

بہ نام خدا



دانشکده شیمی

گروه شیمی تجزیه

رساله دکتری

کاربرد روش‌های میکرو استخراج مایع - مایع پخشی اصلاح شده و

تکنیک‌های بهینه‌سازی برای اندازه‌گیری برخی ترکیبات دارویی

به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)

نگارنده: سحر فارسی‌مدان

اساتید راهنما:

دکتر ناصر گودرزی

دکتر منصور عرب‌چم‌جنگلی

استاد مشاور:

دکتر قدمعلی باقریان

شهریور ۱۳۹۶

شماره: ۱۲.۳
تاریخ: ۹۶/۷/۵
ویرایش:

باسمه تعالی



مدیریت تحصیلات تکمیلی

فرم شماره ۱۲: صورت جلسه نهایی دفاع از رساله دکتری (Ph.D)
(ویژه دانشجویان ورودی های ۹۴ و ما قبل)

بدینوسیله گواهی می شود خانم سحر فارسی مدان دانشجوی دکتری رشته شیمی تجزیه به شماره دانشجویی ۹۰۲۴۶۷۵ ورودی بهمن ماه سال ۱۳۹۰ در تاریخ ۹۶/۰۶/۱۲ از رساله نظری / عملی خود با عنوان: کاربرد روش های میکرو استخراج مایع - مایع یخنی اصلاح شده و تکنیک های بهینه سازی برای اندازه گیری برخی ترکیبات دارویی به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) دفاع و با اخذ نمره ۱۸.۹۹ به درجه بسیار خوب نائل گردید.

<input checked="" type="checkbox"/> الف) درجه عالی: نمره ۱۹-۲۰	<input type="checkbox"/> ب) درجه بسیار خوب: نمره ۱۸/۹۹ - ۱۷
<input type="checkbox"/> ج) درجه خوب: نمره ۱۶/۹۹ - ۱۵	<input type="checkbox"/> د) غیر قابل قبول و نیاز به دفاع مجدد دارد
<input type="checkbox"/> ه) رساله نیاز به اصلاحات دارد	

ردیف	هیئت داوران	سمت	مرتبه علمی	امضاء
۱	دکتر ناصر گودرزی	اساتید راهنما	دانشیار	
۲	دکتر منصور عرب چم جنگلی		استاد	
۳	دکتر قدمعلی باقریان	مشاور	دانشیار	
۴	دکتر فاطمه صدرالامور	استاد مدعو داخلی	استاد یار	
۵	دکتر محمد حسین فاطمی	استاد مدعو خارجی	استاد	
۶	دکتر عبدالرئوف صدقی	استاد مدعو خارجی	استاد	
۷	دکتر مهدی میرزایی	نماینده تحصیلات تکمیلی دانشکده	استاد یار	

مدیر محترم تحصیلات تکمیلی دانشگاه:

ضمن تأیید مراتب فوق مقرر فرمائید اقدامات لازم در خصوص انجام مراحل دانش آموختگی خانم سحر فارسی مدان بعمل آید.

نام و نام خانوادگی رئیس دانشکده:

تاریخ و امضاء و مهر دانشکده:

۹۶/۷/۵



فرستہ زندگیم

بہ پاس مہربانیش

با سپاس صمیمانه خدمت استاد بزرگوار، جناب آقای دکتر ناصر گودرزی، که زحمت راهنمایی این رساله را برعهده داشتند و همواره از راهنمایی‌ها و نظرات ارزشمند ایشان بهره‌مند گشته‌ام.

با تشکر از استاد گرانقدر، جناب آقای دکتر منصور عرب چم جنگلی، که از راهنمایی‌های ارزنده‌شان طی انجام این رساله بهره گرفتم.

با قدردانی از استاد محترم، جناب آقای دکتر قدمعلی باقریان دهقی، که مشاوره این رساله را پذیرفتند و در مسیر پیشبرد آن بی‌دریغ مساعدت نمودند.

با سپاس فراوان و قدردانی از سرکار خانم دکتر فاطمه مصدرالامور و جناب آقایان دکتر محمدحسین فاطمی و دکتر سید عبدالرئوف صمدی (اعضای محترم هیات علمی دانشگاه مازندران)، که زحمت مطالعه رساله اینجانب را با سعه صدر پذیرفته و با ارائه پیشنهادات و نظرات ارزنده جهت بهبود آن یاری رساندند.

با تشکر از جناب آقای دکتر مهدی میرزایی که در سمت نماینده تحصیلات تکمیلی زحمت مدیریت جلسه دفاع از رساله اینجانب را بر عهده داشتند.

با سپاس فراوان از خانواده عزیز و مهربانم که همیشه مدیون لطف ایشان هستم.

همچنین، از تمامی دوستان عزیزم در آزمایشگاه‌های تجزیه و سایر آزمایشگاه‌های تحقیقاتی شیمی، کلیه اساتید محترم و کارمندان زحمتکش دانشکده شیمی کمال تشکر را دارم.

تعهد نامه

اینجانب سحر فارسی مدان دانشجوی دوره دکتری رشته شیمی تجزیه دانشکده شیمی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده رساله کاربرد روش‌های میکرو استخراج مایع - مایع بخشی اصلاح شده و تکنیک‌های بهینه‌سازی برای اندازه‌گیری برخی ترکیبات دارویی به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) تحت راهنمایی دکتر ناصر گودرزی و دکتر منصور عرب چم جنگلی و مشاوره دکتر قدمعلی باقریان 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 صنعتی شاهرود می‌باشد و مقالات مستخرج با نام « دانشگاه صنعتی شاهرود » و یا « Shahrood University of Technology » به چاپ خواهد رسید.
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت 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.

امضای دانشجو

تاریخ

مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، کتاب، برنامه‌های رایانه‌ای، نرم افزارها و تجهیزات ساخته شده است) متعلق به دانشگاه صنعتی 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 اولین قسمت از این پایان‌نامه، یک روش سریع، ساده و حساس به نام روش میکرواستخراج فاز مایع بر اساس قطره جامد با کمک سورفکتانت و امواج فراصوت برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری همزمان مقادیر کم نیترازپام و میدازولام در نمونه‌های حقیقی معرفی شد. در این بخش، پارامترهای مهم و تاثیرگذار بر بازده عمل استخراج با استفاده از طراحی پلاکت برمن به عنوان یک روش غربالگری بررسی گردید. همچنین برای به‌دست آوردن شرایط بهینه، طراحی باکس-بنکن به کار برده شد. در نهایت روش میکرواستخراج با $29/1 \mu\text{L}$ از ۱-آندکانول، $1/36$ درصد وزنی/حجمی NaCl، $10/0 \mu\text{L}$ سدیم دودسیل سولفات با غلظت $25/0 \text{ mg mL}^{-1}$ و $10/0 \mu\text{L}$ Tween 80 با غلظت $25/0 \text{ mg mL}^{-1}$ به‌عنوان عامل پخش کننده با زمان استخراج ۲۰ دقیقه و $\text{pH}=7/88$ اجرا شد. برای اعتبار سنجی روش مفروض، پارامترهای مهم مانند گستره خطی دینامیکی، تکرارپذیری، حد تشخیص، حد اندازه‌گیری و درصد بازیابی تحت شرایط بهینه مورد بررسی قرار گرفت. حد تشخیص‌های $0/017 \mu\text{g L}^{-1}$ و $0/086$ به ترتیب برای نیترازپام و میدازولام به‌دست آمد. درصد بازیابی استخراج برای داروهای تحت مطالعه، در گستره $108/1 - 98/0$ درصد با انحراف استاندارد نسبی در گستره $3/8 - 1/0$ درصد بوده است. این روش به‌طور موفقیت آمیزی برای اندازه‌گیری این داروها در نمونه سرم خون انسانی، قرص و آمپول به‌کار برده شد. در دومین قسمت این پایان‌نامه، روش میکرواستخراج مایع پخشی مبتنی بر انجماد قطره آلی شناور و روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری همزمان سیتالوپرام، دیازپام و سرتالین به‌عنوان داروهای آرام بخش و ضد افسردگی در نمونه‌های قرص، سرم و ادرار انسانی توسعه داده شد. در این روش، ۱-آندکانول و اتانول به ترتیب به‌عنوان حلال استخراج کننده و حلال پخش کننده مورد استفاده قرار گرفتند. پارامترهای موثر بر کارآمدی روش استخراج با استفاده از طراحی پلاکت برمن به‌عنوان یک روش غربالگری مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از طراحی مرکب مرکزی مرکز وجوه پر، pH محلول و همچنین حجم حلال استخراج کننده که اثرات مهمی را روی پاسخ

تجزیه‌ای نشان داده است، بهینه شد. برای اعتبار سنجی این فن، صحت، دقت، حد تشخیص، حد اندازه‌گیری، گستره خطی دینامیکی و حساسیت ارزیابی شدند. حدود اندازه‌گیری $1/3$ ، $2/7$ و $1/2$ به ترتیب برای سیتالوپرام، دیازپام و سرتالین به دست آمد. درصد بازیابی استخراج برای همه داروهای مطالعه شده، بالای $85/0$ درصد با انحراف استاندارد نسبی قابل قبول بود. این روش به طور موفقیت-آمیزی برای اندازه‌گیری این داروها در نمونه‌های قرص، ادرار و سرم انسانی به کار برده شد.

در سومین قسمت این پایان نامه، یک عملکرد جدید براساس روش میکرواستخراج مایع مایع پخشی معکوس با کمک امواج فراصوت برای استخراج و اندازه‌گیری ویتامین A و E در نمونه‌های روغن قبل از آنالیز با روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا توسعه و ارائه داده شد. همچنین طراحی فاکتوریل کامل برای انتخاب پارامترهای موثر بر استخراج به کار برده شد. سپس فاکتورهای مهم و تاثیرگذار بر کارآمدی استخراج شامل pH، ترکیب درصد حلال استخراج، حجم حلال پخش کننده با استفاده از طراحی باکس-بانکن بهینه شد. پس از آنالیز نتایج به دست آمده، شرایط بهینه به صورت $pH = 4/5$ ، نسبت ۲-۸ مخلوط آب-اتانول به عنوان حلال استخراج، $110 \mu L$ از ۴۱ دی اکسان به عنوان حلال پخش کننده و زمان فراصوت ۱۰ دقیقه به دست آمد. برای اعتبار سنجی این روش، گستره خطی دینامیکی، تکرار پذیری، حد تشخیص و درصد بازیابی تحت شرایط بهینه به دست آمدند. حد تشخیص روش $1/6$ و $2/3$ به ترتیب برای ویتامین A و E به دست آمدند. درصد بازیابی استخراج برای ویتامین‌های مطالعه شده بالای ۹۱ درصد با انحراف استاندارد نسبی قابل قبول به دست آمد. این روش به طور موفقیت آمیزی برای اندازه‌گیری این ویتامین‌ها در نمونه‌های مختلف روغن به کار برده شد.

در نهایت در آخرین قسمت این پایان نامه، کاربرد روش میکرواستخراج مایع مایع پخشی فاز معکوس بدون استفاده از حلال آلی برای پیش تغلیظ و تعیین مقدار ویتامین A و E در نمونه‌های مختلف روغن گیاهی توسعه داده شد. روش میکرواستخراج براساس انتقال آنالیت از ماتریس روغن به یک فاز آبی غنی از سورفکتانت است و به همین سبب حلال استخراج آلی در این روش استفاده نشده است.

متغیرهای مورد نظر در این روش با استفاده از روش‌های کمومتریکس بهینه سازی شدند. ابتدا در آزمایشات غربالگری، روش طراحی فاکتوریل کامل برای انتخاب متغیرهای موثر بر روش استخراج استفاده شدند. سپس متغیرهای انتخاب شده با استفاده از روش رویه پاسخ براساس طراحی مکعب مرکزی همراه با تابع مطلوبیت بهینه سازی شدند. در شرایط بهینه گستره خطی دینامیکی mg L^{-1} ۰/۰۰۵-۳/۰ و ۰/۰۰۸-۲/۰ به ترتیب برای ویتامین‌های A و E به دست آمد. همچنین درصد انحراف استاندارد نسبی در گستره ۰/۷۷-۴/۷۱ و ۰/۶۱-۴/۳۷ به ترتیب برای ویتامین A و E به دست آمد. درصد بازیابی نسبی این ویتامین‌ها نیز در نمونه‌های مختلف روغن بالای ۹۸/۳۰ درصد بوده است.

واژه‌های کلیدی:

میکرواستخراج فاز مایع مایع پخشی، میکرواستخراج فاز مایع بر اساس قطره جامد، سورفکتانت، امواج فراصوت، طراحی آزمایش.

