., Bégaud B., Bazin F., Verdoux H., Dartigues JF., Pérès K., Kurth T., Pariente A., (2012), "Benzodiazepine use and risk of dementia: prospective population based study", *BMJ*, **345**, 1-12.
- [21] Sternbach LH., (1979), "The benzodiazepine story". *J. Med. Chem.*, **22**, 1-7.
- [22] Miller NS., Gold MS., (1990), "Benzodiazepines: reconsidered". *Adv Alcohol Subst Abuse.*, **8**, 67-84.
- [23] Moylan S.; Giorlando F.; Nordfjærn T.; Berk., (2012), "The role of for the treatment of panic disorder in Australia", *Psychiatry.*, **46**, 212–224.
- [24] Lydiard RB., Laraia MT., Ballenger JC., Howell EF., (1987)., "Emergence of Depressive Symptoms in Patients Receiving Alprazolam for Panic Disorder". *Am J Psychiatry.*, **144**, 664–665.

- [25] E.N., Langødegård M., Ekeberg D., Øiestad A.M.L., (2012), “Determination of benzodiazepines in ante-mortem and post-mortem whole blood by solid-supported liquid–liquid extraction and UPLC–MS/MS”, *J Chromatogr.B.*, **883– 884**, 177– 188.
- [26] Seno H., Suzuki O., Kumazawa T., Hattori H., (1991), “Rapid isolation with Sep-Pak C18 cartridges and widebore capillary gas chromatography of benzophenones, the acid hydrolysis products of benzodiazepines”., *J Anal Toxicol.*, **15**, 21-24.
- [27] Maurer H., Pflieger K., (1981), “Determination of 1,4-benzodiazepines in urine using a computerized gas chromatographic mass spectrometric technique”, *J Chromatogr.*, **222**, 409-419.
- [28] Hattori H., Suzuki O., Sato K., Mizutani Y., Yamada T., (1987), “Positive- and negative-ion mass spectrometry of 24 benzodiazepines”., *Forensic Sci Int.*, **35**, 165-179.
- [29] Koves EM., Yen B., (1989), “The use of gas chromatography negative chemical ionisation mass spectrometry for the determination of lorazepam in whole blood”, *J Anal Toxicol.*, **13**, 69- 72.
- [30] Chiarotti M, De Giovanni N., Fiori A., “Analysis of benzodiazepines. I Chromatographic identification”, (1986), *J of Chromatogr. A.*, **358**, 169-178.
- [31] Khodadoust S., Ghaedi M., (2013), “Optimization of dispersive liquid–liquid microextraction with central composite design for preconcentration of chlordiazepoxide drug and its determination by HPLC-UV”, *J. Sep. Sci.*, **36**, 1734–1742.
- [32] Uddin N., Victoria F., Ioannis S., Papadoyannis N., (2008), “Development and validation of an HPLC method for the determination of benzodiazepines and tricyclic antidepressants in biological fluids after sequential SPE”, *J. Sep. Sci.*, **31**, 2358–2370.
- [33] Schtitz H., Schneider WR., (1987), “Screening of tetracyclic benzodiazepines with EMIT-st (benzodiazepines) and TDx ”, *Z Rechtsmed.*, **99**, 181-189.
- [34] Blas M., Bruce R., (2008), “Determination of trace levels of benzodiazepine in urine using capillary electrochromatography-time of flight mass spectrometry”, *ELECTROPHORESIS*, **29**, 2182–2192.
- [35] Es’haghi Z., Daneshvar L., Salari P., Bandegi S., (2009), “Determination of low-residue benzodiazepine, lorazepam, in environmental water samples by suspended droplet

microextraction and high performance liquid chromatography-diod array detector”, **20**, 180–185.

[36] Su H. L., Kao W. C., Lin K. W., Lee C. Y., Hsieh Y. Z., (2010), “1-Butyl-3-methylimidazolium-based ionic liquids and an anionic surfactant: Excellent background electrolyte modifiers for the analysis of benzodiazepines through capillary electrophoresis.”, *J of chromatogr. A*, **1217(17)**, 2973-2979.

[37] Rezaei F., Yamini Y., Moradi M., Daraei B., (2013), “Supramolecular solvent-based hollow fiber liquid phase microextraction of benzodiazepines”, *J Anal. Chim. Acta.*, **804**, 135–142.

[38] Fernández P., González C., Pena N., Carro A., (2013), “A rapid ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction followed by ultra-performance liquid chromatography for the simultaneous determination of seven benzodiazepines in human plasma samples”, *J Anal. Chim. Acta.*, **767**, 88–96.

[39] Ghobadi M., Yamin Y., Ebrahimpour B., (2014), “SPE coupled with dispersive liquid–liquid microextraction followed by GC with flame ionization detection for the determination of ultra-trace amounts of benzodiazepines”, *J. Sep. Sci.*, **37**, 287–294

[40] Saito K., Kikuchi Y., Saito R., (2014), “Solid-phase dispersive extraction method for analysis of benzodiazepine drugs in serum and urine samples”, *J. Pharm. Biomed.*

[41] Goudarzi N., Farsimadan S., Chamjangali M. A., Bagherian G. A., (2015), “Optimization of modified dispersive liquid-liquid microextraction coupled with high-performance liquid chromatography for the simultaneous preconcentration and determination of nitrazepam and midazolam drugs: An experimental design.”, *J of separ. Sci.*, **38(10)**, 1673-1679.

