

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشکده شیمی

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

منور امیرنویسی

استاد راهنما:

دکتر ناصر گودرزی

استاد مشاور:

دکتر منصور عرب چم جنگلی

شهریور ۱۳۹۴



دانشگاه شاهرود

دانشکده: شیمی

گروه: شیمی تجزیه

پایان نامه کارشناسی ارشد آقای / خانم منور امیرنویی. به شماره دانشجویی: ۹۱۰۰۹۵۴ تحت عنوان: جداسازی و اندازه‌گیری بعضی داروهای آرام‌بخش 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

در تاریخ ۹۴/۶/۲۲ توسط کمیته تخصصی زیر جهت اخذ مدرک کارشناسی ارشد شیمی تجزیه مورد ارزیابی و با درجه بسیار خوب مورد پذیرش قرار گرفت.

امضاء	اساتید مشاور	امضاء	اساتید راهنما
	نام و نام خانوادگی: دکتر منصور چم‌جنگلی		نام و نام خانوادگی: دکتر ناصی گودرزی
	نام و نام خانوادگی:		نام و نام خانوادگی:

امضاء	نماینده تحصیلات تکمیلی	امضاء	اساتید داور
	نام و نام خانوادگی: دکتر بهرام بهرامیان		نام و نام خانوادگی: دکتر قدمعلی باقریان دهقی
			نام و نام خانوادگی: دکتر فاطمه مصدرالامور
			نام و نام خانوادگی:
			نام و نام خانوادگی:

تقدیم بہ

مقدس ترین واژہ مادر لغت نامہ دلم،

پدر مہربانی مشفق، بردبار و حامی.

مادر مہربانم، کہ زندگیم را دیون مهر و عطوفت آن می دانم.

ہمسر م کہ نشانہ لطف الہی در زندگی من است.

برادر و خواہر بہر امان ہمیشگی و پشتوانہ ہای زندگیم.

تقدیر و شکر:

شکریان نثار ازدستان که توفیق رافیق را هم ساخت تا این پایان نامه را به پایان برسانم.

پاسکزار کانی، هم که سرآغاز من هستند. از یکی زاده می‌شوم و از دیگری جاودانه. اندر و مادر عزیزم و همسرم و برادر و خواهر نازنینم، که همواره مشوق و پشتیبان

من بوده‌اند و ادامه این راه را برایم هموار نمودند. شکر کنم.

از استاد دکترم جناب آقای دکتر ناصر کوردزی که زحمات راهبانی این پایان نامه را بر عهده داشتند و در تمامی مراحل انجام این پایان نامه پیوسته راهبانی من

بودند. قدر دانی و شکر می‌کنم.

از جناب آقای دکتر منصور عرب هم که در انجام این پایان نامه کمال همکاری را باینده داشته‌اند. شکر و قدر دانی می‌کنم.

در پایان از هم کلاسی‌های خوبم و همه دوستان عزیزم که در مراحل انجام این تحقیق کمک و همراه بنده بودند نهایت پاسکزاری را داشته و برای همه این عزیزان

آرزوی سلامتی و سعادت می‌نمایم.

تعهد نامه

اینجانب منور امیرنواپی. دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته شیمی تجزیه. دانشکده شیمی دانشگاه شاهرود نویسنده پایان نامه جداسازی و اندازه‌گیری بعضی داروهای آرام‌بخش 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 می‌شوم.

- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است.
- در استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است.
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است.
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه شاهرود می‌باشد 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 می‌گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که از موجود زنده (یا بافتهای آنها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است

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 می‌باشد. 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 نمی‌باشد.

چکیده

در این تحقیق، یک روش ساده و حساس از میکرو استخراج فاز مایع بر اساس قطره‌ی جامد با کمک سورفاکتانت و امواج مافوق صوت برای پیش تغلیظ و اندازه‌گیری هم‌زمان مقادیر کم کلرودیازپوکساید و آلپرازولام به وسیله‌ی کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا با آشکار ساز طول موج متغیر ماوراء بنفش به کار برده شد. از حلال ۱-آندکانول به دلیل سمیت پایین، چگالی کم و دمای ذوب مناسب نزدیک به دمای اتاق به عنوان حلال استخراج استفاده شد. از آنجاییکه این حلال در فاز آبی غیر قابل امتزاج است، برای افزایش پراکندگی حلال استخراج و در نتیجه کارایی استخراج از سسورفاکتانت CTAB به عنوان امولسیفایر استفاده گردید. بعضی از پارامترهای مؤثر بر استخراج مانند pH، نوع و حجم حلال استخراج، نوع و غلظت سورفاکتانت و اثر نمک با روش طراحی آزمایش بهینه شدند. تحت شرایط بهینه، منحنی کالیبراسیون خطی برای دو داروی کلرودیازپوکساید و آلپرازولام در محدوده‌ی ۰/۰۱ تا ۳/۵ میلی‌گرم بر لیتر خطی بوده همچنین حد تشخیص ۰/۰۲۰ میلی‌گرم بر لیتر برای کلرودیازپوکساید و ۰/۰۲۱ میلی‌گرم بر لیتر برای آلپرازولام، فاکتور پیش تغلیظ برای کلرودیازپوکساید ۱۰۸/۳ و برای آلپرازولام ۱۰۲/۱ و در نهایت انحراف استاندارد نسبی برای سه اندازه‌گیری تکراری در غلظت‌های ۰/۵ و ۱ و ۳ میلی‌گرم بر لیتر به ترتیب ۳/۳ و ۴/۲ و ۴/۸ برای کلرودیازپوکساید و ۳/۴ و ۳/۹ و ۴/۰۸ برای آلپرازولام بدست آمد. این روش برای تعیین غلظت این داروها در نمونه‌های حقیقی متفاوت به کار برده شد.

کلمات کلیدی: کلرودیازپوکساید، آلپرازولام، میکرواستخراج قطره آلی شناور جامد با کمک افزایش

سورفاکتانت و امواج مافوق صوت.

فهرست مطالب

فصل اول

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

فصل دوم

- ۱-۲- کروماتوگرافی..... ۱۲
- ۱-۱-۲- انواع کروماتوگرافی مایع..... ۱۲
- ۲-۱-۲- کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)..... ۱۴
- ۲-۲- مقدمه ای بر روشهای آماده سازی نمونه..... ۱۵
- ۳-۲- استخراج..... ۱۶
- ۱-۳-۲- استخراج مایع مایع (LLE)..... ۱۷
- ۲-۳-۲- میکرواستخراج با فاز مایع..... ۱۷
- ۳-۳-۲- میکرواستخراج قطره آلی شناور جامد با کمک افزایش سورفاکتانت و امواج مافوق صوت (UASEME- SFO)..... ۲۰
- ۴-۳-۲- نقش سورفاکتانت در UASEME- SFO..... ۲۱
- ۴-۲- مزایا و معایب روش UASEME- SFO..... ۲۲

- ۲۲-۵- ویژگی حلال استخراج کننده.....
- ۲۳-۶- مقایسه روش UASEME-SFO با دیگر روش‌های میکرواستخراج.....
- ۲۴-۷- روش‌های بهینه سازی پارامترها.....
- ۲۵-۱-۷-۲- روش تک عاملی (تک متغیره).....
- ۲۵-۲-۷-۲- طرح آزمایش.....
- ۲۹-۸-۲- دسته بندی روش های طراحی آزمایش.....
- ۲۹-۱-۸-۲- طرح غربالگری.....
- ۳۲-۲-۸-۲- طراحی بهینه سازی.....

فصل سوم

- ۳۸-۱-۳- مقدمه.....
- ۳۸-۲-۳- محلولهای مورد استفاده و طرز تهیه آنها.....
- ۴۰-۱-۲-۳- دستگا هها و وسایل مورد استفاده.....
- ۳-۳- روش کار در بهینه سازی پارامترهای مؤثر در اندازه گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام.....
- ۴۱-۱-۳-۳- بررسی و بهینه سازی پارامترهای مؤثر در اندازه گیری کلرودیازپوکسید و آلپرازولام.....
- ۴۷-۲-۳-۳- نتایج حاصل از بهینه سازی یک متغیر در یک زمان.....
- ۴-۳- بررسی و بهینه سازی فاکتورهای مؤثر بر پیش تغلیظ و اندازه گیری کلرودیازپوساید و آلپرازولام با استفاده از طراحی آزمایش (DOE).....
- ۵۳-۱-۴-۳- تعیین سطح فاکتورها.....

- ۳-۴-۱-۱- طراحی آزمایش در طرح پلاکت-برمن.....۵۴
- ۳-۴-۱-۱- الف تعیین عوامل مؤثر به وسیله DOE.....۵۵
- ۳-۴-۲- بهینه سازی فاکتورهای مؤثر بر پیش تغلیظ و اندازه گیری کلرودیازپوساید و آلپرازولام.....۶۱
- ۳-۴-۲-۱- اجرای طرح باکس-بنکن.....۶۲
- ۳-۴-۲-۲- ارزیابی مدل.....۶۷
- ۳-۴-۲-۳- تحلیل واریانس.....۶۷
- ۳-۴-۲-۴- نمودار احتمال نرمال باقی مانده ها.....۶۹
- ۳-۴-۲-۵- نمودار باقی مانده در برابر ترتیب زمان.....۷۰
- ۳-۴-۲-۶- نمودار باقی مانده ها در مقابل مقادیر برازش شده.....۷۱
- ۳-۴-۲-۷- منحنی های رویه پاسخ.....۷۲
- ۳-۴-۳- توجیه فاکتورهای مؤثر بر پیش تغلیظ و اندازه گیری کلرودیازپوکسید و آلپرازولام...۷۴
- ۳-۴-۳-۱- بررسی اثر pH فاز آبی بر میزان استخراج.....۷۴
- ۳-۴-۳-۲- بررسی اثر نوع بافر.....۷۵
- ۳-۴-۳-۳- بررسی اثر حجم بافر.....۷۵
- ۳-۴-۳-۴- بررسی اثر نوع حلال استخراج کننده.....۷۶
- ۳-۴-۳-۵- بررسی اثر حجم حلال استخراج کننده.....۷۷
- ۳-۴-۳-۶- بررسی اثر نوع سورفکتانت.....۷۸
- ۳-۴-۳-۷- بررسی اثر غلظت سورفکتانت.....۷۹
- ۳-۴-۳-۸- بررسی اثر زمان استخراج.....۷۹

- ۳-۴-۳-۹- بررسی اثر قدرت یونی (اثر نمک)..... ۸۰
- ۳-۴-۳-۱۰- بررسی اثر زمان سانتریفیوژ..... ۸۱
- ۳-۴-۳-۱۱- بررسی اثر دور سانتریفیوژ..... ۸۲
- ۳-۵-۵- رسم منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ..... ۸۵
- ۳-۵-۱- رسم منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ کلرودیازپوکساید..... ۸۲
- ۳-۵-۲- رسم منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ آلپرازولام..... ۸۴
- ۳-۶-۶- بررسی اثر گونه‌های مزاحم..... ۸۹
- ۳-۷-۷- ارقام شایستگی روش..... ۹۱
- ۳-۷-۱- دقت و صحت..... ۹۱
- ۳-۸-۸- فاکتور پیش تغلیظ..... ۹۳
- ۳-۱۰-۱- اندازه گیری کلرو دیازپوکساید و آلپرازولام در نمونه‌های حقیقی..... ۹۳

فصل چهارم

- ۴-۱-۱- ارقام شایستگی روش..... ۱۰۲
- ۴-۲-۲- مقایسه روش پیشنهادی با برخی روشهای موجود..... ۱۰۳
- ۴-۳-۳- نتیجه گیری..... ۱۰۴
- ۴-۴-۴- آینده نگری..... ۱۰۵

فهرست شکل‌ها

- شکل (۱-۱): ساختار بنزودیازپین..... ۲
- شکل (۲-۱): ساختار آلپرازولام ۵
- شکل (۳-۱): ساختار کلرودیازپوکساید..... ۵
- شکل (۱-۲): تقسیم‌بندی انواع میکرواستخراج با فاز مایع ۱۸
- شکل (۲-۲): استخراج به روش قطره آلی شناور جامد با کمک افزایش سورفاکتانت و امواج مافوق صوت..... ۲۰
- شکل (۳-۲): طراحی آزمایش در طرح مرکب مرکزی ۳۲
- شکل (۴-۲): طراحی آزمایش در روش باکس- بنکن ۳۴
- شکل (۱-۳): طیف جذبی آلپرازولام و کلرودیازپوکساید..... ۳۹
- شکل (۲-۳): کروماتوگرام حاصل از افزایش سورفاکتانت با حمام فراصوت..... ۴۱
- شکل (۳-۳): کروماتوگرام حاصل از افزایش سورفاکتانت بدون حمام فراصوت..... ۴۲
- شکل (۴-۳): کروماتوگرام حاصل از اثر حمام فراصوت بدون افزایش سورفاکتان..... ۴۲
- شکل (۵-۳): منحنی کالیبراسیون مستقیم کلرودیازپوکساید..... ۴۳
- شکل (۶-۳): کالیبراسیون مستقیم آلپرازولام..... ۴۴
- شکل (۷-۳): کروماتوگرام محلول ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر کلرودیازپوکساید و آلپرازولام..... ۴۵
- شکل (۸-۳): نمودار پارتو اثر فاکتورها بر پیش تغلیظ و اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید آلپرازولا... ۵۴
- شکل (۹-۳): نمودار احتمال نرمال اثر فاکتورها بر پیش تغلیظ و اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام ۵۵

شکل (۳-۱۰): نمودار باقی مانده‌ها برای پاسخ پیش تغلیظ و اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام در طراحی باکس بنکن مربوط به پاسخ کلرودیازپوکساید..... ۶۵

شکل (۳-۱۱): نمودار باقی مانده‌ها برای پاسخ پیش تغلیظ و اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام در طراحی باکس - بنکن مربوط به پاسخ آلپرازولام..... ۶۶

شکل (۳-۱۲): نمودار باقی مانده‌ها به ترتیب زمان جمع آوری برای پاسخ پیش تغلیظ و اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام در طراحی باکس - بنکن مربوط به پاسخ کلرودیازپوکساید..... ۶۷

شکل (۳-۱۳): نمودار باقی مانده‌ها به ترتیب زمان جمع آوری برای پاسخ پیش تغلیظ و اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام در طراحی باکس - بنکن مربوط به پاسخ آلپرازولام..... ۶۸

شکل (۳-۱۴): نمودار باقیمانده در مقابل مقدار برآزش برای پاسخ پیش تغلیظ و اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام در طراحی باکس - بنکن مربوط به پاسخ کلرودیازپوکساید..... ۶۹

شکل (۳-۱۵): نمودار باقیمانده در مقابل مقدار برآزش برای پاسخ پیش تغلیظ و اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام در طراحی باکس - بنکن مربوط به پاسخ آلپرازولام..... ۷۰

شکل (۳-۱۶): منحنی رویه پاسخ پیش تغلیظ و اندازه‌گیری کلرودیازپوساید در مقابل اثر نمک و pH مربوط به پاسخ کلرودیازپوساید..... ۷۱

شکل (۳-۱۷): منحنی رویه پاسخ پیش تغلیظ و اندازه‌گیری کلرودیازپوساید در مقابل اثر نمک و pH مربوط به پاسخ کلرودیازپوساید..... ۷۱

شکل (۳-۱۸): منحنی رویه پاسخ پیش تغلیظ و اندازه‌گیری کلرودیازپوساید در مقابل حجم حلال استخراج و pH..... ۷۲

شکل (۳-۱۹): منحنی رویه پاسخ پیش تغلیظ و اندازه‌گیری آلپرازولام در مقابل حجم حلال استخراج

pH و ۷۲

شکل (۳-۲۰): منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ کلرودیازپوکساید ۸۵

شکل (۳-۲۱): منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ آلپرازولام ۸۶

شکل (۳-۲۲): کروماتوگرام حاصل از نمونه سرم شاهد ۹۴

شکل (۳-۲۳): کروماتوگرام نمونه سرم ۰/۵ میلی گرم بر لیتر کلرودیازپوکساید و آلپرازولام ۹۴

شکل (۳-۲۴): کروماتوگرام نمونه سرم ۱/۰ میلی گرم بر لیتر کلرودیازپوکساید و آلپرازولام ۹۵

فهرست جدول‌ها

- جدول (۲-۱): حلال‌های مورد استفاده در روش (SFO -UASEME) ۲۲
- جدول (۲-۲): کاربردهایی از UASEME-SFO ۲۳
- جدول (۱-۳) مواد شیمیایی مورد استفاده ۳۷
- جدول (۲-۳): سیگنال مستقیم بدست آمده برای داروی کلرودیازپوکساید با غلظت‌های متفاوت... ۴۴
- جدول (۳-۳): سیگنال مستقیم بدست آمده برای آلپرازولام با غلظت‌های متفاوت ۴۷
- جدول (۴-۳) نتایج حاصل از بهینه‌سازی یک متغیر در یک زمان در پیش تغلیظ و اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام ۴۸
- جدول (۵-۳) : تعیین سطح عوامل موثر بر اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام ۴۸
- جدول (۶-۳): طرح پلاکت- برمن با ۵ عامل و ۲ تکرار برای پاسخ اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام ۵۰
- جدول (۷-۳): جدول ضرایب حاصل از طرح پلاکت- برمن ۵۱
- جدول (۸-۳): سطوح فاکتورهای موثر در طرح باکس- بنکن ۵۶
- جدول (۹-۳): طرح عاملی باکس- بنکن با ۳ عامل، ۲ تکرار و یک نقطه مرکزی برای اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام ۵۸
- جدول (۱۰-۳): پارامترهای آماری برای طرح باکس بنکن انجام شده برای پاسخ پیش تغلیظ و اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید ۵۹
- جدول (۱۱-۳): پارامترهای آماری برای طرح باکس بنکن انجام شده برای پاسخ پیش تغلیظ و اندازه‌گیری آلپرازولام ۶۰

- جدول (۳-۱۲): تحلیل واریانس برای مدل پیشنهادی مربوط به پیش تغلیظ و اندازه‌گیری-
کلرودیازپوکساید.....۶۳
- جدول (۳-۱۳): تحلیل واریانس برای مدل پیشنهادی مربوط به پیش تغلیظ و اندازه‌گیری-
آلپرازولام.....۶۳
- جدول (۳-۱۴): مقایسه شرایط بهینه‌سازی یک متغیر در زمان و طراحی آزمایش.....۷۳
- جدول (۳-۱۵): شرایط بهینه نهایی سیستم برای اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام.....۸۳
- جدول (۳-۱۶): داده‌های مربوط به منحنی کالیبراسیون کلرودیازپوکساید۸۴
- جدول (۳-۱۷): داده‌های مربوط به منحنی کالیبراسیون آلپرازولام.....۸۶
- جدول (۳-۱۸): نتایج حاصل از بررسی اثر گونه‌های مزاحم در پیش تغلیظ و اندازه‌گیری
کلرودیازپوکساید ۱/۰ میلی گرم بر لیتر۸۸
- جدول (۳-۱۹): نتایج حاصل از بررسی اثر گونه‌های مزاحم در پیش تغلیظ و اندازه‌گیری
آلپرازولام ۱/۰ میلی گرم بر لیتر۸۸
- جدول (۳-۲۰): بررسی دقت و صحت در شرایط منحنی کالیبراسون کلرودیازپوکساید.....۹۰
- جدول (۳-۲۱): بررسی دقت و صحت در شرایط منحنی کالیبراسون آلپرازولام۹۱
- جدول (۳-۲۲): نتایج حاصل از پیش تغلیظ و اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید در نمونه قرص
کلرودیازپوکساید.....۹۶
- جدول (۳-۲۳): نتایج حاصل از پیش تغلیظ و اندازه‌گیری آلپرازولام در نمونه قرص آلپرازولام.....۹۶
- جدول (۳-۲۴): نتایج حاصل از پیش تغلیظ و اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید در نمونه سرم۹۶
- جدول (۳-۲۵): نتایج حاصل از پیش تغلیظ و اندازه‌گیری آلپرازولام در نمونه سرم۹۷

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

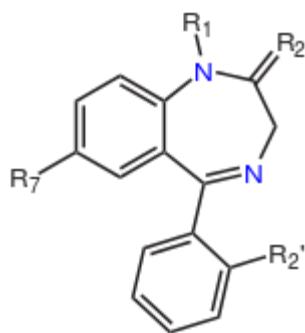
گیری بنزودیازپین.....۱۰۱

فصل اول

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]، که در شکل (۱-۱) نشان داده شده است.



شکل (۱-۱): ساختار بنزودیازپین

بنزودیازپین‌ها اثر انتقال دهنده‌ی عصبی گاما-آمینو بوتیریک اسید^۲ (GABA)^۳ در گیرنده‌های گابا^۳ را افزایش داده که باعث کاهش تحریک‌پذیری سلول‌های عصبی می‌شود، که این مسئله موجب کاهش ارتباط بین نورون‌ها گردیده و در نتیجه این داروها آرام‌بخش، خواب‌آور، ضد اضطراب، ضد تشنج و شل‌کننده‌ی عضلانی هستند [۲].

۱-۱-۱- خواص بنزودیازپین‌ها

بنزودیازپین‌ها با توجه به سرعت اثر و نیمه عمرشان به صورت ترکیبات دارای اثرات کوتاه مدت، متوسط و طولانی مدت دسته‌بندی می‌شوند. به عنوان مثال میدازولام^۴ و تریازولام^۵ دارای اثر کوتاه مدت،

^۱-Benzodiazepine

^۲-Gamma-aminobutyric acid

^۳-GABA

^۴-Midazolam

^۵-Triazolam

آپرازولام^۱، کلونازپام^۲، تمازپام^۳ و لورازپام^۴ دارای اثر متوسط و دیاپام^۵، فلورازپام^۶ و کلرودیازپوکساید^۷ دارای اثر طولانی مدت می‌باشند. بنزودیازپین‌های با اثر کوتاه مدت و متوسط برای درمان بی‌خوابی ترجیح داده می‌شوند در حالی که بنزودیازپین‌های با اثر طولانی مدت برای درمان اضطراب توصیه می‌شوند. به‌طور کلی بنزودیازپین‌ها بی‌خطر و در کوتاه مدت موثر هستند، اگرچه ممکن است گاهی باعث اختلالات شناختی و اثرات متناقض مانند پرخاشگری یا عدم بازداری رفتاری شوند [۳].

استفاده طولانی مدت از این داروها به‌دلیل 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 [۴ و ۵]. افراد مسن به علت استفاده بلند مدت در معرض خطر بیشتری هستند [۶ و ۷]. 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 باربیتورات‌ها^۸ [۸] است. وقتی بنزودیازپین با کندکننده‌های سیستم اعصاب مرکزی مانند الکل و مواد مخدر ترکیب می‌شوند، پتانسیل ایجاد مسمومیت و اگر استفاده از حد مجاز آن بیشتر شود امکان مرگ نیز افزایش می‌یابد [۹]. بنزودیازپین در ترکیب بیشتر آجوها وجود دارد به‌همین علت از آن برای ترک مصرف الکل استفاده می‌شود.

¹-Alprazolam

²-Clonazepam

³-Temazepam

⁴-Lorazepam

⁵-Diazepam

⁶-Flurazepam

⁷-Chlordiazepoxide

⁸-Barbiturate

کاربردهای پزشکی این داروها شامل درمان بی‌خوابی [۱۰ و ۱۱]، تشنج [۱۲-۱۴]، اضطراب

[۱۵]، وحشت زدگی [۱۶-۱۸]، اختلال اضطراب فراگیر [۱۹] و ترک الکل [۲۰ و ۲۱] می‌باشد.

۲-۱- تاریخچه بنزودیازپین‌ها

اولین دارو از گروه بنزودیازپین‌ها، کلرو دیازپوکساید 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، همکاریش 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 [۲۲، ۲۳]. به دنبال کلرو دیازپوکساید، دیازپام با نام تجاری والیوم^۴، در سال ۱۹۶۳ به بازار عرضه شد. معرفی بنزودیازپین‌ها منجر به کاهش تجویز باربیتورات شد به طوری که تا سال ۱۹۷۰ این داروها تا حد زیادی جایگزین داروهای قدیمی‌تر آرام-بخش و خواب‌آور شدند [۱].

از جمله بنزودیازپین‌های مورد استفاده در این پژوهش آلپرازولام و کلرودیازپوکساید هستند. آلپرازولام که ساختار آن در شکل (۱-۲) نشان داده شده است دارای چندین نام تجاری از قبیل زاناکس^۵، نیراوام^۶، آلپرازولام تی اس^۷ و آلپرازولام تی دی^۸ می‌باشد. آلپرازولام ضد اضطراب و داری اثر متوسط از

¹-Leo Sternbach

²-Earl Reeder

³-Librium

⁴-Valium

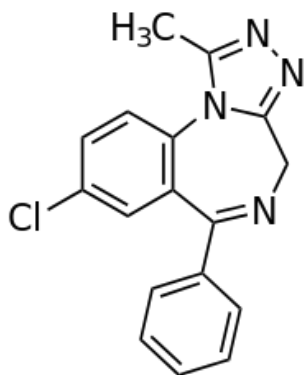
⁵-Xanax

⁶-Niravam

⁷-Alprazolam-ts

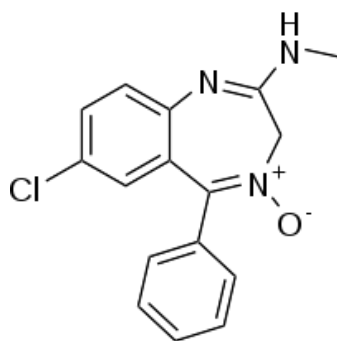
⁸-Alprazolam-td

گروه بنزودیازپین‌ها بوده و نیمه عمر آن بین ۱۵-۱۲ ساعت است. کاربرد پزشکی این دارو شامل درمان وحشت زدگی [۲۴]، اضطراب [۲۵] و تهوع ناشی از شیمی درمانی می‌باشد.



شکل (۲-۱): ساختار آلپرازولام

دیگر داروی مورد استفاده در این پژوهش کلرودیازپوکساید است که ساختار آن در شکل (۳-۱) نشان داده شده است.



شکل (۳-۱): ساختار کلرودیازپوکساید

از نام‌های تجاری کلرو دیازوپوکساید می‌توان به این مواردی مانند النیوم^۱، انگیرکس^۲، کلوپوکساید^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.

۱-۳- اهمیت اندازه گیری بنزودیازپین‌ها

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 سم‌شناسی پزشکی قانونی و شرایط بالینی دارند و چون اندازه‌گیری مستقیم آن‌ها در خون و ادرار به دلیل غلظت بسیار کم آن‌ها امکان‌پذیر نیست، ابتدا باید با یک روش مناسب پیش‌تخلیظ شده و سپس با روش‌های مناسب که در ادامه به توضیح آن پرداخته می‌شود، اندازه‌گیری می‌کنند [۲۶].

۱-۴- روش‌های مختلف اندازه‌گیری بنزودیازپین‌ها

روش‌های تحلیلی متعددی برای تعیین بنزودیازپین‌ها وجود دارد. این ترکیبات اغلب توسط دستگاه کروماتوگرافی مایع (LC)^{۱۱} به همراه طیف‌سنجی جرمی (MS)^{۱۲} [۲۷-۲۹] یا دتکتور آرایه فتودیودی

^۱-Elenium

^۲-Angirex

^۳-Klopoxid

^۴-Silibrin

^۵-Novapam

^۶-Multum

^۷-Librium

^۸-Libritabs

^۹-Libotryp

^{۱۰}-Tropium Mass spectrometry

^{۱۱}-Liquid chromatography

^{۱۲}-Mass spectrometry

(PDA)^۱ [۳۰]، کروماتوگرافی گازی (GC)^۲ به همراه طیف‌سنجی جرمی [۳۱]، کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC)^۳ [۳۲ و ۳۳] و الکتروفورز موئینه^۴ همراه با طیف‌سنجی جرمی [۳۴] اندازه‌گیری می‌شوند.

۱-۵- 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 ۲۰۰۸ بلاس^۵ و همکارانش برای جداسازی و اندازه‌گیری ده بنزودیازپین در ادرار از روش الکتروکروماتوگرافی موئین با طیف‌سنجی جرمی زمان پرواز CEC-MS(TOF)^۶ استفاده کردند. محدوده خطی ۲۵-۵۰۰ نانو گرم بر میلی لیتر برای لورازپام و ۱۲/۵-۵۰۰ 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 ۰/۶-۱/۸ نانو گرم بر میلی لیتر، بدست آمده است و همچنین فاکتور پیش تغلیظ در محدوده ۱۴۰-۷۵ برای این ترکیبات گزارش شده است [۳۵].

در سال ۲۰۰۸ اودین^۷ و همکارانش یک روش جدید برای تعیین هم‌زمان ۶ نمونه‌ی بنزو دیازپین و چهار نمونه داروی ضدافسردگی سه حلقه‌ای^۸ (TCAS) در مایعات بیولوژیک به‌وسیله HPLC با آشکارساز فرابنفش استفاده کردند. جداسازی با استفاده از فاز متحرک $\text{CH}_3\text{COONH}_2/\text{ACN}/\text{CH}_3\text{OH}$ با

¹Photodiode array detector

²Gas chromatography

³High performance liquid chromatography

⁴Capillary electrophoresis

⁵Blas

⁶Capillary electrochromatography-time of flight mass spectrometry

⁷Uddin

⁸Tricyclic antidepressants

نسبت (۵۵:۱۵:۳۰) انجام شد. حد تشخیص و حد کمی به ترتیب ۱/۱۷-۰/۰۸ و ۳/۹-۰/۲۸ نانو گرم بر میکرو لیتر و انحراف استاندارد نسبی کمتر از ۱۰/۰٪ برای همه نمونه‌ها گزارش شد [۳۳].

در سال ۲۰۰۹ اسحاقی و همکارانش برای پیش تغلیظ و اندازه گیری لورازپام، از روش میکرو استخراج فاز مایع با قطره شناور^۱ (LPME-SD) به‌وسیله کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا با دتکتور آرایه دیودی استفاده کردند. منحنی کالیبراسیون در محدوده ۳۰-۵۵۰۰ نانوگرم بر میلی لیتر خطی بوده، حد تشخیص ۲۵ نانو گرم بر میلی لیتر و فاکتور پیش تغلیظ نیز ۶۴۵ بدست آمد [۳۶].

در سال ۲۰۱۳ رضایی و همکارانش برای پیش تغلیظ و اندازه گیری پنج دارو از بنزودیازپین‌ها از روش میکرو استخراج فاز مایع با استفاده از هالو فیبر^۲ (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 میکرو گرم بر لیتر برای دیازپام و برای سایر داروها ۲/۰-۲۰۰/۰ میکرو گرم بر لیتر، حد تشخیص در محدوده ۰/۵-۰/۷ میکرو گرم بر لیتر و فاکتور پیش تغلیظ نیز در محدوده ۱۹۸-۱۱۲ بدست آمد [۳۷].

در سال ۲۰۱۳، خدادوست و همکارانش از روش میکرواستخراج مایع-مایع پخشی همراه با HPLC-UV برای تعیین مقدار کلرو دیازوپوکساید در بعضی از نمونه‌های حقیقی استفاده نمودند. بهینه سازی فاکتورهای مختلف بر راندمان استخراج کلرو دیازوپوکساید و با استفاده از طرح مرکب مرکزی^۳ مورد بررسی قرار گرفت. دامنه خطی در محدوده ۱۰-۰/۰۰۵ میکرو گرم بر میلی لیتر، حد تشخیص ۰/۰۰۰۵ میکرو گرم بر میلی لیتر و انحراف استاندارد نسبی کمتر از ۵٪ بدست آمده است [۲].

^۱-Suspended droplet liquid phase microextraction

^۲-hollow fiber microextraction

^۳-Central composite design

در سال ۲۰۱۳ فرناندز^۱ و همکارانش از روش میکرواستخراج مایع-مایع پخشی به کمک امواج مافوق صوت (UA-DLLME)^۲ با کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا و دتکتور آرایه فتو دیو برای تعیین بنزو دیازپین‌های آلپرازولام، برومازپام، کلونازپام، دیازپام و لورازپام در نمونه‌های سرم انسان استفاده کردند. از کلروفورم و متانول نیز به ترتیب به عنوان حلال استخراج و پخش کننده استفاده گردید. تحت شرایط بهینه محدوده خطی ۵-۰/۰۱ میکرو گرم بر میلی لیتر، و انحراف استاندارد نسبی کمتر از ۸٪ بدست آمد [۳۸].

در سال ۲۰۱۴ قبادی و همکارانش از روش استخراج فاز جامد همراه با میکرو استخراج 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٪ بدست آمد [۳۹].

در سال ۲۰۱۴ کوئیچی^۳ و همکارانش برای تجزیه بنزودیازپین‌ها در سرم و نمونه ادرار از روش استخراج پخشی با فاز جامد^۴ (SPDE)، ترکیب با کروماتوگرافی مایع-طیف‌سنجی جرمی زمان پرواز^۵ (LC/TOF-MS) استفاده نمودند. منحنی کالیبراسیون خطی در محدوده ۲۰۰۰-۵۰۰، حد تشخیص در محدوده ۱۰-۱ نانو گرم بر لیتر و انحراف استاندارد نسبی در محدوده ۲/۸-۲/۱٪ گزارش شد [۴۰].