مقالات مستخرج از این رساله که در مجلات ISI، علمی پژوهشی و همایش ارائه شده است:

- 1- N. Goudarzi, S. Farsimadan, M. A. Chamjangali, and G. A. Bagherian, Optimization of modified dispersive liquid–liquid microextraction coupled with high-performance liquid chromatography for the simultaneous preconcentration and determination of nitrazepam and midazolam drugs: An experimental design, *Journal of Separation Science* 38 (2015) 1673-1679, 2015.
- 2- N. Goudarzi, S. Farsimadan, M. Arab Chamjangali, and G. A. Bagherian, "Development of coupled ultrasound-assisted and reversed-phase dispersive liquid–liquid microextraction before high-performance liquid chromatography for the sensitive determination of vitamin A and vitamin E in oil samples," *Journal of Separation Science*, vol. 38, pp. 3254-3261, 2015.
- 3- S. Farsimadan, N. Goudarzi, M. A. Chamjangali, and G. Bagherian, "Optimization of ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic droplets by experimental design methodologies for determination of three anti-anxiety drugs in human serum and urine samples by high performance liquid chromatography, *Microchemical Journal* 128 (2016) 47-54.

فصل اول:

- ۱مقدمه
- ۱-۱ بنزودیازپین ۲
- ۲-۱ مهار کننده های انتخابی بازجذب سروتونین (SSRIs) ۶
- ۳-۱ ویتامین ۹
- ۱-۳-۱ ویتامین A ۱۰
- ۲-۳-۱ ویتامین E ۱۱
- ۴-۱ روش های کروماتوگرافی ۱۴
- ۱-۴-۱ کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا ۱۵
- ۵-۱ روش های آماده سازی نمونه ۱۶
- ۶-۱ میکرو استخراج مایع مایع پخشی ۲۱
- ۱-۶-۱ اصول میکرو استخراج مایع مایع پخشی ۲۱
- ۲-۶-۱ اصول تئوری میکرواستخراج مایع-مایع پخشی ۲۲
- ۳-۶-۱ ویژگی های حلال استخراج کننده و پخش کننده ۲۳
- ۴-۶-۱ معایب میکرواستخراج مایع مایع پخشی ۲۴

۷-۱ میکرواستخراج مایع- مایع پخشی بر اساس جامدسازی قطره آلی شناور و با کمک امواج فراصوت

۲۴

۸-۱ میکرواستخراج قطره آلی شناور جامد با کمک افزایش سورفکتانت و امواج فراصوت ... ۲۷

۹-۱ میکرواستخراج مایع مایع پخشی معکوس (RP-DLLME) ۲۸

۱۰-۱ روش‌های بهینه‌سازی پارامترها..... ۲۸

۱-۱۰-۱ روش تک‌متغیره ۲۹

۲-۱۰-۱ طراحی آزمایش ۳۰

۳-۱۰-۱ مراحل اصلی اجرای طراحی آزمایش ۳۰

۴-۱۰-۱ طرح‌های متوالی ۳۱

۵-۱۰-۱ طرح‌های هم‌زمان ۳۲

۶-۱۰-۱ طرح‌های فاکتوریل دو سطحی ۳۳

۷-۱۰-۱ طرح‌های چند سطحی ۳۵

۸-۱۰-۱ تابع مطلوبیت ۳۹

۹-۱۰-۱ ایجاد مدل‌های آماری ۴۰

فصل دوم:

۱-۲ مواد شیمیایی ۴۲

- ۲-۲ دستگاه‌ها و تجهیزات مورد استفاده در این پروژه ۴۳
- ۳-۲ آماده سازی محلول‌ها ۴۳
- ۴-۲ روش میکرواستخراج فاز مایع بر اساس قطره جامد با کمک سورفکتانت و امواج فراصوت برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری مقادیر کم نیترازپام و میدازولام در نمونه‌های حقیقی به‌وسیله کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا ۴۶
- ۱-۴-۲ ثبت طیف UV آنالیت‌ها و انتخاب بهترین طول موج ۴۶
- ۲-۴-۲ شرایط کروماتوگرافی برای اندازه‌گیری همزمان نیترازپام و میدازولام ۴۷
- ۳-۴-۲ روش کار در بهینه سازی پارامترهای موثر در اندازه‌گیری نیترازپام و میدازولام ۴۹
- ۵-۴-۲ منحنی کالیبراسیون مستقیم در اندازه‌گیری نیترازپام و میدازولام ۵۰
- ۶-۴-۲ بررسی و بهینه‌سازی فاکتورهای موثر در پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری نیترازپام و میدازولام ۵۳
- ۷-۴-۲ بررسی و بهینه سازی فاکتورهای موثر بر پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری نیترازپام و میدازولام به‌روش طراحی آزمایش ۵۵
- ۱-۷-۴-۲ تعیین سطوح فاکتورها برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری همزمان نیترازپام و میدازولام ۵۶
- ۲-۷-۴-۲ طراحی پلاکت برمن در تعیین فاکتورهای مهم برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری همزمان نیترازپام و میدازولام ۵۷
- ۳-۷-۴-۲ تعیین شرایط بهینه فاکتورهای موثر به‌روش طراحی باکس بنکن برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری همزمان نیترازپام و میدازولام ۶۲

- ۴-۷-۴-۲ ارزیابی مدل برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری همزمان نیترازپام و میدازولام ۶۵
- ۱-۴-۷-۴-۲ تحلیل واریانس ۶۸
- ۲-۴-۷-۴-۲ نمودار احتمال نرمال باقی مانده‌ها ۷۰
- ۳-۴-۷-۴-۲ نمودار باقیمانده‌ها در مقابل مقادیر برازش شده ۷۰
- ۴-۴-۷-۴-۲ منحنی‌های رویه پاسخ ۷۱
- ۵-۴-۷-۴-۲ تابع مطلوبیت ۷۴
- ۸-۴-۲ رسم منحنی کالیبراسیون پیش‌تغلیظ برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری همزمان نیترازپام و میدازولام ۷۵
- ۹-۴-۲ بررسی اثر گونه‌های مزاحم برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری همزمان نیترازپام و میدازولام ۷۷
- ۱۰-۴-۲ ارقام شایستگی روش برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری همزمان نیترازپام و میدازولام ۷۹
- ۱۱-۴-۲ اندازه‌گیری نیترازپام و میدازولام در نمونه‌های حقیقی ۸۱
- ۱۲-۴-۲ مقایسه روش پیشنهادی با برخی روش‌های به‌کار گرفته شده برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری همزمان نیترازپام و میدازولام ۸۸
- ۵-۲ روش میکرواستخراج مایع پخشی مبتنی بر انجماد قطره آلی شناور همراه با امواج فراصوت برای پیش‌تغلیظ مقادیر سرتالین، سیتالوپرام و دیازپام در نمونه‌های حقیقی و اندازه‌گیری به‌روش کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا ۹۰

- ۱-۵-۲ ثبت طیف‌های UV و انتخاب بهترین طول‌موج برای اندازه‌گیری سرتالین، سیتالوپرام و دیازپام
 ۹۰
- ۲-۵-۲ شرایط کروماتوگرافی برای اندازه‌گیری همزمان سیتالوپرام، دیازپام و سرتالین ۹۱
- ۳-۵-۲ روش کار در بهینه‌سازی پارامترهای موثر در اندازه‌گیری سیتالوپرام، دیازپام و سرتالین ۹۴
- ۴-۵-۲ منحنی کالیبراسیون مستقیم در اندازه‌گیری سیتالوپرام، دیازپام و سرتالین ۹۵
- ۵-۵-۲ بررسی و بهینه‌سازی متغیرهای موثر در پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری سیتالوپرام، دیازپام و سرتالین
 ۹۸
- ۶-۵-۲ طراحی پلاکت برمن در اندازه‌گیری سیتالوپرام، دیازپام و سرتالین ۱۰۰
- ۷-۵-۲ تعیین شرایط بهینه فاکتورهای موثر به‌روش طراحی مرکب مرکزی مرکز وجوه‌پر در اندازه‌گیری
 سیتالوپرام، دیازپام و سرتالین ۱۰۳
- ۸-۵-۲ رسم منحنی‌های کالیبراسیون پیش‌تغلیظ در اندازه‌گیری سیتالوپرام، دیازپام و سرتالین ۱۰۹
- ۹-۵-۲ بررسی اثر گونه‌های مزاحم در اندازه‌گیری سیتالوپرام، دیازپام و سرتالین ۱۱۲
- ۱۰-۵-۲ ارقام شایستگی روش در اندازه‌گیری سیتالوپرام، دیازپام و سرتالین ۱۱۳
- ۱۱-۵-۲ اندازه‌گیری سیتالوپرام، دیازپام و سرتالین در نمونه‌های حقیقی ۱۱۴
- ۱۲-۵-۲ مقایسه روش پیشنهادی با برخی روش‌های به‌کار گرفته شده در اندازه‌گیری سیتالوپرام،
 دیازپام و سرتالین ۱۲۳

- ۶-۲ روش میکرواستخراج مایع مایع پخشی معکوس برای پیش تغلیظ و اندازه‌گیری ویتامین A و E در روغن‌های گیاهی ۱۲۴
- ۱-۶-۲ ثبت طیف UV-Vis ویتامین A و ویتامین E ۱۲۴
- ۲-۶-۲ شرایط کروماتوگرافی برای اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین E ۱۲۵
- ۳-۶-۲ رسم منحنی کالیبراسیون مستقیم در پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین E ۱۲۶
- ۴-۶-۲ روش کار در پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین E در روغن خوراکی . ۱۲۸
- ۵-۶-۲ بررسی و بهینه‌سازی متغیرهای موثر در پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین E ۱۲۸
- ۶-۶-۲ بررسی و بهینه‌سازی فاکتورهای موثر بر پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین E به‌روش طراحی آزمایش ۱۳۰
- ۷-۶-۲ رسم کالیبراسیون پیش‌تغلیظ برای اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین E ۱۳۹
- ۸-۶-۲ ارقام شایستگی روش برای اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین E ۱۴۱
- ۹-۶-۲ بررسی اثر گونه‌های مزاحم برای اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین E ۱۴۲
- ۱۰-۶-۲ اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین E در نمونه‌های روغن ۱۴۲
- ۱۱-۶-۲ مقایسه روش پیشنهادی با برخی روش‌های به‌کار گرفته شده برای اندازه‌گیری همزمان ویتامین A و ویتامین E ۱۴۵

- ۲-۷ روش میکرواستخراج مایع مایع پخشی معکوس با کمک فاز غنی شده از سورفکتانت و به کمک امواج فراصوت برای پیش تغلیظ و اندازه‌گیری مقادیر کم ویتامین A و E ۱۴۶
- ۲-۷-۱ ثبت طیف UV-Vis برای ویتامین A و ویتامین E ۱۴۶
- ۲-۷-۲ شرایط کروماتوگرافی برای اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین E ۱۴۷
- ۲-۷-۳ رسم منحنی کالیبراسیون مستقیم برای اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین E ۱۴۹
- ۲-۷-۴ روش کار در پیش تغلیظ و اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین E ۱۵۱
- ۲-۷-۵ بررسی و بهینه‌سازی متغیرهای موثر در پیش تغلیظ و اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین E ۱۵۱
- ۲-۷-۶ بهینه‌سازی فاکتورهای موثر بر پیش تغلیظ و اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین E با روش طراحی آزمایش ۱۵۲
- ۲-۷-۷ رسم منحنی پیش تغلیظ برای اندازه‌گیری همزمان ویتامین A و ویتامین E ۱۶۱
- ۲-۷-۸ ارقام شایستگی روش برای اندازه‌گیری همزمان ویتامین A و ویتامین E ۱۶۳
- ۲-۷-۹ بررسی اثر گونه‌های مزاحم برای اندازه‌گیری همزمان ویتامین A و ویتامین E ۱۶۴
- ۲-۷-۱۰ اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین E در نمونه های روغن ۱۶۴
- ۲-۷-۱۱ مقایسه روش پیشنهادی با برخی روش‌های به کار گرفته شده برای اندازه‌گیری همزمان ویتامین A و ویتامین E ۱۶۷

فصل سوم:

۱۷۰ ۱-۳ نتیجه‌گیری

۱۷۱ ۲-۳ آینده نگری

فهرست جدول‌ها

- جدول (۱-۲): مواد شیمیایی مورد استفاده در این کار تحقیقاتی ۴۲
- جدول (۲-۲): سیگنال مستقیم به دست آمده برای داروهای نیترازپام و میدازولام با غلظت‌های متفاوت ۵۱
- جدول (۳-۲): نتایج حاصل از بهینه‌سازی یک متغیر در یک زمان در پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری نیترازپام و میدازولام ۵۵
- جدول (۴-۲): نام و سطوح فاکتورهای موثر بر پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری نیترازپام و میدازولام در طراحی پلاکت برمن ۵۷
- جدول (۵-۲): طرح پلاکت برمن و نتایج به دست آمده با ۶ فاکتور برای پاسخ در پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری نیترازپام و میدازولام ۵۸
- جدول (۶-۲): جدول ضرایب حاصل از طراحی پلاکت- برمن برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری همزمان نیترازپام و میدازولام ۵۸
- جدول (۷-۲): طرح باکس- بنکن با ۳ فاکتور و سه نقطه مرکزی برای اندازه‌گیری نیترازپام و میدازولام ۶۳
- جدول (۸-۲): پارامترهای آماری برای طرح باکس بنکن انجام شده برای پاسخ پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری نیترازپام و میدازولام ۶۵
- جدول (۹-۲): تحلیل واریانس برای مدل پیشنهادی مربوط به پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری همزمان نیترازپام و میدازولام ۶۸