[۴۲] امیرنوازی م، (۱۳۹۴)، پایان نامه کارشناسی ارشد: " جداسازی و اندازه گیری بعضی داروهای آرام بخش

با استفاده از روش میکرواستخراج قطره آلی شناور جامد با کمک افزایش سورفاکتانت و امواج مافوق صوت

جفت شده با کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا"، دانشکده شیمی، دانشگاه شاهرود.

[۴۳] رحیمی ع، (۱۳۹۵)، پایان نامه کارشناسی ارشد: "استفاده از نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن اصلاح شده جهت پیش تغلیظ برخی از مشتقات بنزودیازپین و اندازه گیری آنها به روش HPLC"، دانشکده شیمی، دانشگاه شاهرود.

[۴۴] ابراهیمی س، (۱۳۹۲)، پایان نامه کارشناسی ارشد: "بهینه سازی استخراج و جداسازی برخی آمین های آروماتیک یا فاز جامد و کروماتوگرافی مایع مایسلی و اندازه گیری آنها در آب های محیطی"، دانشکده شیمی، دانشگاه مازندران.

[45] Skoog D A., Holler F J., Crouch S R., (1985). "Principles of instrumental analysis" Sander College, New York.

[46] Haric C., (1999), "Quantitative Chemical Analysis"., Clancy Marshall., United States of America.

[۴۷] ناظری س، (۱۳۹۲)، پایان نامه کارشناسی ارشد: "کاربرد روش میکرو استخراج فاز مایع بر اساس قطره جامد جهت پیش تغلیظ مقادیر کم مس در نمونه های محیطی قبل از اندازه گیری با اسپکترومتری جذب اتمی" دانشکده شیمی، دانشگاه شاهرود.

[48] Es'haghi Z., Golsefidi M.A., Saify A., Tanha A.A., Rezaeifar Z., Alian-Nezhadi Z., (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 of chromatogr. A*, **1217**(17), 2768-2775.

[49] Nerín C., (2007)., "Focus on sample handling"., *Anal and Bioanal Chem*, **388**, 1001-1002.

[50] Flanagan R., Morgan P., Spencer E., Whelpton R., (2006), "Micro-extraction techniques in analytical toxicology: short review", *Biomed chromatogr.*, **20**, 530-538.

[51] Pena-pereira F., Lavilla I., Bendicho C., (2009), "Miniaturized preconcentration methods based on liquid-liquid extraction and their application in inorganic ultratrace analysis and specification: a review", *spectrochim acta B: atomic spec.*, **64** (1), 1-15.

- [52] Hyotylainen T., (2009), "Critical evaluation of sample pretreatment technique", *Anal. Bioanal. Chem.*, **394**, 743-758.
- [53] Micheal A., John M., (2010), "Single drop microextraction-development, applications and future trends", *J. Chromatogr. A.*, **1217**, 2326-2336.
- [54] Rezaee M., Assadi Y., Milani Hosseini M.R., Aghaee E., Ahmadi F., Berijani S., (2006), "Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction.", *J. Chromatogr. A.*, **1116** (1).
- [55] Berijani S., Assadi Y., Anbia M., Milani Hosseini M.R., Aghaee E., (2006), "Dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography-flame photometric detection. Very simple, rapid and sensitive method for the determination of organophosphorus pesticides in water", *J. Chromatogr. A.*, **1123** (1).
- [56] Rezaee M., Yamini Y., Faraji M., (2010), "Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method", *J of Chromato.*, **1217**, 2342-2357.
- [57] Khalili-Zanjani M.R., Yamini Y., Shariati S., Jonsson J.A., (2007), "A new liquid-phase microextraction method based on solidification of floating organic drop", *J Anal. Chim. Acta*, **585**, 286-293.
- [58] Khalili-Zanjani M.R., Yamini Y., Yazdanfar N., Shariati S., (2008), "Extraction and determination of organophosphorus pesticides in water samples by a new liquid phase microextraction-gas chromatography-flame photometric detection, *J Anal. Chim. Acta*, **606**, 202-208.
- [59] Leong M.I., Huang S.D., (2008), "Dispersive liquid-liquid microextraction method based on solidification of floating organic drop combined with gas chromatography with electron-capture or mass spectrometry detection", *J. Chromatogr. A.*, **1211**, 8-12.

[۶۰] حاجیان ف، (۱۳۹۲)، پایان نامه ارشد: "اندازه گیری ال-سیستئین به روش تزریق در جریان پیوسته با آشکارساز اسپکتروفتومتری" دانشکده شیمی، دانشگاه شاهرود.