¹-Fernández

²-Ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction

³-Koichi

⁴-Solid-phase dispersive extraction

⁵-Liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry

در این پژوهش برای اولین بار پیش تغلیظ و اندازه گیری همزمان کلرودیازپوکساید و آلپرازولام با استفاده از روش میکرو استخراج قطره آلی شناور جامد با کمک افزایش سورفاکتانت و امواج مافوق صوت و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا با دتکتور UV استفاده شده است.

فصل دوم

پخش تئوری

۱-۲ کروماتوگرافی

بسیاری از روش‌های جداسازی براساس انتقال یک یا چند نمونه از یک فاز به فاز دیگر استوار بوده و عمل تا مرحله تعادل یا نزدیک به آن ادامه می‌یابد. کروماتوگرافی، یکی از روش‌های جداسازی تجزیه‌ای است که در آن اجزای یک مخلوط بین دو فاز توزیع می‌شود که یکی از فازها ثابت بوده و می‌تواند به صورت جامد یا مایع باشد و فاز ساکن نامیده می‌شود. فاز دیگر ممکن است گاز یا مایع باشد که از روی فاز ساکن عبور کرده و اصطلاحاً فاز متحرک نامیده می‌شود. کروماتوگرافی مایع، روشی است که در آن جداسازی اجزای مخلوط براساس اختلاف در تمایل اجزاء مختلف برای توزیع بین فاز متحرک مایع و فاز ساکن صورت می‌گیرد [۴۱].

۱-۱-۲ انواع کروماتوگرافی مایع

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 پایه‌ی 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 [۴۲]:

- 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

۱-۱-۱-۲ کروماتوگرافی تقسیمی

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 بی نظیری 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 دسته‌ی 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 [۴۲].

¹-partition chromatography

²-Size exclusion chromatography

³-Revers phase chromatography

⁴High-performance liquid chromatography

۲-۱-۲ کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)

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 بالایی دستگاه، تزریق شده و وارد ستون می‌شود. اجزا نمونه بر اساس ماهیت شیمیایی، با فاصله زمانی متفاوتی از ستون عبور کرده و سپس بوسیله آشکارساز شناسایی می‌شوند و نتایج به صورت پیک‌هایی به ثبت می‌رسند. به طور معمول، جداسازی‌ها و تجزیه‌هایی که با دیگر روش‌های کروماتوگرافی سخت یا غیر ممکن است، با این روش به سادگی انجام می‌شود [۴۳].

اجزای دستگاه HPLC شامل موارد زیر است:

الف) پمپ: وسیله‌ای 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 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 لیتر 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: فلئوئورسانس، الکتروشیمیایی و طیف سنج جرمی استفاده می‌شود.

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

۲-۲ مقدمه‌ای بر روش‌های آماده‌سازی نمونه

تجزیه بسیاری از نمونه‌ها بدون آماده‌سازی آن به‌علت پیچیده بودن بافت، حجم محدود نمونه و غلظت پایین ترکیبات مورد بررسی بسیار مشکل است. بنابراین انجام یک مرحله پیش‌تغلیظ و همچنین استخراج ترکیبات مورد نظر از بافت نمونه ضروری است [۴۴]. با وجود پیشرفت‌های زیادی که در زمینه تکنیک‌های اندازه‌گیری صورت گرفته است، هنوز در بسیاری از موارد امکان اندازه‌گیری مستقیم نمونه

^۱ Loop

^۲-Support

وجود ندارد، که این امر ناشی از پیچیدگی بافت نمونه و نیز غلظت پایین آنالیت است. بنابراین انجام یک مرحله جداسازی و پیش تغلیظ قبل از اندازه‌گیری مقادیر کم آنالیت ضروری به نظر می‌رسد [۴۴].

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 گزینش‌پذیری
- فراهم کردن یک روش تکرارپذیر و کارآمد که مستقل از تغییرات بافت نمونه باشد.

۲-۱-۲- استخراج

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 [۴۵]. اغلب آماده‌سازی نمونه‌های آبی به منظور جداسازی و تغلیظ آنالیت‌ها از بافت نمونه صورت گرفته تا این‌که، نمونه‌ای با شرایط مناسب برای اندازه‌گیری با روش دستگاهی به دست آید. اگرچه اهمیت جداسازی نمونه اغلب نادیده گرفته می‌شود؛ اما در واقع آماده‌سازی نمونه مهم‌ترین مرحله در فرایندهای تجزیه‌ای محسوب می‌شود. چالش عمده‌ی شیمی‌دان‌های تجزیه دست‌یابی به شیوه‌هایی از آماده‌سازی نمونه است که از نظر اجرا سریع‌تر، آسان‌تر و ارزان‌تر باشند. 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)

این تکنیک آماده‌سازی نمونه چند منظوره ولی قدیمی است که برای بسیاری از روش‌های تجزیه‌ای استاندارد توصیه می‌شود. اگرچه در حال حاضر از این روش بطور گسترده ای استفاده می‌شود ولی متأسفانه در این تکنیک مقادیر زیادی از حلال‌های آلی سمی که اغلب گران و خطرناک هستند به کار گرفته می‌شود [۴۶]. این روش یک فرآیند تجزیه ای چند مرحله‌ای بسیار وقت‌گیر و گاه‌آ خسته‌کننده می‌باشد. به همین علت در اثر قرار گرفتن طولانی مدت پرسنل آزمایشگاه در مجاورت بخارات مواد شیمیایی، می‌تواند بیماری‌های گوناگونی در شخص ایجاد کند. علاوه بر این، امکان از دادن آنالیت‌ها یا آلوده شدن نمونه با افزایش تعداد عملیات‌های انجام شده در همان نمونه را افزایش می‌یابد، همچنین این روش دارای اشکالاتی نظیر حجم بالایی از حلال‌های آلی سمی و گران قیمت، تشکیل امولسیون و کف در هنگام استخراج می‌باشد. بنابراین جایگزینی روش‌های زیست‌سازگار، خودکار، استفاده از کمترین مقدار حلال استخراج (روش میکرواستخراج فاز مایع^۱، (LPME)) و استخراج کننده‌های امن و غیر سمی (مانند محلول سورفاکتانت) برای آماده‌سازی نمونه، مقدار خطا را کاهش داده و تاثیر منفی بر روی محیط زیست و همچنین تاثیر منفی بر سلامتی کارکنان آزمایشگاه را کاهش می‌دهد [۴۷].

۲-۲-۳- میکرواستخراج با فاز مایع

روش میکرو استخراج فاز مایع (LPME) ویژگی‌های منحصر به فردی مانند چون قابلیت پیش تغلیظ بالا، سادگی، هزینه پایین و خالص‌سازی نمونه را نشان می‌دهد. روش‌های LPME تقریباً امکان ترکیب با هر نوع تکنیک تجزیه‌ای را دارند [۴۸]. 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

^۱-Liquid- phase microextraction

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، فرم های 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^۱

۲- میکرو استخراج با تک قطره^۲

۳- میکرو استخراج مایع-مایع پخشی^۳

تقسیم بندی انواع روش‌های میکرو استخراج فاز مایع در شکل (۱-۲) نشان داده شده است [۴۹].

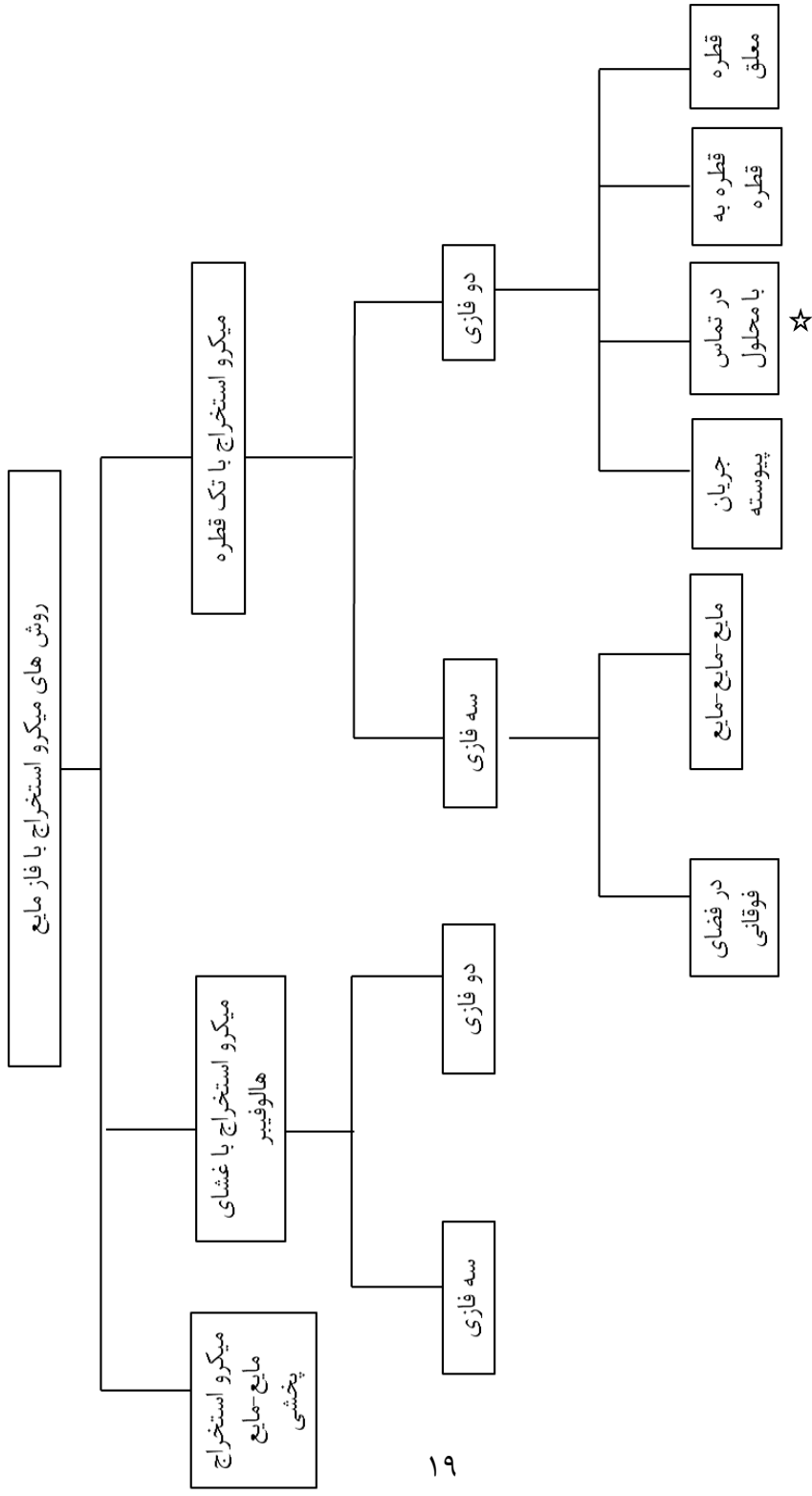
تفاوت اصلی دو دسته اول وجود یا عدم وجود غشا بین دو فاز آبی و آلی است که هر یک مزایا و معایب مخصوص به خود را دارند. اما تکنیک آخر به دلیل استفاده از یک سیستم سه تایی حلال با دیگر روش‌های میکرو استخراج فاز مایع تفاوت اساسی دارد [۴۴]. روش بکار برده شده در این تحقیق میکرو استخراج قطره آلی شناور جامد با کمک افزایش سورفاکتانت و امواج مافوق صوت^۴ می‌باشد که جزء روش های میکرو استخراج با تک قطره و استاتیک بوده و همچنین در تماس با محلول و دو فاز می‌باشد که در شکل (۱-۲) با علامت ستاره نشان داده شده و در قسمت بعد در مورد این روش توضیح داده می‌شود.

¹-Hollow fiber liquid-phase microextraction

²-Single drop microextraction

³-Dispersive-liquid liquid microextraction

⁴-Ultrasound-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction with solidification of floatin organic droplet



شکل (۱-۲): تقسیم بندی انواع میکرواستخراج با فاز مایع

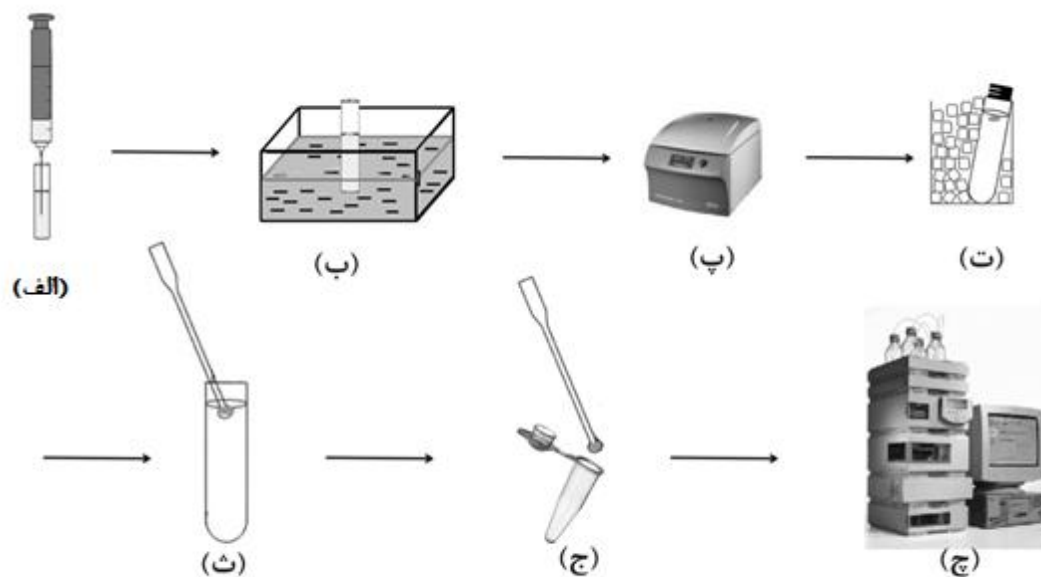
۲-۲-۴- میکرواستخراج قطره آلی شناور جامد با کمک افزایش سورفاکتانت و

امواج مافوق صوت (UASEME- SFO)

یو^۱ و همکارانش در سال ۲۰۱۲ یک روش میکرواستخراج به نام میکرواستخراج با قطره آلی شناور جامد با کمک افزایش سورفاکتانت و امواج مافوق صوت را توسعه دادند که در آن استخراج با حلال آلی دارای چگالی کمتر از آب و دارای سمیت پایین و نقطه ذوب نزدیک به دمای محیط (30°C - 10) استفاده شد [۵۰].

در این روش که در شکل (۲-۲) نشان داده شده، ابتدا مخلوطی از حجم کم و مشخصی از حلال استخراج و سورفاکتانت به محلول حاوی آنالیت اضافه می‌گردد. لازم به ذکر است که سورفاکتانت مولکولی است که دارای یک سر آبدوست و یک سر آبگریز بوده و به عنوان امولسیون کننده و افزایش پراکندگی حلال در فاز آبی بکار می‌رود (قسمت الف شکل). همچنین محلول در معرض امواج مافوق صوت که باعث افزایش سطح تماس دو فاز می‌گردد، قرار می‌گیرد (قسمت ب شکل). پس از قرار گرفتن نمونه تحت امواج مافوق صوت و به دنبال آن سانتریفیوژ کردن محلول، حلال آلی که دارای چگالی کمتری نسبت به آب است در روی سطح شناور می‌گردد (قسمت پ شکل). و سپس ظرف نمونه را در درون حمام یخ قرار داده تا حلال استخراج منجمد گردیده و در مرحله بعد (قسمت ت شکل) قطره جامد را می‌توان به راحتی به وسیله اسپاتول جمع‌آوری کرد (قسمت ث شکل). حلال استخراج منجمد شده در دمای محیط به سرعت ذوب شده (قسمت ج شکل) و آن را می‌توان توسط روش مورد نظر آنالیز کرد (قسمت چ شکل).

^۱-You



شکل (۲-۲): استخراج به روش قطره آلی شناور جامد با کمک افزایش سورفاکتانت و امواج مافوق صوت

۲-۲-۵- نقش سورفاکتانت در UASEME-SFO

انتخاب سورفاکتانت مناسب اهمیت زیادی برای انجام پیش تغلیظ و استخراج آنالیت‌ها در این روش دارد. سورفاکتانت به عنوان امولسیفایر می‌تواند به امولسیون حلال استخراج آلی در محلول آبی تحت تابش امواج فراصوت سرعت بخشد استفاده از امولسیفایر در روش USAEME-SFO باعث می‌شود که سرعت تشکیل قطرات ریز حلال استخراج در محلول آبی نمونه تحت تابش امواج فراصوت افزایش یابد و همچنین باعث پایداری قطرات ریز بخش شده در محلول آبی می‌گردند که این عمل منجر به کاهش زمان استخراج می‌شود. اثر سورفاکتانت‌های مختلف بر بازده استخراج به میزان تعادل آب‌دوستی-چربی دوستی^۱

^۱-Hydrophile-lipophile balance

سورفاکتانت‌ها (HLB) و همچنین آب‌گریزی و قطبیت آنالیت‌ها وابسته است. هنگامی که میزان HLB سورفاکتانت در بازه ۸-۱۸ باشد، سورفاکتانت می‌تواند به عنوان امولسیفایر استفاده شود [۵۰ و ۵۱].

۳-۲ مزایا و معایب روش SFO-UASEME

از مزایای این روش می‌توان به سادگی، مصرف کم حلال آلی، تکرار پذیری خوب، هزینه پایین، فاکتور پیش تغلیظ بالا و راندمان بالا اشاره کرد و همچنین این روش برای تجزیه نمونه‌های با بافت پیچیده مناسب است. عیب این روش نیز محدودیت در انتخاب نوع حلال استخراج کننده می‌باشد [۵۲].

۴-۲ ویژگی حلال استخراج کننده

انتخاب حلال استخراج مناسب برای افزایش کارایی روش SFO - UASEME ضروری است. از جمله ویژگی‌هایی که حلال استخراج برای این روش باید داشته باشد: [۵۳].

- چگالی کمتر از آب
- نقطه ذوب حدود دمای اتاق
- حلالیت بسیار کم در آب
- فراریت آن پایین باشد تا در زمان استخراج پایدار بماند.

عوامل بالا منجر به بهتر شدن بهره استخراج می‌شوند. در جدول (۲-۱) حلال‌های قابل کاربرد در این روش، همراه با نقطه ذوب آنها آورده شده است.

جدول (۱-۲): حلال‌های مورد استفاده در روش (UASEME-SFO) [۵۲]

حلال استخراج	نقطه ذوب (°C)
۱-آندکانول	۱۵-۱۳
۱-دودکانول	۲۴-۲۲
۱۰ادی کلرودکان	۱۶-۱۴
۱-برمو هگزادکان	۱۷-۱۸
هگزادکان	۱۸
۱-کلرواکتادکان	۲۰-۲۳

۲-۵ مقایسه‌ی روش UASEME-SFO با دیگر روش‌های میکرواستخراج

میکرواستخراج با فاز جامد [۵۴] و میکرواستخراج تک قطره (SDME) [۵۵] تقریباً ۲۵-۳۵ دقیقه زمان برای استخراج نیاز دارند. در حالی که در UASEME-SFO زمان استخراج حدود یک دقیقه است و به‌علت سطح زیاد سورفکتانت بین حلال استخراج آلی و نمونه آبی، استخراج سریع‌اً به حالت تعادل می‌رسد [۵۰]. علاوه بر این UASEME-SFO نیاز به ابزار خاصی مانند هم‌زن مکانیکی نیز ندارد. در مقایسه با روش میکرواستخراج مایع-مایع پخشی با مایع یونی توسط امواج مافوق صوت (-USA-IL) (DLPM)^۱، زمان استخراج روش پیشنهادی به کمک سورفکتانت به‌طور قابل ملاحظه‌ای کاهش می‌یابد و به حلال پخش کننده نیاز ندارد [۵۰]. علاوه بر این روش UASEME-SFO تکرار پذیری خوبی به‌علت جمع‌آوری کامل حلال استخراج پس از انجماد نشان داده است. این نتایج می‌دهد که روش UASEME-

^۱-ultrasound-assisted ionic liquid-dispersive liquid-phase microextraction

SFO یک روش ساده، سریع، حساس و نسبتاً زیست‌سازگار است و همچنین بعضی از کاربردهای این روش در جدول (۲-۲) آورده شده است.

جدول (۲-۲): کاربردهایی از UASEME-SFO

مرجع	درصد انحراف استاندارد نسبی (RSD)	حد تشخیص (LOD)	فاز استخراج	روش تجزیه ای	آنالیت
[۵۰]	٪۰/۴ تا ٪۱۲/۳	۰/۴-۱/۴ µg/l	۱-دودکانول	UASEME-SFO HPLC/VWD	حشره‌کش ^۱
[۵۱]	٪۰/۳ تا ٪۵/۶	۲-۴ ng/l	۱-آندکانول	UASEME-SFO HPLC/VWD	فارچ‌کش آستروبیورین
[۵۶]	٪۱۰/۷ تا ٪۵/۶	۲/۲-۵ ng/l	سیکلوهگزانون	UASEME-SFO GC/ECD	آلودگی چوب پنبه در شراب ^۳
[۵۷]	< ٪۱۲/۶	۰/۰۰۵-۰/۰۱ µg/l	۱-آندکانول	UASEME-SFO HPLC/DAD	استر فتالات ^۴

۲-۶ روش‌های بهینه‌سازی فاکتورها

روش‌های بهینه‌سازی روش‌هایی هستند که سطوحی از متغیرهای موثر در آزمایش را مشخص می‌نمایند، به طوری که در این سطوح از متغیرها، پاسخ^۵ 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 بهینه‌سازی، افزایش سیگنال به نوفه یا سیگنال به زمینه، ایجاد بهترین تفکیک و یا بدست آوردن حداقل پاسخ برای گونه‌های مزاحم می‌باشد. یک روش بهینه‌سازی خوب باید دو ویژگی داشته باشد. اول اینکه شرایط تجربی

¹-Pesticide

²-Strobilurin fungicide

³-Cork taint in wine

⁴-Phthalate ester

⁵-Response

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 [۵۸].

در این پروژه از روش‌های طراحی آزمایش برای بهینه‌سازی متغیرها استفاده شده است که در این بخش به طور مختصر به بررسی دو روش تک‌عاملی^۱ و طراحی آزمایش پرداخته خواهد شد.

۲-۶-۱ روش تک عاملی (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 به دست 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 برهم کنشی بین متغیرها وجود نداشته باشد و در صورت وجود برهم کنش، باید از سایر روش‌های بهینه‌سازی استفاده شود. برای مطالعه برهم کنش‌ها از روش طراحی آزمایش استفاده می‌شود.

۲-۶-۲ طرح آزمایش^۲

طرح‌های آزمایش الگوهایی هستند که برای انجام آزمایش‌ها و به منظور به دست آوردن اطلاعات دقیق و صحیح درباره مواد مورد مطالعه به کار 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

^۱-One-at-a time

^۲-Experimental design

می‌توان با افزایش راندمان یک سنتز، مقدار محصولات جانبی را به حداقل رساند. در علوم غذایی می‌توان خواص محصولات غذایی را بر اساس ترکیب آنها بهینه‌سازی نموده و در فناوری دارویی، شکنندگی گرانول‌ها را به صورت تابعی از ترکیب آنها بهینه کرد. 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 [۴۱].

۲-۶-۲-۱ اصول اولیه طراحی آزمایش

هدف از اجرای طراحی آزمایش، تعیین یک سری از شرایط و یا مقادیر فاکتورها است که بهترین پاسخ آزمایش را ایجاد نمایند. فاکتور نام متغیرهایی است که ممکن است بر روی ویژگی‌های مورد مطالعه موثر باشند و جهت مطالعه اثر آنها بر فرایند و محصول می‌بایست به طریقی کنترل شده تغییر داده شوند. ویژگی‌هایی از محصول یا فرایند که قرار است بهینه شوند، اغلب پاسخ نامیده می‌شوند یا اینکه پاسخ‌ها را باید متغیرهایی دانست که کارایی را توصیف می‌کنند. بنابراین دو نوع متغیر وجود دارد، که اولی پاسخ‌ها هستند متغیرهای وابسته محسوب شده و فاکتورها که متغیرها مستقل می‌باشند. رابطه بین پاسخ و متغیرهای مستقل را می‌توان به صورت زیر تعریف نمود:

$$(y_1, y_2, \dots, y_p) = f(x_1, x_2, \dots, x_n) \quad (1-2)$$

در این معادله y ، متغیر وابسته و x نیز متغیر مستقل یا فاکتور آزمایشی است. در اکثر موارد هر پاسخ به-طور جداگانه مورد بررسی قرار می‌گیرد، لذا رابطه بالا را می‌توان به صورت رابطه (۲-۲) نشان داد:

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

به طور کلی اهداف طرح‌های آزمایشی شامل درک اثرات فاکتورها و یا مدل‌سازی جهت ایجاد یک رابطه بین x و y با استفاده از حداقل تعداد آزمایش‌ها است. این امر مستلزم طراحی دقیق و کارآمد فضای

آزمایشی است. در صورتی که طرح آزمایشی به خوبی اجرا شود، موجب صرفه‌جویی در وقت و هزینه خواهد شد و در بسیاری از کاربردها این اهداف در یکدیگر ادغام می‌شوند. آزمایشگر کار را با تعیین اینکه کدام فاکتورها، پاسخ‌ها را تحت تاثیر قرار داده و میزان این تاثیر چقدر است، آغاز می‌کند. در مرحله بعد، هدف به‌دست آوردن مدلی جهت توصیف کمی اثرات این فاکتورها است که منجر به بهترین خصوصیات محصول، فرایند یا روش مورد بررسی می‌گردند [۵۹].

۲-۲-۶-۲ فاکتورهای آزمایشی

فاکتورها در طراحی آزمایش ممکن است کمی یا کیفی باشند. به عنوان مثال نوع حلال، یک فاکتور کیفی و غلظت حلال آلی و pH فاکتورهای کمی هستند. مقادیر مختلفی را که به فاکتورها اختصاص داده می‌شود، سطوح فاکتور^۱ می‌نامند. اصطلاح "سطح" نه تنها برای فاکتورهای کمی بلکه برای فاکتورهای کیفی نیز به کار می‌رود. اولین مرحله در کاربرد طراحی آزمایش انتخاب فاکتورها جهت بررسی آنها است. پس از انتخاب فاکتورها، باید مرزهای محدوده آزمایش یعنی سطوحی از فاکتورها را که در آن، فاکتورها مطالعه می‌شوند را تعریف کرد. محدوده آزمایشی به وسیله سطوح در نظر گرفته شده برای فاکتورها تعیین می‌گردد [۴۱].

۲-۲-۶-۳ انتخاب پاسخ‌ها

یک مرحله مهم در طراحی آزمایش‌ها، انتخاب پاسخ یا پاسخ‌ها است. معمولاً هر پاسخ به‌طور جداگانه مدل‌سازی شده و تلاش می‌شود تا سطوحی از فاکتورها که بیشترین و یا کمترین پاسخ را می‌دهند، تعیین گردند. در دنیای واقعی، معمولاً بیش از یک پاسخ وجود دارد و نتایج به‌دست آمده گاه با یکدیگر در

^۱-Factor levels

تضادند. به عنوان مثال در کروماتوگرافی، معمولاً جداسازی با افزایش زمان بازداری بهبود می‌یابد؛ اما در آن صورت زمان تجزیه نیز زیادتر می‌شود. در این موارد نیازی نیست که مقدار بهینه در پاسخ جداگانه را بیابیم، بلکه کافی است که سازگاری مناسبی را بین آنها جستجو کنیم. روش‌های لازم برای مورد عمل قرار دادن پاسخ‌های متضاد را روش‌های تصمیم‌گیری چند مقیاسی^۱ می‌نامند که در بخش‌های بعدی به آنها خواهیم پرداخت [۴۱].

۴-۲-۶-۲ توابع پاسخ

توابع پاسخ درجه اول و دوم برای دو فاکتور X_1 و X_2 به صورت زیر می‌باشند:

$$y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{12}X_1 X_2 \quad (۳-۲)$$

$$y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{12}X_1 X_2 \quad (۴-۲)$$

در رابطه‌های بالا b_0 مقدار ثابت، b_1 و b_2 ضرایب‌های خطی، b_{11} و b_{22} ضرایب‌های برهم‌کنش دوتایی و b_{12} ضرایب‌های برهم‌کنش X_1 و X_2 هستند. مدل‌های بالا، مدل‌های رگرسیونی بوده و در صورتی که حداقل تعداد آزمایش‌ها مساوی یا بزرگتر از تعداد ضرایب b باشد، این ضرایب به وسیله رگرسیون خطی چندگانه^۲ (MLR) قابل محاسبه‌اند. هنگامی که ضرایب b توسط رگرسیون خطی چندگانه به دست آیند، می‌توان از آنها برای پیش‌بینی پاسخ (y) به صورت تابعی از فاکتورهای X استفاده کرد که منجر به استخراج روبه‌های پاسخ^۳ می‌گردد. [۴۱].

^۱-Several criteria making methods

^۲-Multiple linear regression

^۳-Response

۷-۲ دسته بندی روش های طراحی آزمایش

براساس اهداف یک آزمایش، همه طرح‌ها می‌توانند در دو طبقه بزرگ دسته بندی شوند که عبارتند از: طرح غربالگری^۱ و طرح بهینه سازی^۲ [۵۹].

۱-۷-۲ 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 علاقه مند هستیم متغیرهای تأثیرگذار بر پاسخ فرایند 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 [۶۰].

۱-۱-۷-۲ 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 محاسن این روش تعداد کم آزمایش‌ها برای به دست آوردن بیشترین اطلاعات است. از انواع اصلی می‌توان به طرح فاکتوریال کامل و فاکتوریال کسری اشاره نمود [۶۱].

¹- Screening design

²-Optimization design

³-Full factorial design

⁴-Fractoinal factorial design

⁵-Placket Burman design

۲-۸-۱-۱-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 نحوه‌ی نمایش برای فاکتورهای کمی و کیفی مورد استفاده قرار می‌گیرد.

۲-۸-۱-۱-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 [۶۱].

۲-۱-۷-۲ 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. در این طراحی که برای تعیین فاکتورهای موثر 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 می‌باشد که در آن ماکزیمم فاکتورهایی که می‌توان در هر طراحی آزمایش بررسی کرد برابر است با:

$$f = N - 1 \quad (4-2)$$

$f =$ حداکثر تعداد عامل‌های مورد بررسی

$N =$ تعداد آزمایش‌های تعریف شده نرم افزار

هنگامی که در یک طرح پلاکت- برمن نقاط مرکزی و تکرار وجود داشته باشد تعداد آزمایش‌ها از معادله زیر بدست می‌آید که k تعداد فاکتورهاست [۶۲].

$$N = 2(K - 3) \quad (5-2)$$

مهم‌ترین حسن این روش‌ها کاهش تعداد آزمایش‌ها برای ارزیابی متغیرهای چندتایی و برهم کنش بین آنها است. این تکنیک‌ها می‌توانند به طور موفقیت آمیزی با بررسی پارامترهای گوناگون برای فرآیند حذف به کار برده شوند [۶۳].

۲-۷-۲ طراحی بهینه سازی

بعد از غربالگری مرحله بهینه سازی است که در آن از طرح‌هایی استفاده می‌شود که هدف آنها، توصیف روابط غیرخطی بین پاسخ و فاکتورهاست. در این صورت لازم است مرتبه دوم فاکتورها در مدل وارد شوند (معادله ۴-۲). و بدین منظور حداقل سه سطح از هر فاکتور را باید در نظر گرفت. دلیل اصلی استفاده از این طرح‌ها، استخراج مدل و رویه پاسخ مربوطه است. معمولاً ابتدا طرح‌های دو فاکتوری جهت تعیین فاکتورهای موثر مورد استفاده قرار گرفته و سپس تنها فاکتورهای مهم در بیش از دو سطح، توسط این طرح‌ها مورد مطالعه قرار خواهند گرفت.

۱-۲-۷-۲ طرح‌های چندسطحی^۱

ترسیم رویه‌های پاسخ مستلزم مدل‌سازی پاسخ به صورت تابعی از فاکتورها و برهم‌کنش‌های موثر است. طراحی آزمایش با بیش از دو سطح، جهت ایجاد مدل‌های خمیده^۲ برای توصیف رابطه کمی پاسخ و فاکتورها به کار می‌روند. توصیف محدوده‌ی 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 باکس‌بنکن^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.

۲-۲-۷-۲ 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 توسط 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

^۱-Multi-level design

^۲-Curved models

^۳-Rotatable

^۴-Box-Benken

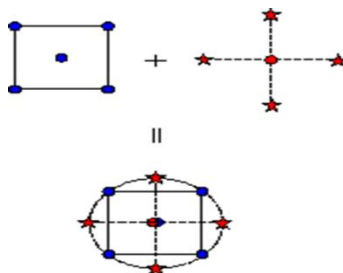
^۵-Doehlert

^۶-Wilson

آزمایش‌های متوالی بوده و امکان بررسی خطای مدل را زمانی که مقادیر مناسبی از آزمایش در دسترس باشد را امکان پذیر می‌سازد. تعداد آزمایش‌ها از معادله (۲-۶) بدست می‌آید [۶۳ و ۶۴].

$$N = 2^f + 2f + N_0 \quad (۲-۶)$$

در این معادله 2^f نقاط فاکتوریل $2f$ نقاط ستاره‌دار و N_0 نیز تعداد نقاط مرکزی است.