- جدول (۲-۱۰): مقایسه شرایط بهینه‌سازی یک متغیر در زمان و طراحی آزمایش برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری همزمان نیترازپام و میدازولام ۷۳
- جدول (۲-۱۱): شرایط بهینه نهایی سیستم برای اندازه‌گیری نیترازپام و میدازولام ۷۴
- جدول (۲-۱۲): داده‌های مربوط به منحنی کالیبراسیون پیش‌تغلیظ نیترازپام و میدازولام ... ۷۷
- جدول (۲-۱۳): نتایج حاصل از بررسی اثر گونه‌های مزاحم در پیش‌تغلیظ نیترازپام و میدازولام با غلظت $1/0 \text{ mg L}^{-1}$ ۷۹
- جدول (۲-۱۴): بررسی دقت و صحت در شرایط بهینه به‌دست آمده برای نیترازپام ۸۱
- جدول (۲-۱۵): بررسی دقت و صحت در شرایط بهینه به دست آمده برای میدازولام ۸۱
- جدول (۲-۱۶): نتایج اندازه‌گیری همزمان نیترازپام و میدازولام در نمونه‌های قرص و آمپول. ۸۷
- جدول (۲-۱۷): نتایج اندازه‌گیری همزمان نیترازپام و میدازولام در نمونه سرم خون ۸۷
- جدول (۲-۱۸): مقایسه روش پیشنهادی با برخی از روش‌های گزارش شده برای اندازه‌گیری نیترازپام و میدازولام ۸۹
- جدول (۲-۱۹): نتایج مربوط به مقایسه اثر امواج فراصوت بر اندازه‌گیری همزمان سیتالوپرام، دیازپام و سرتالین ۹۵
- جدول (۲-۲۰): سیگنال‌های مستقیم به‌دست آمده برای داروهای سیتالوپرام، دیازپام و سرتالین با غلظت‌های متفاوت ۹۶
- جدول (۲-۲۱): نتایج حاصل از بهینه‌سازی یک متغیر در یک زمان در اندازه‌گیری سیتالوپرام، دیازپام و سرتالین ۹۹

جدول (۲-۲۲): تعیین سطح فاکتورهای موثر بر پیش تغلیظ و اندازه‌گیری سیتالوپرام، دیازپام و سرتالین

۱۰۰

جدول (۲-۲۳): طراحی پلاکت برمن و نتایج به‌دست آمده از آن در اندازه‌گیری سیتالوپرام (CIT) ،

دیازپام (DIZ) و سرتالین (CIT)..... ۱۰۱

جدول (۲-۲۴): جدول ضرایب حاصل از طراحی پلاکت برمن در اندازه‌گیری سیتالوپرام، دیازپام و

سرتالین..... ۱۰۱

جدول (۲-۲۵): تعیین سطح فاکتورهای موثر بر پیش تغلیظ و اندازه‌گیری سیتالوپرام، دیازپام و سرتالین

۱۰۳

جدول (۲-۲۶): ماتریس طراحی CCF با ۲ فاکتور، ۳ نقطه مرکزی در اندازه‌گیری سیتالوپرام، دیازپام

و سرتالین..... ۱۰۴

جدول (۲-۲۷): پارامترهای آماری برای طراحی CCF انجام شده برای پاسخ پیش تغلیظ و اندازه‌گیری

سرتالین، سیتالوپرام و دیازپام..... ۱۰۴

جدول (۲-۲۸): تحلیل واریانس برای مدل پیشنهادی مربوط به پیش تغلیظ و اندازه‌گیری سیتالوپرام،

دیازپام و سرتالین..... ۱۰۵

جدول (۲-۲۹): مقایسه شرایط بهینه به دست آمده توسط روش‌های یک متغیر در یک زمان و طراحی

آزمایش در اندازه‌گیری سیتالوپرام، دیازپام و سرتالین..... ۱۰۵.....

جدول (۲-۳۰): نتایج حاصل از بررسی اثر گونه‌های مزاحم در پیش تغلیظ و اندازه‌گیری سیتالوپرام

۱۱۲

جدول (۲-۳۱): نتایج حاصل از بررسی اثر گونه‌های مزاحم در پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری دیازپام ۱۱۲

جدول (۲-۳۲): نتایج حاصل از بررسی اثر گونه‌های مزاحم در پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری سرتالین

۱۱۲

جدول (۲-۳۳): نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت روش برای سیتالوپرام ۱۱۳

جدول (۲-۳۴): نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت روش برای دیازپام ۱۱۳

جدول (۲-۳۵): نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت روش برای سرتالین ۱۱۴

جدول (۲-۳۶): نتایج اندازه‌گیری سیتالوپرام و دیازپام و سرتالین در نمونه‌های قرص ۱۱۶

جدول (۲-۳۷) نمونه‌های حقیقی سرم و ادرار برای اندازه‌گیری سیتالوپرام و دیازپام و سرتالین ۱۱۶

جدول (۲-۳۸) : مقایسه روش پیشنهادی با سایر روش‌های انجام شده برای اندازه‌گیری سیتالوپرام،

دیازپام و سرتالین..... ۱۲۳

جدول (۲-۳۹): نتایج حاصل از بهینه‌سازی یک متغیر در یک زمان اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین

E..... ۱۲۹

جدول (۲-۴۰): تعیین سطح فاکتورهای موثر بر پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین E

۱۳۰

جدول (۲-۴۱): طرح فاکتوریل کامل و نتایج به‌دست آمده از آن برای اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین

E..... ۱۳۱

جدول (۲-۴۲): ماتریس طرح BBD با ۳ فاکتور، ۳ نقطه مرکزی برای اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین

E..... ۱۳۳

جدول (۲-۴۳): پارامترهای آماری برای طراحی BBD انجام شده برای پاسخ اندازه‌گیری ویتامین A و

ویتامین E ۱۳۴

جدول (۲-۴۴): تحلیل واریانس برای مدل پیشنهادی مربوط به پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری ویتامین A

و ویتامین E ۱۳۴

جدول (۲-۴۵): شرایط بهینه نهایی سیستم برای اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین E ۱۳۸

جدول (۲-۴۶): نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت روش برای ویتامین A ۱۴۱

جدول (۲-۴۷): نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت روش برای ویتامین E ۱۴۱

جدول (۲-۴۸): نتایج حاصل از بررسی اثر گونه‌های مزاحم در پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری ویتامین A و

E ۱۴۲

جدول (۲-۴۹): نتایج نمونه‌های حقیقی برای اندازه‌گیری همزمان ویتامین A و ویتامین E ۱۴۴

جدول (۲-۵۰): مقایسه روش پیشنهادی با برخی از روش‌های گزارش شده برای اندازه‌گیری ویتامین

A و ویتامین E ۱۴۵

جدول (۲-۵۱): نتایج حاصل از بهینه‌سازی یک متغیر در یک زمان در پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری ویتامین

های A و E ۱۵۲

جدول (۲-۵۲): تعیین سطح فاکتورهای موثر بر پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین E

..... ۱۵۳

جدول (۲-۵۳): طراحی فاکتوریل کامل و نتایج آن برای اندازه‌گیری همزمان ویتامین A و ویتامین E

..... ۱۵۴

جدول (۲-۵۴): جدول ضرایب حاصل از طرح فاکتوریل کامل برای اندازه‌گیری همزمان ویتامین A و

ویتامین E ۱۵۵

جدول (۲-۵۵): طراحی CCD و نتایج آن برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری همزمان ویتامین A و ویتامین

E ۱۵۶

جدول (۲-۵۶): پارامترهای آماری برای طراحی CCD انجام شده برای پاسخ پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری

ویتامین A و ویتامین E ۱۵۷

جدول (۲-۵۷): تحلیل واریانس برای مدل پیشنهادی مربوط به پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری ویتامین A

و ویتامین E ۱۵۸

جدول (۲-۵۸): شرایط بهینه نهایی سیستم برای اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین E ۱۶۰

جدول (۲-۵۹): نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت روش برای ویتامین A ۱۶۳

جدول (۲-۶۰): نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت روش برای ویتامین E ۱۶۳

جدول (۲-۶۱): نتایج حاصل از بررسی اثر گونه‌های مزاحم در پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری ویتامین A و

E ۱۶۴

جدول (۲-۶۲): نتایج نمونه‌های حقیقی برای اندازه‌گیری همزمان ویتامین A و ویتامین E ۱۶۶

جدول (۲-۶۳): مقایسه روش پیشنهادی با برخی از روش‌های گزارش شده برای اندازه‌گیری ویتامین

A و ویتامین E ۱۶۸

جدول (۱-۲) پ: نتایج حاصل از بررسی اثر حجم محلول نمونه بر میزان استخراج ۱۷۶

جدول (۱-۳) پ: نتایج حاصل از بررسی نوع بافر بر میزان استخراج ۱۷۷

- جدول (۴-۱) پ: نتایج حاصل از بررسی اثر حجم بافر بر میزان استخراج ۱۷۸
- جدول (۵-۱) پ: نتایج حاصل از بررسی اثر نوع حلال استخراج کننده بر میزان استخراج . ۱۷۹
- جدول (۶-۱) پ: نتایج حاصل از بررسی حجم حلال استخراج کننده بر میزان استخراج .. ۱۸۰
- جدول (۷-۱) پ: نتایج حاصل از بررسی اثر نوع سورفکتانت بر میزان استخراج ۱۸۱
- جدول (۸-۱) پ: نتایج حاصل از بررسی اثر غلظت SDS بر میزان استخراج ۱۸۲
- جدول (۹-۱) پ: نتایج حاصل از بررسی اثر غلظت Tween80 بر میزان استخراج ۱۸۳
- جدول (۱۰-۱) پ: نتایج حاصل از بررسی اثر حجم SDS بر میزان استخراج ۱۸۴
- جدول (۱۱-۱) پ: نتایج حاصل از بررسی اثر حجم Tween80 بر میزان استخراج ۱۸۵
- جدول (۱۲-۱) پ: نتایج حاصل از بررسی اثر زمان استخراج بر میزان استخراج ۱۸۶
- جدول (۱۳-۱) پ: نتایج حاصل از بررسی اثر قدرت یونی (اثر نمک) بر میزان استخراج ... ۱۸۷
- جدول (۱۴-۱) پ: نتایج حاصل از بررسی اثر زمان سانتریفیوژ بر میزان استخراج ۱۸۸
- جدول (۱-۲) پ: نتایج حاصل از بررسی اثر pH فاز آبی بر میزان استخراج ۱۹۱
- جدول (۲-۲) پ: نتایج حاصل از بررسی اثر حجم محلول نمونه بر میزان استخراج ۱۹۳
- جدول (۳-۲) پ: نتایج حاصل از بررسی نوع بافر بر میزان استخراج ۱۹۴
- جدول (۴-۲) پ: نتایج حاصل از بررسی اثر حجم بافر بر میزان استخراج ۱۹۵
- جدول (۵-۲) پ: نتایج حاصل از بررسی اثر نوع حلال استخراج کننده بر میزان استخراج . ۱۹۶

- جدول (۲-۶ پ): نتایج حاصل از بررسی حجم حلال استخراج کننده بر میزان استخراج .. ۱۹۷
- جدول (۲-۷ پ): نتایج حاصل از بررسی اثر نوع حلال پخش کننده بر میزان استخراج ... ۱۹۸
- جدول (۲-۸ پ): نتایج حاصل از بررسی اثر حجم حلال پخش کننده بر میزان استخراج . ۱۹۹
- جدول (۲-۹ پ): نتایج حاصل از بررسی اثر زمان استخراج بر میزان استخراج..... ۲۰۰
- جدول (۲-۱۰ پ): نتایج حاصل از بررسی اثر قدرت یونی (اثر نمک) بر میزان استخراج... ۲۰۱
- جدول (۳-۱ پ): نتایج حاصل از بررسی اثر pH حلال استخراج بر میزان استخراج ۲۰۳
- جدول (۳-۲ پ): نتایج حاصل از بررسی اثر حجم محلول بر میزان استخراج..... ۲۰۴
- جدول (۳-۳ پ): نتایج حاصل از بررسی نوع بافر بر میزان استخراج..... ۲۰۵
- جدول (۳-۴ پ): نتایج حاصل از بررسی اثر حجم محلول استخراج بر میزان استخراج..... ۲۰۶
- جدول (۳-۵ پ): نتایج حاصل از بررسی اثر ترکیب درصد حلال استخراج بر میزان استخراج..... ۲۰۷
- جدول (۳-۶ پ): نتایج حاصل از بررسی اثر نوع حلال پخش کننده بر میزان استخراج ۲۰۸
- جدول (۳-۷ پ): نتایج حاصل از بررسی حجم حلال پخش کننده بر میزان استخراج ۲۰۹
- جدول (۳-۸ پ): نتایج حاصل از بررسی اثر زمان استخراج بر میزان استخراج..... ۲۱۰
- جدول (۴-۱ پ): نتایج حاصل از بررسی اثر نوع سورفکتانت بر میزان استخراج ۲۱۱
- جدول (۴-۲ پ): نتایج حاصل از بررسی اثر غلظت سورفکتانت بر میزان استخراج..... ۲۱۲
- جدول (۴-۳ پ): نتایج حاصل از بررسی حجم سورفکتانت بر میزان استخراج..... ۲۱۳