[۶۱] ادیسی م، (۱۳۸۵)، "روش تحقیق تجربی" چاپ اول، جهاد دانشگاهی دانشگاه امیرکبیر، تهران، ۹۳-

- [62] Lundstedt T., Seifert E., Abramo L., Thelin B., Nystrom A., Pettersen J., Bergman R., (1940), "Experimental design and optimization", *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **42**, 3-40.
- [63] Bezerra M., Santelli R., Oliveira E., Villar L., Escalera L., (2008), "Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry-Review", *Talanta*, **76**, 965–977.
- [64] Dejaegher B., Heyden Y., (2011), "Experimental designs and their recent advances in set up, data interpretation, and analytical applications-Review", *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **56**, 141–158.
- [65] Hibbert D., (2012), "Experimental design in chromatography: A tutorial review", *J. Chromatogr. B*, **910**, 2–13.
- [66] Ferreira S., Bruns R., Silva E., Santos W., Quintella C, David J, Andrade J, Breitzkreitz M, Jardim I, Neto B., (2007), "Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems", *J. Chromatogr. A*, **1158**, 2–14.
- [67] Ferreira S., Bruns R., Silva E., Santos W., Quintella C, David J, Andrade J, Breitzkreitz M, Jardim I, Neto B., (2007), "Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems", *J. Chromatogr. A*, **1158**, 2–1.
- [68] Morgan ED., (1995)., "Chemometrics: Experiental Desinge", **Publication data.**, British library.
- [69] Sematech.N., (2012)., "Engineering statistics Handbook", Nist/Sematech.
- [70] Berry L. G., Thompson R. M., (1962), "X-ray powder data for ore minerals: The peacock atlas.", *Geolog. Soci. of America mem.*, **85**, 261.
- [71] Miller J.N., (2013), "Experimental design and optimisation (4): Plackett–Burman designs", RSC publishing.

[۷۲] ابراهیم پور م، (۱۳۶۸)، "تحلیل رگرسیون با مینی تب ۱۴"، ناشر اقلیدس

- [73] Frost J., (2013), "Multiple regression analysis: use adjusted R-squared and predicted R-squared to include the correct number of variables.", minitab blog.

- [74] Montgomery, D.C., (1991)., "Design and analysis of experiments", Canada., 1-12.

[۷۵] نیرومند ح، (۱۳۸۷) "تحلیل رگرسیون خطی ابزاری برای تحقیق" چاپ اول، دانشگاه.

- [76] Pyrzynska K., Kilian K., (2007), "On-line sorption-based systems for determination of cadmium with atomic spectrometry detectors", *Water res.*, **41**, 2839-2851.
- [77] Naushad M., Gupta V., Wabaidur S., Alothman Z., (2013), "Simultaneous determination of benserazide and levodopa in pharmaceutical tablet, human serum and urine sample by differential pulse voltammetry using modified glassy carbon electrode"., *J. Electrochem. Sci.*, **8**, 297-311.
- [78] Karampela S., Vardakou I., Papoutsis I., Dona A., Spiliopoulou C., Athanaselis S., Pistos C., (2012), "Direct urine analysis for the identification and quantification of selected benzodiazepines for toxicology screening", *J of Chromatography B*, **902**, 42-46.
- [79] Farajizadeh A., Fereiduni B., Afshar Moghaddam M. R., (2016), "Development of a new extraction method based on counter current salting-out homogenous liquid-liquid extraction followed by dispersive liquid-liquid microextraction: Application for the extraction and preconcentration of widely used pesticides from fruit juices", *Talanta*, **146**, 772-779.

Abstract

In this study, a simple and sensitive counter current salting-out homogenous liquid-liquid extraction followed by dispersive liquid-liquid microextraction coupled with HPLC used for simultaneous preconcentration and determination of Alprazolam and Chlordiazepoxide. The solvent, Acetonitrile was used as an extraction solvent in first step and dispersive solvent in second stage. The solvent, 1-undecanol, was used as an extraction solvent. For its low density and proper melting point near room temperature. Some of parameters such as pH, first step extraction solvent volume and salt effect optimized with experimental design method. At the optimized condition, preconcentration calibration curve in range of 0.017-5.6 and 0.010-5.5 mg L⁻¹ was linear for chlorodiazepoxide and alprazolam, also limit of detections (LOD) were 1.9 and 1.3 µg L⁻¹ for alprazolam and chlorodiazepoxide respectively. Preconcentration factor (PF) was 99.3 for alprazolam and 104.9 for chlorodiazepoxide. Relative standard deviation (RSD) for 3 repeated measurement in 0.6, 1.5, 5.0 mg L⁻¹ concentration were 3.3, 2.0, 1.7 for alprazolam and 1.9, 1.5, 1.5 for chlorodiazepoxide. This method was applied successfully for determination of these drugs in different real samples such as pills, urine and blood serum.

Keywords: Chlordiazepoxide, Alprazolam, Dispersive liquid-liquid microextraction, Salting out effect, experimental design.



Shahrood University of Technology
Faculty of chemistry

**Application of counter current salting-out homogenous liquid-liquid
extraction followed by dispersive liquid-liquid microextraction coupled with
HPLC for simultaneous preconcentration and determination of Alprazolam and
Chlordiazepoxide**

By:
Adeleh Ebadi

Supervisor:
Dr. N. Goudarzi

Advistor:
Dr. M. Arab chamjangali

2017