شکل (۲-۳): طراحی آزمایش در طرح مرکب مرکزی [۶۵]

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^1)، مرکب مرکزی محاط شده (CCI^2) و مرکب مرکزی وجوه مرکز پر (CCF^3) 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 CCI و CCC مقدار این پارامتر به ترتیب بزرگتر و کوچکتر از یک است. از بین طرح‌های مرکب مرکزی، طرح‌های CCI و CCC چرخش‌پذیر بوده و طرح CCF مکعبی نیز است.

¹-Central composite circumscribed (CCC)

²-Central composite iinscribed (CCI)

³-Central composit face-centred (CCF)

۲-۷-۲-۳ طرح باکس-بنکن

این مدل در سال ۱۹۶۰ توسط باکس و بنکن ارائه شد. این طرح یک مدل مرتبه دوم سه سطحی و چرخش‌پذیر می‌باشد که برای مطالعه فاکتورهای متعدد مورد استفاده قرار می‌گیرد. تعداد آزمایشات در این طرح از رابطه زیر بدست می‌آید:

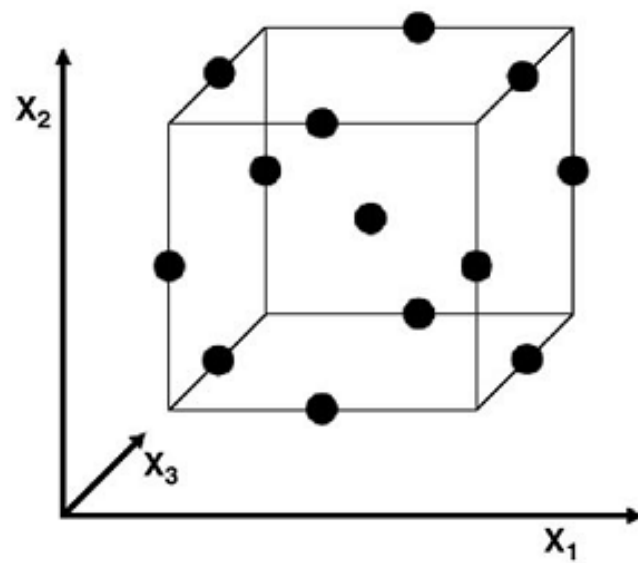
$$N = 2K(K - 1) + C_0 \quad (۷-۲)$$

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

$$y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ij} X_i X_j + \sum \beta_{ii} X_i^2 \quad (۸-۲)$$

که y پاسخ، X_i و X_j متغیرهای ورودی موثر 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.

آنها پیشنهاد کردند که انتخاب نقاط در سه سطح فاکتوریل تنظیم شود، که این اجازه برآوردی مناسب می‌دهد تا تخمین از ضرایب درجه اول و دوم مدل ریاضی انجام شود. در این طرح همچنین متغیرها در نقاط میانی یال‌ها و مرکز فضای طراحی قرار می‌گیرند و هیچ نقطه‌ای روی گوشه مکعب وجود ندارد [۶۲]، که در شکل (۳-۲) 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 بکار می‌رود.



شکل (۲-۴): طراحی آزمایش در روش باکس-بنکن [۶۳]

فصل سوم

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 روشی ساده، حساس و گزینش‌پذیر برای اندازه‌گیری مقادیر کم از آنها ضروری به نظر می‌رسد. در این کار پژوهشی امکان استفاده از روش میکرواستخراج فاز مایع بر اساس قطره جامد با کمک سورفکتانت و امواج مافوق صوت برای جداسازی و پیش‌تغلیظ مقادیر کم کلرودیازپوکساید و آلپرازولام در نمونه‌های حقیقی و اندازه‌گیری آنها به وسیله کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا مورد بررسی قرار گرفته است.

۳-۲- محلول‌های مورد استفاده و طرز تهیه آنها

برای تهیه تمام محلول‌ها از آب دو بار تقطیر استفاده گردید. ۰/۰۱۰۰ گرم از داروی کلرو دیازپوکساید و آلپرازولام تهیه شده از شرکت دکتر عبیدی در متانول حل شده و به حجم ۱۰/۰ میلی‌لیتر رسانده و بدین صورت محلول مادر کلرودیازپوکساید و آلپرازولام با غلظت ۱۰۰۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر تهیه شد. محلول ۱۰۰/۰ میلی‌گرم 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. محلول ۵۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر سورفکتانت ستیل تری متیل آمونیوم برمید^۱ (CTAB) در بالن ۱۰۰/۰ میلی‌لیتری تهیه شد.

محلول‌های بافر فسفاتی با pH ۳/۰ تا ۸/۰ از مخلوط کردن حجم‌های معینی از محلول‌های پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات دو آب ۰/۰۶۷ مولار و پتاسیم هیدروژن فسفات ۰/۰۶۷ مولار تهیه شدند. برای تهیه

^۱-Cetyl trimethylammonium bromide

محلول بافر فسفاتی با $\text{pH}=3/0$ نیز از محلول‌های پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات دو آبه $0/067$ مولار و فسفریک اسید $0/100$ مولار استفاده شد. مشخصات مواد شیمیایی مورد استفاده در جدول (۱-۳) آمده است.

جدول (۱-۳) مواد شیمیایی مورد استفاده

شرکت سازنده	فرمول شیمیایی	نام ماده شیمیایی
مرک ^۱	$\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات دو آبه
مرک	K_2HPO_4	پتاسیم هیدروژن فسفات
مرک	H_3PO_4	فسفریک اسید
مرک	CH_3OH	متانول
مرک	$\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$	استون
مرک	CH_3CN	استونیتریل
مرک	HCl	هیدروکلریک اسید
مرک	NaOH	سدیم هیدروکسید
مرک	$\text{C}_{11}\text{H}_{24}\text{O}$	۱-آندکانول
مرک	$\text{C}_{12}\text{H}_{26}\text{O}$	۱-دوکانول
مرک	$\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{Cl}_2$	۱۰-دی کلرو دکان

^۱-Merck

۳-۲-۱- دستگا هها و وسایل مورد استفاده

جداسازی و اندازه‌گیری داروها با استفاده از سیستم HPLC ۱۱۰۰ Agilent مجهز به آشکارساز فرا بنفش چند طول موجی^۱ (UV-VWD) انجام شد. همچنین از یک رایانه مجهز به برنامه نرم افزاری ChemStation Agilent برای پردازش داده‌های کروماتوگرافی مورد استفاده قرار گرفت. ستون مورد استفاده نیز از نوع C₁₈ (۴/۵ × ۱۵۰ میلی متر با اندازه ذرات ۵ میکرومتر) بود و مخلوطی از بافر فسفاتی (pH برابر ۵/۵، با غلظت ۰/۰۶ M) و استونیتریل با نسبت (۱:۱) با سرعت جریان ۱/۰ میلی لیتر بر دقیقه به عنوان فاز متحرک مورد استفاده قرار گرفت [۶۶]. جداسازی‌ها با دستگاه HPLC در دمای اتاق انجام شد و اندازه‌گیری‌ها در دو طول موج جذبی ۲۵۸ و ۲۲۰ نانومتر به ترتیب برای کلرو دیازپوکساید و آلپرازولام، انجام شد. لازم به ذکر است که انتخاب طول موج‌ها با توجه به طیف جذبی این داروها (شکل (۳-۱)) صورت گرفته است، که در اینجا λ_{max} به عنوان طول موج مورد اندازه‌گیری انتخاب شده است زیرا بالاترین جذب و بیشترین حساسیت را نشان می‌دهد. حمام آب فرا صوت (BANDELIN الکترونیکی، آلمان) و یک دستگاه سانتریفیوژ (EBA Hettich ۲۰، آلمان) در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت. تنظیم و اندازه‌گیری pH محلول نمونه و فاز متحرک با استفاده از pH متر متراهم^۲ ۷۸۰ مجهز به الکتروود ترکیبی شیشه‌ای-کالومل (۳/۰ مولار پتاسیم کلرید) انجام شد.

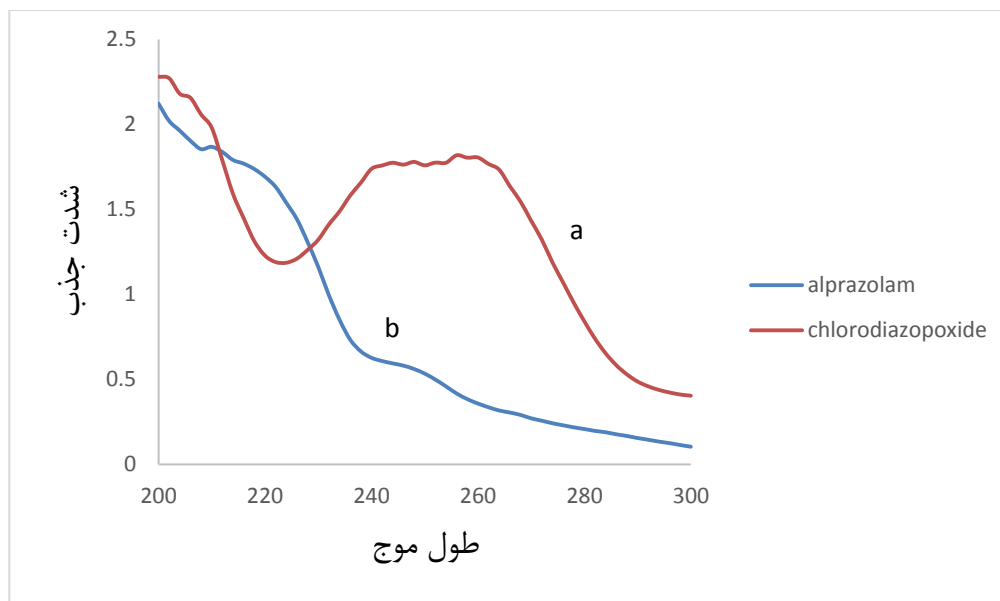
برای وزن کردن جرم معینی از مواد شیمیایی از ترازوی تجزیه‌ای با دقت ۰/۱ میلی گرم سارتریوس^۳ مدل A200S ساخت کشور آلمان استفاده شد. برای برداشتن حجم معینی از حلال آلی از میکروپیپت‌های

^۱-Ultraviolet-variable wavelength detector

^۲-Metrohm

^۳-Sartorius

۱۰۰/۰ و ۱۰۰۰/۰ میکرولیتری با حجم قابل تنظیم ساخت شرکت اپندروف^۱ مدل Research ۱۰۰ استفاده شد و همچنین برای برداشتن سورفاکتانت از یک سرنگ اچیلنت ۵۰/۰ میکرولیتری استفاده شد.



شکل (۳-۱): طیف جذبی آلپرازولام و کلرودیازپوکساید، شرایط آزمایش: غلظت آلپرازولام و کلرودیازپوکساید (۲/۰ میلی گرم)، حلال فاز متحرک (مخلوطی از بافر فسفاتنی (pH برابر ۵/۵، با غلظت ۰/۰۶ M)) و استونیتریل با نسبت ۱:۱. رنگ آبی مربوط به طول موج ۲۵۸ نانومتر و رنگ قرمز، طول موج ۲۲۰ نانومتر می باشد. a: کلرودیازپوکساید و b: آلپرازولام

۳-۳- روش کار در بهینه سازی پارامترهای موثر در اندازه گیری کلرودیازپوکساید

و آلپرازولام

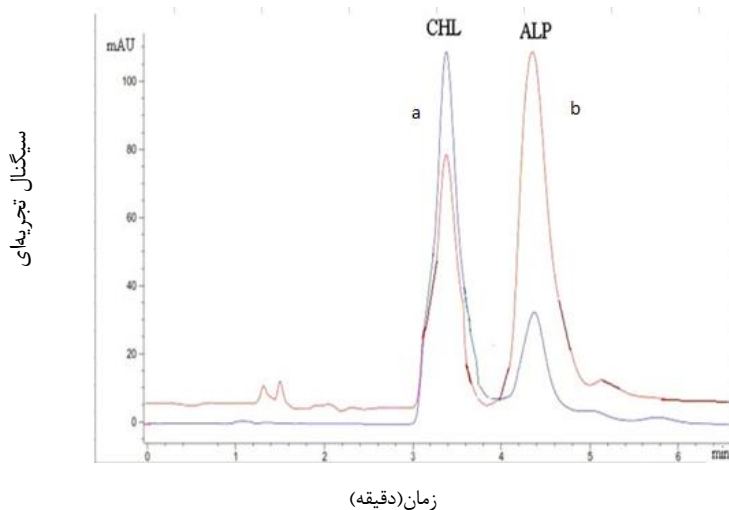
در یک لوله آزمایش ۱/۰ میلی لیتر از محلول ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر کلرودیازپوکساید و ۱/۰ میلی لیتر محلول ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر آلپرازولام، ۱/۰ میلی لیتر محلول بافر و سپس، به وسیله میکرو پیپت ۵۰/۰ μl، ۱-آندکانول به عنوان حلال استخراج و ۱۵/۰ μL CTAB با غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیتر به عنوان

^۱-Eppendorf, model Research ۱۰۰

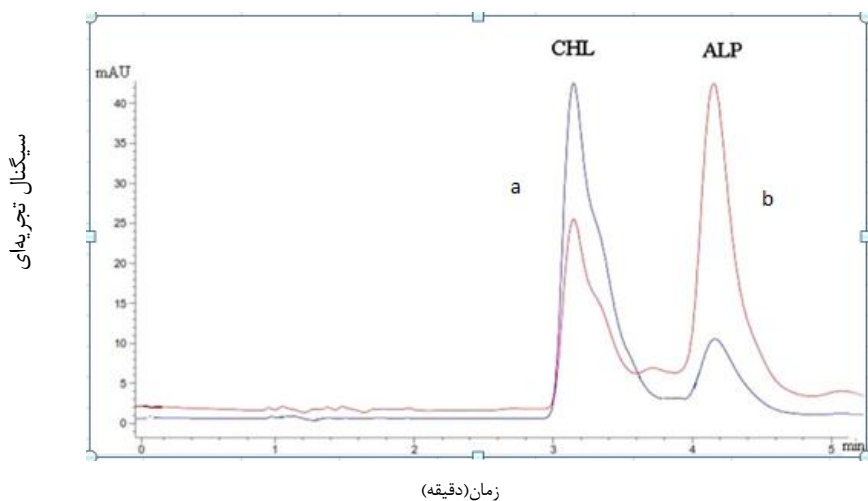
امولسیفایر به محلول نمونه اضافه شد و به حجم نهایی ۱۰/۰ میلی لیتر رسید. پس از آن، لوله آزمایش را در حمام فراصوت با فرکانس مافوق صوت ۶۰ کیلو هرتز به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد تا یک محلول ابری متشکل از قطرات بسیار ریز ۱-آندکانول پراکنده در محلول آبی تشکیل شد که در این مرحله آنالیت‌ها در قطرات ریز حلال آلی استخراج شدند. سپس محلول نمونه در ۳۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و قطرات مایع آلی ((لایه ۱-آندکانول)) با توجه به چگالی آن که نسبت به آب کمتر است) در بالای لوله آزمایش به صورت شناور تشکیل شد. پس از آن، لوله آزمایش به مدت ۳۰ 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 مجموع سطوح زیر منحنی کلرودیازپوکساید در طول موج ۲۵۸ نانومتر و آلپرازولام در ۲۲۰ نانومتر می‌باشد) و شاهد به عنوان سیگنال تجزیه‌ای مورد استفاده قرار گرفت.

با بررسی کروماتوگرام‌های حاصل از اثر افزایش سورفاکتانت با حمام فراصوت و افزایش سورفاکتانت بدون حمام فراصوت که در شکل‌های (۲-۳) و (۳-۳) (که رنگ آبی مربوط به طول موج ۲۵۸ نانومتر و رنگ قرمز، طول موج ۲۲۰ نانومتر می‌باشد) نشان داده شده است، سطح زیر پیک کلرودیازپوکساید و آلپرازولام در اثر افزایش سورفاکتانت با حمام فراصوت بیشتر است، زیرا حمام فراصوت باعث افزایش انتقال جرم آنالیت از فاز آبی به فاز آلی می‌شود. همچنین اثر حمام فراصوت در حضور سورفاکتانت و در غیاب سورفاکتانت در شکل‌های (۲-۳) و (۴-۳) آمده است، که نشان می‌دهد سطح زیر پیک داروها در حضور حمام فراصوت با سورفاکتانت بیشتر است، زیرا سورفاکتانت باعث می‌شود که سرعت تشکیل قطرات ریز حلال استخراج در محلول آبی نمونه تحت تابش امواج فراصوت افزایش یابد، در صورتی که در غیاب

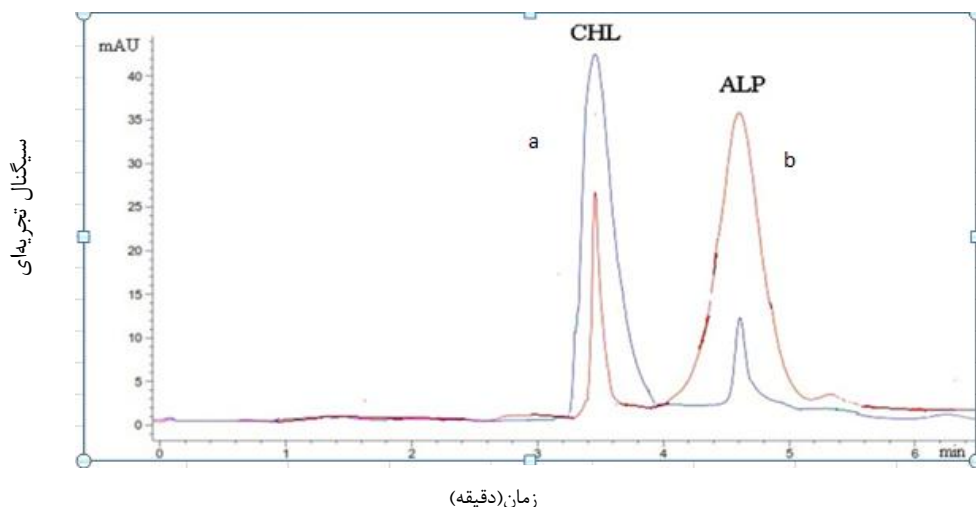
سورفاکتانت و حمام فراصوت پایداری قطرات ریز پخش شده در محلول آبی کاهش می‌یابد. در نتیجه تلفیق این دو روش با هم (افزایش سورفاکتانت با حمام فراصوت) منجر به افزایش راندمان استخراج ترکیبات دارویی مورد نظر می‌شود.



شکل (۳-۲): کروماتوگرام حاصل از پیش تغلیظ و اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام با افزایش سورفاکتانت و حمام فراصوت. شرایط آزمایش: غلظت کلرودیازپوکساید و آلپرازولام ۱/۰ میلی گرم بر لیتر، حجم محلول نمونه ۱۰/۰ میلی لیتر، حجم حلال استخراج کننده (۱-آندکانول) ۵۰/۰ میکرولیتر، غلظت سورفاکتانت ۰/۰۷۵، زمان استخراج ۱۰/۰ دقیقه، زمان سانتریفیوژ ۱۰/۰ دقیقه، رنگ آبی مربوط به طول موج ۲۵۸ نانومتر و رنگ قرمز مربوط به طول موج ۲۲۰ نانومتر می‌باشد. a: پیک مربوط به کلرودیازپوکساید در طول موج ۲۵۸ نانومتر، b: پیک مربوط به آلپرازولام در طول موج ۲۲۰ نانومتر.



شکل (۳-۳): کروماتوگرام حاصل از از پیش تغلیظ و اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام با افزایش سورفاکتانت بدون حمام فراصوت. شرایط آزمایش: غلظت کلرودیازپوکساید و آلپرازولام ۱/۰ میلی گرم بر لیتر، حجم محلول نمونه ۱۰/۰ میلی لیتر، حجم حلال استخراج کننده (۱-آندکانول) ۵۰/۰ میکرولیتر، غلظت سورفاکتانت ۰/۰۷۵ میلی گرم بر لیتر، زمان استخراج ۱۰/۰ دقیقه، زمان سانتریفیوژ ۱۰/۰ دقیقه، رنگ آبی مربوط به طول موج ۲۵۸ نانومتر و رنگ قرمز مربوط به طول موج ۲۲۰ نانومتر می‌باشد. a: پیک مربوط به کلرودیازپوکساید در طول موج ۲۵۸ نانومتر، b: پیک مربوط به آلپرازولام در طول موج ۲۲۰ نانومتر.



شکل (۳-۴): کروماتوگرام حاصل از پیش تغلیظ و اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام در حضور حمام فراصوت بدون افزایش سورفاکتانت. شرایط آزمایش: غلظت کلرودیازپوکساید و آلپرازولام ۱/۰ میلی گرم بر لیتر، حجم محلول نمونه ۱۰/۰ میلی لیتر، حجم حلال استخراج کننده (۱-آندکانول) ۳۰ میکرولیتر، غلظت سورفاکتانت ۰/۰۷۵ میلی گرم بر لیتر، زمان استخراج ۱۰/۰ دقیقه، زمان سانتریفیوژ ۱۰/۰ دقیقه، رنگ آبی مربوط به طول موج ۲۵۸ نانومتر و رنگ قرمز مربوط به طول موج ۲۲۰ نانومتر می‌باشد. a: پیک مربوط به کلرودیازپوکساید در طول موج ۲۵۸ نانومتر، b: پیک مربوط به آلپرازولام در طول موج ۲۲۰ نانومتر.

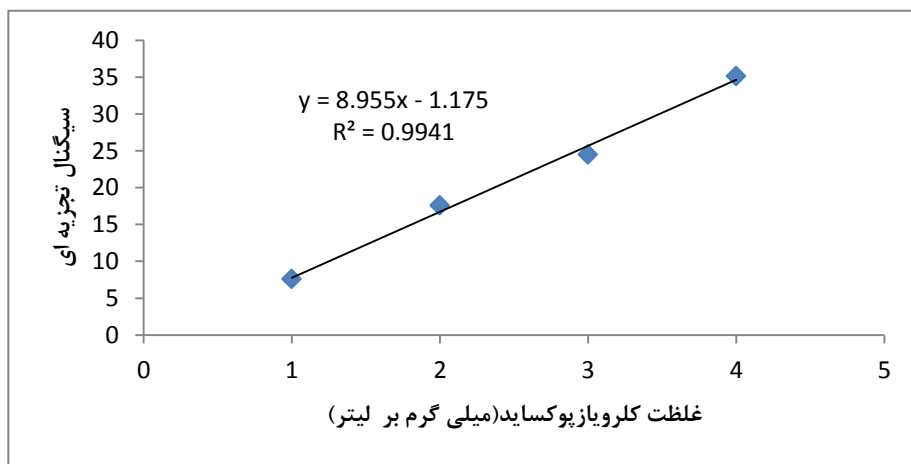
برای رسم منحنی کالیبراسیون مستقیم به شیوه زیر عمل شد:

محلول‌هایی با غلظت‌های متفاوت از کلرودیازپوکساید و آلپرازولام در محدوده غلظتی ۰/۵ تا ۱۵/۰ میلی گرم بر لیتر با رقیق‌سازی از محلول ۱۰۰/۰ میلی گرم بر لیتر با متانول تهیه شدند. پس از آماده‌سازی، ۰/۱ میلی لیتر از محلول و ۰/۹ میلی لیتر از حلال استخراج ۱-آندکانول برداشته به یک ویال ۱/۰ میلی-لیتری منتقل شدند. سپس ۵/۰ میکرولیتر از حلال اقطره حلال آلی بعد از استخراج حاوی این دو دارو به دستگاه HPLC تزریق گردید و سیگنال حاصل که مجموع سطوح زیر پیک دو نمونه بود ثبت گردید.

منحنی‌های کالیبراسیون مربوطه نیز از رسم تغییرات سیگنال آنالیت بر حسب غلظت کلرودیازپوکساید و آلپرازولام به دست آمد که نتایج آن به ترتیب در جدول (۲-۳) و شکل (۵-۳) برای کلرودیازپوکساید و جدول (۳-۳) و شکل (۶-۳) برای آلپرازولام نشان داده شده است، که در محدوده‌ی ۱/۰ تا ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر خطی است.

جدول (۲-۳): سیگنال مستقیم بدست آمده برای داروی کلرودیازپوکساید با غلظت‌های متفاوت

سیگنال تجزیه‌ای (سطح زیر منحنی)	غلظت کلرودیازپوکساید (میلی گرم بر لیتر)
۷/۱۳	۱/۰
۱۶/۱۲	۲/۰
۲۵/۳۲	۳/۰
۳۵/۱۲	۴/۰

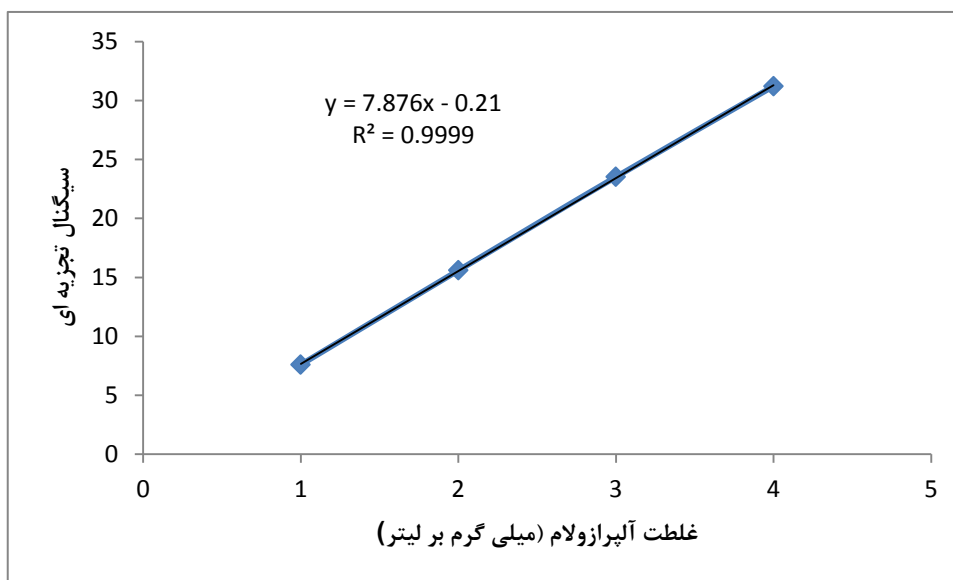


شکل (۵-۳): منحنی کالیبراسیون مستقیم کلرودیازپوکساید

غلظت‌های مختلفی از آنالیت در حجم ۱ میلی لیتر در حلال ۱-آندکانول، ترکیبات بافر فسفاتی با pH برابر ۵/۵ و استونیتریل با نسبت ۱:۱ به عنوان فاز متحرک، سرعت جریان ۱/۰ میلی لیتر بر دقیقه.

جدول (۳-۳): سیگنال مستقیم بدست آمده برای آلپرازولام با غلظت‌های متفاوت

غلظت آلپرازولام (میلی گرم بر لیتر)	سیگنال تجزیه‌ای (سطح زیر منحنی)
۱/۰	۷/۶
۲/۰	۱۵/۵۹
۳/۰	۲۴/۵۲
۴/۰	۳۲/۱۴



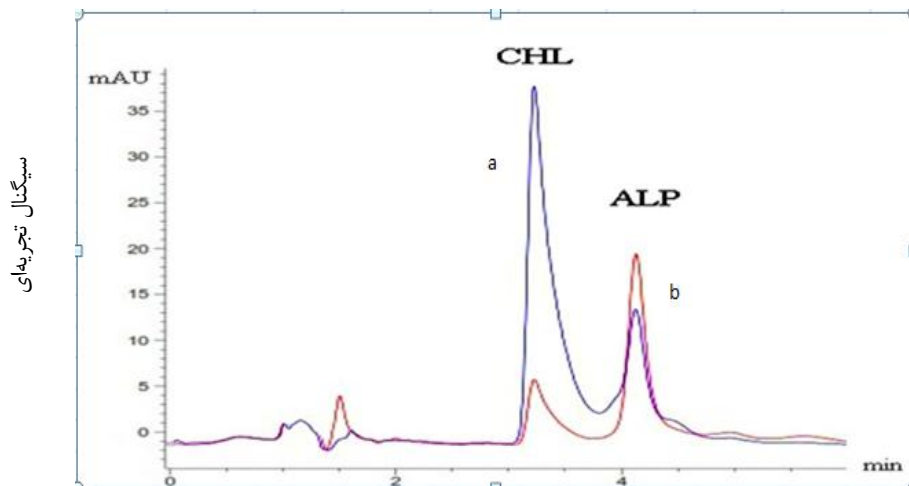
شکل (۳-۶): منحنی کالیبراسیون مستقیم آلپرازولام

غلظت‌های مختلفی از آنالیت در حجم ۱ میلی لیتر در حلال ۱-آندکانول، ترکیبات بافر فسفات‌ی با pH برابر ۵/۵ و استونیتریل با نسبت ۱:۱ به عنوان فاز متحرک، سرعت جریان ۱/۰ میلی لیتر بر دقیقه.

کروماتوگرام حاصل از محلول ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر کلرودیازپوکساید و آلپرازولام در شکل (۳-۷)

نشان داده شده است (رنگ آبی مربوط به طول موج ۲۵۸ نانومتر و رنگ قرمز، طول موج ۲۲۰ نانومتر می

باشد).



زمان (دقیقه)

شکل (۳-۷): کروماتوگرام محلول ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر کلرودیازپوکساید و آلپرازولام، ترکیب بافر فسفاتی با pH برابر با ۵/۵ و استونیتریل، با نسبت ۱:۱ به عنوان فاز متحرک، سرعت جریان ۱/۰ میلی لیتر بر دقیقه، حجم لوپ ۵/۰ میکرولیتر، رنگ آبی مربوط به طول موج ۲۵۸ نانومتر و رنگ قرمز، طول موج ۲۲۰ نانومتر می باشد. a: پیک مربوط به کلرودیازپوکساید در طول موج ۲۵۸ نانومتر، b: پیک مربوط به آلپرازولام در طول موج ۲۲۰ نانومتر.

۳-۳-۱- بررسی و بهینه‌سازی فاکتورهای مؤثر در پیش تغلیظ و اندازه گیری

کلرودیازپوکساید و آلپرازولام

به منظور فراهم نمودن بهترین شرایط جهت پیش تغلیظ و بهترین حساسیت، فاکتورهای مؤثر بر میکرواستخراج کلرودیازپوکساید و آلپرازولام، مورد بررسی قرار گرفتند. اصلی ترین عیب روش های بهینه سازی یک متغیر در یک زمان این است که برای نشان دادن بر هم کنش 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، بکار 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. همچنین از روش طراحی پلاکت برمن جهت مشخص نمودن فاکتورهای مهم و مؤثر بر راندمان استخراج استفاده گردید. فاکتورهای بررسی شده عبارتند از:

(۱) pH نمونه

(۲) نوع بافر

(۳) حجم بافر

(۴) نوع حلال استخراج کننده

(۵) حجم حلال استخراج کننده

(۶) نوع سورفکتانت

(۷) غلظت سورفکتانت

(۸) زمان استخراج

(۹) اثر نمک (قدرت یونی)

(۱۰) زمان سانتریفیوژ

(۱۱) دور سانتریفیوژ

پارامترهای ۱ الی ۱۱ ابتدا توسط روش بهینه‌سازی یک متغیر در یک زمان مورد بررسی قرار گرفتند و سپس با توجه به مقادیر بهینه، سطوح مورد نظر هر فاکتور برای روش طراحی آزمایش تعیین گردید.

۳-۲-۳- نتایج حاصل از بهینه‌سازی یک متغیر در یک زمان^۱

نتایج به دست آمده در بررسی و بهینه‌سازی فاکتورهای موثر بر میکرواستخراج قطره آلی شناور جامد با کمک افزایش سورفکتانت و امواج مافوق صوت به روش بهینه‌سازی یک متغیر در یک زمان در جدول (۳-۴) نشان داده شده است و نتایج در پیوست آمده است.