جدول (۴-۴ پ): نتایج حاصل از بررسی اثر درصد اسید بر میزان استخراج ۲۱۴

جدول (۴-۵ پ): نتایج حاصل از بررسی اثر زمان استخراج بر میزان استخراج ۲۱۵

فهرست شکل‌ها

- شکل (۱-۱): ساختار پایه یک بنزودیازپین [۱] ۲
- شکل (۲-۱) ساختار شیمیایی داروی میدازولام [۶]. ۳
- شکل (۳-۱) ساختار شیمیایی داروی نیترازپام [۸]. ۴
- شکل (۴-۱) ساختار شیمیایی داروی دیازپام [۹]. ۵
- شکل (۵-۱) ساختار شیمیایی داروی سیتالوپرام [۱۷]. ۷
- شکل (۶-۱) ساختار شیمیایی سرتالین [۱۹]. ۸
- شکل (۷-۱): ساختار شیمیایی ویتامین A [۲۹]. ۱۱
- شکل (۸-۱): ساختار شیمیایی ویتامین E [۳۵]. ۱۲
- شکل (۹-۱) تقسیم بندی انواع روش‌های میکرواستخراج فاز مایع [۵۰]. ۲۰
- شکل (۱۰-۱): نمایش هندسی طرح فاکتوریل 2^3 [۷۵]. ۳۴
- شکل (۱۱-۱): طرح مرکب مرکزی برای دو فاکتور، (●) نقاط طرح فاکتوریل، (o) نقطه مرکزی، (×) نقاط محوری [۸۰]. ۳۷
- شکل (۱۲-۱): طراحی آزمایش در روش باکس-بنکن [۸۲]. ۳۸
- شکل (۱-۲): طیف جذبی نیترازپام و میدازولام ۴۷

شکل (۲-۲): طیف جذبی متانول نسبت به فاز متحرک (مخلوطی از بافر فسفاتی pH برابر ۵/۵، با

غلظت ۰/۰۶ M و استونیتریل با نسبت ۱:۱) ۴۷

شکل (۳-۲): کروماتوگرام محلول آبی $5/0 \text{ mg L}^{-1}$ نیترازپام، ترکیب بافر فسفاتی با pH برابر با ۵/۵ و

استونیتریل، با نسبت ۱:۱ به عنوان فاز متحرک، سرعت جریان ۱/۵ میلی لیتر بر دقیقه، حجم لوپ $5/0 \mu\text{L}$

در طول موج ۲۲۰ nm ۴۸

شکل (۴-۲): کروماتوگرام محلول آبی $5/0 \text{ mg L}^{-1}$ میدازولام، ترکیب بافر فسفاتی با pH برابر با ۵/۵ و

استونیتریل، با نسبت ۱:۱ به عنوان فاز متحرک، سرعت جریان ۱/۵ میلی لیتر بر دقیقه، حجم لوپ $5/0 \mu\text{L}$

در طول موج ۲۲۰ nm ۴۸

شکل (۵-۲): کروماتوگرام محلول آبی $5/0 \text{ mg L}^{-1}$ نیترازپام و میدازولام، ترکیب بافر فسفاتی با pH

برابر با ۵/۵ و استونیتریل، با نسبت ۱:۱ به عنوان فاز متحرک، سرعت جریان ۱/۵ میلی لیتر بر دقیقه،

حجم لوپ $5/0 \mu\text{L}$ در طول موج ۲۲۰ nm ۴۹

شکل (۶-۲): منحنی کالیبراسیون مستقیم نیترازپام. ۵۲

شکل (۷-۲): منحنی کالیبراسیون مستقیم میدازولام. ۵۲

شکل (۸-۲): نمودار پارتو برای طراحی پلاکت برمن در پیش تغلیظ و اندازه گیری نیترازپام و میدازولام

..... ۶۰

شکل (۹-۲): نمودار احتمال نرمال در طراحی پلاکت برمن بر پیش تغلیظ و اندازه گیری نیترازپام و

میدازولام ۶۳

شکل (۱۰-۲): نمودار باقیمانده ها برای پیش تغلیظ و اندازه گیری نیترازپام و میدازولام در طراحی باکس -

بنکن ۷۰

شکل (۲-۱۱): نمودار باقیمانده در مقابل مقدار برآزش برای پیش تغلیظ و اندازه‌گیری نیترازپام و

میدازولام در طراحی باکس- بنکن ۷۱

شکل (۲-۱۲ الف): منحنی سطح رویه حجم حلال استخراج (B) در مقابل pH (A) برای اندازه‌گیری

همزمان نیترازپام و میدازولام (ب): منحنی سطح رویه اثر نمک (F) در مقابل pH (A) برای اندازه‌گیری

همزمان نیترازپام و میدازولام، (ج): منحنی سطح رویه برای اثر نمک (F) در مقابل حجم حلال استخراج

(B) برای اندازه‌گیری همزمان نیترازپام و میدازولام ۷۲

شکل (۲-۱۳): پروفایل مطلوبیت برای فاکتورهای موثر در طراحی باکس بنکن در اندازه‌گیری همزمان

نیترازپام و میدازولام ۷۵

شکل (۲-۱۴): الف: کروماتوگرام شاهد. ب: کروماتوگرام حاصل از نمونه قرص قبل از اسپایک استاندارد

نیترازپام. ۸۳

شکل (۲-۱۵): الف: کروماتوگرام حاصل از نمونه آمپول میدازولام قبل از اسپایک استاندارد میدازولام.

..... ۸۵

شکل (۲-۱۶): الف: کروماتوگرام حاصل از نمونه سرم شاهد ب: کروماتوگرام نمونه سرم حاوی نیترازپام و

میدازولام از هر کدام 5 mg L^{-1} ۸۶

شکل (۲-۱۷): طیف جذبی سیتالوپرام، دیازپام و سرتالین ۹۱

شکل (۲-۱۸) کروماتوگرام محلول آبی $5/0 \text{ mg L}^{-1}$ سیتالوپرام. ۹۲

شکل (۲-۱۹) کروماتوگرام محلول آبی $5/0 \text{ mg L}^{-1}$ دیازپام. ۹۳

شکل (۲-۲۰) کروماتوگرام محلول $5/0 \text{ mg L}^{-1}$ سرتالین. ۹۳

شکل (۲-۲۱) کروماتوگرام محلول حاوی سیتالوپرام، دیازپام، سرتالین هر کدام با غلظت $5/0 \text{ mg L}^{-1}$..

۹۳

شکل (۲-۲۲): منحنی کالیبراسیون مستقیم سیتالوپرام. ۹۷

شکل (۲-۲۳): منحنی کالیبراسیون مستقیم دیازپام. ۹۷

شکل (۲-۲۴): منحنی کالیبراسیون مستقیم سرتالین. ۹۸

شکل (۲-۲۵): نمودار پارتو حاصل از طراحی پلاکت برمن در اندازه‌گیری سیتالوپرام، دیازپام و سرتالین

۱۰۲

شکل (۲-۲۶): نمودار احتمال نرمال برای پاسخ پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری سیتالوپرام، دیازپام و سرتالین

۱۰۷

شکل (۲-۲۷): منحنی رویه پاسخ پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری سیتالوپرام، دیازپام و سرتالین در مقابل pH

(A) و حجم حلال استخراج (C) ۱۰۸

شکل (۲-۲۸): پروفایل مطلوبیت برای طراحی CCF در اندازه‌گیری همزمان سیتالوپرام، دیازپام

و سرتالین ۱۰۹

شکل (۲-۲۹): منحنی کالیبراسیون پیش‌تغلیظ سیتالوپرام. ۱۱۰

شکل (۲-۳۰): منحنی کالیبراسیون پیش‌تغلیظ سرتالین. ۱۱۱

شکل (۲-۳۱): منحنی کالیبراسیون پیش‌تغلیظ دیازپام. ۱۱۰

شکل (۲-۳۲): کروماتوگرام (الف): کروماتوگرام حاصل از نمونه قرص سیتالوپرام قبل از اسپایک استاندارد،

(ب) بعد از اسپایک استاندارد سیتالوپرام با غلظت $50/0 \mu\text{g L}^{-1}$. ۱۱۸

شکل (۲-۳۳): کروماتوگرام (الف) کروماتوگرام حاصل از نمونه قرص دیازپام قبل از اسپایک استاندارد،

(ب) بعد از اسپایک استاندارد دیازپام با غلظت $500/0 \mu\text{g L}^{-1}$ ۱۱۹

شکل (۲-۳۴): کروماتوگرام (الف) کروماتوگرام حاصل از نمونه قرص سرتالین قبل از اسپایک استاندارد،

(ب) بعد از اسپایک استاندارد سرتالین با غلظت $500/0 \mu\text{g L}^{-1}$ ۱۲۰

شکل (۲-۳۵): کروماتوگرام نمونه (A) شاهد سرم انسان بدون مصرف دارو، (B) سرم حاوی mg L^{-1}

5/0 سیتالوپرام و دیازپام و سرتالین..... ۱۱۹

شکل (۲-۳۶): کروماتوگرام نمونه (A) ادرار فرد بیمار، (B) ادرار حاوی $0/5 \mu\text{g L}^{-1}$ سیتالوپرام و دیازپام

و سرتالین..... ۱۲۲

شکل (۲-۳۷): طیف جذبی ویتامین A و ویتامین E ۱۲۴

شکل (۲-۳۸): کروماتوگرام مربوط به استاندارد ویتامین A با غلظت $10/0 \text{mg L}^{-1}$ ۱۲۵

شکل (۲-۳۹): کروماتوگرام مربوط به استاندارد ویتامین E با غلظت $10/0 \text{mg L}^{-1}$ ۱۲۶

شکل (۲-۴۰): کروماتوگرام مربوط به مخلوط استاندارد ویتامین A و E هر یک با غلظت $10/0 \text{mg L}^{-1}$.

..... ۱۲۶

شکل (۲-۴۱): منحنی کالیبراسیون مستقیم ویتامین A ۱۲۷

شکل (۲-۴۲): منحنی کالیبراسیون مستقیم ویتامین E ۱۲۷

شکل (۲-۴۳): نمودار پارتو حاصل از طرح فاکتوریل کامل برای اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین E

..... ۱۳۲

شکل (۲-۴۴): نمودار احتمال نرمال برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین E ۱۳۵

شکل (۲-۴۵): منحنی رویه پاسخ برای pH (A) در برابر ترکیب درصد محلول استخراج (B) برای

اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین E ۱۳۶

شکل (۲-۴۶): منحنی رویه پاسخ برای pH (A) در برابر حجم حلال پخش کننده (D) ... ۱۳۷

شکل (۲-۴۷): منحنی رویه پاسخ برای حجم حلال پخش کننده (D) در مقابل ترکیب درصد محلول

استخراج (B) برای اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین E ۱۳۷

شکل (۲-۴۸): پروفایل مطلوبیت برای طراحی باکس بنکن در اندازه‌گیری همزمان ویتامین A و ویتامین

E ۱۳۹

شکل (۲-۴۹): منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ ویتامین A ۱۴۰

شکل (۲-۵۰): منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ ویتامین E ۱۴۰

شکل (۲-۵۱): کروماتوگرام نمونه (A) روغن زیتون سنتی ، (B) روغن سنتی زیتون حاوی 1 mg L^{-1}

ویتامین A و ویتامین E ۱۴۳

شکل (۲-۵۲): طیف جذبی ویتامین A و ویتامین E ۱۴۶

شکل (۲-۵۳): کروماتوگرام مربوط به استاندارد ویتامین A با غلظت 1.0 mg L^{-1} ۱۴۷

شکل (۲-۵۴): کروماتوگرام مربوط به استاندارد ویتامین E با غلظت 1.0 mg L^{-1} ۱۴۷

شکل (۲-۵۵): کروماتوگرام مربوط به استاندارد مخلوط ویتامین A و E ۱۴۶

شکل (۲-۵۶): کروماتوگرام مربوط به استاندارد مخلوط ویتامین A و E ۱۴۶

شکل (۲-۵۷): کروماتوگرام مربوط به استاندارد مخلوط ویتامین A و E هر یک با غلظت 1 mg L^{-1}