^۱-One at-a-time

جدول (۳-۴) نتایج حاصل از بهینه‌سازی یک متغیر در یک زمان در پیش تغلیظ و اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام

مقدار بهینه	محدوده مورد بررسی یا نوع فاکتور	فاکتور
۵/۰۰	۲/۰-۹/۰	pH
۱-آندکانول	۱-آندکانول، ۱۰-دودکانول، ۱۰-دی کلرودکان	نوع حلال استخراج‌کننده
۳۰/۰ میکرولیتر	۲۰/۰-۲۰۰/۰ میکرولیتر	حجم حلال استخراج‌کننده
CTAB	Tween80, CTAB, SDS	نوع سورفکتانت
۰/۰۲۵ میلی گرم بر لیتر	۰/۰-۰/۱۵ میلی گرم بر لیتر	غلظت سورفکتانت
۵ دقیقه	۱/۰-۱/۰ دقیقه	زمان استخراج
۰/۰۱۷	۰/۰-۱/۰	اثر نمک (قدرت یونی)
فسفاتی	فسفاتی، فتلاتی، استاتی	نوع بافر
۱/۰ میلی لیتر	۰/۵-۳/۰ میلی لیتر	حجم بافر
۱۵ دقیقه	۵/۰-۲۰/۰	زمان سانتریفیوژ
۳۵۰۰	۳۵۰۰-۴۵۰۰	دور سانتریفیوژ

۳-۴- بررسی و بهینه‌سازی فاکتورهای موثر بر پیش تغلیظ و اندازه‌گیری

کلرودیازپوکساید و آلپرازولام با استفاده از طراحی آزمایش^۱ (DOE)

هدف از بکارگیری تکنیک‌های مختلف طراحی آزمایش، شناسایی فاکتورهای موثر در فرآیند و تعیین مقادیر بهینه آنها است. با کمک تکنیک‌های DOE می‌توان اولاً فاکتورهایی که بیشترین تاثیر را بر پاسخ دارند، تعیین کرد و ثانیاً فاکتورهای ورودی موثر را به گونه‌ای تعیین کرد که مقادیر پاسخ را به مقدار بهینه واقعی خود نزدیک کرده، تغییرپذیری آنها را کوچک نموده و تاثیر فاکتورهای غیرقابل کنترل را بر متغیر پاسخ مینیمم نمود. همانطور که در بخش قبل دیده شد، پارامترهایی نظیر: pH، نوع حلال استخراج‌کننده، حجم حلال استخراج‌کننده، غلظت سورفکتانت، اثر نمک، نوع بافر، حجم بافر، زمان سانتریفیوژ و دور سانتریفیوژ در میزان پاسخ آشکارساز و حساسیت روش موثر هستند. از طرف دیگر احتمال برهم کنش

^۱-Design of Experiment

بین متغیرها وجود دارد و در نتیجه شرایط حاصل از بهینه‌سازی یک متغیر در یک زمان نمی‌تواند شرایط بهینه واقعی باشد و از طرفی نیاز به تعداد آزمایش‌های زیاد و سخت آزمایشگاهی است، بنابراین لازم است اثر فاکتورهای موثر بر حساسیت با استفاده از روش‌های طراحی آزمایش مورد بررسی قرار گیرد. بدین منظور از روش غربالگری طرح پلاکت-برمن برای تعیین فاکتورهای موثر و همچنین از روش بهینه‌سازی طرح باکس-بنکن برای بدست آوردن شرایط بهینه استفاده شد.

۳-۴-۱- تعیین سطح فاکتورها

برای بررسی و تشخیص فاکتورهای مهم و تاثیرگذار بر پاسخ، طرح پلاکت-برمن انتخاب گردید که انتخاب بعضی از فاکتورها مانند نوع سورفاکتانت، نوع حلال استخراج، نوع و حجم بافر و دور سانتریفوژ بر اساس نتایج حاصل از روش یک متغیر در زمان انجام گردید. سپس سطوح سایر فاکتورهای باقی مانده بر مبنای اطلاعات بدست آمده از روش بهینه‌سازی 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 موثر بر پیش تغلیظ و اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام

فاکتور	اسم و علامت	سطح بالا(+)	سطح پایین(-)
pH	pH	۹/۰	۲/۵
اثر نمک (درصد وزنی حجمی)	Salt effect(St)	٪۱/۰	٪۰
غلظت سورفاکتانت (میلی‌گرم بر لیتر)	Surfactant concentration(S.C)	۰/۲۰	۰/۰۱
حجم حلال استخراج-کننده (میکرولیتر)	Extraction solvent volume(E.S.V)	۱۲۰/۰	۱۵/۰
زمان استخراج (دقیقه)	Extraction.time(E.t)	۱۰/۰	۱/۰

۳-۴-۱-۱- طراحی آزمایش در طرح پلاکت-برمن جهت تعیین فاکتورهای مهم

برای طراحی آزمایش‌ها جهت غربال کردن فاکتورها و تعیین فاکتورهای موثر بر اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام از نرم افزار Minitab 16 برای انجام طرح پلاکت-برمن و پردازش داده‌ها استفاده شد. همانطور که در بخش ۲-۸-۳ بیان شد، تعداد آزمایش‌ها هنگامی که ۵ فاکتور مورد بررسی و همچنین دو تکرار نیز وجود داشته باشد، ۲۴ آزمایش می‌باشد. طرح آزمایش برای تمام فاکتورها که شامل pH، حجم حلال استخراج کننده، اثر غلظت سورفاکتانت، قدرت یونی و زمان استخراج هستند، در دو سطح و با دو تکرار انجام شدند. در تمامی ۲۴ آزمایش، میکرواستخراج بر اساس روش کار زیر انجام گردید. در یک ظرف نمونه، ۱/۰ میلی‌لیتر از محلول ۱۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر کلرودیازپوکساید و ۱/۰ میلی‌لیتر محلول آلپرازولام ۱۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر، ۱/۰ میلی‌لیتر بافر فسفاتی با pH مورد نظر، مقدار نمک مورد نظر افزوده شد و سپس با آب تقطیر به حجم ۱۰/۰ میلی‌لیتر رسانده شد سپس، به‌وسیله میکرو پیپت حجم مشخصی از ۱-آندکانول به عنوان حلال استخراج و غلظت مشخصی از سورفاکتانت CTAB به عنوان امولسیفایر به محلول نمونه اضافه شد و به حجم نهایی ۱۰/۰ میلی‌لیتر رسید. پس از آن، لوله آزمایش را در حمام فراصوت با فرکانس مافوق صوت ۶۰ کیلو هرتز به مدت مشخصی در ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد که در این مرحله آنالیت‌ها در قطرات ریز حلال آلی استخراج شدند. سپس محلول نمونه با دور ۳۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰/۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. پس از آن، لوله آزمایش به حمام یخ منتقل و حلال آلی شناور به صورت قطره جامد درآمد. سپس قطره آلی منجمدشده به یک ویال مخروطی توسط یک قاشق پزشکی کوچک منتقل شد که در دمای اتاق ذوب شده و سپس 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 که نتایج حاصله نیز در

جدول (۳-۶) آورده شده است.

جدول (۳-۶): طرح پلاکت-برمن و نتایج به‌دست آمده با ۵ فاکتور و ۲ بار تکرار برای پاسخ پیش تغلیظ و اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام

شماره آزمایش	pH	حجم حلال استخراج	اثر نمک	زمان استخراج	غلظت سورفاکتانت	پاسخ
۱	-	-	-	+	+	۹۱۳/۰۲
۲	+	+	+	-	+	۱۴۰۸/۶۴
۳	+	+	+	-	+	۱۱۹۴/۱۵
۴	-	-	-	+	+	۱۰۷۳/۱۴
۵	-	+	+	+	-	۴۹۹/۳۱
۶	+	-	-	-	+	۱۴۷۶/۶۷
۷	-	+	-	-	-	۳۲۱/۵۹
۸	+	+	-	+	-	۱۰۶۵/۳۰
۹	+	-	-	-	+	۱۶۰۷/۷۳
۱۰	-	+	+	-	+	۹۶۵/۰۵
۱۱	+	-	+	-	-	۲۲۴۶/۴۶
۱۲	+	+	-	+	+	۳۵۲/۳۰
۱۳	-	+	+	+	-	۴۹۲/۱۲
۱۴	+	+	-	+	+	۱۵۲۰/۱۲
۱۵	-	-	+	+	+	۱۹۰۱/۷۴
۱۶	-	-	-	-	-	۱۹۸۵/۳۰
۱۷	+	-	+	+	-	۲۵۵۵/۳۷
۱۸	+	-	+	-	-	۲۰۳۶/۶۰
۱۹	+	+	-	+	-	۱۱۳۰/۶۹
۲۰	-	-	+	+	+	۲۰۶۱/۴۴
۲۱	-	+	-	-	-	۵۹۷/۲۳
۲۲	+	-	+	+	-	۲۴۵۶/۳۰
۲۳	-	+	+	-	+	۹۰۳/۲۱
۲۴	-	-	-	-	-	۲۰۰۵/۶۴

۳-۴-۱-۱-الف- تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از طرح پلاکت-برمن و تعیین

عوامل مهم

پس از انجام آزمایش‌های طراحی شده، داده‌های حاصل، با استفاده از نرم افزار ۱۶ Minitab جهت ارزیابی فاکتورهای مهم، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نتایج حاصل از تحلیل در جدول (۳-۷) آورده شده است.

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

عبارت	اثر	ضریب ^۱	خطای استاندارد ضریب ^۲	T	ارزش P ^۳
pH	۴۴۴/۳	۲۲۰/۲	۷۴/۵	۲/۹۸	۰/۰۱۲
E.S.V	-۹۸۹/۱	-۴۹۴/۶	۷۴/۵	-۶/۶۴	۰/۰۰۰
St	۳۸۹/۳	۱۹۴/۶	۷۴/۵	۲/۶۱	۰/۰۱۲
E.t	-۶۰/۶	-۳۰/۳	۷۴/۵	-۰/۴۱	۰/۶۸۹
S.C	-۱۶۷/۹	-۸۳/۹	۷۴/۵	-۱/۱۳	۰/۲۷۵

در این جدول ضرایب رگرسیونی نیز آورده شده است. حال به طور خلاصه پارامترهای حاصل از این بررسی توضیح داده خواهد شد.

اثر: مقدار اثر هر متغیر از رابطه زیر به دست می‌آید [۶۷].

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

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

^۱-Coefficient

^۲-Standard error of coefficient

^۳-P value

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 حجم حلال استخراج بیشترین است، به عبارت دیگر کاهش حجم حلال استخراج باعث افزایش پاسخ می‌شود.

ضریب: تغییر در میانگین پاسخ را به ازاء هر واحد افزایش در X ، وقتی که سایر فاکتورها ثابت نگه داشته شوند، برآورد می‌کند و به صورت زیر محاسبه می‌گردد. با توجه به ضرایب نشان داده شده در جدول (۷-۳) هر چه مقدار ضریب بیشتر باشد تاثیر آن اثر بر روی پاسخ بیشتر است، بنابراین با توجه به ضرایب نشان داده شده در جدول (۷-۳)، حجم حلال استخراج بالاترین ضریب را دارد در نتیجه تاثیر 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 تاثیر گذاشته و مقدار آن مثبت است و همچنین مقدار کوچکتر آن نشان‌دهنده برآورد دقیق‌تر است [۶۸].

آماره t : برای بررسی معنی دار بودن یک فاکتور به کار می‌رود، بدین نحو 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 [۶۸]. با توجه به نتایج در جدول (۷-۳) مقدار t مربوط به حجم حلال استخراج بیشتر، در نتیجه تاثیر آن بر روی پاسخ بیشتر است.

$$t = \frac{\text{ضریب}}{\text{ضریب خطای استاندارد}} \quad (3-3)$$

ارزش P: برای تصمیم گیری در مورد رد یا عدم رد فرضیه صفر در آزمون فرض‌ها بکار 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 $0/05$ ($P < 0/05$) به عنوان نقطه حد در نظر گرفته شد. بنابراین برای فاکتورهای با ارزش P کمتر $0/05$ فرضیه صفر رد می‌شود و به عنوان فاکتور موثر در پاسخ شناخته می‌شوند در حالی که فاکتورهای با ارزش P بیشتر از $0/05$ به عنوان فاکتور غیرموثر بر پاسخ شناخته می‌شوند. بنابراین با توجه به مقدار P در جدول (3-7)، pH، حجم حلال استخراج و اثر نمک به عنوان فاکتورهای موثر و زمان استخراج و غلظت سورفاکتانت به عنوان فاکتور غیرموثر شناخته شدند.

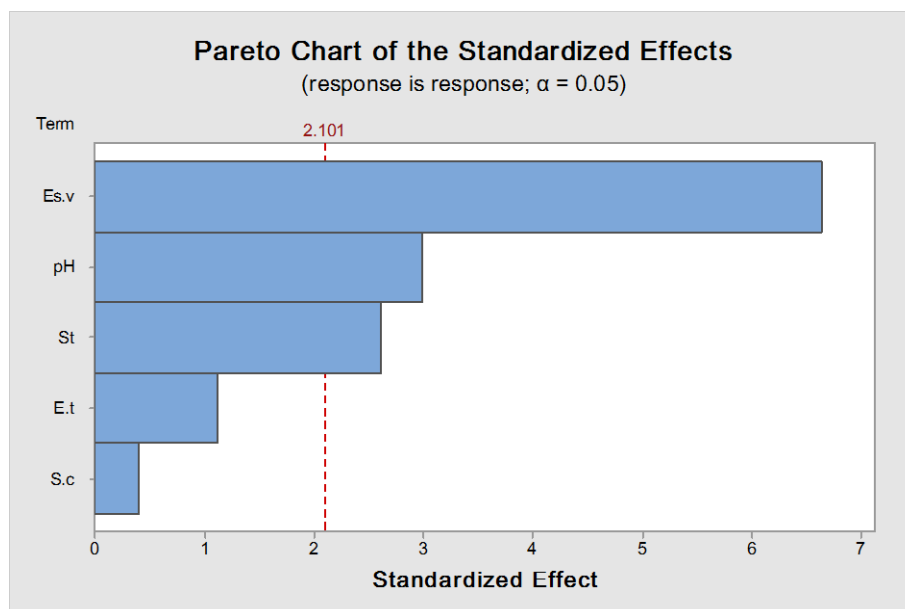
همچنین نمودارهایی که می‌توانند در تعیین فاکتورهای اصلی کمک کنند، نمودارهای پارتو^۱، نمودار احتمال نرمال^۲ و نمودار نیمه نرمال^۳ می‌باشند.

نمودار پارتو: نموداری است برای تعیین اهمیت اثرات که در آن از آزمون t استفاده شده است تا اختلاف معنادار 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 طبق رابطه (3-4) در سطح اطمینان ۹۵٪ از جدول t محاسبه می‌شود. فاکتورهایی که مقدار t آنها سمت راست خط مبنا قرار گرفته‌اند دارای اثر معنادار در سطح اطمینان ۹۵٪ می‌باشند. نمودار پارتو برای پنج فاکتور مورد بررسی در طرح پلاکت-برمن در شکل (3-8) نشان داده شده است. همانطور که نمودار نشان می‌دهد، متغیرهای pH، حجم حلال استخراج و اثر نمک به عنوان فاکتورهای موثر بر راندمان استخراج مشخص شدند.

¹-Pareto chart

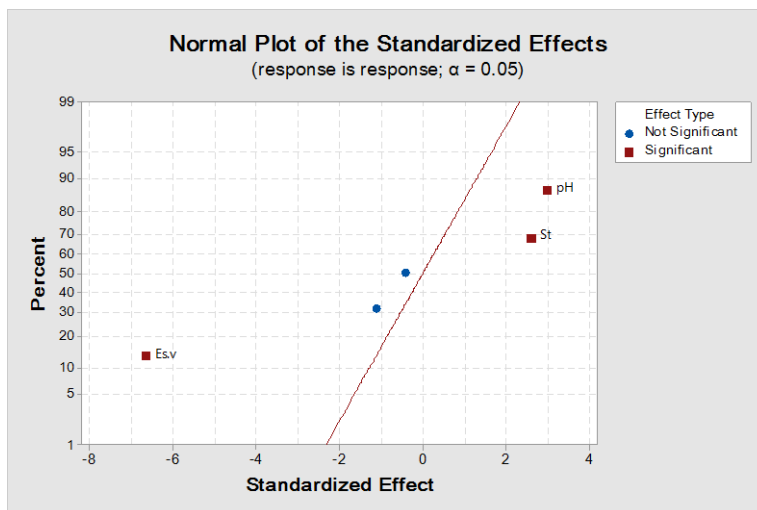
²-Normal Probability Plot

³-Half Normal Plot



شکل (۳-۸): نمودار پارتو اثر فاکتورها بر پیش تغلیظ و اندازه‌گیری کلرودیاژپوکساید آلپرازولام

نمودار احتمال نرمال: برای مقایسه اثرات اصلی و برهم‌کنش اثرات 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 هستند 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 برآزش قرار دارند دارای اثر مثبت و نقاطی که در سمت چپ آن قرار دارند دارای اثر منفی می‌باشند [۶۸]. همانطور که در شکل (۳-۹) مشاهده می‌شود متغیرهای pH، حجم حلال استخراج و اثر نمک به عنوان فاکتورهای مهم شناسایی شدند که دو فاکتور pH و اثر نمک دارای اثر مثبت و عامل حجم حلال استخراج دارای اثر منفی می‌باشد.



شکل (۳-۹): نمودار احتمال نرمال اثر فاکتورها بر پیش تغلیظ و اندازه گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام

۳-۴-۲- کاربرد طرح باکس بنکن جهت به دست آوردن شرایط بهینه فاکتورهای

موثر بر پیش تغلیظ و اندازه گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام

با توجه به نتایج مشاهده شده در قسمت‌های قبل، سه فاکتور pH، حجم حلال استخراج و اثر نمک به عنوان مهم‌ترین فاکتورهای موثر بر میزان پاسخ اندازه‌گیری شده برای کلرودیازپوکساید و آلپرازولام تعیین شدند. در این قسمت برای تعیین مقادیر بهینه هر کدام از این فاکتورها از روش بهینه‌سازی باکس-بنکن استفاده شد. در این طرح که بر مدل سازی تأکید می‌شود مطالعه هر یک از فاکتورها در بیش از دو سطح لازم است و تنها فاکتورهای موثر مشخص شده از طرح پلاکت-برمن در سه سطح بالا، میانی و پایین مورد بررسی قرار می‌گیرند. در جدول (۳-۸) مقادیر سطوح بالا، میانی و پایینی برای هر یک از فاکتورها نشان داده شده است. انتخاب این سطوح با توجه به نتایج حاصل از بهینه‌سازی یک متغیر در یک زمان انتخاب گردید.

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

فاکتور	سطح پایین (-۱)	سطح میانی (۰)	سطح بالا (+۱)
pH	۲/۵۰	۵/۷۵	۹/۰۰
حجم حلال استخراج کننده	۱۵/۰	۵۷/۵	۱۰۰/۰
اثر نمک	٪۰/۱۰	٪۰/۰۵	٪۱/۰

هچنین لازم به ذکر است که در تمام آزمایش‌هایی که بر اساس طرح باکس- بنکن انجام می‌شود، سایر فاکتورهای غیرموثر در مقدارهایی که با توجه به علامت اثرشان (۱+ نشان دهنده سطح بالا و ۱- نشان دهنده سطح پایین) در طرح پلاکت بر من بدست آمده‌اند، ثابت باقی می‌مانند، بنابراین در آزمایش‌های انجام شده مدت زمان استخراج ۱ دقیقه و غلظت سورفاکتانت ۰/۰۱ میلی گرم بر لیتر به کار گرفته شد.

۳-۴-۲-۱- اجرای طرح باکس-بنکن

برای طراحی آزمایش‌ها به منظور بررسی برهم کنش بین فاکتورها و همچنین برای تعیین مقدار بهینه هر فاکتور در اندازه گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام از نرم افزار Minitab 16 برای ایجاد طرح باکس- بنکن و پردازش داده‌ها استفاده شد. همانطور که در بخش ۲-۸-۴-۱ بیان شد، تعداد آزمایش‌ها هنگامی که در طرح باکس- بنکن، ۳ فاکتور در یک بلوک با ۲ بار تکرار و ۱ نقطه مرکزی مورد بررسی قرار گیرد برابر با ۲۶ آزمایش می‌باشد. در جدول (۳-۹) طرح مورد نظر و سیگنال‌های ثبت شده در آزمایش‌های انجام شده مطابق با طرح باکس- بنکن آمده است. لازم به ذکر است که آزمایش پیش تغلیظ بر اساس روش کار زیر انجام گردید.

در یک ظرف نمونه، ۱/۰ میلی لیتر از محلول ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر کلرودیازپوکساید و ۱/۰ میلی لیتر محلول آلپرازولام ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر، ۱/۰ میلی لیتر بافر فسفاتی با pH مورد نظر، مقدار نمک مورد نظر افزوده شد و سپس با آب تقطیر به حجم ۱۰/۰ میلی لیتر رسانده شد سپس، به وسیله میکرو پیپت حجم مشخصی از ۱-آندکانول به عنوان حلال استخراج و غلظت سورفاکتانت CTAB ۰/۱، به محلول نمونه اضافه شد و به حجم نهایی ۱۰/۰ میلی لیتر رسید. پس از آن، لوله آزمایش را در حمام فراصوت با فرکانس مافوق صوت ۶۰ کیلو هرتز به مدت ۱/۰ 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 ۳۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰/۰ دقیقه 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 که در دمای اتاق ذوب شده و سپس 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 تجزیه ای مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج تجربی بدست آمده از انجام آزمایش ها با روش ANOVA تحلیل و بررسی شدند، که در این بررسی اثرات خطی، درجه دوم و برهمکنش ها نیز در نظر گرفته شدند. جدول (۳-۱۰) و جدول (۳-۱۱) ضرایب رگرسیون و سایر پارامترهای آماری مربوط به فاکتورهای داده شده در مدل که شامل خود فاکتورها و برهمکنش های آنها می باشد را نشان می دهد. همانطور که قبلا اشاره شد ضرایب با ارزش P کوچکتر از ۰/۰۵ (در سطح $\alpha=0/05$) معنی دار است و متناظر با سطح اطمینان ۹۵ درصد برای این آزمون است.

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

شماره آزمایش	pH	اثر نمک	حجم حلال استخراج	پاسخ کلرودیازپوکساید	پاسخ آلپرازولام
۱	+۱	۰	+۱	۳۳۰/۰۳	۲۴۳/۰۳
۲	-۱	۰	-۱	۲۴۰/۱۰	۱۶۶/۴۱
۳	-۱	-۱	۰	۴۳۰/۳۶	۲۷۹/۷۴
۴	۰	۰	۰	۱۱۹۵/۵۶	۱۰۴۶/۸۸
۵	-۱	۰	+۱	۳۵۱/۸۱	۱۸۹/۳۰
۶	-۱	۰	-۱	۲۵۴/۶۲	۱۵۶/۶۶
۷	+۱	+۱	۰	۴۵۸/۹۰	۳۳۵/۳۹
۸	-۱	۰	+۱	۳۴۷/۸۱	۲۰۴/۱۲
۹	۰	+۱	-۱	۶۰۸/۴۰	۵۳۲/۱۸
۱۰	-۱	-۱	۰	۴۲۰/۳۲	۳۱۲/۲۸
۱۱	+۱	-۱	۰	۸۸۶/۷۰	۷۴۴/۳۷
۱۲	+۱	+۱	۰	۴۵۳/۸۲	۳۳۵/۳۹
۱۳	۰	۰	۰	۱۱۹۵/۵۶	۱۰۴۶/۸۸
۱۴	-۱	+۱	۰	۵۲۶/۱۸	۳۴۵/۲۵
۱۵	۰	-۱	+۱	۳۷۲/۴۶	۳۷۲/۵۰
۱۶	۰	+۱	-۱	۶۰۸/۴۰	۵۳۲/۱۸
۱۷	۰	-۱	-۱	۸۰۸/۷۷	۸۰۲/۹۴
۱۸	۰	+۱	+۱	۴۲۷/۲۳	۳۸۷/۳۹
۱۹	-۱	+۱	۰	۵۵۰/۳۹	۳۴۵/۲۵
۲۰	+۱	-۱	۰	۱۰۰۲/۸۵	۸۳۴/۷۹
۲۱	+۱	۰	-۱	۸۳۹/۷۵	۴۲۷/۲۳
۲۲	۰	+۱	+۱	۵۵۰/۳۹	۴۰۹/۱۳
۲۳	۰	-۱	-۱	۸۰۷/۲۳	۷۹۹/۲۷
۲۴	+۱	۰	+۱	۳۵۸/۰۳	۲۴۳/۰۳
۲۵	۰	-۱	+۱	۵۴۰/۳۹	۴۶۰/۹۶
۲۶	+۱	۰	-۱	۸۳۹/۷۵	۶۴۵/۶۲

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

عبارت	ضریب	خطای استاندارد ضریب	T	P
Constant	۱۱۹۵/۶	۳۸/۴	۳۱/۱۳	۰/۰۰۰
pH	۱۲۸/۰	۱۳/۶	۹/۴۳	۰/۰۰۰
St	-۶۷/۸	۱۳/۶	-۵/۰۰	۰/۰۰۰
E.S.V	-۱۰۸/۱	۱۳/۶	-۷/۹۶	۰/۰۰۰
pH*pH	-۳۷۴/۸	۲۵/۴	-۱۴/۷۵	۰/۰۰۰
St*St	-۲۲۹/۶	۲۵/۴	-۹/۰۴	۰/۰۰۰
E.S.V* E.S.V	-۳۷۵/۶	۲۵/۴	-۱۴/۷۸	۰/۰۰۰
pH*St	-۱۵۰/۳	۲۵/۴	-۷/۳۸	۰/۰۰۰
pH* E.S.V	-۱۴۹/۵	۱۹/۲	-۷/۷۹	۰/۰۰۰
St* E.S.V	۵۸/۰	۱۹/۲	۳/۰۲	۰/۰۰۸

همانطور که مشخص است عبارات pH، اثر نمک، حجم حلال استخراج، برهمکنش‌های pH*pH، St*St، E.S.V* E.S.V، pH*St و pH* E.S.V دارای مقدار P کمتر از ۰/۰۵ بوده و به طور آماری معنی دار می‌باشند و برهمکنش St* E.S.V به دلیل دارا بودن p بالاتر از ۰/۰۵ معنی دار نبوده و لذا عبارت-هایی 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 کلرودیازپوساید به صورت زیر پیشنهاد می‌شود که در آن R همان متغیر پاسخ می‌باشد.

$$\text{Response} = 1195/6 + 128/0 \text{ pH} - 67/8 \text{ St} - 108/1 \text{ E.S.V} - 374/8 \text{ pH} \times \text{pH} - 229/6 \text{ St} \times \text{St} - 375/06 \text{ E.S.V} \times \text{E.S.V} - 150/3 \text{ pH} \times \text{St} - 149/5 \text{ pH} \times \text{E.S.V} + 58/0 \text{ St} \times \text{E.S.V} \quad (5-3)$$

$$R^2 = 0.97/46 \quad R^2_{\text{adj}} = 0.96/03$$

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

عبارت	ضریب	خطای استاندارد ضریب	T	P
Constant	۱۰۴۶/۹	۴۰/۸	۲۵/۶۴	۰/۰۰۰
pH	۱۱۲/۰	۱۴/۴	۷/۷۶	۰/۰۰۰
St	۸۵/۴	۱۴/۴	-۵/۹۲	۰/۰۰۰
E.S.V	-۹۷/۱	۱۴/۴	-۶/۷۲	۰/۰۰۰
pH*pH	-۴۲۷/۹	۲۷/۰	-۱۵/۸۴	۰/۰۰۰
St*St	-۱۷۵/۲	۲۷/۰	-۶/۴۹	۰/۰۰۰
E.S.V* E.S.V	-۳۳۴/۶	۲۷/۰	-۱۲/۳۹	۰/۰۰۰
pH*St	-۱۲۸/۱	۲۰/۴	-۶/۲۸	۰/۰۰۰
pH* E.S.V	-۸۲/۱	۲۰/۴	-۴/۲۰	۰/۰۰۰
St* E.S.V	۶۲/۶	۲۰/۴	۳/۷۰	۰/۰۰۷

همچنین ساده-ترین مدل مربوط به پاسخ آلپرازولام به صورت زیر پیشنهاد می‌شود.

$$\text{Response} = 1046/9 + 112/0 \text{ pH} - 85/4 \text{ St} - 97/1 \text{ E.S.V} - 427/9 \text{ pH} \times \text{pH} - 175/2 \text{ St} \times \text{St} - 334/6 \text{ E.S.V} \times \text{E.S.V} - 128/1 \text{ pH} \times \text{St} - 82/1 \text{ pH} \times \text{E.S.V} + 62/6 \text{ St} \times \text{E.S.V} \quad (3-6)$$

$$R^2 = 0.96/90 \quad R^2_{\text{adj}} = 0.95/16$$

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.

$$R^2 = 1 - \left[\frac{SS_{\text{Residual}}}{SS_{\text{Residual}} + SS_{\text{model}}} \right] = \frac{SS_{\text{model}}}{SS_{\text{total}}} \quad (3-7)$$

^۱-Determinaton coefficient

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 کلرودیازپوساید و ۹۷/۴۶ درصد می‌باشد که نشان می‌دهد ۹۷/۴۶ درصد تغییرات در متغیر وابسته می‌تواند توسط متغیر مستقل توضیح داده شود، همچنین مقدار ضریب تعیین (R^2) برای پاسخ آلپرازولام در اندازه‌گیری همزمان کلرودیازپوکساید و آلپرازولام ۹۶/۹۰ درصد می‌باشد

ضریب تعیین تعدیل شده^۱: ضریب تعیین تعدیل شده یکی از پارامترهایی 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.

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

که در این رابطه $DF_{Residual}$ درجه آزادی باقی مانده و DF_{model} درجه آزادی مدل می‌باشد. برخلاف R^2 ، مقدار R^2 تعدیل شده (که مقدار آن برای پاسخ کلرودیازپوکساید برابر با ۹۷/۴۶٪ و برای پاسخ آلپرازولام برابر با ۹۶/۹۰٪ می‌باشد) ممکن است با اضافه شدن پارامتر کوچکتر شود.

^۱-Adjusted R squared

۳-۴-۲-۲-ارزیابی مدل

برای اطمینان از اینکه مدل بدست آمده، مدل مناسبی است که توانایی پیش بینی نمونه‌های مختلفی از یک جمعیت را داراست، باید مدل را ارزیابی کرد. لازم به ذکر است که در ارزیابی مدل فرضیات زیر باید محقق شود.

۱- پاسخ به دست آمده به خوبی با مدل توضیح داده شود.

۲- داده پرت وجود نداشته باشد.

۳- توزیع باقی مانده‌ها نرمال باشد.

۴- تغییرات خطاها مستقل باشد.

۵- واریانس ثابت باشد.

برای ارزیابی مدل بدست آمده از روش تحلیل واریانس و بررسی باقی مانده‌ها استفاده گردید که در این ارزیابی‌ها از طریق شاخص‌های کمی صحت نتایج ارائه شده توسط مدل مورد سنجش قرار می‌گیرند.

۳-۴-۲-۳-تحلیل واریانس

با در نظر گرفتن عوامل اصلی، مدل ریاضی برای پاسخ مربوط به پیش تغلیظ و اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام طبق معادله (۳-۴) 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 کلرودیازپوکساید و جدول (۳-۱۳) برای آلپرازولام نشان داده شده است.

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

Source	DF ^۱	Adj SS ^۲	Adj MS ^۳	F	P
Regression	۹	۱۸۱۰۱۶۸	۲۰۱۱۳۰	۶۸/۱۶	۰/۰۰۰
Linear	۳	۵۲۲۶۳۹	۱۷۴۲۱۳	۵۹/۰۴	۰/۰۰۰
Square	۳	۹۰۰۹۰۲	۳۰۰۳۰۱	۱۰۱/۷۷	۰/۰۰۰
Interaction	۳	۳۸۶۶۲۷	۱۲۸۸۷۶	۴۳/۶۸	۰/۰۰۰
Residual Error	۱۶	۴۷۲۱۱	۲۹۵۱	۶۳/۳۱	-
Lack-of-Fit	۳	۱۷۹۱۷	۵۹۷۲	۲/۶۵	۰/۰۹۳
Pure Error	۱۳	۲۹۲۹۴	۲۲۵۳	-	-
Total	۲۵	-	-	-	-

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

Source	DF ^۴	Adj SS ^۵	Adj MS ^۶	F	P
Regression	۹	۱۶۶۷۳۴۹	۱۸۵۲۶۱	۵۵/۵۶	۰/۰۰۰
Linear	۳	۴۶۸۱۴۹	۱۵۶۰۵۰	۴۶/۸۰	۰/۰۰۰
Square	۳	۹۸۲۵۶۴	۳۲۷۵۲۱	۹۸/۲۳	۰/۰۰۰
Interaction	۳	۲۱۶۶۳۶	۷۲۲۱۲	۲۱/۶۶	۰/۰۰۰
Residual Error	۱۶	۵۳۳۴۹	۳۳۳۴	-	-
Lack-of-Fit	۳	۲۰۵۷۱	۶۸۵۷	۲/۷۲	۰/۰۸۷
Pure Error	۱۳	۳۲۷۷۸	۲۵۲۱	-	-
Total	۲۵	-	-	-	-

عدم برازش^۷: ارتباط بین فاکتورها و پاسخ را نشان می‌دهد. با توجه به نتایج به دست آمده، مقدار P

مربوط به عدم برازش مدل برای کلرودیازپوکساید ($p=۰/۰۹۳$) و آلپرازولام ($p=۰/۰۸۷$) بیشتر از $۰/۰۵$

می‌باشد که نشان می‌دهد بین مدل و داده‌های تجربی تطابق خوبی دارد.

^۱ Degrees of Freedom
^۲ Adjusted Sum of Square
^۳ Adjusted Mean Square
^۴ Degrees of Freedom
^۵ Adjusted Sum of Square
^۶ Adjusted Mean Square
^۷ Lack-of-fit

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، p تعداد متغیرهای مستقل مدل، n تعداد کل ترکیبات مربوط به مدل (تعداد کل آزمایش‌ها) و df_{res} نیز درجه آزادی باقیمانده‌ها است. SSR و SSE نیز در روابط (۳-۸) و (۳-۶) توضیح داده شدند. هر چه مقدار میانگین مربع فاکتور به باقی مانده بیشتر باشد، مقدار F بیشتر که با توجه به مقادیر به‌دست آمده در جدول (۳-۱۱) مقدار F مربوط به اثرات مربع پارامترها برای کلرودیازپوکساید و آلپرازولام بیشتر و در نتیجه تاثیر آن فاکتورها بر پاسخ بیشتر است. مقدار Adj MS، از تقسیم Adj SS بر درجه آزادی به‌دست می‌آید که در محاسبه آماره F بکار می‌رود. خطای خالص^۱ برای یک سری داده‌های تکراری به کار می‌رود.

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

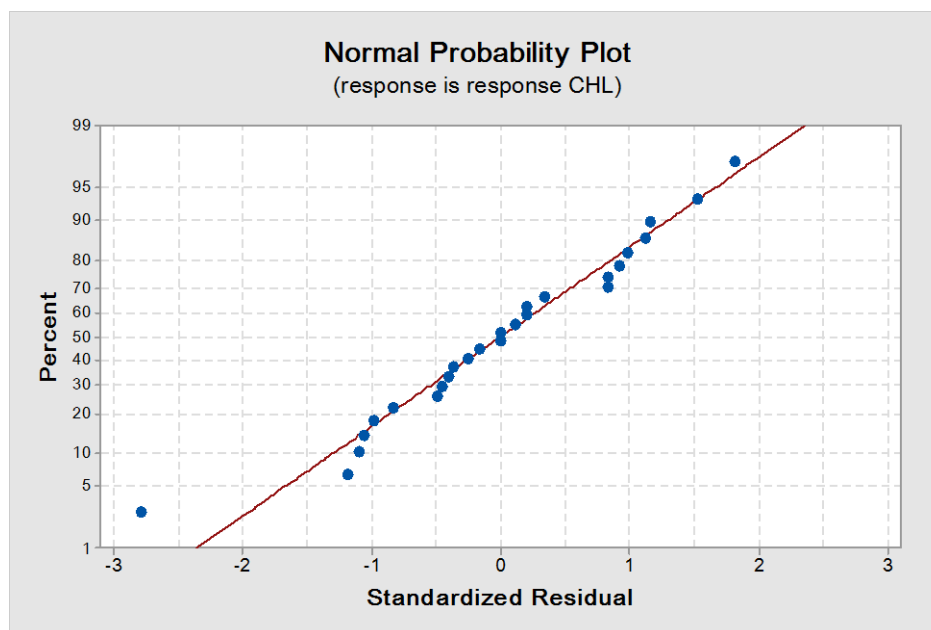
از آنجایی که در محاسبه‌ی آماره‌های t و F برای آزمون‌های رگرسیون و همچنین در محاسبه فواصل اطمینان، از فرض نرمال بودن خطاها استفاده می‌کنیم، لذا انحراف‌های بزرگ از توزیع نرمال می‌تواند روی صحت و اعتبار نتایج بدست آمده تاثیر زیادی بگذارد. یک روش ساده برای بررسی فرض نرمال بودن رسم نمودار احتمال نرمال باقی مانده‌ها است. زیرا این نمودار الگوی تقریباً خطی سازگار با توزیع نرمال را نشان می‌دهد اگر باقی مانده‌ها دارای توزیع نرمال باشند، عموماً نقاط باید روی یک خط راست قرار گیرند و در

¹ Pure Error

²-Normal probability of plot

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^۱ را می‌توان برای تعیین نرمال بودن باقی مانده‌ها بکار برد، در صورتی که مقدار احتمال از سطح α ی مورد نظر کمتر باشد داده‌ها از توزیع نرمال پیروی نمی‌کنند.

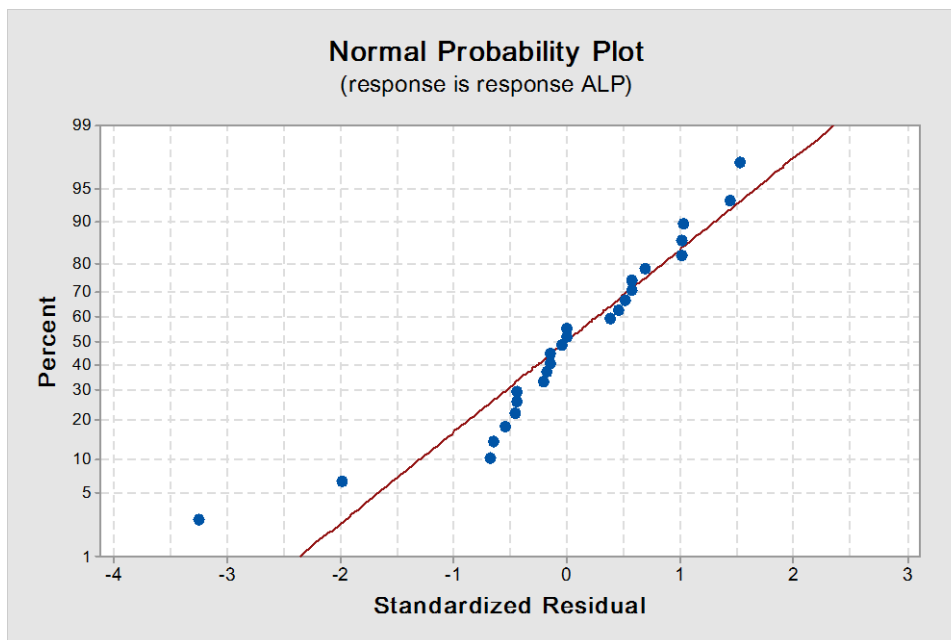
نمودار مربوط به توزیع باقی مانده‌ها و بررسی نرمال بودن این توزیع در شکل (۳-۱۰) نشان داده شده است. در اینجا مقدار P بزرگتر از ۰/۰۵ است که نشان می‌دهد توزیع باقی مانده‌ها نرمال است [۷۰۶۹].



شکل (۳-۱۰): نمودار باقی مانده‌ها برای پیش تغلیظ و اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام در طراحی باکس -

بنکن مربوط به پاسخ کلرودیازپوکساید

^۱-Anderson-Darling



شکل (۳-۱۱): نمودار باقی مانده‌ها برای پیش تغلیظ و اندازه‌گیری کلرود یازپوکساید و آلپرازولام در طراحی باکس -

بنکن مربوط به پاسخ آلپرازولام

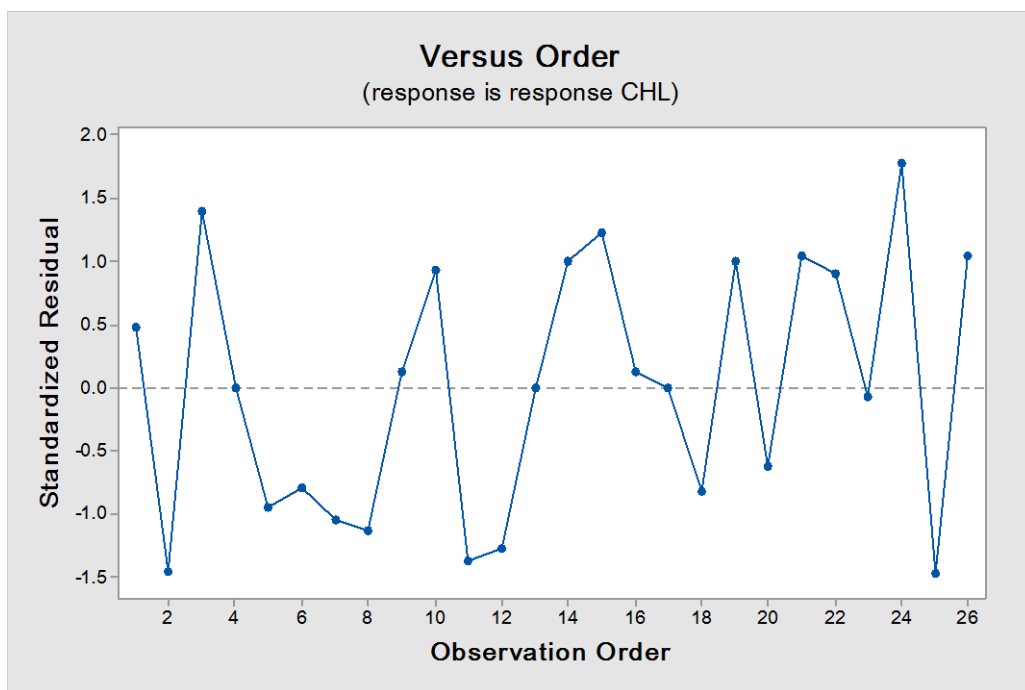
۳-۴-۲-۵- نمودار باقی مانده در برابر ترتیب زمان^۱

در بررسی همبستگی بین باقی مانده‌ها، رسم نمودار باقی مانده‌ها نسبت به ترتیب زمان جمع‌آوری داده‌ها مفید است. و از این نمودار برای یافتن خطای غیر تصادفی استفاده می‌شود. یک همبستگی مثبت توسط دسته ای 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 نسبت به طرف دیگر نشان می‌دهد. اگر این نمودار طرح خاصی نداشته باشد مبین فرض وجود استقلال خطا است. در صورتی که باقی مانده‌ها در برابر زمان سیر افزایشی داشته باشند، نشان دهنده آن است که واریانس‌ها ثابت نبوده و به مرور زمان افزایش می‌یابد [

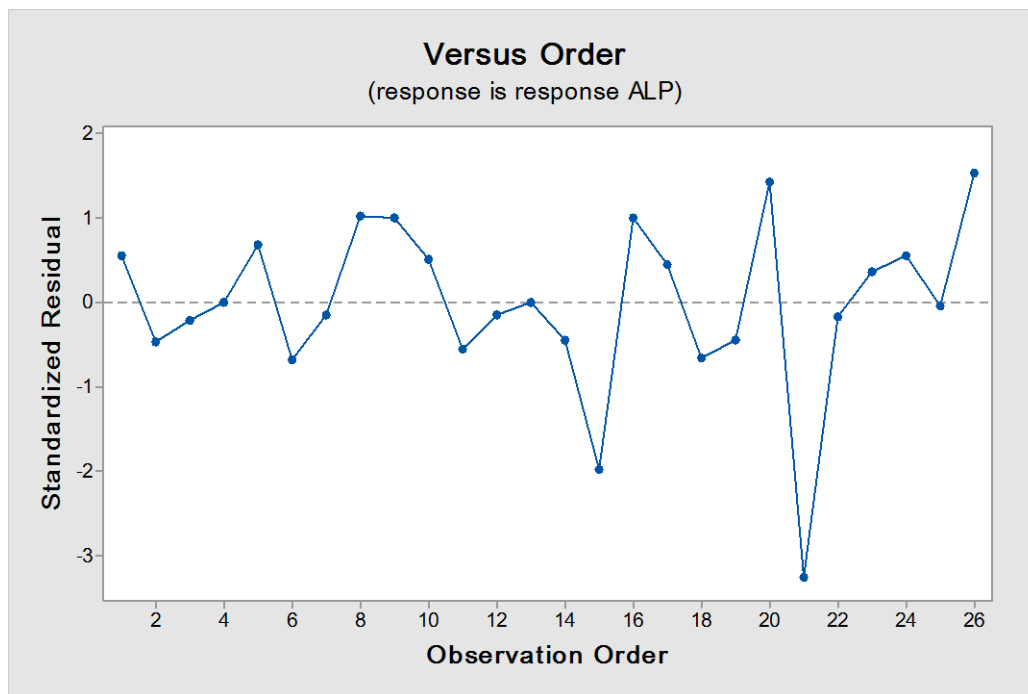
^۱-Residuals versus order of time

۷۰ و ۶۹. با توجه به شکل (۱۲-۳) و (۱۳-۳) همبستگی کمی بین داده‌ها مشاهده می‌شود که نشان‌دهنده

استقلال خطاهاست [۶۹].



شکل (۱۲-۳): نمودار باقی‌مانده‌ها به ترتیب زمان جمع‌آوری برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام در طراحی باکس-بنکن مربوط به پاسخ کلرودیازپوکساید



شکل (۳-۱۳): نمودار باقی‌مانده‌ها به ترتیب زمان جمع‌آوری برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام در طراحی باکس-بنکن مربوط به پاسخ آلپرازولام

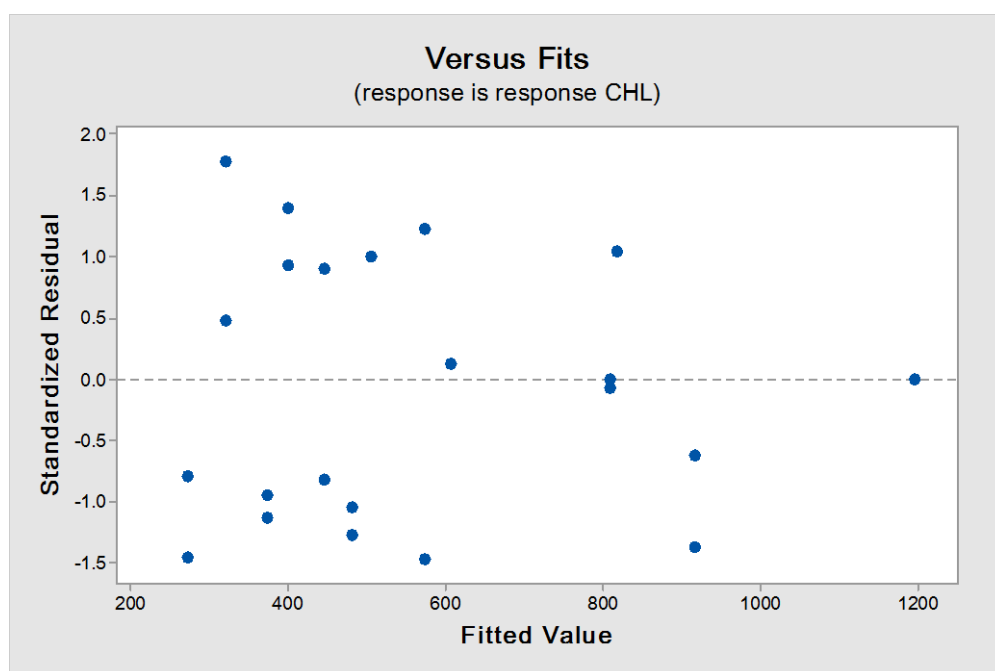
۳-۴-۲-۶- نمودار باقی‌مانده‌ها در مقابل مقادیر برازش شده^۱

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 دور تر از سایر نقاط واقع شود، ممکن است آن نقطه، نقطه پرت باشد و همچنین ممکن است هیچ الگوی قابل تشخیصی در نمودار باقی‌مانده‌ها پیدا نشود. موارد زیر مشخص‌کننده خطای غیر تصادفی هستند:

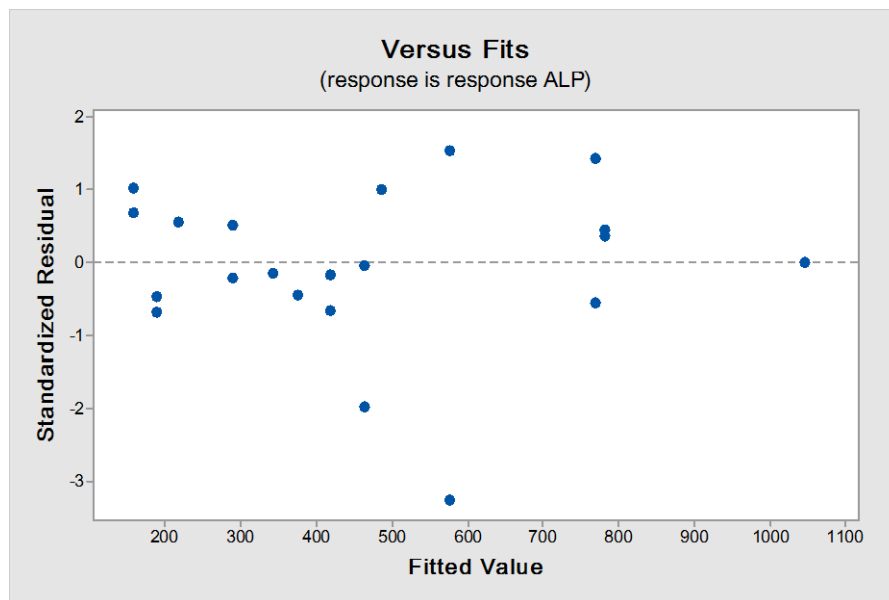
^۱-Residuals versus fits

- یکسری از نقاط صعودی یا نزولی
- اکثر داده‌ها مثبت یا اکثر آن‌ها منفی باشند
- وجود الگویی مانند باقی مانده‌های افزایشی با برآزش‌های افزایشی

شکل (۳-۱۴) و (۳-۱۵) نشان می‌دهد که پراکندگی دو طرف خط صفر تقریباً یکسان است.



شکل (۳-۱۴): نمودار باقیمانده در مقابل مقدار برآزش برای پیش تغلیظ و اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام در طراحی باکس- بنکن مربوط به پاسخ کلرودیازپوکساید



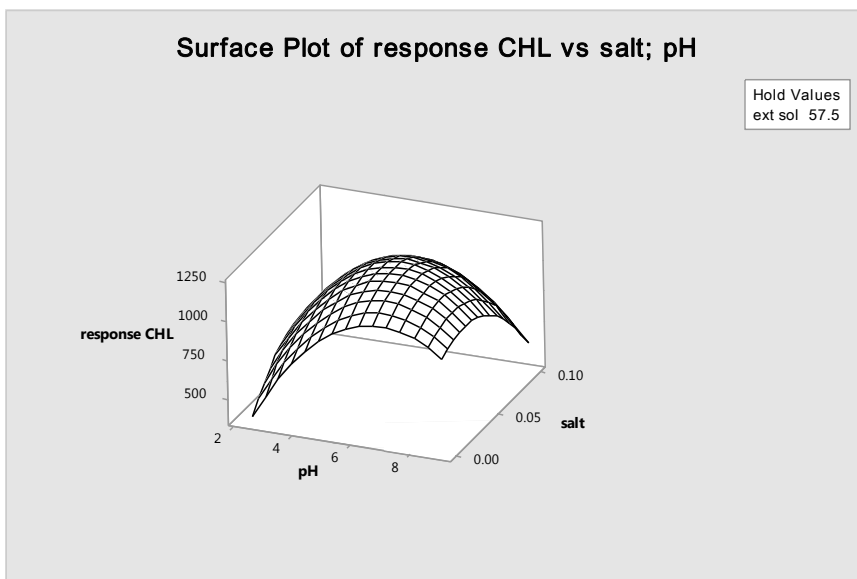
شکل (۳-۱۵): نمودار باقیمانده در مقابل مقدار برازش برای پیش تغلیظ و اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام در طراحی باکس- بنکن مربوط به پاسخ آلپرازولام

۳-۴-۲-۷- منحنی‌های رویه پاسخ^۱

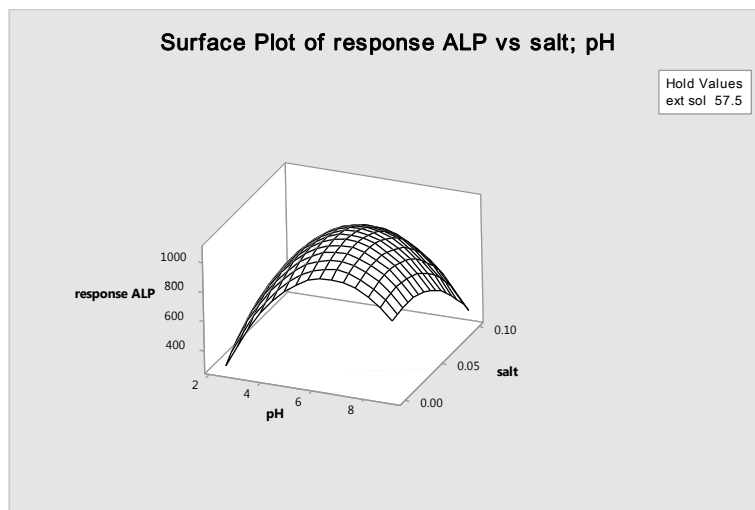
تجسم فضایی معادله پیش‌بینی شده می‌تواند بوسیله منحنی رویه پاسخ بدست آید. این نمایش گرافیکی، یک سطح n بعدی در فضای $(n+1)$ بعد است و معمولاً نمایش ۲ بعدی یک طرح ۳ بعدی را می‌توان رسم کرد. بنابراین اگر ۳ یا تعداد بیشتری متغیر وجود داشته باشد، تنها اگر یک یا تعداد بیشتری از متغیرها ثابت نگه داشته شوند، رسم منحنی پاسخ ممکن می‌شود. شکل‌های (۳-۱۷) تا (۳-۲۰) این منحنی‌ها را برای اندازه‌گیری کلرودیازپوساید و آلپرازولام نشان می‌دهند، که در شکل (۳-۱۷) و (۳-۱۸) با ثابت نگه داشتن حجم حلال استخراج در سطح میانی آن (۵/۵ میکرولیتر) با افزایش pH تا مقدار ۶/۵ پاسخ افزایش و بالاتر از این مقدار پاسخ کاهش می‌یابد، همچنین با افزایش مقدار نمک تا ۰/۳ درصد مقدار پاسخ افزایش و بیشتر از این مقدار پاسخ کاهش می‌یابد، و با توجه به شکل (۳-۱۶) و (۳-۱۹) با

^۱-Surface response plot

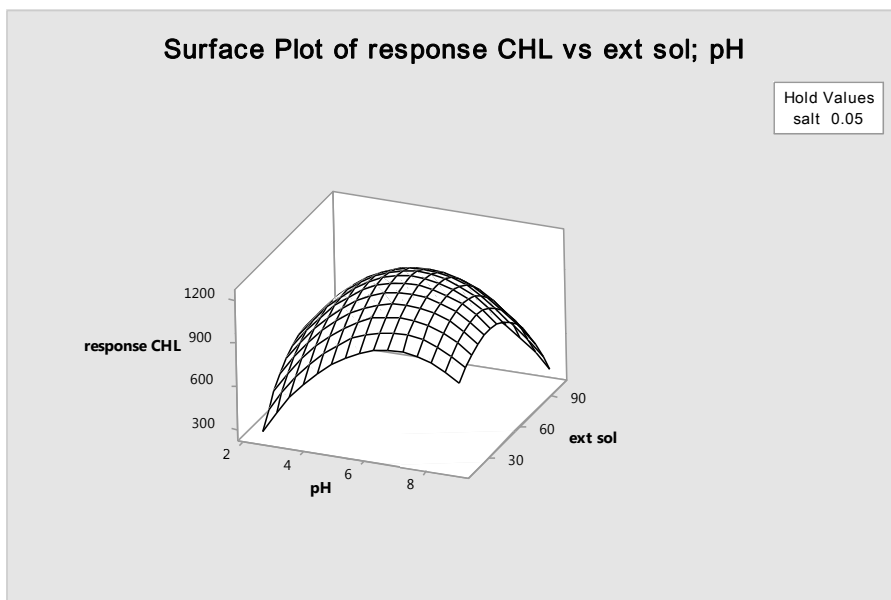
ثابت نگه داشتن مقدار نمک در سطح میانی آن (۰/۰۵ درصد) با افزایش pH تا ۶/۵ و حجم حلال استخراج تا ۵۰/۰ میکرولیتر پاسخ افزایش و بالاتر از این مقدار پاسخ کاهش می‌یابد.



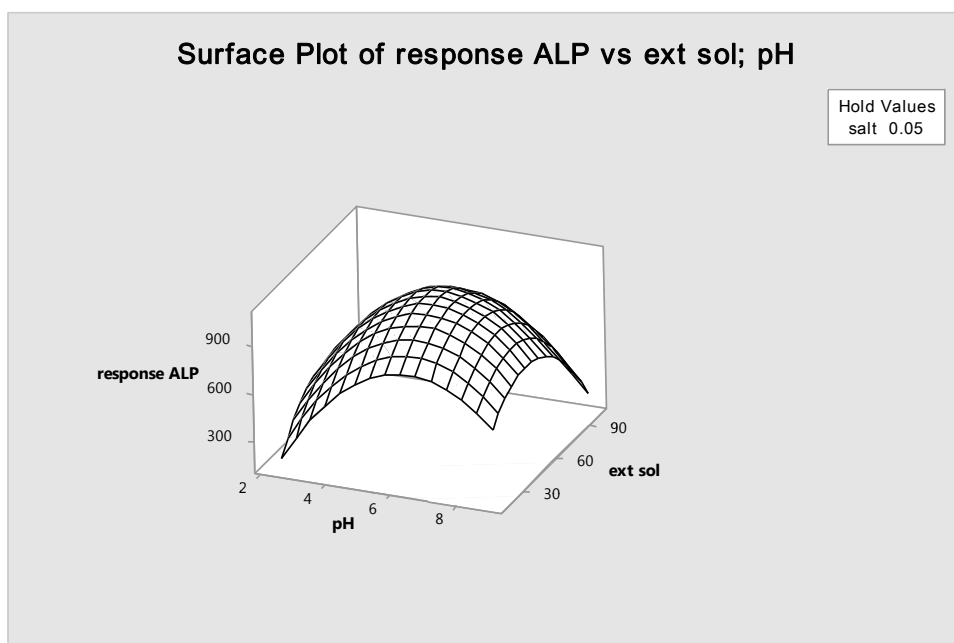
شکل (۳-۱۶): منحنی رویه پاسخ پیش تغلیظ و اندازه‌گیری کلرودیازپوساید و آلپرازولام در مقابل اثر نمک و pH مربوط به پاسخ کلرودیازپوساید



شکل (۳-۱۷): منحنی رویه پاسخ پیش تغلیظ و اندازه‌گیری آلپرازولام در مقابل حجم حلال استخراج و pH



شکل (۳-۱۸): منحنی رویه پاسخ پیش تغلیظ و اندازه‌گیری کلرودیازپوساید در مقابل حجم حلال استخراج و pH



شکل (۳-۱۹): منحنی رویه پاسخ پیش تغلیظ و اندازه‌گیری آلپرازولام در مقابل حجم حلال استخراج و pH

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، نوع سورفکتانت، نوع بافر، حجم بافر و دور سانتریفوژ اشاره نمود. مقایسه نتایج حاصل از این دو روش نشان می‌دهد که شرایط بهینه بدست آمده از روش طراحی آزمایش با استفاده از مدل باکس-بنکن، تا حدودی تفاوت دارد. علت این تفاوت را نیز می‌توان بر هم‌کنش بین فاکتورهای موثر بر پیش تغلیظ 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 یک متغیر در زمان	مقادیر بهینه با روش طراحی آزمایش
pH	۵/۰۰	۶/۵۰
حجم حلال استخراج کننده	۳۰/۰ میکرولیتر	۵۰/۰ میکرولیتر
غلظت سورفکتانت	۰/۰۲۵ میلی گرم بر لیتر	۰/۰۱ میلی گرم بر لیتر
زمان استخراج	۵ دقیقه	۱ دقیقه
اثر نمک (قدرت یونی)	٪۰/۷	٪۰/۳

۳-۴-۳- توجیه فاکتورهای موثر بر پیش تغلیظ و اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید و

آلپرازولام

۳-۴-۱- بررسی اثر pH فاز آبی بر میزان استخراج

۱/۰ میلی لیتر محلول ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر کلرو دیازپوکساید و ۱/۰ میلی لیتر محلول ۱۰/۰ میلی- گرم بر لیتر آلپرازولام، ۲ میلی لیتر محلول بافر فسفاتی بین pH ۲/۰۰ تا ۹/۰۰ به یک لوله آزمایش منتقل گردید. برای انجام استخراج ۱۵/۰ μL سورفکتانت Tween 80 ۵۰/۰ میلی گرم بر لیتر و ۵۰/۰ μL حلال استخراج ۱- آندکانول اضافه شد و به حجم نهایی ۱۰/۰ میلی لیتر رسید. سپس به مدت ۱۰/۰ دقیقه در حمام فراصوت با فرکانس ۶۰/۰ کیلوهرتز قرار داده شد. سپس در مرحله بعد لوله آزمایش را که در آن محلول ابری شکل تشکیل شده به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ با (۳۵۰۰ rpm در دقیقه) گردید و فاز آلی در سطح محلول جمع گردید. سپس ظرف نمونه را در یخچال قرار داده و بعد از ۳۰ 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 با دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا تزریق گردید و سیگنال محلول شاهد هم اندازه گیری شد و اختلاف سیگنال محلول نمونه و شاهد به عنوان سیگنال تجزیه ای در نظر گرفته شد. نتایج حاصله (جدول (۱- پیوست) و شکل (۱- پیوست)) نشان می دهد که در بهینه سازی یک متغیر در زمان بیشترین سیگنال تجزیه ای در $\text{pH}=5/0$ مشاهده می گردد. با توجه به اینکه کلرودیازپوکساید ($\text{pka}=4/8$) و آلپرازولام ($\text{pka}=2/3$) ترکیبات اسیدی می باشند در محیط های با pH بازی یونیزه شد و امکان ورود به فاز آلی وجود ندارد و میزان استخراج کاهش می یابد. از طرف دیگر در pH های پایین هم احتمال پروتونه شدن ترکیب وجود دارد، در نتیجه تشکیل یون می دهند که منجر به کاهش استخراج می شود. اما با در نظر گرفتن بر هم کنش ها در طرح باکس بنکن $\text{pH}=6/5$ به عنوان pH بهینه انتخاب شد.

۳-۴-۳-۲- بررسی اثر نوع بافر

با توجه به pH بهینه برای دستیابی به حساسیت بیشتر، سه نوع بافر شامل بافر فسفات، استات و فتالاتی مورد بررسی قرار گرفت. در این بررسی روش کار مطابق با بخش (۳-۴-۳-۱) و فقط هر بار ۲/۰ میلی لیتر محلول بافر از نوع فسفات، استات و فتالاتی با pH= ۵/۰ 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 فسفات و کمترین سیگنال در حضور بافر استات بدست آمد و لذا از بافر فسفات در آزمایشها استفاده گردید.

۳-۴-۳-۳- بررسی اثر حجم بافر

در این قسمت بعد از بررسی نوع بافر، اثر حجم بافر فسفات با pH= ۵/۰ در محدوده ۰/۵-۳/۰ میلی لیتر از بافر مورد بررسی قرار گرفت. روش کار جهت انجام آزمایش مطابق با روش ارائه شده در بخش (۳-۴-۳-۱) است و 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 (۳-پیوست) و شکل (۳-پیوست) نشان می دهد که بیشترین سیگنال تجزیه ای در حجم ۱/۰ میلی لیتر از بافر فسفات با pH=۵/۰ بدست آمد و به نظر می رسد این مقدار از محلول بافری برای ثابت ماندن ظرفیت بافری کافی است و لذا در بررسی های بعدی حجم ۱/۰ میلی لیتر از بافر فسفات با pH=۵/۰ استفاده گردید.

۳-۴-۳-۴- بررسی اثر نوع حلال استخراج کننده

انتخاب حلال استخراج مناسب اهمیت اساسی در فرایند UASEME-SFOD دارد. خواص فیزیکی آن نه تنها بر پدیده امولسیون، بلکه بر راندمان استخراج نیز تاثیر دارد. حلال استخراج در این روش باید چگالی کمتر از آب، نقطه ذوب در حدود دمای اتاق و حلالیت کم در آب داشته باشد و همچنین تشکیل یک سیستم امولسیون پایدار در حضور امولسیفایر پس از تابش امواج فراصوت دهد. در بررسی اثر نوع حلال استخراج کننده سه حلال آلی ۱-دودکانول، ۱-آندکانول و ۱-دی‌کلرو دکان مورد بررسی قرار گرفتند. ۱/۰ میلی‌لیتر محلول ۱/۰ میلی‌گرم بر لیتر کلرو دیازپوکساید و ۱/۰ میلی‌لیتر محلول ۱۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر آلپرازولام، ۱۰/۰ میلی‌لیتر محلول بافر فسفاتی با $\text{pH}=5/0$ به یک لوله آزمایش منتقل گردید. عمل استخراج همانند روش ارائه شده در قسمت (۳-۴-۳-۱) انجام شد با این تفاوت که در هر مورد از حلال‌های استخراج متفاوتی که در بالا ذکر شد، استفاده گردید. سپس سیگنال تجزیه‌ای با تزریق نمونه استخراج شده به دستگاه HPLC اندازه‌گیری شد. سیگنال محلول شاهد هم اندازه گیری شد و اختلاف سیگنال محلول نمونه و شاهد به عنوان سیگنال تجزیه‌ای در نظر گرفته شد. با توجه به نتایج بدست آمده (جدول (۴-پیوست) و شکل (۴-پیوست)) مشاهده شد که قطره آلی ۱-دی‌کلرو دکان تشکیل یک لایه صاف و نازک بر روی سطح محلول می‌دهد، که پس از آن به سرعت ذوب شده و به دشواری قابل جمع شدن و جدا کردن از محلول آبی است. قابل ذکر است که تشکیل قطره جامد زمانی که از ۱-آندکانول به عنوان حلال استخراج استفاده می‌شود، بهتر از حالتی است که از ۱-دودکانول به عنوان حلال استخراج استفاده می‌شود. به همین دلیل سیگنال تجزیه‌ای در حضور ۱-آندکانول بهتر از ۱-دودکانول است و بهترین کارایی استخراج زمانی که از ۱-آندکانول استفاده شد به دست آمد، زیرا درصد بازیابی استخراج در این حالت بهتر از ۱-دودکانول است (لازم به ذکر است که درصد بازیابی کلرو دیازپوکساید و آلپرازولام هنگامی که از ۱-آندکانول به عنوان حلال استفاده شد، ۷۴٪ و ۸۷٪ بود، اما وقتی از ۱-

دودکانول به عنوان حلال استفاده شد، ۳۳٪ و ۱۵٪ بود). بنابراین در بررسی‌های بعدی از حلال ۱- آندکانول به عنوان حلال استخراج استفاده گردید.