..... ۱۴۹

- شکل (۲-۵۸): منحنی کالیبراسیون مستقیم ویتامین A. ۱۵۰
- شکل (۲-۵۹): منحنی کالیبراسیون مستقیم ویتامین E. ۱۵۰
- شکل (۲-۶۰): نمودار پارتو حاصل از طرح فاکتوریل کامل برای اندازه‌گیری همزمان ویتامین A و ویتامین E. ۱۵۵
- شکل (۲-۶۱): منحنی رویه پاسخ برای اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین E. ۱۵۹
- شکل (۲-۶۲): پروفایل مقدار پیش بینی شده و مطلوبیت برای اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین E. ۱۶۱
- شکل (۲-۶۳): منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ ویتامین A. ۱۶۲
- شکل (۲-۶۴): منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ ویتامین E. ۱۶۲
- شکل (۲-۶۵): کروماتوگرام نمونه (A) روغن زیتون سنتی، (B) روغن زیتون سنتی با افزایش غلظت mg L⁻¹ ۰/۱ ویتامین A و ویتامین E. ۱۶۵
- شکل (۱-۱): پ: نمودار اثر pH فاز آبی بر میزان استخراج همزمان نیترازپام و میدازولام. ۱۷۶
- شکل (۲-۱): پ: نمودار تاثیر حجم محلول بر میزان استخراج. ۱۷۷
- شکل (۳-۱): پ: نمودار تاثیر نوع بافر بر میزان استخراج. ۱۷۸
- شکل (۴-۱): پ: نمودار تاثیر حجم بافر بر میزان استخراج. ۱۷۹
- شکل (۵-۱): پ: نمودار تاثیر حجم بافر بر میزان استخراج. ۱۸۰
- شکل (۶-۱): پ: نمودار اثر حجم حلال استخراج بر میزان استخراج. ۱۸۱

- شکل (۷-۱) پ: نمودار اثر نوع سورفکتانت بر میزان استخراج ۱۸۲
- شکل (۸-۱) پ: نمودار اثر غلظت SDS بر میزان استخراج ۱۸۳
- شکل (۹-۱) پ: نمودار اثر غلظت Tween 80 بر میزان استخراج ۱۸۴
- شکل (۱۰-۱) پ: نمودار اثر حجم SDS بر میزان استخراج ۱۸۵
- شکل (۱۱-۱) پ: نمودار اثر حجم Tween 80 بر میزان استخراج ۱۸۶
- شکل (۱۲-۱) پ: نمودار اثر زمان استخراج بر میزان استخراج ۱۸۷
- شکل (۱۳-۱) پ: نمودار اثر درصد نمک بر میزان استخراج ۱۸۸
- شکل (۱۴-۱) پ: نمودار اثر زمان سانتریفیوژ بر میزان استخراج ۱۸۹
- شکل (۱-۲) پ: بررسی اثر pH بر میزان استخراج ۱۹۲
- شکل (۲-۲) پ: بررسی اثر حجم محلول نمونه بر میزان استخراج ۱۹۳
- شکل (۳-۲) پ: بررسی اثر نوع بافر بر میزان استخراج ۱۹۴
- شکل (۴-۲) پ: بررسی اثر حجم بافر بر میزان استخراج ۱۹۵
- شکل (۵-۲) پ: بررسی اثر نوع حلال استخراج بر میزان استخراج ۱۹۶
- شکل (۶-۲) پ: نمودار اثر حجم حلال استخراج کننده بر میزان استخراج ۱۹۷
- شکل (۷-۲) پ: بررسی اثر نوع حلال پخش کننده بر میزان استخراج ۱۹۸
- شکل (۸-۲) پ: نمودار اثر حجم حلال پخش کننده بر استخراج ۱۹۹

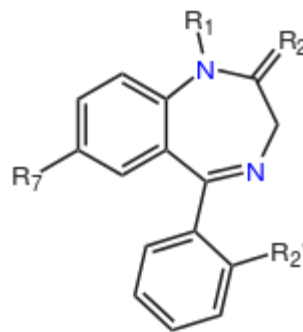
- شکل (۲-۹ پ) نمودار اثر زمان استخراج بر استخراج ۲۰۰
- شکل (۲-۱۰ پ) بررسی اثر نمک بر استخراج ۲۰۱
- شکل (۳-۱ پ) نمودار تاثیر pH بر میزان استخراج ۲۰۳
- شکل (۳-۲ پ) نمودار تاثیر حجم محلول بر میزان استخراج ۲۰۴
- شکل (۳-۳ پ) نمودار تاثیر نوع بافر بر میزان استخراج ۲۰۵
- شکل (۳-۴ پ) نمودار تاثیر حجم محلول استخراج بر میزان استخراج ۲۰۶
- شکل (۳-۵ پ) نمودار تاثیر ترکیب درصد حلال استخراج بر میزان استخراج ۲۰۷
- شکل (۳-۶ پ) نمودار تاثیر نوع حلال پخش کننده بر میزان استخراج ۲۰۸
- شکل (۳-۷ پ) نمودار تاثیر حجم حلال پخش کننده بر میزان استخراج ۲۰۹
- شکل (۳-۸ پ) بررسی تاثیر زمان استخراج بر میزان استخراج ۲۱۰
- شکل (۴-۱ پ) نمودار تاثیر نوع سورفکتانت بر میزان استخراج ۲۱۲
- شکل (۴-۲ پ) نمودار تاثیر غلظت سورفکتانت بر میزان استخراج ۲۱۳
- شکل (۴-۳ پ) نمودار تاثیر حجم سورفکتانت بر میزان استخراج ۲۱۴
- شکل (۴-۴ پ) نمودار تاثیر درصد اسید افزوده شده بر میزان استخراج ۲۱۵
- شکل (۴-۵ پ) نمودار تاثیر زمان استخراج بر میزان استخراج ۲۱۶

فصل اول

مقدمه و تئوری

۱-۱ بنزودیازپین

بنزودیازپین‌ها در گروه داروهای فعال کننده روانی^۱ قرار دارند که ساختار شیمیایی پایه آن‌ها شامل یک حلقه بنزن و یک حلقه دیازپین می‌باشد [۱]، که در شکل (۱-۱) نشان داده شده است.



شکل (۱-۱): ساختار پایه یک بنزودیازپین [۱]

این داروها، اثر انتقال دهنده عصبی گاما-آمینوبوتریک اسید (GABA)^۲ را در پذیرنده GABA افزایش می‌دهند که سبب حالت‌هایی چون آرام‌بخش، خواب‌آور، ضد افسردگی و همچنین شل کننده عضلات می‌گردند [۲]. بنزودیازپین‌ها با کاهش تحریک‌پذیری نورون‌ها یک اثر آرام‌بخش و تضعیف کننده بر فعالیت‌های مغزی دارند و مصرف بالای این خانواده دارویی سبب کاهش حافظه می‌گردد. بنزودیازپین‌ها بسته به سرعت اثر و نیمه‌عمر به انواع کوتاه اثر، متوسط اثر و طولانی اثر تقسیم می‌شوند. عموماً بنزودیازپین‌های دارای نیمه عمر کوتاه‌تر در درمان بی‌خوابی و بنزودیازپین‌های با اثر طولانی‌تر در درمان افسردگی و اضطراب کاربرد دارند [۳]. به عنوان مثال میدازولام^۳ و تریازولام^۴ دارای اثر کوتاه مدت، آلپرازولام^۵، کلونازپام^۶، تمازپام^۷ و لورازپام^۸ دارای اثر متوسط و دیازپام^۹، فلورازپام^{۱۰} و

¹ Psychoactive drug

² Gamma-amino butyric acid

³ Midazolam

⁴ Triazolam

⁵ Alprazolam

⁶ Clonazepam

⁷ Temazepam

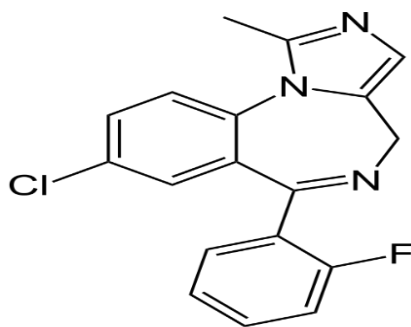
⁸ Lorazepam

⁹ Diazepam

¹⁰ Flurazepam

کلوردیازپوکساید^۱ دارای اثر طولانی مدت می‌باشند. 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 [۴]. بنزودیازپین‌ها بهترین انتخاب در درمان ترک الکل، به‌ویژه برای پیش‌گیری و درمان عارضه خطرناک تشنج هستند و در سم‌شناسی پزشکی قانونی و شرایط بالینی اهمیت ویژه‌ای دارند. در حالی‌که اندازه‌گیری مستقیم آن‌ها در نمونه‌های بیولوژیکی مانند خون و ادرار به دلیل غلظت بسیار کم آن‌ها امکان پذیر نیست. بنابراین ابتدا باید با یک روش مناسب پیش تغلیظ شده و سپس با روش‌های مناسب که در ادامه به توضیح آن پرداخته می‌شود، اندازه‌گیری شوند [۵]. از جمله بنزودیازپین‌های مورد استفاده در این مطالعه دیازپام، میدازولام و نیترازپام می‌باشد.

میدازولام با نام شیمیایی ۸-کلرو-۶-(۲-فلوروفنیل)-۱-متیل-۴-H-ایمیدازو[۵،۱-a] بنزودیازپین و با نام تجاری ورسد^۲ به‌عنوان آرام بخش جراحی و برای بیهوشی، درمان مشکلات خواب، بی‌قراری و ناآرامی‌های شدید به کار می‌رود که ساختار آن در شکل (۲-۱) آمده است [۶].



شکل (۲-۱) ساختار شیمیایی داروی میدازولام [۶].

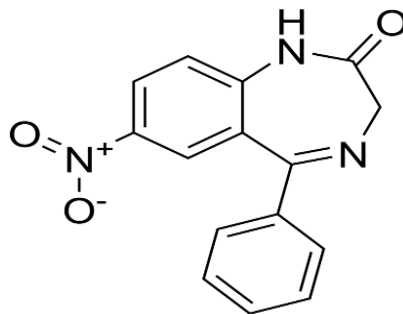
میدازولام همچنین برای درمان حمله ناگهانی صرع نیز به کار می‌رود [۷]. این دارو می‌تواند بصورت خوراکی از راه دهان، وریدی، تزریق این دارو به درون ماهیچه و اسپری درون بینی تجویز شود. در صورت تزریق وریدی، پس از حدود ۵ دقیقه، اثرگذاری آن آغاز می‌گردد. در حالیکه در صورت تزریق

^۱ Chlordiazepoxide

^۲ Versed

درون ماهیچه، این زمان به حدود ۱۵ دقیقه افزایش می‌یابد. اثر این دارو در بدن بین یک تا ۶ ساعت به طول می‌انجامد. اثرات جانبی میدازولام می‌تواند شامل تنگی نفس، فشار خون پایین و همچنین خواب آلودگی باشد [۶].

نیترازپام، ۷-نیترو-۵-فنیل-۱ و ۳ دی هیدرو- ۱ و ۴- بنزودیازپین-۲- اون با ساختاری که در شکل (۳-۱) نشان داده شده است، یک داروی خواب آور از خانواده بنزودیازپین‌ها می‌باشد که برای اثر کوتاه مدت درمان اضطراب و همچنین به‌عنوان آرام بخش به‌کار برده می‌شود [۸].

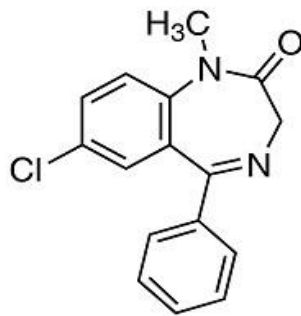


شکل (۳-۱) ساختار شیمیایی داروی نیترازپام [۸].

نیترازپام با نام‌های تجاری آلودورم^۱، اینزوما^۲، نیترازادون^۳ و پاکسادورم^۴ در بازار موجود است.

دiazepam یا ۷-کلرو-۱-متیل-۵-فنیل-۳-*H*-۱،۴-بنزودیازپین-۲-اون با نام تجاری والیوم^۵ (شکل ۴-۱)، دارویی مسکن و خواب‌آور است که در رده درمانی بنزودیازپین‌های طولانی اثر قرار گرفته و متابولیت‌های کبدی آن نیز فعال هستند [۹].

¹ Alodorm
² Insoma
³ Nitrazadon
⁴ Paxadorm
⁵ Valium



شکل (۴-۱) ساختار شیمیایی داروی دیازپام [۹].

دیازپام برای تسکین اضطراب، اختلالات خواب و اختلالات هراس^۱ تجویز می‌شود. این دارو همچنین به‌عنوان شل‌کننده ماهیچه اسکلتی، درمان انقباض عضلانی و تشنج (تب و تشنج در کودکان یا حمله صرع) نیز استفاده می‌شود [۱۰].

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

در سال ۲۰۱۲، کامیلا اسوانستروم^۲ و همکارانش، روش استخراج مایع را برای اندازه‌گیری همزمان میدازولام و ۱-هیدروکسی میدازولام در پلاسما به وسیله کروماتوگرافی مایع به همراه اسپکتروسکوپی جرمی استفاده نمودند. در شرایط بهینه، گستره خطی $0.2-100.0 \text{ nmol L}^{-1}$ با درصد بازیابی بین ۹۸/۶-۹۱/۲ درصد برای دو آنالیت گزارش شد [۱۱].

در سال ۲۰۱۴، کاتجا کوان تروبی^۳ و همکارانش، از کروماتوگرافی مایع-طیف‌سنجی جرمی برای اندازه‌گیری همزمان بیسوپرولول، رامیپریلات، پروپرانولول و میدازولام در نمونه خون موش استفاده نمودند. گستره خطی $5-250 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ و حد اندازه‌گیری $5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ برای میدازولام گزارش گردید [۱۲].

¹ Panic Disorders

² Camila Svanstrom

³ Katja Cvan trobee

اندازه‌گیری و جداسازی برومازپام، مدازپام و میدازولام در سرم خون با ستون C18 در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد و با استفاده از فاز متحرک شامل استونیتریل-متانول-آمونیم استات با نسبت درصدی ۳۰-۴۵-۲۵ توسط حسن الهواسلی^۱ و همکارانش در سال ۲۰۱۲ انجام پذیرفت. گستره غلظتی خطی میدازولام و برومازپام بین ۰/۱۲-۰/۱۸ mg mL⁻¹ به دست آمد. در حالی که گستره خطی مدازپام در حدود ۰/۰۸-۰/۱۲ mg mL⁻¹ گزارش شده است. درصد بازیابی نمونه سرم خون در گستره بین ۹۹/۰-۹۱/۵ درصد بوده است [۱۳].

در قسمت اول این پژوهش، برای اولین بار از روش میکرو استخراج قطره آلی شناور جامد با کمک افزایش سورفکتانت و امواج فراصوت و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا با آشکارساز UV برای پیش تغلیظ و اندازه‌گیری همزمان نیترازپام و میدازولام استفاده شد.

۱-۲ مهار کننده‌های انتخابی بازجذب سروتونین^۲ (SSRIs)

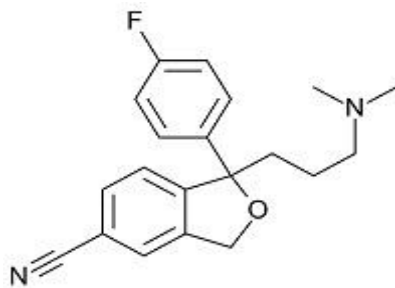
مهار کننده‌های بازجذب سروتونین، دسته‌ای از داروهای ضد افسردگی هستند که در درمان افسردگی و برخی از انواع اختلالات اضطرابی و شخصیتی کاربرد دارند. این داروها میزان سروتونین برون‌سلولی را افزایش داده و این کار با جلوگیری از بازجذب سریع سروتونین در گیرنده‌های عصبی پیش سیناپسی انجام می‌دهند [۱۴]. در نتیجه، غلظت سروتونین در شکاف سیناپسی بالا رفته و سروتونین بیشتری در اختیار گیرنده‌های پس سیناپسی قرار می‌گیرد. همچنین SSRIs بر انتقال‌دهنده‌های نوراپینفرین و دوپامین هم مؤثر هستند [۱۵]. از طرفی مصرف این خانواده دارویی ممکن است غلظت داروهایی چون وارفارین، ترکیبات ضد آریتمی، بتابلاکرها مانند پروپرانول، ضد افسردگی‌های سه حلقه‌ای مانند آمی‌تریپتیلین، بنزودیازپین‌ها از جمله آلپرازولام و دیازپام، را افزایش

¹ Hasan Al hwasli

² Selective serotonin reuptake inhibitors

داده و منجر به مسمومیت شود [۱۶]. بنابراین اندازه‌گیری همزمان SSRI با این ترکیبات دارای اهمیت بوده که از جمله SSRI مورد مطالعه در این پژوهش، سرتالین و سیتالوپرام می باشد.

سیتالوپرام یا ۱-۳-(دی متیل آمینو) پروپیل-۱-(۴-فلوروفنیل)-۱،۳-دی هیدروایزوبنزوفوران-۵-کربونیتریل با نام تجاری سلکسا^۱ و سیپرامیل^۲ یک داروی ضد افسردگی از گروه مهار کننده‌های باز جذب سروتونین می باشد که برای درمان اختلالات خلقی و درمان اختلالات افسردگی شدید به کار برده می شود [۱۷]. ساختار سیتالوپرام در شکل (۵-۱) نشان داده شده است.

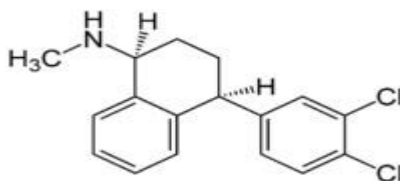


شکل (۵-۱) ساختار شیمیایی داروی سیتالوپرام [۱۷].

همچنین این دارو برای درمان اختلالات اضطرابی نیز تجویز می گردد [۱۸]. استفاده از این دارو برای درمان افسردگی، اختلالات هراس و اضطراب اجتماعی مورد تایید قرار گرفته است.

سرتالین، (۳،۴-دی کلروفنیل)-ان-متیل-۱،۲،۳،۴-تتراهیدرونیفتالین-۱-آمین با نام تجاری زولفت^۳ که ساختار آن در شکل (۶-۱) نشان داده شده است، یک داروی ضد افسردگی از گروه مهارکننده‌های باز جذب سروتونین است که استفاده از آن برای درمان افسردگی، اختلال وسواسی جبری، اختلال هراس، فوبیای اجتماعی، اختلال خلقی پیش از قاعدگی و اختلال استرس پس از سانحه پذیرفته شده است [۱۹].

¹ Celexa
² Ciperamil
³ Zoloft



شکل (۶-۱) ساختار شیمیایی سرتالین [۱۹].

مکانیسم عمل سرتالین از طریق جلوگیری از جذب مجدد سروتونین توسط گیرنده‌های عصبی پس سیناپسی و بالابردن غلظت سروتونین در دستگاه عصبی مرکزی است. سرتالین هم‌چنین به میزان کمی از جذب مجدد دوپامین جلوگیری می‌کند. نیمه عمر این دارو بین ۱۳ تا ۴۵ ساعت و در زنان حدود ۱/۵ برابر بیش از مردان است. غلظت آن در پلاسما خون پس از ۴ تا ۶ ساعت به حداکثر می‌رسد و تا حدود ۹۹٪ در افراد ایجاد وابستگی می‌کند [۲۰].

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

در سال ۲۰۰۱، جی مک^۱ و همکارانش، یک روش برای اندازه‌گیری سریع سیتالوپرام در پلاسما خون را به وسیله روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا توسعه دادند. آشکارساز فلئورسان در طول موج برانگیختگی ۳۲۶ nm نانومتر و نشری ۳۰۶ nm تنظیم گردید. حد اندازه‌گیری 0.096 ng mL^{-1} با استفاده از یک میلی لیتر از پلاسما به دست آمد. هم‌چنین در این مطالعه انحراف استاندارد نسبی کمتر از ۷ درصد گزارش گردید [۲۱].

اندازه‌گیری همزمان سیتالوپرام و دسیتیل سیتالوپرام به وسیله کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا با آشکارساز فلئورسان پس از استخراج فاز مایع در سال ۲۰۰۵ توسط منگ^۲ و همکارانش انجام پذیرفت. گستره خطی $12-1600 \text{ ng mL}^{-1}$ برای سیتالوپرام و $6-800 \text{ ng mL}^{-1}$ برای دسیتیل سیتالوپرام گزارش

¹ J. Meck

² Qing.H. Meng

شد. همچنین حد اندازه‌گیری $12 \mu\text{g L}^{-1}$ و ۶ به ترتیب برای سیتالوپرام و دسیتیل سیتالوپرام به دست آمد [۲۲].

در سال ۲۰۰۸ اندازه‌گیری همزمان سیتالوپرام، فلوکسیتین و متابولیت‌های اصلی آن توسط نورا آنستا^۱ و همکارانش در نمونه‌های ادرار انسان به وسیله روش میکرواستخراج فاز جامد کوپل شده با کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا انجام پذیرفت. در این مطالعه گستره خطی $0.05-2.0 \text{ mg L}^{-1}$ و حد تشخیص 0.01 L^{-1} برای سیتالوپرام، فلوکسیتین و همچنین متابولیت‌های آن به دست آمد [۲۳].

رومانا^۲ و همکارانش در سال ۲۰۱۲، یک روش سریع توسط کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا با اسپکتروسکوپی جرمی برای اندازه‌گیری همزمان سرتالین، سیتالوپرام و همچنین داروهای دیگر ضد افسردگی معرفی نمودند. گستره خطی برای سرتالین و سیتالوپرام $5-500 \text{ ng mL}^{-1}$ و همچنین درصد بازیابی بالاتر از ۸۷ درصد برای این گستره از داده‌ها گزارش شده است [۲۴].

در سال ۲۰۱۲ فرانی^۳ و همکارانش از روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا با دتکتور فرابنفش برای اندازه‌گیری سرتالین و سه ناخالصی غیر کایرال مرتبط استفاده نمودند. گستره خطی $700-425 \mu\text{g mL}^{-1}$ و حد تشخیص 0.0098 g mL^{-1} به دست آمد [۲۵].

در قسمت دوم این پژوهش، اندازه‌گیری همزمان سرتالین، سیتالوپرام و دیازپام به روش میکرواستخراج مایع مایع پخشی به همراه جامدسازی قطره آلی شناور و کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا ارائه شد.

۳-۱ ویتامین

ویتامین‌ها ترکیبات آلی هستند که قسمت‌های مختلف بدن به مقدار محدود به آن‌ها نیاز دارند [۲۶]. در واقع یک ترکیب شیمیایی آلی هنگامی ویتامین نامیده می‌شود که ارگان‌های بدن نتوانند آن

¹ Nora Unceta

² rumana

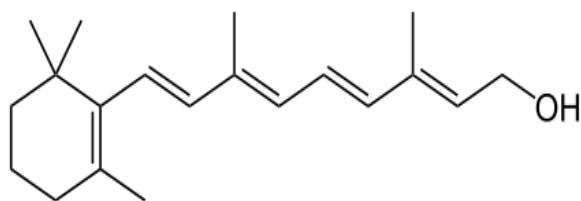
³ Alessia ferranini

را در مقادیر کافی سنتز کنند و بنابراین باید از رژیم غذایی دریافت شوند. ویتامین‌ها به دو دسته ویتامین‌های محلول در آب و محلول در چربی طبقه بندی می‌شوند. در انسان، ۱۳ نوع ویتامین وجود دارد که شامل ۴ ویتامین محلول در چربی (K, E, D, A) و ۹ ویتامین محلول در آب (۸ ویتامین گروه B و ویتامین C) است. ویتامین‌های محلول در آب، به آسانی در آب حل شده و به آسانی نیز از بدن دفع می‌شوند. بنابراین آزمایش ادرار، نشان دهنده دقیق میزان مصرف ویتامین‌ها است و نتیجه اینکه این نوع ویتامین‌ها در بدن ذخیره نمی‌شوند [۲۷]. ویتامین‌های محلول در چربی، در روده با کمک چربی‌ها جذب می‌شوند و به علت اینکه این ویتامین‌ها تمایل دارند که در بدن ذخیره شوند، ممکن است سبب بیماری‌های ناشی از ازدیاد ویتامین در بدن شوند. تنظیم ویتامین‌های محلول در چربی، اهمیت ویژه‌ای در افزایش بافت‌های کیستی دارد [۲۸]. با توجه به اینکه دو ویتامین A و E در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفته‌اند، در ادامه توضیحاتی در رابطه با این دو ویتامین خواهد آمد.

۱-۳-۱ ویتامین A

ویتامین A و مشتقات سنتزی و طبیعی آن متعلق به دسته ترکیبات آلی می‌باشند که از نظر ساختاری شبیه رتینوئید^۱ می‌باشند. این ویتامین برای رشد، حفظ سیستم ایمنی و بینایی مهم می‌باشد [۲۹]. ساختار این ویتامین در شکل (۷-۱) آمده است.

¹ Retinoid



شکل (۷-۱): ساختار شیمیایی ویتامین A [۲۹].

ویتامین A به وسیله رتینای^۱ چشم به شکل رتینال^۲، مورد نیاز است که با پروتئین اپسین^۳ برای تشکیل رودوپسین^۴، مولکول جاذب نور، ترکیب می‌شود. شایان ذکر است که دو نوع ویتامین A در رژیم غذایی وجود دارد. اولین نوع آن در محصولات حیوانی مانند گوشت، ماهی و محصولات لبنیاتی وجود دارد [۳۰، ۳۱]. نوع دیگر ویتامین A در محصولات گیاهی مانند میوه‌ها و سبزیجات موجود است. اسکلت رتینوئید طبیعی شامل حلقه سیکلوهگزانیل و شاخه پلی ان و یک گروه قطبی و زنجیره غیر قطبی در قسمت انتهایی می‌باشد. اگرچه اصلاحات اسکلت رتینوئید، کلاس‌های مختلف از رتینوئیدها را با اثرات بیولوژیکی ایجاد نموده است، سیستم مزدوج در شاخه پلی ان، ایجاد شده به وسیله پیوند دوگانه C=C، مسئول رنگ رتینوئیدها و همچنین توانایی برای عمل به‌عنوان کروموفر^۵ است [۳۲، ۳۳]. گروه‌های استخلافی روی کروموفر رتینوئید می‌تواند رفتار فیزیکی و شیمیایی مولکول رتینوئید را تغییر دهد [۳۴].