۳-۴-۳-۵- بررسی اثر حجم حلال استخراج کننده

پس از انتخاب ۱- آندکانول به عنوان حلال استخراج کننده، اثر حجم آن در محدوده ۲۰/۰-۲۰۰/۰ میکرولیتر مورد بررسی قرار گرفت. عمل استخراج همانند روش ارائه شده در قسمت (۳-۴-۳-۱) انجام شد با این تفاوت که در هر مورد حجم‌های متفاوتی از حلال استخراج، استفاده گردید و پس از استخراج، قطره جامد آلی به ویال منتقل و سیگنال تجزیه‌ای آن پس از تزریق نمونه به دستگاه HPLC اندازه‌گیری شد و اختلاف مجموع سطوح زیر پیک آنالیت‌ها و شاهد که به عنوان سیگنال تجزیه‌ای در نظر گرفته شد، با توجه به نتایج بهینه سازی یک متغیر در زمان در جدول (۵-پیوست) و شکل (۵-پیوست)، ۳۰/۰ میکرو لیتر به عنوان حجم بهینه انتخاب شد اما با طراحی آزمایش و با در نظر گرفتن برهم کنش میان فاکتورها در طرح باکس بنکن، با افزایش حجم حلال استخراج، با توجه به ثابت بودن حجم فازآبی، امکان تماس دو فاز بیشتر شده و لذا راندمان استخراج افزایش می‌یابد و بنابراین سیگنال تجزیه‌ای و درصد بازیابی نیز به تدریج افزایش می‌یابند. این روند تا حجم ۵۰/۰ میکرولیتر از حلال استخراج مشاهده شد. اما علت کاهش سیگنال تجزیه‌ای در حجم‌های بالاتر از ۵۰/۰ میکرولیتر این است که در حجم‌های بالاتر احتمالاً مقدار آنالیت استخراج شده تغییر نکرده و با توجه به افزایش حجم حلال آلی، نمونه رقیق شده و سیگنال تجزیه‌ای کاهش می‌یابد. اما اگر حجم ۱- آندکانول کمتر از ۵۰/۰ میکرولیتر باشد حجم فاز آلی توانایی استخراج ماکزیمم مقدار نمونه را نداشته و لذا سیگنال کاهش می‌یابد. بنابراین حجم ۵۰ میکرولیتر به عنوان حجم بهینه انتخاب شد.

۳-۴-۳-۶- بررسی اثر نوع سورفاکتانت

نوع سورفاکتانت یکی از پارامترهای مهم در این روش پیش تغلیظ می‌باشد. سورفاکتانت به عنوان امولسیفایر می‌تواند به امولسیون حلال استخراج در محلول آبی تحت تابش امواج فراصوت سرعت بخشد. در این بررسی یک لوله آزمایش که شامل ۱/۰ میلی لیتر محلول ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر کلرودیازپوکساید و آلپرازولام، ۱۰/۰ میلی لیتر محلول بافر فسفاتی با pH= ۵/۰ اضافه گردید که در آن ۱۵/۰ میکرولیتر (غلظت ۰/۰۷۵ میلی گرم بر لیتر) از هر سه نوع سورفاکتانت جداگانه مورد بررسی قرار گرفتند و ۳۰ میکرولیتر حلال استخراج ۱-آندکانول نیز به محتوی لوله آزمایش اضافه شد و به حجم ۱۰/۰ رسانده شد عمل استخراج همانند روش ارائه شده در قسمت (۳-۴-۳-۱) انجام شد با این تفاوت که در هر مورد از حلال‌های استخراج متفاوتی که در بالا ذکر شد استفاده گردید. سپس ۵/۰ µl از حلال استخراج حاوی آنالیت‌ها جهت آنالیز به دستگاه HPLC تزریق شد. نتایج حاصل از آنالیز نشان دهنده این است که SDS دارای پایین ترین بازده استخراج می‌باشد. اثر سورفاکتانت‌های مختلف در بازده استخراج به مقدار تعادل آب‌دوستی-چربی دوست سورفاکتانت‌ها (HLB)^۱ و همچنین آب‌گریزی و قطبیت آنالیت‌ها وابسته است. هنگامی که مقدار HLB سورفاکتانت بین ۸ و ۱۸ است. سورفاکتانت می‌تواند به عنوان امولسیفایر استفاده شود، مقدار HLB مربوط به CTAB، SDS و توئین ۸۰، به ترتیب برابر با ۱۵/۸، ۴۰ و ۱۵/۰ بود. با توجه به نتایج به دست آمده در جدول (۶-پیوست) و شکل (۶-پیوست) CTAB بیشترین بهره استخراج را در این بررسی نشان داد. در امولسیون‌های چربی در آب از امولسیفایرهای با HLB بالاتر استفاده می‌کنند زیرا مقدار HLB حلالیت یک مولسیفایر را تعیین می‌کند و بالا بودن آن نشان دهنده آب دوستی و حلالیت در آب است در نتیجه به نظر می‌رسد که CTAB قابلیت بیشتری جهت بر هم کنش با نمونه و

^۱ Hydrophile-lipophile balance

انتقال آن به حلال آلی نسبت به دیگر سورفاکتانت‌ها دارد. بنابراین CTAB به عنوان سورفاکتانت بهینه انتخاب شد.

۳-۴-۳-۷- بررسی اثر غلظت سورفاکتانت

در این بررسی مطابق روش ارائه شده در بخش (۳-۴-۳-۱) غلظت‌های مختلفی از CTAB در گستره ۰/۱-۰ میلی‌گرم بر لیتر مورد آزمایش قرار گرفت. غلظتی که در آن یک سورفاکتانت شروع به تشکیل مایسل می‌کند به عنوان غلظت بحرانی مایسل^۱ (CMC)، شناخته شده است. غلظت سورفاکتانت از این نظر مهم است که می‌تواند امولسیون و فرایند انتقال جرم را تحت تاثیر قرار دهد. با انتخاب غلظت CTAB کمتر از CMC (۳۶۴/۵ میلی‌گرم بر لیتر) است بازده استخراج افزایش یافت. با توجه به نتایج به دست آمده در جدول (۷-پیوست) و شکل (۷-پیوست)، در بهینه سازی یک متغیر در زمان نقطه بهینه غلظت ۰/۰۲۵ میلی‌گرم بر لیتر به دست آمد، اما در غلظت‌های بالاتر از ۰/۰۲۵ میلی‌گرم بر لیتر تقریباً جدایی فاز پس از سانتریفیوژ اتفاق نمی‌افتد زیرا با افزایش غلظت سورفاکتانت کشش سطحی بین فاز آبی و آلی کاهش می‌یابد و باعث افزایش حلالیت قطره استخراج در محلول نمونه و کاهش بهره استخراج می‌شود. از آنجایی که در طراحی پلاکت-برمن با توجه به نمودار پارتو غلظت سورفاکتانت جز پارامترهای موثر نبود و با توجه به علامت اثرش در این طرح، غلظت بهینه سورفاکتانت در سطح پایین غلظت آن، یعنی ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر به عنوان انتخاب شد.

¹-critical micelle concentration

۳-۴-۳-۸- بررسی اثر زمان استخراج

زمان استخراج که یکی از پارامترهای مهم در اکثر روش‌های استخراج است نیز مورد بررسی قرار گرفت. مقدار آنالیت استخراج شده در یک زمان معین بستگی به انتقال جرم آنالیت از فاز آبی به آلی دارد. برای افزایش بهره استخراج به انتخاب یک زمان استخراج مناسب، که در طی آن تعادل بین فاز آبی و آلی برقرار شده باشد، لازم است. انتخاب زمان استخراج مناسب می‌تواند تضمینی برای برقراری تعادل بین فاز آبی و آلی باشد تا حداکثر میزان استخراج از آنالیت حاصل شود. در این روش زمان استخراج به عنوان فاصله زمانی از افزایش حلال استخراج و سورفکتانت تا پایان زمان قرار دادن نمونه در حمام فراصوت تعریف می‌شود [۵۲]. بر این اساس استخراج کلرو دیازپوکساید و آلپرازولام در یک سری محلول در زمان-های ۱۰/۰-۱/۰ دقیقه با ثابت نگه داشتن پارامترهای دیگر مورد بررسی قرار گرفت. عمل استخراج بر روی محلول‌ها مطابق با روش ارائه شده در بخش (۳-۴-۳-۱) در مقادیر بهینه فاکتورها صورت گرفت و سیگنال مربوطه اندازه‌گیری شد. با توجه به نتایج به دست آمده در جدول (۸-پیوست) و شکل (۸-پیوست)، در روش یک متغیر در زمان، زمان استخراج ۵ دقیقه به عنوان بهینه انتخاب گردید. البته افزایش سطح زیر پیک آنالیت از ۱/۰ تا ۵/۰ دقیقه نسبتاً کم بود به طوری که در طرح پلاکت برمن با توجه به نمودار پارتو زمان استخراج جز پارامترهای موثر نبود و با توجه به علامت اثرش در این طرح، در سطح پایین زمان پاسخ بهتری به دست آمد و بنابراین ۱/۰ دقیقه به عنوان زمان استخراج بهینه انتخاب شد.

۳-۴-۳-۹- بررسی اثر قدرت یونی (اثر نمک)

اثر نمک بر راندمان استخراج نمونه با اضافه کردن مقادیر مختلفی از سدیم کلرید مورد بررسی قرار گرفت. در یک لوله آزمایش ۱/۰ میلی لیتر از محلول ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر از کلرودیازپوکساید و ۱/۰ میلی لیتر از محلول ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر از آلپرازولام، ۲ میلی لیتر محلول فسفاتی با $\text{pH} = 5.00$ و مقادیر مختلفی

از سدیم کلرید ۰/۰-۱/۰% w/v به لوله آزمایش انتقال داده شد. سپس عمل استخراج مطابق با روش ارائه شده در بخش (۳-۴-۳) انجام شد که با تزریق ۵/۰ میکرولیتر از حلال استخراج حاوی نمونه به دستگاه HPLC سیگنال تجزیه‌ای مربوط به نمونه اندازه‌گیری شد. اثر افزودن نمک را می‌توان به عنوان نتیجه دو اثر رقابتی بزرگ در نظر گرفت که یکی تاثیر salting-out و دیگری اثر مقاومت ویسکوزیته [۵۲]، اثر salting-out می‌تواند حلالیت آنالیت‌ها در فاز آبی را کاهش داده و باعث افزایش انتقال آنالیت‌ها از فاز آبی به فاز آلی و در نتیجه بهبود بهره‌وری استخراج شود. با این حال، درغلظت بالاتر نمک، در محلول نمونه ویسکوزیته و چگالی محلول آبی نیز افزایش یافته و منجر به کاهش کارایی فرایند انتقال جرم و در نتیجه کاهش در بازده استخراج روش می‌شود. با توجه به نتایج نشان داده شده در جدول (۹- پیوست) و شکل (۹- پیوست) در روش یک متغیر در زمان سدیم کلرید ۰/۰/۷ W/v به عنوان بهینه انتخاب شد به طوری که برای انتخاب فاکتورهای تأثیر گذار در طرح پلاکت برمن اثر نمک جزء فاکتورهای تأثیر گذاری است اما با در نظر گرفتن برهم کنش بین فاکتورها در طرح باکس بنکن، سدیم کلرید ۰/۰/۳ W/v به عنوان مقدار بهینه نمک انتخاب گردید.

۳-۴-۳-۱۰- بررسی اثر زمان سانتریفیوژ

یکی دیگر از پارامترهای موثر بر بازده استخراج زمان سانتریفیوژ است. روش کار جهت انجام آزمایش مطابق روش ارائه شده در بخش (۳-۴-۳) است به طوری که زمان سانتریفیوژ در محدوده ۵/۰-۲۰/۰ 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 بازده استخراج با افزایش زمان سانتریفیوژ تا ۱۰/۰ دقیقه افزایش یافته، و در زمان‌های بیشتر از ۱۰/۰ دقیقه، تقریباً تغییر

قابل توجهی در سیگنال‌های تجزیه ای حاصله رخ نداد. بنابراین ۱۰/۰ دقیقه سانتریفیوژ به‌عنوان زمان بهینه سانتریفیوژ در نظر گرفته شد.

۳-۴-۱۱- بررسی اثر دور سانتریفیوژ

یکی دیگر از پارامترهای موثر دور سانتریفیوژ است که طبق روش ارائه شده در بخش (۳-۴-۱) دور سانتریفیوژ در هر دقیقه در محدوده ۳۵۰۰-۴۵۰۰ مورد بررسی قرار گرفت که با توجه به نتایج نشان داده شده در جدول (۱۱-پیوست) و شکل (۱۱-پیوست)، ۳۵۰۰ به‌عنوان بهینه انتخاب شد و علت نیز این است که در دوره‌های بالاتر از ۳۵۰۰، قطره حلال آلی در سطح محلول ابی پخش شده و امکان جمع آوری تمام آن وجود نداشت، همچنین در دوره‌های کمتر از ۳۵۰۰ امکان جدایی دو فاز وجود نداشت. بنابراین دور ۳۵۰۰ به‌عنوان مقدار بهینه انتخاب شد.

جدول (۳-۱۵): شرایط بهینه نهایی سیستم برای اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام

فاکتور	مقدار بهینه
pH	۶/۵
نوع حلال استخراج‌کننده	۱-آندکانول
حجم حلال استخراج‌کننده	میکرولیتر
نوع سورفکتانت	CTAB
غلظت سورفکتانت	۰/۰۱ میلی گرم بر لیتر
زمان استخراج	۱۰ دقیقه
اثر نمک (قدرت یونی)	۰/۳٪
نوع بافر	فسفاتی
حجم بافر	۰/۱ میلی لیتر
زمان سانتریفیوژ	۱۰/۰ دقیقه
دور سانتریفیوژ	۳۵۰۰

۳-۱- رسم منحنی‌های کالیبراسیون پیش‌تغلیظ

۳-۵-۱- رسم منحنی کالیبراسیون پیش‌تغلیظ کلرودیازپوکساید

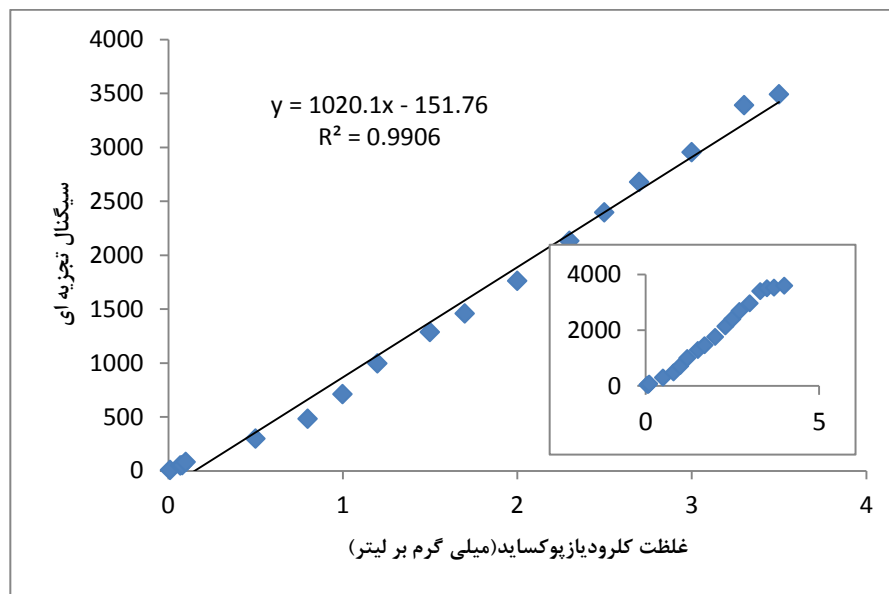
به‌منظور رسم منحنی کالیبراسیون پیش‌تغلیظ، محلول‌های نمونه با غلظت‌های متفاوت از کلرودیازپوکساید تهیه شد. بدین ترتیب که در یک لوله آزمایش حجم‌های معینی از محلول ۱۰/۰ میلی-گرم بر لیتر کلرودیازپوکساید و آلپرازولام برای ایجاد گستره غلظتی ۰/۰۱ تا ۳/۵ میلی‌گرم بر لیتر، سدیم کلرید ۰/۳٪، ۱/۰ میلی لیتر محلول بافر فسفاتی با pH= ۶/۵ و غلظت سورفکتانت CTAB ۰/۰۱ میلی گرم بر لیتر اضافه شد و به حجم ۱۰/۰ میلی لیتر رسانده شد و سپس عمل استخراج تحت شرایط بهینه

بر روی این محلول‌ها انجام شد. پس از جداسازی، قطره استخراج شناور با دستگاه HPLC اندازه‌گیری شد.

نتایج حاصل از این بررسی در جدول (۳-۱۶) و شکل (۳-۲۰) نشان داده شده است.

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

سیگنال تجزیه‌ای	غلظت
۷/۱۵	۰/۰۱
۴۹/۲۲	۰/۰۷
۵۰/۴۲	۰/۰۸
۴۹/۲۲	۰/۱۰
۲۹۸/۱۳	۰/۵۰
۴۸۲/۲۹	۰/۸۰
۷۱۰/۲۰	۱/۰۰
۹۹۳/۵۷	۱/۲۰
۱۲۸۴/۲۲	۱/۵۰
۱۴۵۶/۲۵	۱/۷۰
۱۷۵۹/۱۹	۲/۰۰
۲۱۳۲/۲۵	۲/۳۰
۲۳۹۵/۵۹	۲/۵۰
۲۶۷۷/۲۲	۲/۷۰
۲۹۵۲/۳۲	۳/۰۰
۳۳۸۹/۳۲	۳/۳۰
۳۴۹۰/۳۲	۳/۵۰
۲۵۲۱/۳۲	۳/۷۰
۳۵۹۱/۳۰	۴/۰۰



شکل (۳-۲۰): منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ کلرودیازپوکساید

۳-۵-۲- رسم منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ آلپرازولام

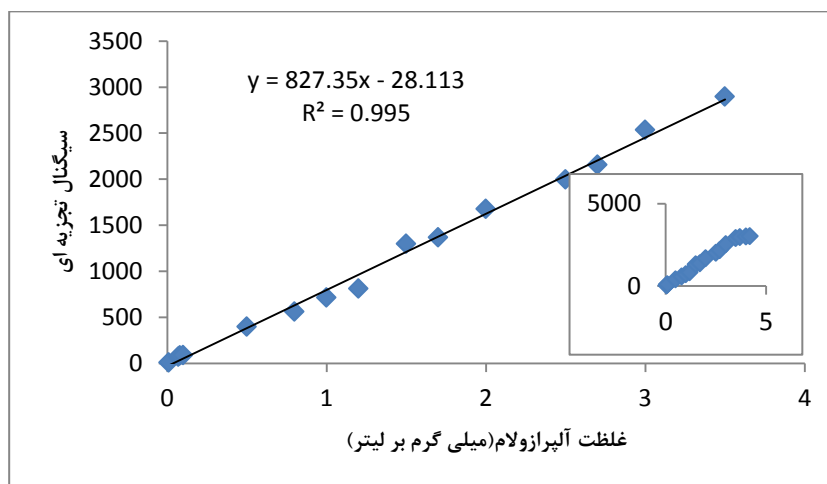
به منظور رسم منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ، محلول‌های نمونه با غلظت‌های متفاوت از آلپرازولام

تهیه شد، مشابه روش بالا رسم منحنی کالیبراسیون آلپرازولام صورت گرفت. نتایج حاصل از این بررسی در

جدول (۳-۱۷) و شکل (۳-۲۱) نشان داده شده است.

جدول (۳-۱۷) داده‌های مربوط به منحنی کالیبراسیون آلپرازولام

سیگنال	غلظت
۹/۱۳	۰/۰۱
۷۱/۲۱	۰/۰۷
۸۷/۰۶	۰/۰۸
۹۰/۴۳	۰/۱۰
۳۹۹/۱۲	۰/۵۰
۵۶۰/۷۰	۰/۸۰
۷۱۳/۷۱	۱/۰۰
۸۱۱/۳۸	۱/۲۰
۱۲۹۹/۹۲	۱/۵۰
۱۳۶۸/۴۴	۱/۷۰
۱۶۷۸/۳۱	۲/۰۰
۱۹۹۷/۱۶	۲/۵۰
۲۱۵۶/۱۵	۲/۷۰
۲۵۳۳/۶۷	۳/۰۰
۲۸۹۵/۰۶	۳/۵۰
۲۹۵۲/۳	۳/۷۰
۲۰۰۳/۶	۴/۰۰
۳۰۱۵/۳	۴/۲۰



شکل (۳-۲۱): منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ آلپرازولام

همانطور که مشاهده می‌شود منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ دارای دامنه خطی در محدوده ۰/۰۱ تا ۳/۵ میلی گرم بر لیتر با ضریب تعیین $R^2 = ۰/۹۹۰۶$ برای کلرودیازپوکساید و دامنه خطی در محدوده ۰/۰۱ تا ۳/۵ میلی گرم بر لیتر با ضریب تعیین $R^2 = ۰/۹۹۵۰$ برای آلپرازولام می‌باشد. معادله بهترین خط برای غلظت و سیگنال مربوط به استخراج کلرودیازپوکساید و آلپرازولام به صورت روابط (۳-۱۲) و (۳-۱۳) به دست آمد.

$$Y = ۱۰۲۰/۱ C_{\text{CHL}} - ۱۵۱/۷۶ \quad (۱۰-۳)$$

$$Y = ۸۲۷/۳۵ C_{\text{Alp}} - ۲۸/۱۱۳ \quad (۱۱-۳)$$

۳-۲- بررسی اثر گونه‌های مزاحم

برای بررسی قابلیت کاربرد روش میکرواستخراج قطره آلی شناور جامد با کمک افزایش سورفاکتانت و امواج مافوق صوت اندازه‌گیری کلرو دیازپوکساید و آلپرازولام در نمونه‌های حقیقی، اثر مزاحمت‌های احتمالی در پیش‌تغلیظ این داروها و اندازه‌گیری آن‌ها با استفاده از HPLC مورد استفاده قرار گرفت. روش کار در این بررسی به صورت زیر بود:

ابتدا سیگنال محلول نمونه تحت شرایط بهینه و در غیاب یون‌های مزاحم اندازه‌گیری شد. ۱/۰ میلی-گرم بر لیتر از کلرو دیازپوکساید و آلپرازولام، ۰/۰۳ گرم نمک NaCl، ۱/۰ میلی‌لیتر بافر فسفاتی با ۶/۵ pH= و ۲ میکرولیتر از سورفاکتانت CTAB ۵۰/۰ میلی گرم بر لیتر به لوله آزمایش انتقال داده شد و به حجم نهایی ۱۰/۰ میلی لیتر رسانده شد. در مرحله بعد عمل استخراج بر روی این محلول‌ها تحت شرایط بهینه انجام گرفت، 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 به‌دست آمد. برای بررسی اثر مزاحمت احتمالی هر گونه با نسبت ۱۰۰۰ برابر وزنی-حجمی نسبت به کلرو دیازپوکساید و آلپرازولام به محلول اولیه اضافه شد سپس عمل استخراج انجام گرفت و سیگنال تجزیه‌ای مربوط به هر دارو به‌دست آمد. اگر سیگنال تجزیه‌ای به‌دست آمده در حضور گونه مورد نظر در دامنه $\bar{A} \pm 3S_A$ قرار می‌گرفت به این معنا بود که یون مورد نظر با نسبت موجود مزاحم نیست. در غیر این صورت نسبت وزنی-حجمی گونه مزاحم آنقدر کاهش داده می‌شد تا سیگنال تجزیه‌ای در دامنه $\bar{A} \pm 3S_A$ قرار گیرد. نتایج حاصل در این بررسی در جدول (۳-۱۸) و جدول (۳-۱۹) 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 کلرو دیازپوکساید و آلپرازولام حضور داشتند مزاحم نبودند.

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

نسبت غلظت گونه به غلظت کلرو دیازپوکساید	گونه‌های مورد بررسی
۱۰۰۰	گلوکز، لاکتوز، متیونین، تیو اوره، آلانین، سیتالوپرام، ویتامین B ₆ ، ویتامین B ₁
۵۰۰	سرتالین
۲۰۰	ونلافاکسین

جدول (۳-۱۹): نتایج حاصل از بررسی اثر گونه‌های مزاحم در پیش تغلیظ و اندازه‌گیری آلپرازولام با غلظت ۱/۰ میلی گرم بر لیتر

نسبت غلظت گونه به غلظت آلپرازولام	گونه‌های مورد بررسی
۱۰۰۰	گلوکز، لاکتوز، متیونین، تیو اوره، ویتامین B ₆ ، ویتامین B ₁ آلانین سیتالوپرام، سرتالین، ونلافاکسین

۳-۳-۳- 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 (۳-۱۴) استفاده شد:

$$LOD = \frac{KS_{bl}}{m} \quad (۳-۱۴)$$

S_{bl} = 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 $k = ۳/۰$ است [۴۲]. با ۶ بار اندازه گیری تکراری روی محلول شاهد (فاقد کلرودیازپوکساید و آلپرازولام) طبق شرایط بهینه و با قرار دادن مقادیر، در رابطه (۳-۱۴) مقدار حد تشخیص روش برای کلرودیازپوکساید با در نظر گرفتن انحراف استاندارد شاهد برابر با $۱/۰۲$ و شیب منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ، حد آشکارسازی $۳/۰$ میکروگرم بر لیتر بدست آمد. به طور مشابه برای داروی آلپرازولام با S_{bl} برابر با $۰/۸۵$ و شیب منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ، حد آشکارسازی به دست آمده برابر با $۳/۱$ میکروگرم بر لیتر می‌باشد.

۳-۳-۱- 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:

$$\%RSD = \frac{S_C}{C} \times 100 \quad (15-3)$$

$\%RSD$ = 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 غلظت‌های انتخاب‌شده، 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 (۳-۲۰) و (۳-۲۱) نشان داده شده است مقادیر t و درصد انحراف نسبی به‌ترتیب نشان دهنده دقت و صحت خوب روش است. لازم به ذکر است که در سطح اطمینان ۹۵٪ مقدار t بحرانی برای ۲ درجه آزادی برابر ۴/۳۰ است.

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

درصد بازیابی	مقدار t	RSD%	کلرودیازپوکساید اندازه گیری شده (میلی گرم بر لیتر)	کلرودیازپوکساید موجود در محلول آبی (میلی گرم بر لیتر)
۱۰۶/۶	۰/۳۵	۳/۳۱	۳/۰۲±۰/۱۰	۳/۰۰
۱۰۶/۰	۲/۵۰	۴/۲۴	۱/۰۶±۰/۰۴	۱/۰۰
۱۰۲/۶	۰/۸۹	۴/۸۷	۰/۵۱±۰/۰۲	۰/۵۰

جدول (۳-۲۱) بررسی دقت و صحت در شرایط منحنی کالیبراسیون آلپرازولام

درصد بازیابی	مقدار t	RSD%	آلپرازولام اندازه گیری شده (میلی گرم بر لیتر)	آلپرازولام موجود در محلول آبی (میلی گرم بر لیتر)
۹۶/۶	۱/۷۰	۳/۴۴	۲/۹۰±۰/۱۰	۳/۰۰
۱۰۴/۰	۰/۵۵	۳/۹۲	۱/۰۴±۰/۱۰	۱/۰۰
۹۸/۰	۱/۷۱	۴/۰۸	۰/۴۹±۰/۰۲	۰/۵۰

۳-۴- فاکتور پیش تغلیظ^۱

فاکتور پیش تغلیظ (PF)، به صورت نسبت شیب منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ بر شیب منحنی کالیبراسیون مستقیم تعریف می‌شود [۷۱] که در رابطه (۳-۱۶)، m_1 شیب منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ و m_2 شیب منحنی کالیبراسیون مستقیم است. که به ترتیب در قسمت (۳-۵) و قسمت (۳-۳) محاسبه شده است، مقدار فاکتور پیش تغلیظ برای کلرو دیازپوکساید و آلپرازولام، به ترتیب ۱۰۸/۳ و ۱۰۲/۱ به دست آمد.

$$PF_{CHL} = \frac{m_1}{m_2} = \frac{۱۰۲۰/۱}{۹/۴۱۵۷} = ۱۱۳/۹ \quad (۱۲-۳)$$

$$PF_{Alp} = \frac{۸۲۷/۳۵}{.۸/۱۰۴۷} = ۱۰۵/۰ \quad (۱۳-۳)$$

۳-۵- اندازه‌گیری کلرو دیازپوکساید و آلپرازولام در نمونه‌های حقیقی

برای بررسی کارایی روش پیشنهادی به منظور استفاده در نمونه‌های حقیقی با بافت‌های مختلف، این روش برای جداسازی، پیش تغلیظ و اندازه‌گیری کلرو دیازپوکساید و آلپرازولام در قرص کلرو دیازپوکساید و آلپرازولام و همچنین نمونه سرم با اعمال شرایط بهینه به کار گرفته شد.

^۱-Preconcentration factor

نحوه‌ی آماده‌سازی نمونه‌ی قرص به صورت زیر انجام شد:

ابتدا ۳ عدد قرص کلرودیازپوکساید ۵/۰ میلی‌گرمی را پودر نموده و توزین شد، سپس یک سوم این مقدار معادل ۵/۰ میلی‌گرم ماده مؤثره کلرودیازپوکساید در بالن حجمی ۵۰/۰ میلی‌لیتری با متانول حل و به حجم رسانیده شد. پس از صاف کردن آن با آب مقطر در بالن ۱۰/۰ میلی‌لیتری به حجم رسانده شد. سپس ۱/۰ میلی‌لیتر از این محلول به بالن ۱۰/۰ میلی‌لیتری منتقل و به حجم رسانده شد. یک میلی‌لیتر از محلول حاصل به روش افزایش استاندارد مورد آنالیز قرار گرفت به این صورت که ابتدا به محلول نمونه حاوی یک میلی‌لیتر نمونه‌ی قرص هیچ ماده‌ی استاندارد اضافه نشد و سیگنال به دست آمد. در مراحل بعدی، به ترتیب ۰/۵، ۱/۰ و ۱/۵ میلی‌لیتر از محلول استاندارد به محلول نمونه اضافه شد و پس از انجام پیش تغلیظ سیگنال تجزیه‌ای محاسبه شد. هر اندازه‌گیری ۳ بار تکرار گردید که نتایج آن در جدول (۳-۱۹) آمده است. نتایج نشان می‌دهد که درصد بازیابی برای پیش تغلیظ و اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید در نمونه قرص کلرودیازپوکساید ۱۲۰/۰-۹۸/۰٪ با انحراف استاندارد نسبی قابل قبول ۳/۵-۵/۸ می‌باشد، همچنین با توجه به نتایج، هنگام اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید در حضور آلپرازولام تغییری در سیگنال کلرودیازپوکساید ایجاد نشد، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که اندازه‌گیری هم زمان این داروها در نمونه حقیقی مزاحمتی ندارند.

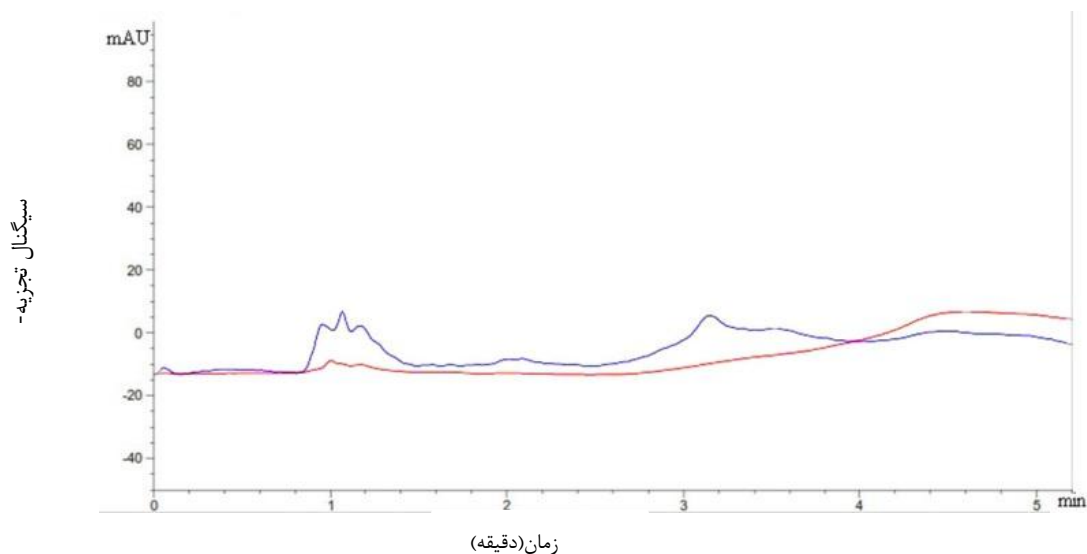
آماده سازی قرص آلپرازولام نیز به همین ترتیب صورت گرفت، ابتدا ۳ عدد قرص آلپرازولام ۲/۰ میلی‌گرمی را پودر نموده و توزین شد، سپس یک سوم این مقدار معادل ۲/۰ میلی‌گرم ماده مؤثره کلرودیازپوکساید در بالن حجمی ۲۵/۰ میلی‌لیتری با متانول حل و به حجم رسانیده شد. پس از صاف کردن آن با آب مقطر در بالن ۱۰/۰ میلی‌لیتری به حجم رسانده شد. سپس ۱/۰ میلی‌لیتر از این محلول به بالن ۱۰/۰ میلی‌لیتری منتقل و به حجم رسانده شد. یک میلی‌لیتر از این محلول حاصل به روش افزایش استاندارد مورد آنالیز قرار گرفت به این صورت که ابتدا محلول نمونه حاوی یک میلی‌لیتر نمونه‌ی

قرص هیچ ماده‌ی استاندارد‌ی اضافه نشد و سیگنال به دست آمد. در مرحله بعدی، به ترتیب ۰/۵، ۱/۰ و ۱/۵ میلی‌لیتر از محلول استاندارد به محلول نمونه اضافه شد و پس از انجام پیش‌تخلیظ سیگنال تجزیه‌ای محاسبه شد. هر اندازه‌گیری ۳ بار تکرار گردید که نتایج آن در جدول (۳-۲۰) آمده است. نتایج نشان می‌دهد که درصد بازیابی پیش‌تخلیظ و اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید در نمونه قرص آلپرازولام ۱۰۰/۰-۹۰/۰٪ با انحراف استاندارد نسبی قابل قبول ۳/۷-۵/۶ می‌باشد.

نحوه آماده‌سازی سرم به این صورت بود که ابتدا ۱/۲ میلی‌لیتر استونیتریل به ۲/۰ میلی‌لیتر سرم به منظور جداکردن پروتئین‌های موجود در آن اضافه گردید. سپس به مدت ۱۰/۰ دقیقه در سانتریفیوژ با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد [۷۲]. سپس محلول رویی آن برداشته و در بالن حجمی ۲۵/۰ میلی‌لیتری منتقل کرده و در انتها یک میلی‌لیتر از این محلول به لوله آزمایش ۱۰/۰ میلی‌لیتری 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 (۳-۲۲) و (۳-۲۳) آورده شده است. نتایج نشان می‌دهد که درصد بازیابی برای پیش‌تخلیظ و اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید در نمونه سرم ۱۰۴/۰-۹۴/۰٪ با انحراف استاندارد نسبی قابل قبول ۶/۷-۴/۹ بوده و نیز درصد بازیابی روش برای پیش‌تخلیظ و اندازه‌گیری آلپرازولام در نمونه سرم ۹۸/۰-۹۲/۰٪ با انحراف استاندارد نسبی قابل قبول ۶/۵-۰/۰۶ می‌باشد. همچنین با توجه به نتایج اندازه‌گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام در حضور هم‌تغییری در سیگنال یکدیگر ایجاد نمی‌کنند، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که اندازه‌گیری هم‌زمان این داروها در نمونه حقیقی سرم مزاحمتی بر روی یکدیگر ندارند.

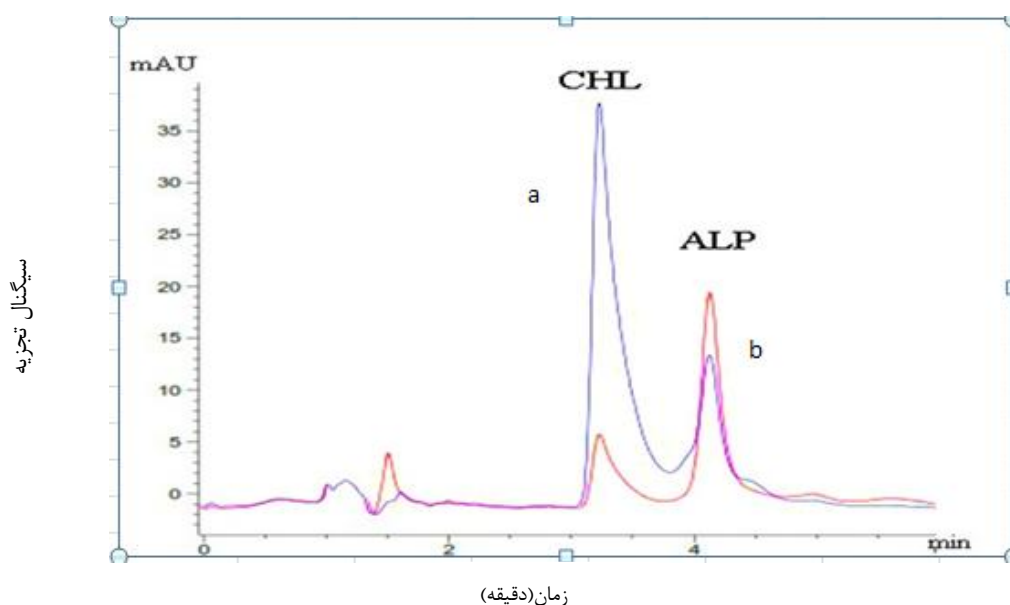
کروماتوگرام حاصل از نمونه سرم شاهد (شکل (۳-۲۲)) که در آن هیچ یک از داروهای مذکور در نمونه سرم وجود نداشته است، و نمونه سرم حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر و ۱/۰ میلی‌گرم بر لیتر از

کلرودیازپوکساید و آلپرازولام در شکل‌های (۳-۲۳) و (۳-۲۴) (که رنگ آبی مربوط به طول موج ۲۵۸ نانومتر و رنگ قرمز، طول موج ۲۲۰ نانومتر می باشد) نشان داده شده است.

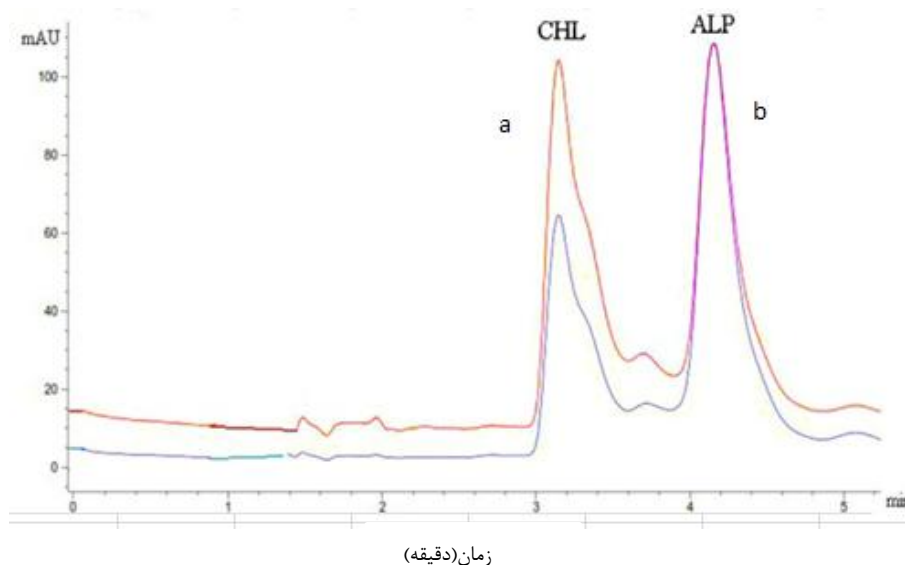


شکل (۳-۲۲): کروماتوگرام حاصل از نمونه سرم شاهد

شرایط آزمایش: حجم محلول نمونه ۱۰/۰ میلی لیتر، حجم حلال استخراج کننده (۱-آندکانول) ۵۰ میکرولیتر، غلظت سورفکتانت (CTAB) ۰/۰۱ میلی گرم بر لیتر، زمان استخراج ۱۰/۰ دقیقه، زمان سانترفیوژ کردن ۱۰/۰ دقیقه، رنگ آبی مربوط به طول موج ۲۵۸ نانومتر و رنگ قرمز، طول موج ۲۲۰ نانومتر می باشد.



شکل (۳-۲۳): کروماتوگرام نمونه سرم حاوی ۰/۵ میلی گرم بر لیتر کلرودیازپوکساید و آلپرازولام
 شرایط آزمایش: غلظت کلرودیازپوکساید و آلپرازولام ۱/۰ میلی گرم بر لیتر، حجم محلول نمونه ۱۰/۰ میلی لیتر، حجم
 حلال استخراج کننده (۱-آندکانول) ۵۰ میکرولیتر، غلظت سورفکتانت (CTAB) ۰/۰۱ میلی گرم بر لیتر، زمان استخراج
 ۱۰/۰ دقیقه، زمان سانترفیوژ کردن ۱۰/۰ دقیقه، رنگ آبی مربوط به طول موج ۲۵۸ نانومتر و رنگ قرمز، طول موج ۲۲۰
 نانومتر می باشد. a: پیک مربوط به کلرودیازپوکساید در طول موج ۲۵۸ نانومتر، b: پیک مربوط به آلپرازولام در طول موج
 ۲۲۰ نانومتر.



شکل (۳-۲۴): کروماتوگرام نمونه سرم 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 ۱۰/۰ میلی لیتر، حجم
 حلال استخراج کننده (۱-آندکانول) ۵۰ میکرولیتر، غلظت سورفکتانت (CTAB) ۰/۰۱ میلی گرم بر لیتر، زمان استخراج
 ۱۰/۰ دقیقه، زمان سانترفیوژ کردن ۱۰/۰ دقیقه، رنگ آبی مربوط به طول موج ۲۵۸ نانومتر و رنگ قرمز، طول موج ۲۲۰
 نانومتر می باشد. a: پیک مربوط به کلرودیازپوکساید در طول موج ۲۵۸ نانومتر، b: پیک مربوط به آلپرازولام در طول موج
 ۲۲۰ نانومتر.

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

میلی گرم کلرودیازپوکساید در قرص	درصد بازیابی	t نتایج آزمون	%RSD (n=3)	کلرودیازپوکساید اندازه‌گیری شده (میلی گرم بر لیتر)	کلرودیازپوکساید اضافه شده (میلی گرم بر لیتر)	
۳/۵				۰/۷	آلپرازولام (۰)	کلرودیازپوکساید (۰)
	۹۸/۰	۰/۳	۵/۸	۱/۷	آلپرازولام (۰)	کلرودیازپوکساید (۱/۰)
	۱۲۰/۰	۳/۸	۳/۵	۱/۳	آلپرازولام (۰/۵)	کلرودیازپوکساید (۰/۵)
	۹۸/۶	۰/۳	۴/۵	۲/۲	آلپرازولام (۰/۵)	کلرودیازپوکساید (۱/۵)

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

میلی گرم کلرودیازپوکساید در قرص	درصد بازیابی	t نتایج آزمون	%RSD (n=3)	آلپرازولام اندازه‌گیری شده (میلی گرم بر لیتر)	آلپرازولام اضافه شده (میلی گرم بر لیتر)	
۱/۵				۰/۶	کلرودیازپوکساید (۰)	آلپرازولام (۰)
	۹۰/۰	۲/۰۶	۵/۶	۱/۴	کلرودیازپوکساید (۰)	آلپرازولام (۱/۰)
	۹۶/۰	۰/۳	۵/۵	۱/۲	کلرودیازپوکساید (۰/۵)	آلپرازولام (۰/۵)
	۱۰۰/۰	۰/۰۵	۵/۲	۲/۲	کلرودیازپوکساید (۰/۵)	آلپرازولام (۱/۵)

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

درصد بازیابی	t نتایج آزمون	%RSD (n=3)	کلرودیازپوکساید اندازه‌گیری شده (میلی گرم بر لیتر)	کلرودیازپوکساید اضافه شده (میلی گرم بر لیتر)	
-	-	-	<LOD	آلپرازولام (۰)	کلرودیازپوکساید (۰)
۹۶/۰	۱/۳۷	۴/۹۸	۰/۴۸	آلپرازولام (۰)	کلرودیازپوکساید (۰/۵)
۹۴/۰	۰/۸۸	۵/۶۰	۰/۴۷	آلپرازولام (۰/۵)	کلرودیازپوکساید (۰/۵)
۱۰۴/۰	۰/۹۸	۶/۷۰	۱/۰۴	آلپرازولام (۰/۵)	کلرودیازپوکساید (۱/۰)

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

درصد بازیابی	نتایج آزمون	%RSD (n=3)	آلپرازولام اندازه‌گیری شده (میلی‌گرم بر لیتر)	آلپرازولام اضافه شده (میلی‌گرم بر لیتر)	
				آلپرازولام (۰)	کلرودیازپوکساید (۰)
-	-	-	<LOD	آلپرازولام (۰)	کلرودیازپوکساید (۰)
۹۲/۰	۲/۳۰	۶/۵۱	۰/۴۶	کلرودیازپوکساید (۰)	آلپرازولام (۰/۵)
۹۸/۰	۰/۱۷	۲/۰۴	۰/۴۹	کلرودیازپوکساید (۰/۵)	آلپرازولام (۰/۵)
۹۳/۰	۲/۰۲	۰/۰۶	۰/۹۳	کلرودیازپوکساید (۰/۵)	آلپرازولام (۱/۰)

فصل چهارم
بحث و نتیجه‌گیری

در این تحقیق با استفاده از روش میکرو استخراج به وسیله قطره آلی شناور جامد با کمک افزایش سورفکتانت و امواج ما فوق صوت با HPLC مقادیر کم کلرودیازپوکساید و آلپرازولام اندازه گیری شد.

۴-۱ ارقام شایستگی روش

بررسی ها نشان داد که در ناحیه خطی غلظتی برای کلرو دیازپوکساید و آلپرازولام $3/5 - 1/1$ میلی-گرم بر لیتر می باشد. معادلات مربوط و مقادیر ضریب تعیین در جدول (۳-۱۵) و (۳-۱۶) آمده است. مطابق جدول (۳-۱۹) و (۳-۲۰) مقادیر انحراف استاندارد نسبی برای ۳ اندازه گیری تکراری در غلظت های $1/0$ ، $3/0$ میلی گرم بر لیتر به ترتیب برابر $3/3$ ، $4/2$ و $4/8$ برای کلرودیازپوکساید و برابر $3/4$ ، $3/9$ و $4/08$ برای آلپرازولام می باشد که نشان دهنده دقت خوب روش است.

مقادیر درصد بازیابی نشان داده شده برای غلظت های ذکر شده در جدول (۳-۱۹) و (۳-۲۰) بیانگر صحت خوب روش است. مقدار حد تشخیص روش برای کلرودیازپوکساید و آلپرازولام به ترتیب $3/0$ و $3/1$ میکروگرم بر لیتر و فاکتور پیش تغلیظ تحت شرایط بهینه به ترتیب $108/3$ و $102/1$ بدست آمد. بر اساس نتایج ارائه شده در جدول (۳-۱۷) و (۳-۱۸) بیشتر گونه ها در اندازه گیری کلرو دیازپوکساید و آلپرازولام مزاحم نیستند و روش از گزینش پذیری بالایی برخوردار است.

نتایج حاصل از اندازه گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام در نمونه های قرص کلرو دیازپوکساید و آلپرازولام و سرم در جدول (۳-۲۱) تا (۳-۲۴) آمده است. این نتایج نشان می دهد که می توان روش پیشنهادی را با دقت و صحت خوبی در اندازه گیری کلرو دیازپوکساید و آلپرازولام در نمونه های حقیقی به کار گرفت.

۲-۴ مقایسه روش پیشنهادی با برخی روش‌های موجود

در جدول (۱-۴) فهرستی از برخی از روش‌های پیش‌تغلیظ به کار گرفته شده برای اندازه‌گیری کلرو دیازپوکساید و آلپرازولام آورده شده است. در این جدول پارامترهای مختلف، مانند حد تشخیص، دامنه خطی و فاکتور پیش‌تغلیظ برای مقایسه آورده شده است. روش پیشنهادی نسبت به برخی از روش‌های گزارش شده بهتر است. مقایسه ارقام شایستگی گزارش شده برای این روش‌ها در اندازه‌گیری کلرو دیازپوکساید و آلپرازولام با روش پیشنهادی نشان می‌دهد که روش ارائه شده در این پروژه در برخی از ارقام شایستگی مطلوب‌تر از سایر روش‌هاست، حد تشخیص این روش نسبت به روش CEC [۳۸] پایین‌تر است اما روش‌های DLLME [۴۲] و SPE-DLLME [۴۴] نسبت به روش پیشنهادی حد تشخیص پایین‌تری دارند، فاکتور پیش‌تغلیظ این روش نسبت به روش CEC بالاتر است اما از روش DLLME کمتر است و همچنین دارای گستره خطی خوب ۰/۰۱-۳/۵ میلی گرم بر لیتر می‌باشد. حجم محلول نمونه لازم برای استخراج کلرو دیازپوکساید و آلپرازولام و حجم حلال آلی مصرف شده در این روش بسیار کم است. بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری کرد که UASEME-SFO یک روش بسیار ساده، سریع، موثر و سازگار با محیط زیست می‌باشد.

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

روش پیشنهادی	روش اندازه‌گیری	حد تشخیص (میکرو گرم بر لیتر)	دامنه خطی (میلی گرم بر لیتر)	فاکتور پیش‌تغلیظ	مرجع
^۲ CEC	^۱ MS	۲۵/۰-۵۰/۰	۰/۰۰۱۸-۰/۰۰۰۶	۷۵-۱۴۰	[۳۸]
^۴ DLLME	^۳ HPLC	۰/۵	۰/۰۰۵-۱/۰۰۰	-	[۴۲]
DLLME	HPLC	۱/۰-۲۰/۰	۰/۰۰۰۵-۰/۰۰۰۷	۱۱۲-۱۹۸	[۴۱]
^۶ SPE- DLLME	^۵ GC	۰/۰۲-۰/۰۵	۰/۰۰۰۱-۰/۱	-	[۴۴]
UASEME-SFO ^۷	HPLC	۳/۰ و ۳/۱	۰/۰۱-۳/۵	۱۰۸/۳ و ۱۰۲/۱	کار حاضر

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.

امکان استفاده از روش میکرو استخراج فاز مایع به وسیله قطره آلی شناور جامد با کمک افزایش سورفکتانت و امواج ما فوق صوت برای جداسازی و پیش‌تغلیظ داروهای کلرودیازپوکساید و آلپرازولام و اندازه‌گیری به وسیله HPLC برای اولین بار در این کار تحقیقاتی مورد بررسی قرار گرفته است.

¹-Mass espectrometry

²Capillary electrophoresis

³-High perfoemence liquid choromagraphy

⁴- Dispersive liquid liquid microextraction

⁵- Gas chromatography

⁶Solid-phase dispersive

⁷-Ultrasound-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction with solidification of floating organic droplet

۱- مصرف کم حلال استخراج در حد چند میکرو لیتر با استفاده از روش میکرو استخراج فاز مایع به وسیله قطره آلی شناور جامد با کمک افزایش سورفکتانت و امواج ما فوق صوت از مزایای این روش می باشد.

۲- زمان آنالیز کوتاه است.

۳- در روش پیشنهادی، فاکتور پیش تغلیظ برای داروهای کلرودیازپوکساید و آلپرازولام نسبتا بالا است.

۴- دامنه خطی روش نسبتا وسیع است.

۵- نتایج درصد بازیابی حاصل از اندازه گیری کلرودیازپوکساید و آلپرازولام در نمونه های مختلف قرص و سرم، نشان دهنده صحت بالای روش است.

۶- استفاده از این روش هزینه کمی دارد.

۴-۴ آینده نگری

۱- می توان از مخلوط سورفاکتانت ها به جای یک سورفاکتانت استفاده نمود.

۲- کاربرد دیگر روش های میکرو استخراج مانند استفاده از دستگاه ورتکس به جای حمام فراصوت

۳- کاربرد این روش در پیش تغلیظ دیگر ترکیبات دارویی

پیوست

نمودارها و نتایج بررسی یک متغیر در زمان برای اندازه گیری تیکلوپیدین و لوزارتان به

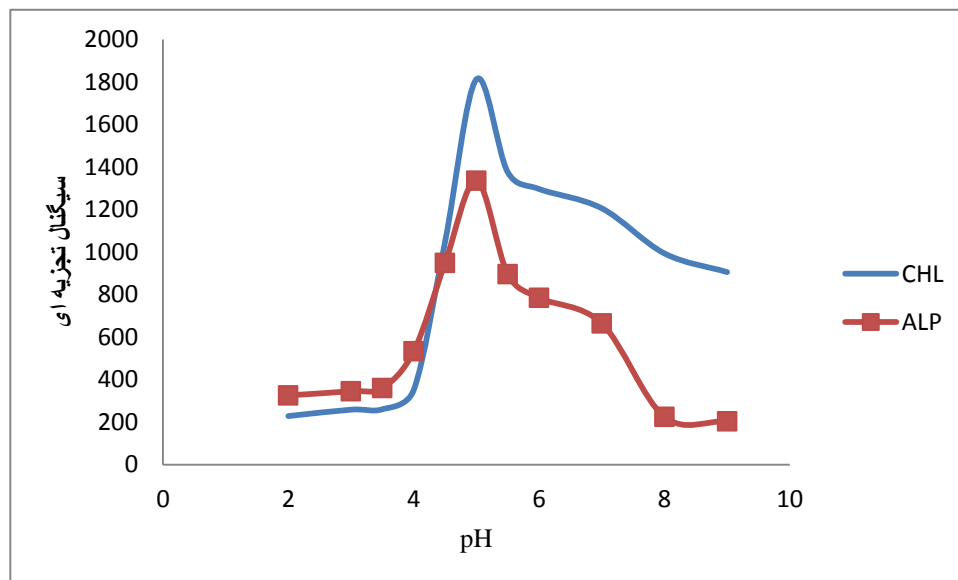
روش UASEME-SFO

روش کار:

در یک لوله آزمایش 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، مقدار نمک مورد نظر افزوده شد و سپس، به وسیله میکرو پیپت حجم مشخصی از ۱-آندکانول به عنوان حلال استخراج و غلظت مشخصی از سورفاکتانت CTAB به عنوان امولسیفایر به محلول نمونه اضافه شد و به حجم نهایی ۱۰/۰ میلی لیتر رسید. پس از آن، لوله آزمایش را در حمام فراسوت با فرکانس مافوق صوت ۶۰ کیلو هرتز به مدت مشخصی 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 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 که در دمای اتاق ذوب شده و سپس 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 تجزیه ای مورد استفاده قرار گرفت. لازم به ذکر است که تا بهینه سازی زمان استخراج نمک اضافه نشده است.

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

pH	کلرودیازپوک ساید	آلپرازولام	مجموع سیگنال
۲/۰	۲۲۸/۲۴	۳۲۵/۳۵	۳۲۵/۳۵
۳/۰	۲۵۸/۳۴	۳۴۵/۱۵	۶۰۳/۵۰۳
۳/۵	۲۶۰/۳۴	۲۲۰/۲۱	۴۸۰/۵۵
۴/۰	۳۵۰/۴۵	۵۳۲/۵۶	۸۸۳/۰۱
۴/۵	۱۰۴۷/۰۸	۹۴۷/۵۹	۱۹۹۴/۶۸
۵/۰	۱۸۱۱/۷۰۵	۱۳۳۵/۱۸	۲۴۴۱/۸۸
۵/۵	۱۳۷۵/۳۶	۸۹۶/۲۱	۲۲۷۱/۵۷
۶/۰	۱۲۹۶/۱۰	۷۸۴/۱۸	۲۰۸۰/۲۸
۷/۰	۱۲۰۵/۳۲	۵۶۴/۲۱	۱۷۶۹/۵۳
۸/۰	۹۹۳/۱۱	۲۲۴/۶۸	۱۰۱۷/۷۹
۹/۰	۹۰۵/۲۱	۲۰۲/۹۳	۹۹۸/۴۱۲

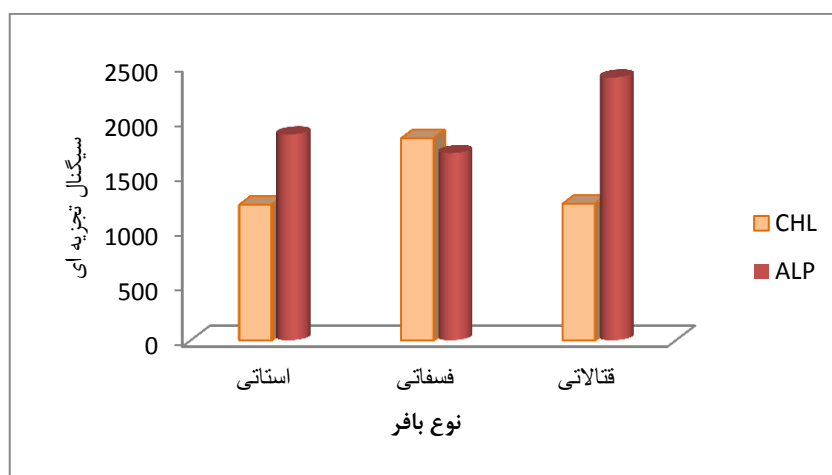


شکل ۱ پ): نمودار تاثیر pH فاز آبی بر میزان استخراج

شرایط آزمایش: غلظت کلرودیازپوکساید و آلپرازولام ۱/۰ میلی گرم بر لیتر، حجم محلول نمونه ۱۰/۰ میلی لیتر، ۲/ میلی لیتر بافر فسفات، زمان استخراج ۱۰ دقیقه، حجم حلال استخراج کننده (۱-آندکانول) ۵۰/۰ میکرولیتر، نوع سورفاکتانت Tween80، غلظت سورفاکتانت ۰/۰۷۵ میلی گرم بر لیتر، زمان استخراج ۱۰/۰ دقیقه، زمان سانترفیوژ کردن ۱۰/۰ دقیقه، دور سانترفیوژ ۳۵۰۰ دور در دقیقه.

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

نوع بافر	کلرودیازپوکساید	آلپرازولام	مجموع سیگنال
استاتی	۱۲۳۳/۵۳	۱۸۷۳/۵۸	۳۱۰۷/۱۱
فسفاتی	۱۸۳۹/۱	۱۷۰۳/۲	۴۳۹۹/۳۳
فتالاتی	۱۲۴۳/۳۹	۲۳۹۱/۶۹	۳۶۳۴/۹۹

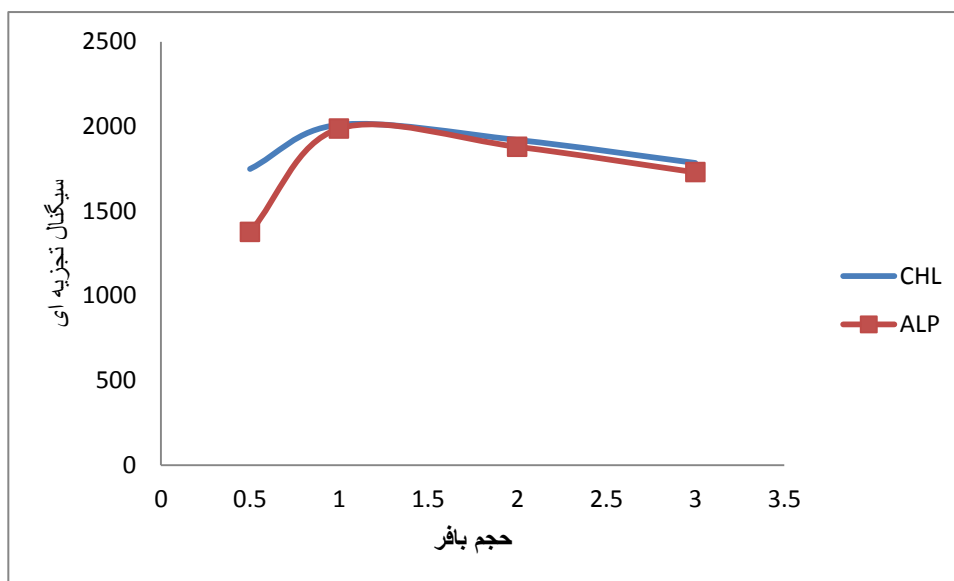


شکل ۲ پ): نمودار تاثیر نوع بافر بر میزان استخراج

شرایط آزمایش: غلظت کلرودیازپوکساید و آلپرازولام ۱/۰ میلی گرم بر لیتر، حجم محلول نمونه ۱۰/۰ میلی لیتر، ۲/۰ میلی لیتر بافر با pH=۵/۰، زمان استخراج ۱۰ دقیقه، حجم حلال استخراج کننده (۱-آندکانول) ۵۰/۰ میکرولیتر، نوع سورفاکتانت Tween80، غلظت سورفاکتانت ۰/۰۷۵ میلی گرم بر لیتر، زمان استخراج ۱۰/۰ دقیقه، زمان سانترفیوژ کردن ۱۰/۰ دقیقه، دور سانترفیوژ ۳۵۰۰ دور در دقیقه.

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

حجم بافر	کلرودیازپوکساید	آلپرازولام	مجموع سیگنال
۰/۵	۱۷۴۸/۵۴	۱۳۷۶/۴۳	۳۱۲۴/۹۸
۱/۰	۱۹۸۶/۶۰	۱۹۸۶/۶۰	۳۹۹۵/۸۲
۲/۰	۱۹۱۹/۸۱	۱۸۷۹/۳۶	۳۷۹۹/۱۷
۳/۰	۱۷۸۳/۸۵	۱۷۲۸/۶۴	۳۵۱۲/۵۳

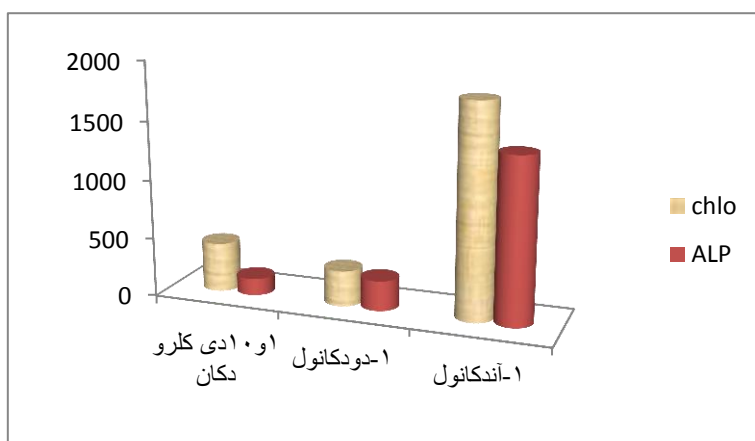


شکل ۳ پ): نمودار تاثیر حجم بافر بر میزان استخراج

شرایط آزمایش: غلظت کلرودیازپوکساید و آلپرازولام ۱/۰ میلی گرم بر لیتر، حجم محلول نمونه ۱۰/۰ میلی لیتر، بافر فسفاتی با pH=۵/۰، زمان استخراج ۱۰ دقیقه، حجم حلال استخراج کننده (۱-آندکانول) ۵۰/۰ میکرولیتر، نوع سورفاکتانت Tween80، غلظت سورفاکتانت ۰/۰۷۵ میلی گرم بر لیتر، زمان استخراج ۱۰/۰ دقیقه، زمان سانترفیوژ کردن ۱۰/۰ دقیقه، دور سانترفیوژ ۳۵۰۰ دور در دقیقه.

جدول ۴ پ): نتایج حاصل از بررسی اثر نوع حلال استخراج کننده بر میزان استخراج

نوع حلال استخراج کننده	کلرودیازپوکساید	آلپرازولام	مجموع سیگنال
۱۰دی کلرو دکان	۶۷۹۵/۴۱	۱۴۳/۷۰	۵۶۳/۳۸
۱-دو دکانول	۳۰۳/۳۷	۲۵۵/۲۹	۵۵۸/۶۶
۱-آندکانول	۱۷۹۴/۰۰	۱۳۴۹/۵۵	۳۱۸۸/۵۵



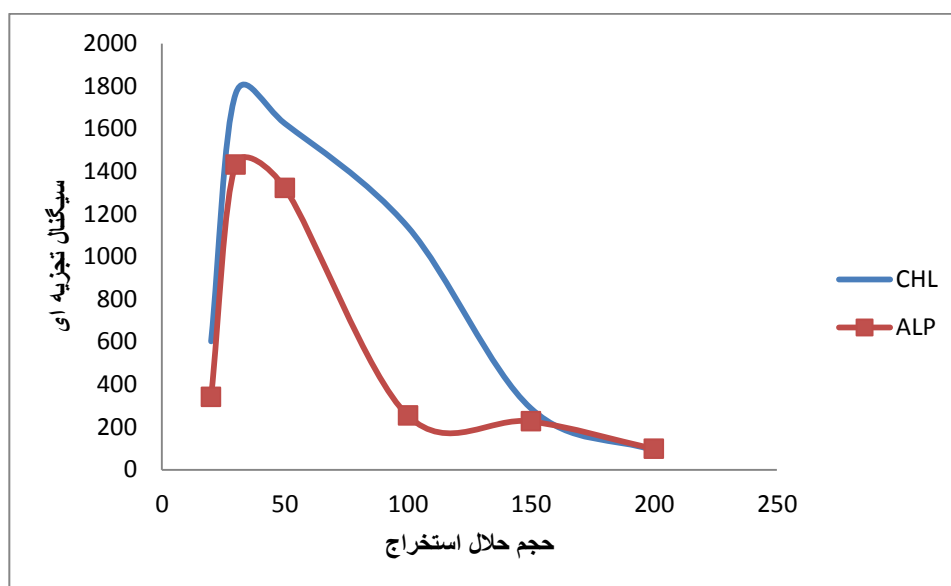
شکل ۴ پ): نمودار تاثیر نوع حلال استخراج کننده بر میزان استخراج

شرایط آزمایش: غلظت کلرودیازپوکساید و آلپرازولام ۱/۰ میلی گرم بر لیتر، حجم محلول نمونه ۱۰/۰ میلی لیتر، ۱۰/۰ میلی لیتر بافر فسفات با pH=۵/۰، زمان استخراج ۱۰ دقیقه، حجم حلال استخراج کننده ۵۰/۰ میکرولیتر، نوع سورفاکتانت Tween80، غلظت سورفاکتانت ۰/۰۷۵ میلی گرم بر لیتر، زمان استخراج ۱۰/۰ دقیقه، زمان سانترفیوژ کردن ۱۰/۰ دقیقه، دور سانترفیوژ ۳۵۰۰ دور در دقیقه.