۱-۳-۲ ویتامین E

آلفا توکوفرول^۶ شکل کلی ویتامین E در بافت و خون انسان است که ساختار آن در شکل (۱-۸) نشان داده شده است. این نوع از ویتامین E بالاترین فعالیت بیولوژیکی را در میان توکوفرول‌ها و توکوتری انول‌ها^۷ نشان می‌دهد [۳۵].

¹ Retina

² Retinal

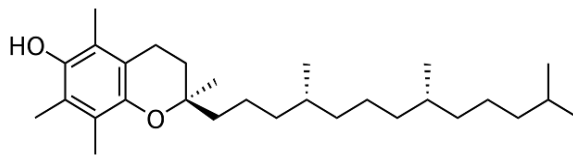
³ Opsin

⁴ Rhodopsin

⁵ Chromopher

⁶ α -tocopherol

⁷ Tocotri enol



شکل (۸-۱): ساختار شیمیایی ویتامین E [۳۵].

ادعاهایی در مورد فعالیت پیشگیرانه توکوفرول در مقابل گونه‌های اکسیژن فعال^۱ (ROS) در سیستم های بیولوژیکی وجود دارد که اثر مثبت درمانی روی برخی از انواع سرطان، بیماری‌های حفظ سیستم ایمنی و قلبی و عروقی دارد. مصرف بیش از ۱۰۰۰ mg از ویتامین E در روز ممکن است سبب بیماری-های ناشی از زیاده ویتامین در بدن شود [۳۶].

امروزه روش‌های مختلفی برای اندازه‌گیری مقادیر بسیار کم این ویتامین‌ها گزارش شده است که در زیر خلاصه ای از کارهای انجام شده برای اندازه‌گیری این ویتامین‌ها آورده شده است.

مومن بیک^۲ و همکارانش در سال ۲۰۰۵، جداسازی و اندازه‌گیری همزمان ویتامین A و E را در شربت مولتی ویتامین با استفاده از کروماتوگرافی مایع مایسل به همراه بهینه سازی سادگی^۳ گزارش نمودند. گستره خطی $0.15-1.5 \text{ ng L}^{-1}$ برای ویتامین A و $2.0-8.0 \text{ ng L}^{-1}$ برای ویتامین E گزارش شد. همچنین حد تشخیص $1/71 \text{ ng mL}^{-1}$ و $4/52$ به ترتیب برای ویتامین A و ویتامین E به دست آمد. درصد بازیابی بالای ۹۰ درصد نشان دهنده این است که روش به‌طور موفقیت آمیزی برای اندازه‌گیری این ترکیبات در محصولات دارویی قابل کاربرد است [۳۷].

در سال ۲۰۱۰ عبد خان^۴ و همکارانش یک روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا را برای بهینه‌سازی شرایط کروماتوگرافی برای اندازه‌گیری همزمان ویتامین A و E در نمونه های سرم انسانی توسعه دادند. حد تشخیص 0.3 ng mL^{-1} و ۲۹ برای ویتامین A و E گزارش شد [۳۸].

¹ Reactive oxygen species

² Momenbeik

³ Simplex optimization

⁴ Abad Khan

در سال ۲۰۱۱ جداسازی و پیش‌تغلیظ ویتامین‌های A و E با استفاده از روش استخراج فاز جامد و کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا با دکتور فرابنفش توسعه داده شد. از مزایای این روش مصرف پایین حلال استخراج آلی بوده است. RSD کمتر از ۵ درصد و درصد بازیابی بالاتر از ۹۰ درصد نشان می‌دهد که این روش به‌طور موفقیت‌آمیزی برای اندازه‌گیری این نوع ویتامین‌های محلول در چربی در مکمل‌های رژیمی و غذایی قابل‌کاربرد است [۳۹].

در سال ۲۰۱۲، جی سانتوز^۱ و همکارانش اندازه‌گیری ویتامین‌های محلول در چربی را در گیاهان با برگ سبز با روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا گزارش دادند. گستره خطی $1-10000 \text{ ng mL}^{-1}$ و حد تشخیص 170 ng mL^{-1} برای ویتامین A به دست آمد. همچنین درصد بازیابی $87/5$ با انحراف استاندارد نسبی $4/9$ درصد گزارش گردید [۴۰].

پیلار ویناس^۲ و همکارانش در سال ۲۰۱۴، روش کروماتوگرافی مایع لوله موئین^۳ با دکتور فرابنفش به‌همراه استخراج مایع تحت فشار^۴ و میکرواستخراج مایع پخشی را برای اندازه‌گیری ویتامین E در محصولات آرایشی ارائه نمودند. گستره خطی روش در شرایط بهینه $200-0/5 \mu\text{g L}^{-1}$ به دست آمد. در این شرایط حد تشخیص $0/13 \mu\text{g L}^{-1}$ گزارش گردید. درصد بازیابی در گستره $87-105\%$ با انحراف استاندارد نسبی کمتر از $7/8\%$ به دست آمد [۴۱].

در سال ۲۰۱۴ یانگ فو وونگ^۵ و همکارانش یک روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا با آشکارساز فرابنفش برای اندازه‌گیری ویتامین E و مشتقات آن در روغن‌های گیاهی، مارگارین و کپسول‌های مکمل خوراکی با استفاده از ستون کروماتوگرافی پنتا فلورو فنیل گزارش نمودند. گستره خطی برای ویتامین E، $200-2500 \mu\text{g L}^{-1}$ با حد تشخیص $0/2 \mu\text{g L}^{-1}$ گزارش گردید [۴۲].

¹ J.Santos

² Pilar vinas

³ Capillary liquid extraction

⁴ Pressurized liquid chromatography

⁵ Yong foo wong

در قسمت سوم و چهارم این پژوهش، اندازه‌گیری همزمان ویتامین A و E در روغن‌های خوراکی مورد بررسی قرار گرفته است. در قسمت سوم، اندازه‌گیری همزمان ویتامین A و E در نمونه‌های روغن خوراکی به روش میکرواستخراج مایع پخشی معکوس و کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا انجام پذیرفته است. در قسمت چهارم این پژوهش نیز اندازه‌گیری همزمان این دو ویتامین محلول در چربی به وسیله میکرواستخراج مایع پخشی معکوس و به وسیله فاز غنی شده از سورفکتانت و با روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا انجام پذیرفته است.

۱-۴ روش های کروماتوگرافی

کروماتوگرافی مهم‌ترین و پرکاربردترین روش جداسازی می‌باشد. کروماتوگرافی اولین بار به وسیله یک گیاه شناس روسی به نام میکائیل تسوت^۱، در اوایل قرن بیستم (۱۹۰۳) ارائه شد. او از این فن برای جداسازی رنگدانه‌های مختلف گیاهی مانند کلروفیل‌ها و گزانتوفیل‌ها استفاده کرد. پس از او، دانشمندان زیادی در توسعه تئوری و روش‌های کروماتوگرافی نقش داشته‌اند. از جمله مارتین^۲ و سینج^۳ که به علت توصیف کروماتوگرافی تقسیمی موفق به اخذ جایزه نوبل در سال ۱۹۵۲ شدند. بطور کلی روش‌های کروماتوگرافی دسته‌ای از روش‌های جداسازی هستند که در آن‌ها نمونه در یک فاز متحرک حل گردیده و این مخلوط از درون یک فاز ساکن غیرقابل امتزاج با فاز متحرک عبور نموده و در نتیجه برهم کنش با فاز ساکن، اجزای نمونه به طور متفاوت بین فاز ساکن و متحرک توزیع می‌شوند. لذا هرچه میزان تمایل نمونه به فاز متحرک بیشتر باشد، سریعتر حرکت نموده و این گونه زودتر از ستون خارج می‌شود و برعکس هرچه میزان تمایل به فاز ساکن بیشتر باشد نمونه‌ها زمان بازداری بیشتری خواهند داشت و دیرتر ستون را ترک می‌کنند [۴۳].

¹ Mikhail Tsvet

² A. J. P. Martin

³ R. L. M. Synge

کروماتوگرافی به عنوان بهترین روش جداسازی گونه‌های شیمیایی با ساختار بسیار نزدیک به یکدیگر، رشد یافته است. این روش را می‌توان برای شناسایی کیفی و اندازه‌گیری کمی گونه‌های جدا شده به کار برد. کروماتوگرافی بخشی از رشد سریع خود را در طول چهار دهه گذشته مدیون سرعت، سادگی و دامنه کاربرد وسیع خود به عنوان یک وسیله جداسازی است.

۱-۴-۱ کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا^۱

کروماتوگرافی مایع اولیه، در ابتدا، در ستون‌های شیشه‌ای با قطرهای ۱ cm تا ۵ cm و طول ۵۰ تا ۵۰۰ cm انجام می‌شد. برای اطمینان از جریان‌هایی با سرعت معقول، قطر ذرات فاز ساکن جامد معمولاً در گستره‌ی ۱۵۰ تا ۲۰۰ μ انتخاب شدند. حتی در این حالت نیز سرعت جریان‌ها کم و در گستره چند دهم میلی‌لیتر در دقیقه بود و بنابراین زمان جداسازی طولانی و اغلب چند ساعت طول می‌کشید. کوشش‌ها در مورد استفاده از خلا یا پمپ برای افزایش سرعت جریان موثر نبود، زیرا افزایش در سرعت جریان سبب افزایش ارتفاع بشقابک‌ها و در نتیجه کاهش کارایی می‌شد [۴۴].

در اوایل ابداع کروماتوگرافی مایع، دانشمندان تشخیص دادند که افزایش چشم‌گیر کارایی ستون را می‌توان با کاهش اندازه‌ی ذرات پرکننده انجام داد. با وجود این، تا اواخر دهه‌ی ۱۹۶۰ فن‌آوری تولید و استفاده از پرکننده‌هایی با قطر ذراتی به کوچکی ۳ تا ۱۰ میکرومتر ابداع نگردیده بود. این فن‌آوری در مقایسه با ستون‌های ساده شیشه‌ای کروماتوگرافی کلاسیک، به دستگاه‌های پیچیده‌ای نیاز داشت. نام کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا اغلب اوقات برای متمایز کردن این روش‌های جدیدتر از روش‌های کلاسیک به کار می‌رود.

اجزای دستگاه HPLC شامل موارد زیر است:

¹ High performance liquid chromatography (HPLC)

الف) پمپ: وسیله‌ای است که 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 ۵-۵۰ cm و قطر داخلی ۳-۹ mm 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، فلئورسانس، 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 [۴۵].

۱-۵ روش‌های آماده سازی نمونه

¹ Loop

² Support

اندازه‌گیری گونه‌های مهم شیمیایی و زیستی یکی از هدف‌های اساسی علوم تجزیه‌ای از گذشته تاکنون بوده است. از آن جایی که در بسیاری از موارد گونه مورد نظر در محیط‌های بسیار پیچیده وجود دارد، لذا نیاز به روش‌هایی است که بدون نیاز به مراحل وقت‌گیر و پر هزینه جداسازی، گونه مورد نظر را به صورت انتخابی اندازه‌گیری کنند، ضمن این که از حساسیت لازم نیز برخوردار باشند.

اغلب روش‌های به‌کار برده شده برای جداسازی گونه‌های شیمیایی از بافت نمونه و یا دیگر گونه‌های موجود شامل یک سیستم دو فازی می‌باشد که آنالیت و مزاحمت‌ها بین دو فاز توزیع شده است. استخراج مایع مایع (LLE)^۱ مربوط به توزیع حل‌شونده بین دو فاز مایع امتزاج‌ناپذیر در تماس با یکدیگر می‌باشد. اگر نمونه بین یک فاز جامد و یک فاز مایع توزیع شود، این فن، استخراج فاز جامد (SPE)^۲ نامیده می‌شود [۴۶]. این دو فن، بعنوان روش‌های استخراج پایه و قدرتمند، سال‌های زیادی برای جداسازی و پیش‌تغلیظ آنالیت‌ها به‌کار رفته است. با این وجود، این روش‌ها زمان‌بر هستند و از مقدار زیاد حلال آلی گرانبی‌قیمت و سمی استفاده می‌کنند. همچنین این فنون، به روش‌های چند مرحله‌ای با خطر بالای از دست رفتن آنالیت، نیاز دارند. بنابراین، علاوه بر معایب ذکر شده، با توجه به اینکه بعضی از روش‌های تجزیه‌ای در زمینه‌های متفاوتی از تحقیقات ممکن است منشاء چندین آلودگی باشند و توجه زیاد عموم به حفاظت و مراقبت از محیط زیست، دانشمندان و شیمی‌دانان را ملزم می‌سازد تا فعالیتشان را در جهت سازگاری با محیط زیست گسترش دهند. لذا شیمی‌دانان تجزیه‌ای سعی کرده‌اند تا از اصول معروف زیر برای به دست آوردن فعالیتشان در راستای سازگاری با محیط زیست، پیروی کنند.