جدول ۵ پ): نتایج حاصل از بررسی حجم حلال استخراج کننده بر میزان استخراج

حجم حلال استخراج کننده	کلرودیازپوکساید	آلپرازولام	مجموع سیگنال
۲۰/۰	۶۰۲/۲۷	۳۴۱/۲۳	۹۴۳/۵۰
۳۰/۰	۱۷۶۴/۵۷	۱۴۳۱/۶۱	۳۱۹۶/۱۸
۵۰/۰	۱۶۲۴/۳	۱۳۲۱/۳	۲۹۴۵/۶

۱۰۰/۰	۱۱۳۸/۱۴	۲۵۳/۱۹	۱۳۹۱/۹۰
۱۵۰/۰	۲۸۷/۸۵	۲۲۶/۴۷	۵۱۴/۳۲
۲۰۰/۰	۸۹/۷۴	۹۷/۶۹	۱۸۷/۴۳

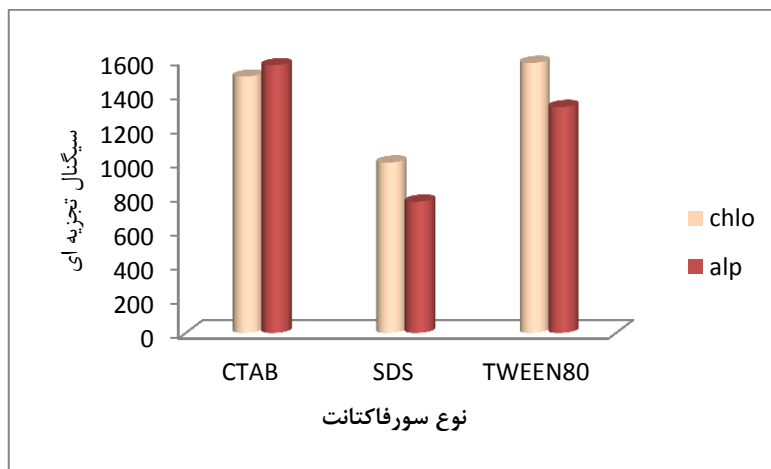


شکل ۵ پ): نمودار تاثیر حجم حلال استخراج کننده بر میزان استخراج

شرایط آزمایش: غلظت کلرودیازپوکساید و آلپرازولام ۱/۰ میلی گرم بر لیتر، حجم محلول نمونه ۱۰/۰ میلی لیتر، ۲/۰ میلی لیتر بافر فسفات با pH=۵/۰، زمان استخراج ۱۰ دقیقه، نوع سورفاکتانت Tween80، غلظت سورفاکتانت ۰/۰۷۵ میلی گرم بر لیتر، زمان استخراج ۱۰/۰ دقیقه، زمان سانترفیوژ کردن ۱۰/۰ دقیقه، دور سانترفیوژ ۳۵۰۰ دور در دقیقه.

جدول ۶ پ): نتایج حاصل از بررسی اثر نوع سورفاکتانت بر میزان استخراج

نوع سورفاکتانت	کلرودیازپوکساید	آلپرازولام	مجموع سیگنال
CTAB	۱۸۰/۱/۹۱	۱۵۶۸/۳۲	۳۳۷۰/۲۳
SDS	۹۹۸/۳۲	۷۶۹/۲۹	۱۷۶۷/۶۱
TWEEN80	۱۵۸۲/۳۹	۱۳۲۳/۷۷	۲۹۰۶/۱۷

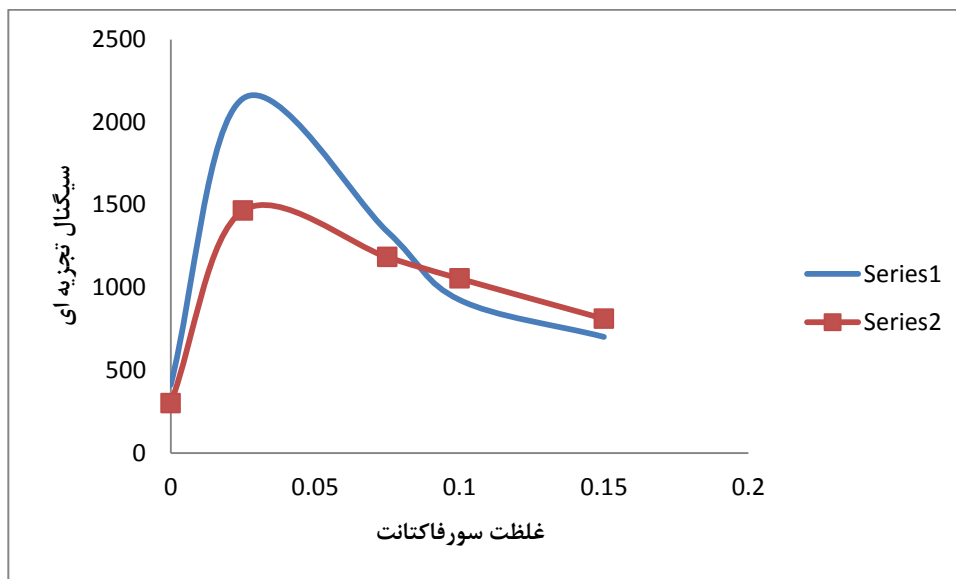


شکل ۶ پ): نمودار تاثیر نوع سورفاکتانت بر میزان استخراج

شرایط آزمایش: غلظت کلرودیازپوکساید و آلپرازولام ۱/۰ میلی گرم بر لیتر، حجم محلول نمونه ۱۰/۰ میلی لیتر، ۲/۰ میلی لیتر بافر فسفاتی با pH=۵/۰، زمان استخراج ۱۰ دقیقه، حجم حلال استخراج کننده (۱-آندکانول) ۳۰ میکرولیتر، نوع سورفاکتانت، غلظت سورفاکتانت ۰/۰۷۵ میلی گرم بر لیتر، زمان استخراج ۱۰/۰ دقیقه، زمان سانترفیوژ کردن ۱۰/۰ دقیقه، دور سانترفیوژ ۳۵۰۰ دور در دقیقه.

جدول ۷ پ): نتایج حاصل از بررسی اثر غلظت سورفاکتانت بر میزان استخراج

غلظت سورفاکتانت	کلرودیازپوکساید	آلپرازولام	مجموع سیگنال
۰	۴۱۱/۸۶	۳۰۰/۹۵	۷۱۲/۸۱
۰/۰۲۵	۲۱۴۲/۹۳	۱۴۶۴/۹۰	۳۶۰۷/۸۳
۰/۰۷۵	۱۹۸۵/۳۲	۱۳۴۳/۲۵	۳۳۲۸/۵۷
۰/۱	۹۲۶/۴۸	۱۰۵۴/۹۷	۱۹۸۱/۴۵
۰/۱۵	۷۰۲/۶۲	۸۱۲/۱۳	۱۵۱۴/۷۵

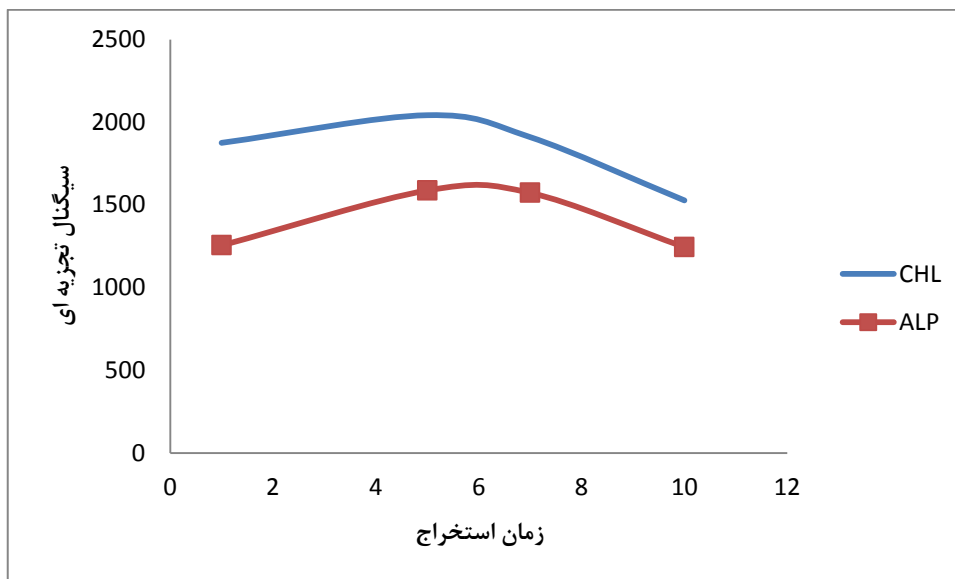


شکل ۷ پ): نمودار تاثیر غلظت سورفاکتانت بر میزان استخراج

شرایط آزمایش: غلظت کلرودیازپوکساید و آلپرازولام ۱/۰ میلی گرم بر لیتر، حجم محلول نمونه ۱۰/۰ میلی لیتر، ۲/۰ میلی لیتر بافر فسفاتی با $\text{pH}=5/0$ ، زمان استخراج ۱۰ دقیقه، حجم حلال استخراج کننده (۱-آندکانول) ۳۰ میکرولیتر، نوع سورفاکتانت CTAB، زمان استخراج ۱۰/۰ دقیقه، زمان سانترفیوژ کردن ۱۰/۰ دقیقه، دور سانترفیوژ ۳۵۰۰ دور در دقیقه.

جدول ۸ پ): نتایج حاصل از بررسی اثر زمان استخراج بر میزان استخراج

زمان استخراج	کلرودیازپوکساید	آلپرازولام	مجموع سیگنال
۱	۱۸۷۵/۵۱	۱۲۵۵/۷۹	۳۱۳۱/۳۱
۵	۲۰۴۲/۳۵	۱۵۸۷/۷۱	۳۶۳۰/۰۶
۷	۱۹۱۰/۱۵	۱۵۷۳/۱۲	۳۴۸۳/۲۷
۱۰	۱۵۲۷/۵۸	۱۲۴۵/۴۹	۲۷۷۳/۰۸

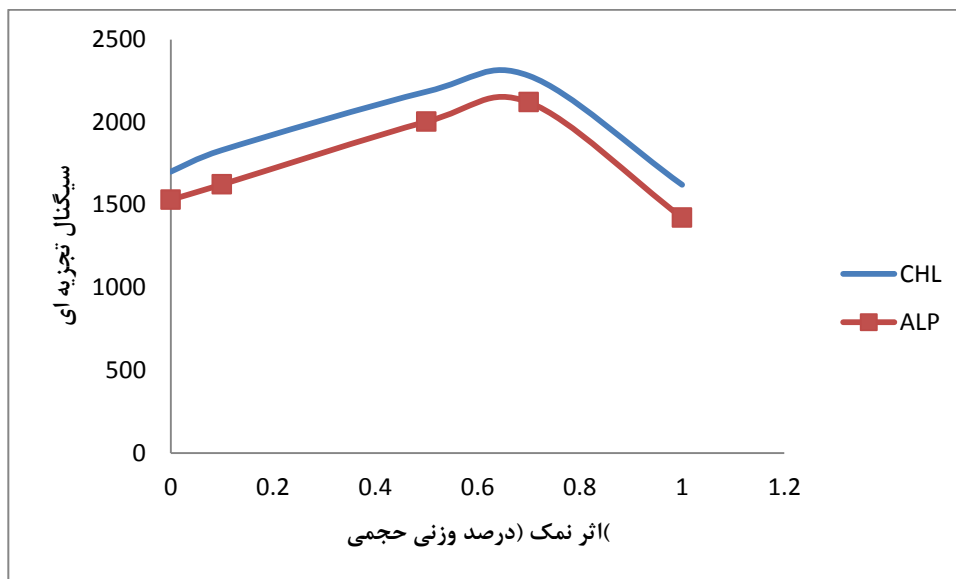


شکل ۸ پ): نمودار تاثیر زمان استخراج بر میزان استخراج

شرایط آزمایش: غلظت کلرودیازپوکساید و آلپرازولام ۱/۰ میلی گرم بر لیتر، حجم محلول نمونه ۱۰/۰ میلی لیتر، ۲/۰ میلی لیتر بافر فسفاتی با pH=۵/۰، زمان استخراج ۱۰ دقیقه، حجم حلال استخراج کننده (۱-آندکانول) ۳۰ میکرولیتر، نوع سورفاکتانت CTAB، غلظت سورفاکتانت ۰/۰۲۵ میلی گرم بر لیتر، زمان سانترفیوژ کردن ۱۰/۰ دقیقه، دور سانترفیوژ ۳۵۰۰ دور در دقیقه.

جدول ۹ پ): نتایج حاصل از بررسی اثر قدرت یونی (اثر نمک) بر میزان استخراج

اثر نمک (قدرت یونی)	کلرودیازپوکساید	آلپرازولام	مجموع سیگنال
۰	۱۷۰۱/۱۲	۱۵۳۱/۴۵	۳۲۳۲/۵۷
%۰/۱	۱۸۳۱/۲۳	۱۶۲۳/۵۲	۳۴۵۴/۷۵
%۰/۵	۲۱۸۴/۴۷	۲۰۰۳/۳۲	۴۱۸۷/۸۰
%۰/۷	۲۲۸۱/۰۸	۲۱۲۰/۱۷	۴۴۰۱/۲۵
%۱/۰	۱۶۲۲/۰۷	۱۴۲۳/۱۴	۳۰۴۵/۲۲

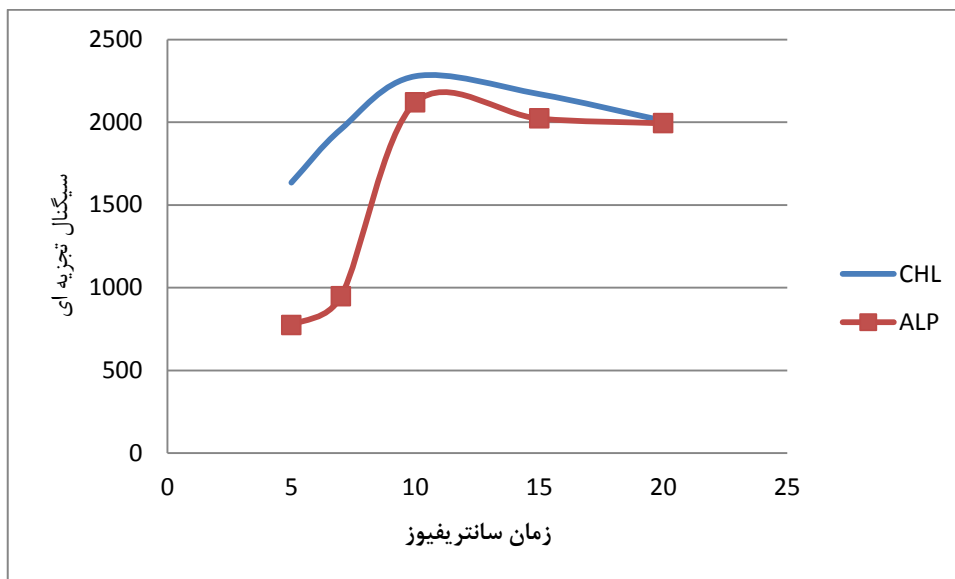


شکل ۹ پ): نمودار تاثیر اثر قدرت یونی (اثر نمک) بر میزان استخراج

شرایط آزمایش: غلظت کلرودیازپوکساید و آلپرازولام ۱/۰ میلی گرم بر لیتر، حجم محلول نمونه ۱۰/۰ میلی لیتر، ۲/۰ میلی لیتر بافر فسفاتی با $\text{pH}=5/0$ ، زمان استخراج ۱۰ دقیقه، حجم حلال استخراج کننده (۱-آندکانول) ۳۰ میکرولیتر، نوع سورفاکتانت CTAB، غلظت سورفاکتانت ۰/۰۲۵ میلی گرم بر لیتر، زمان استخراج ۵/۰ دقیقه، زمان سانترفیوژ کردن ۱۰/۰ دقیقه، دور سانترفیوژ ۳۵۰۰ دور در دقیقه.

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

زمان سانترفیوژ	کلرودیازپوکساید	آلپرازولام	مجموع سیگنال
۵	۱۶۳۵/۰۰	۷۷۳/۸۷	۲۴۰۸/۸۸
۷	۱۹۵۷/۹۶	۹۸۴/۱۱	۲۹۰۶/۰۷
۱۰	۲۲۷۷/۹۶	۲۱۱۸/۷۳	۴۳۹۶/۶۹
۱۵	۲۱۶۹/۹۱	۲۰۲۱/۶۳	۴۱۹۱/۵۴
۲۰	۲۰۰۹/۰۱	۱۹۹۳/۲۱	۴۰۰۲/۲۲

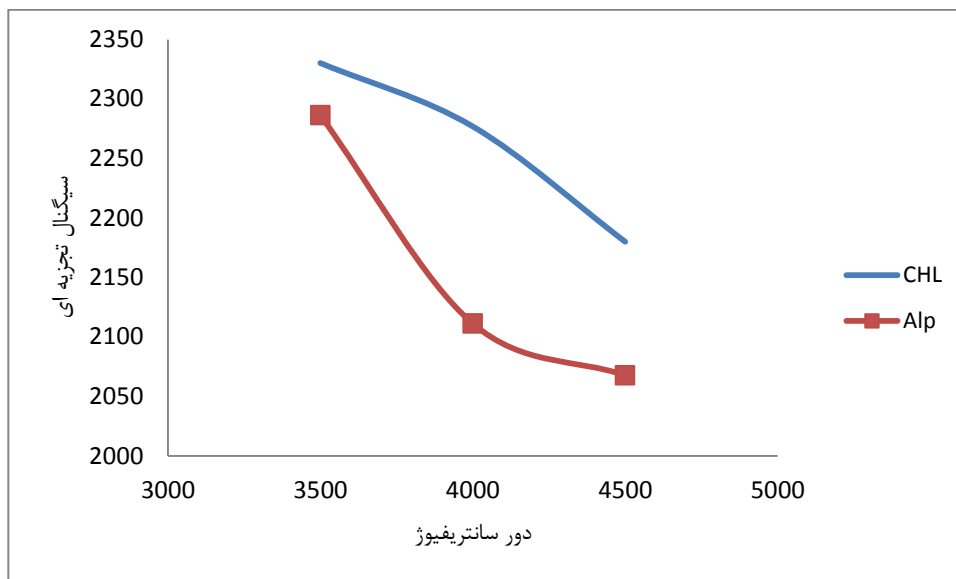


شکل ۱۰ پ): نمودار تاثیر اثر زمان سانترفیوژ بر میزان استخراج

شرایط آزمایش: غلظت کلرودیازپوکساید و آلپرازولام ۱/۰ میلی گرم بر لیتر، حجم محلول نمونه ۱۰/۰ میلی لیتر، ۲/۰ میلی لیتر بافر فسفاتی با pH=۵/۰، مقدار نمک ۰/۷٪ وزنی حجمی، زمان استخراج ۱۰ دقیقه، حجم حلال استخراج کننده (۱-آندکانول) ۳۰ میکرولیتر، نوع سورفاکتانت CTAB، غلظت سورفاکتانت ۰/۰۲۵ میلی گرم بر لیتر، زمان استخراج ۵/۰ دقیقه، دور سانترفیوژ ۳۵۰۰ دور در دقیقه.

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

دور سانترفیوژ	کلرودیازپوکساید	آلپرازولام	مجموع سیگنال
۳۵۰۰	۲۳۳۰/۲۰	۲۲۸۶/۲۳	۴۶۱۶/۴۴
۴۰۰۰	۲۲۷۶/۸۹	۲۱۱۱/۲۵	۴۳۸۸/۱۵
۴۵۰۰	۲۱۸۰/۰۱	۲۰۶۷/۷۳	۴۲۴۷/۷۵



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

شرایط آزمایش: غلظت کلرودیازپوکساید و آلپرازولام ۱/۰ میلی گرم بر لیتر، حجم محلول نمونه ۱۰/۰ میلی لیتر، ۲/۰ میلی لیتر بافر فسفاتی با $\text{pH}=5/0$ ، مقدار نمک ۰/۷٪ وزنی حجمی، زمان استخراج ۱۰ دقیقه، حجم حلال استخراج کننده (۱-آندکانول) ۳۰ میکرولیتر، نوع سورفاکتانت CTAB، غلظت سورفاکتانت ۰/۰۲۵ میلی گرم بر لیتر، زمان استخراج ۵/۰ دقیقه، زمان سانتریفیوژ کردن ۱۰/۰ دقیقه.

- [1] Shorter E., (2005), "A Historical Dictionary of Psychiatry", Ph.D. Oxford University Press, New York.
- [2] Khodadoust S., Ghaedi., (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.
- [3] Saïas T., Gallarda T., (2008)., "Paradoxical aggressive reactions to benzodiazepine use: a review", *Encephale, French.*, 34, 330-336.
- [4] Lader M., (2008)., "Effectiveness of benzodiazepines: do they work or not?", *Expert Rev Neurother.*, 8, 1189-1191.
- [5] Lader M., Tylee A., Donoghue J., (2009)., "Withdrawing benzodiazepines in primary care", *CNS Drugs.*, 23, 19-34.
- [6] Ashton H., (2005)., "The diagnosis and management of benzodiazepine dependence", *CURR OPIN PSYCHIATR.*, 18, 249-255.
- [7] McIntosh A., Semple D., Smyth R., Burns J., Darjee., (2005), "Depressants". Oxford Handbook of Psychiatry., Oxford University Press.
- [8] Billioti de., Gage S., Bégau 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.
- [9] Fraser AD., (1998), "Use and abuse of the benzodiazepines", *Ther Drug Monit.*, 20, 481-489.
- [10] Baldwin D., (2005)., "Short-term treatment with hyponotic drugs for insomnia" psychopharmacology., 19, 134-135.
- [11] Ramakrishnan K, Scheid DC., "Treatment options for insomnia", *Am Fam Physician.*, 76,(2007), 517-26.
- [12] Scottish Intercollegiate Guidelines Network., (2005)., "Diagnosis and management of epilepsy in adults", 17-9.
- [13] 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

[14] Shorvon SD., (2009), "Drug treatment of epilepsy in the century of the ILAE: the second 50 years, 1959–2009" ., *Epilepsia.*, 50, 69-92.

[15] Ashton CH., (1994)., “Guidelines for the Rational Use of Benzodiazepines”., *RVI.*, 48, 25-40.

[16] McIntosh A., Cohen A., Turnbull N., (2004), "Clinical guidelines and evidence review for panic disorder and generalised anxiety disorder"., National Collaborating Centre for Primary Care., London.

[17] 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.

[18] Murray B., Marcia K., (2009), "APA Practice Guideline for the Treatment of Patients With Panic Disorder, Second Edition"., Second Edition.

[19] Martin JL., Sainz-Pardo M., Furukawa TA., Martín-Sánchez E., Seoane T., Galán C., (2007)., "Benzodiazepines in generalized anxiety disorder: heterogeneity of outcomes based on a systematic review and meta-analysis of clinical trials". *Psychopharmacol.*21, 774-782.

[20] Ashworth M., Gerada C., (1997)., "ABC of mental health. Addiction and dependence II: Alcohol"., *BMJ.*, 315, 358-360.

[21] Kraemer KL., Conigliaro J., Saitz R., (1999)., "Managing alcohol withdrawal in the elderly". *Drugs Aging.*, 14, 409–425

[22] Sternbach LH., (1979)., "The benzodiazepine story". *J. Med. Chem.*,22, 1-7.

[23] Miller NS., Gold MS., (1990)., "Benzodiazepines: reconsidered". *Adv Alcohol Subst Abuse.*, 8, 67-84.

[24] Moylan S.; Giorlando F.; Nordfjærn T.; Berk., (2012)., “The role of for the . treatment of panic disorder in Australia”., *Psychiatry.*, 46, 212–224.

- [25] 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.
- [26] E.N., Langødegård M., Ekeberg D., Øiestad A.M.L., (2012)., Sauve "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.
- [27] 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.
- [28] 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.
- [29] 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.
- [30] 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.
- [31] Chiarotti M, De Giovanni N., Fiori A., "Analysis of benzodiazepines. I Chromatographic identification"., (1986)., *Chromatogr. A.*, 358, 169-178.
- [32] . 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.
- [33] 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.
- [34] Schtitz H., Schneider WR., (1987)., "Screening of tetracyclic benzodiazepines .with EMIT-st (benzodiazepines) and TDx "., *Z Rechtsmed.*, 99, 181-189.

- [35] 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.
- [36] 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
- [37] Rezaei F., Yamini Y., Moradi M., Daraei B., (2013)., "Supramolecular solvent-based hollow fiber liquid phase microextraction of benzodiazepines"., *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"., *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.*
- [۴۱] ابراهیمی س ، (۱۳۹۲)، پایان نامه کارشناسی ارشد: "بهینه سازی استخراج و جداسازی برخی آمین‌های آروماتیک یا فاز جامد و کروماتوگرافی مایع مایسلی و اندازه‌گیری آن‌ها در آب‌های محیطی"، دانشکده شیمی، دانشگاه مازندران.
- [42] Skoog D A., HollerF J., Crouch S R., (1985). "Principiles of instrumental analysis" Sander College, New York.
- [43] Haric C., (1999), "Quantitative Chemical Analysis"., Clancy Marshall., United States of America.

[۴۴] ناظری س، (۱۳۹۲)، پایان نامه کارشناسی ارشد: "کاربرد روش میکرو استخراج فاز مایع بر

اساس قطره جامد جهت پیش تغلیظ مقادیر کم مس در نمونه‌های محیطی قبل از اندازه‌گیری با

اسپکترومتری جذب اتمی" دانشکده شیمی، دانشگاه شاهرود.

Nerín C., (2007)., "Focus on sample handling"., Analytical and Bioanalytical [۴۵]

.Chemistry.,388, 1001-1002

[46] Es'haghi Z., (2011)., "Extraction and Determination of Three Chlorophenols by Hollow Fiber Liquid Phase Microextraction Spectrophotometric Analysis, and Evaluation Procedures Using Mean Centering of Ratio Spectra Method"., J. Anal. Chem., 2, 1-8

[47] He Y., Hian K.L., (1997)., "Combination of solid-phase extraction and field-amplified concentration for trace analysis of organonitrogen pesticides by micellar electrokinetic"., chromatography Electrophoresis., 18, 2036-2041

[48] Hyotylainen T., (2009)., "Critical evaluation of sample pretreatment technique"., . Anal.Bioanal.Chem, 394, 743-758.

[49] Micheal A., John M., (2010)., "Single drop microextraction-development, applications and future trends"., J. Chromatogr.A., 1217, 2326-2336.

[50] You X., Wang S., Liu F., Shi K., (2013)., "Ultrasound-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction based on the solidification of a floating organic droplet used for the simultaneous determination of six fungicide residues in juices and red wine" J. Chromatogr. A., 1300, 64-69.

[51] Proverbio Z.E., Bardavid S., Arancibia E.L., Schulz P.C., (2003)., "Hydrophile/lipophile balance and solubility parameter of cationic surfactants"., Colloids Surf., A., 214, 167-171.

[52] Liang P., Liu G., Wang F., Wang W., (2013)., "Ultrasound-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction with solidification of floating organic droplet followed by high performance liquid chromatography for the determination of strobilurin fungicides in fruit juice samples" J. Chromatogr B., 926, 62-67

- [53] Bidabadi M, Dadfarnia S, A.M. Haji Shabani., (2009)., "Solidified floating organic drop microextraction (SFODME) for simultaneous separation/preconcentration and determination of cobalt and nickel by graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS)" *J. Hazard. Mater.*, 166, 291-296
- [54] Rial-Otero R., Yagüe-Ruiz C., Cancho-Grande B., Simal-Gándara J., (2002)., "Solid-phase microextraction–gas chromatographic–mass spectrometric method for the determination of the fungicides cyprodinil and fludioxonil in white wines"., *J. Chromatogr.A.*, 942, 41
- [55] Vinas P, Martínez-Castillo N, Campillo N, Hernández-Córdoba M, (2010)
 "Liquid-liquid microextraction methods based on ultrasound-assisted emulsification and single-drop coupled to gas chromatography-mass spectrometry for determining strobilurin and oxazole fungicides in juices and fruits".*J. Chromatogr. A.*, 1217, 65-69
- [56] Pizarro C., Sáenz-González C., Pérez-del-Notario N., González-Sáiz J.M., (2012), "Optimisation of ultrasound-assisted emulsification microextraction method with solidification of floating organic drop for the analysis of cork taint responsible compounds in wine" , *J. Chromatogr.A.*, 1248, 60–66
- [57] Kamarei F., Ebrahimzadeh H., Yamini Y., (2011)., "Optimization of ultrasound-assisted emulsification microextraction with solidificationOf floating organic droplet followed by high performance liquid chromatography for the analysis of phthalate esters in cosmetic and environmental water samples"., *Microchem. J.*, 99, 26–33
- [58] حاجیان ف، (۱۳۹۲)، پایان نامه ارشد: "اندازه‌گیری ال - سیستمین به روش تزریق در جریان پیوسته با آشکارساز اسپکتروفتومتری" دانشکده شیمی، دانشگاه شاهرود.
- [59] Lundstedt T., Seifert E., Abramo L., Thelin B., Nystrom A., Pettersen J., Bergman , "Experimental design and optimization"., *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 42, 3-40.R., (1940)
- [60] Bezerra M., Santelli R., Oliveira E., Villar L., Escaleira L., (2008)

- [60] Bezerra M., Santelli R., Oliveira E., Villar L., Escaleira L., (2008)., "Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry-Review"., *Talanta* 76, 965–977
- [61] 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
- [62] Hibbert D., (2012)., "Experimental design in chromatography: A tutorial review"., *J. Chromatogr.B.*, 910, 2–13
- [63] Ferreira S., Bruns R., Silva E., Santos W., Quintella C, David J, Andrade J, , "Statistical designs and response surface .Breitkreitz M, Jardim I., Neto B., (2007) techniques for the optimization of chromatographic systems"., *J. Chromatogr. A.*, 1158, 2–14.
- [64] Morgan ED., (1995)., "Chemometrics: Experiental Desinge"., Publication data., British library.
- [65] Sematech.N., (2012)., "Engineering statistics Handbook"., Nist/Sematech.
- [66]. Rashmin B., Arpita B., Mrunali R., Madhira B., Kashyap K., Bhatt A., (2009)., "Estimation of Alprazolam and Sertraline in Pure Powder and Tablet Formulations by High-Performance Liquid Chromatography and HighPerformance Thin-Layer Chromatography".*J. Anal Letts.*, 42, 1588–1602.
- [67]Miller J.N., (2013)., "Experimental design and optimisation (4): Plackett–Burman .designs"., RSC publishing
- [68] ابراهیم پور م، (۱۳۶۸)، "تحلیل رگرسیون با مینی تب ۱۴"، ناشر اقلیدس
- [69]. Montgomery, D.C., (1991)., "Design and analysis of experiments"., Canada., 1-12.
- [70] نیرومند ح، (۱۳۸۷) "تحلیل رگرسیون خطی ابزاری برای تحقیق " چاپ اول، دانشگاه.

[71] Pyrzyńska K., Kilian K., (2007)., “On-line sorption-based systems for cadmium with atomic spectrometry detectors” ., *Water research.*, 41., of determination 2839-2851.

[72] 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.

Abstract

In this research, a simple and sensitive ultrasound-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction technique based on the solidification of a floating organic droplet followed by high performance liquid chromatography with ultraviolet-variable wavelength detection was developed for simultaneous preconcentration and determination of Chlorodiazepoxide and Alprazolam. The solvent, 1-undecanol, was used as an extraction solvent. For its low density and proper melting point near room temperature, the surfactant, CTAB, was used as an emulsifier to enhance the dispersion of the organic extraction solvent into an aqueous phase, which hastened the mass-transfer of the analytes. Some parameters (e.g., pH, the type and volume of extraction solvent, the type and concentration of surfactant, salt addition, and etc) that affect the extraction efficiency were optimized by experimental design. Under the optimized conditions; a linear calibration curves in the range of 0.5-3.5 mg.L⁻¹ for both drugs, with detection limits of 0.021 mg.L⁻¹ for Chlorodiazepoxide and 0.02 mg.L⁻¹ for Alprazolam. Also, the preconcentration factor of Chlorodiazepoxide and Alprazolam were obtained 109.4 and 105.0 respectively. The relative standard deviation for three replicate determinations of 0.5, 1.0 and 3mg.L⁻¹ of Chlorodiazepoxide were 3.3%, 4.2% and 4.8% and Alprazolam were 3.4%, 3.9% and 4.08% respectively. This method was applied successfully for determination of these drugs in different real samples.

Keywords: Ultrasound-assisted surfactant-enhanced, Microextraction, Floating organic droplet, chlorodiazepoxide, alprazolam



University of Shahrood
Faculty of chemistry

**Separation and determination of some calmative drug by chromatography using
ultrasound-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction with
solidification of floating organic droplet coupled with high performance liquid**

Monavar Amirnavae

Supervisor:

Dr. N. Goudarzi

Advistor:

Dr. M. Arab chamjangali

September 2015