• حذف یا به حداقل رساندن مصرف مواد شیمیایی، مخصوصاً حلال‌های آلی، در روش‌های تجزیه

ای

¹ Liquid liquid extraction

² Solid phase extraction

- کاهش انتشار بخارات و گازها و همچنین فاضلاب مایع و جامد تولید شده در آزمایشگاه‌های تجزیه ای

- حذف مواد شیمیایی با سمیت بالا از روش‌های تجزیه‌ای (مانند جایگزینی بنزن با حلال‌های دیگر)

- سادگی و کاهش مصرف انرژی در روش‌های تجزیه‌ای (برای یک آنالیت یا برای کل چرخه تجزیه‌ای)

در سال‌های اخیر، توجهات زیادی به توسعه فعالیت‌های سبز از قبیل جایگزینی حلال‌های سمی و مینیاتوری کردن روش‌های استخراج شده است که می‌تواند به طور قابل ملاحظه‌ای مصرف حلال‌های آلی سمی را کاهش دهد. بدین منظور روش‌های میکرواستخراج به عنوان جایگزین مناسب برای روش‌های استخراج سنتی توسعه یافتند. به همین منظور روش‌های میکرواستخراج به دو دسته کلی میکرواستخراج فاز مایع (LPME)^۱ و میکرواستخراج فاز جامد (SPME)^۲ تقسیم می‌شوند [۴۷].

روش میکرو استخراج فاز مایع (LPME) ویژگی‌های منحصر به فردی مانند چون قابلیت پیش‌تغلیظ بالا، سادگی، هزینه پایین و خالص‌سازی نمونه را نشان می‌دهد. روش‌های LPME تقریباً امکان ترکیب با هر نوع تکنیک تجزیه‌ای را دارند. در این روش حجم فاز آلی حاوی آنالیت بسیار کمتر از حجم فاز آبی اولیه حاوی آنالیت است [۴۸].

از زمان ارائه اولیه میکرواستخراج فاز مایع، فرم‌های متفاوتی از آن به منظور بهبود عملکرد، ارائه شده است، که می‌توان انواع روش میکرو استخراج با فاز مایع را به سه دسته زیر تقسیم نمود [۴۹]:

۱- میکرو استخراج با فاز مایع با استفاده از غشا هالو فیبر^۳

¹ Liquid phase microextraction

² Solid phase microextraction

¹ Hollow fiber liquid-phase microextraction

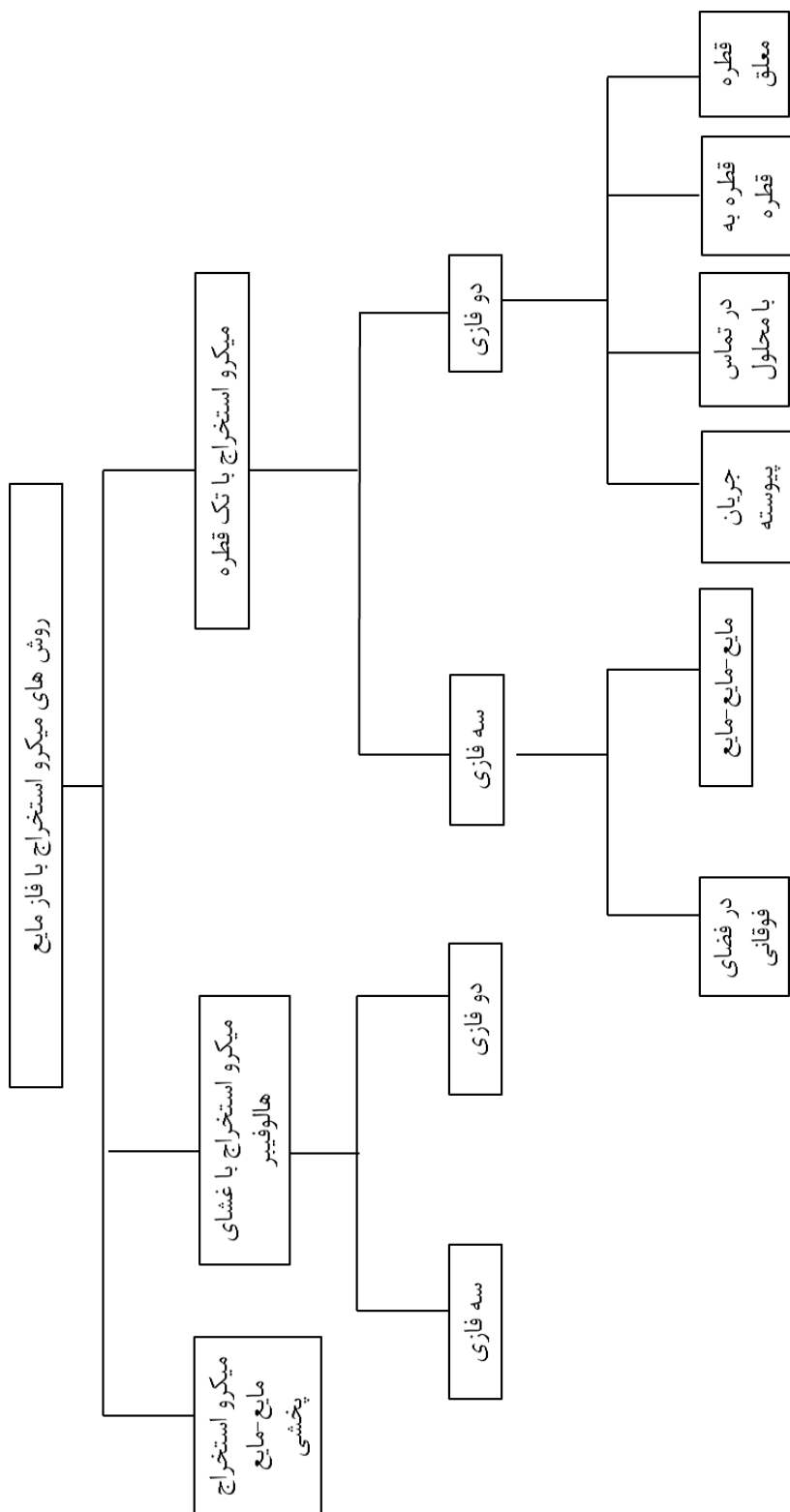
۲- میکرو استخراج با تک قطره^۱

۳- میکرو استخراج مایع-مایع پخشی^۲

تقسیم بندی انواع روش های میکرو استخراج فاز مایع در شکل (۱-۱) نشان داده شده است [۵۰]. در ادامه، از آن جا که موضوع اصلی این رساله، روش های اصلاح شده میکرواستخراج مایع مایع پخشی می باشد، اصول و همچنین اصلاحات انجام شده در این روش به تفصیل توضیح داده خواهد شد.

² Single drop microextraction

³ Dispersive-liquid liquid microextraction



شکل (۹-۱) تقسیم بندی انواع روش های میکرواستخراج فاز مایع [۵۰].

۱-۶ میکرو استخراج مایع مایع پخشی

۱-۶-۱ اصول میکرو استخراج مایع مایع پخشی

میکرواستخراج مایع مایع پخشی بر پایه سیستم‌های سه جزئی بنا شده است و با توجه به ترکیب درصد اجزا و قدرت اختلاط آن‌ها با یکدیگر، بصورت دو فاز مجزا در می‌آید. سیستم‌های سه جزئی براساس نمودارهای فازی در یک نمودار دو بعدی در فشار و دمای ثابت توضیح داده می‌شوند. این سیستم‌ها از سه جز تشکیل شده‌اند که معمولاً یک جز آن را آب تشکیل می‌دهد. از دو جز دیگر، یک جز غیر قابل امتزاج با آب و دیگری کاملاً قابل امتزاج با دو جز دیگر است. در سیستم‌های سه جزئی، دو فاز بر حسب سه جز مخلوط شده وجود دارد. در نسبت‌های مشخصی از اجزا، سیستم به شکل یک فازی بوده و هیچ حد فاصل مشخصی بین اجزا قابل تشخیص نمی‌باشد. با تغییر نسبت اجزا، سیستم وارد ناحیه دو فازی شده و دو جز غیر قابل امتزاج بصورت فازهای جداگانه در حال تعادل با یکدیگر قرار می‌گیرند. به طور کلی در روش میکرواستخراج مایع-مایع پخشی، سه جز حلال آبی، حلال آلی استخراج کننده و حلال آلی پخش کننده به گونه‌ای با هم مخلوط می‌شوند که حلال آلی استخراج کننده به صورت قطرات بسیار ریز در بین لایه‌های حلال آبی پخش شده و نمی‌تواند بدون حضور یک نیروی خارجی به یکدیگر متصل شده و ته نشین شود. بر اثر پخش حلال آلی استخراج کننده در درون آب، سطح تماس مولکول‌های آب و حلال آلی به میزان بسیار زیادی در مقایسه با استخراج مایع-مایع معمولی افزایش یافته و سبب می‌گردد که زمان لازم برای رسیدن به تعادل گونه استخراج شونده بین آب و حلال آلی کاهش یافته و به چند ثانیه برسد. به طور کلی مراحل انجام میکرواستخراج مایع-مایع پخشی بدین ترتیب می‌باشد که ابتدا یک محلول همگن از حلال آلی استخراج کننده و حلال پخش کننده با نسبتی معین تهیه می‌گردد. سپس مقدار مشخصی از این محلول به کمک سرنگ به سرعت به درون محلول آبی حاوی گونه آزمایشی مورد نظر تزریق می‌گردد. در لحظات ابتدایی مخلوط شدن حلال استخراج کننده، حلال پخش کننده و آب منجر به تولید یک محلول تک فازی شده ولی با وارد شدن

مولکول‌های بیشتر حلال استخراج کننده به محلول، تعادل بهم خورده و محلول از حالت تک فازی به دو فازی تبدیل شده و حالت ابری پیدا می‌کند. این حالت ابری شدن، به علت پخش ذرات ریز حلال استخراج کننده در درون حلال آبی می‌باشد. این مخلوط تا حد زیادی پایدار بوده و می‌تواند ساعت‌ها به همین حالت باقی بماند. سپس این مخلوط سانتریفیوژ شده و در نتیجه ذرات ریز حلال استخراج کننده که دارای دانسیته بالاتری نسبت به آب هستند، ته‌نشین می‌گردند. این فاز ته‌نشین شده که حاوی گونه آزمایشی موردنظر می‌باشد، جهت آنالیز با روش‌های دستگاهی مورد استفاده قرار می‌گیرد [۵۱].

۱-۶-۲ اصول تئوری میکرواستخراج مایع-مایع پخشی

مقدار ماده استخراج شده در فاز ته‌نشین شده^۱، n_{sed} را می‌توان از روابط ریاضی میکرواستخراج مایع-مایع پخشی به صورت زیر به دست آورد:

$$n_{tot} = n_{sed} + n_{aq} \quad (۱-۱)$$

$$n_{sed} = C_0 \times V_{aq} - C_{aq} \times V_{aq} \quad (۲-۱)$$

پارامترهای ذکر شده در معادلات فوق به صورت زیر تعریف می‌شوند:

$$n_{tot} = \text{مقدار کل گونه آزمایشی مورد نظر در نمونه}$$

$$n_{sed} = \text{مقدار آنالیت در فاز ته‌نشین شده}$$

$$n_{aq} = \text{مقدار آنالیت در فاز آبی پس از تعادل}$$

$$C_0 = \text{غلظت اولیه گونه آزمایشی مورد نظر در نمونه}$$

$$C_{aq} = \text{غلظت آنالیت در فاز آبی پس از تعادل}$$

¹ Sedimented phase

$$V_{aq} = \text{حجم نمونه آبی}$$

همچنین ضریب توزیع (K_D) به صورت نسبت غلظت ماده استخراج شده در فاز ته نشین شده (C_{sed}) به غلظت گونه آزمایشی موردنظر در فاز آبی پس از تعادل (C_{aq}) تعریف می شود:

$$K_D = \frac{C_{sed}}{C_{aq}} \quad (3-1)$$

با جایگزینی ضریب توزیع در رابطه (۲-۱) روابط زیر به دست می آید:

$$n_{sed} = C_0 \times V_{aq} - \frac{C_{sed}}{K_D} \times V_{aq} \quad (4-1)$$

$$n_{sed} = C_{sed} \times V_{sed} \quad (5-1)$$

که V_{sed} حجم فاز ته نشین شده می باشد و با جایگزینی رابطه (۵-۱) در رابطه (۴-۱) روابط زیر به دست می آید:

$$n_{sed} = C_0 \times V_{aq} - \frac{n_{sed}}{V_{sed} \times K_D} \times V_{aq} \quad (6-1)$$

$$n_{sed} = \frac{C_0 \times V_{aq}}{1 + \frac{V_{aq}}{V_{sed} \times K_D}} \quad (7-1)$$

$$n_{sed} = \frac{K_D \times V_{sed} \times C_0 \times V_{aq}}{V_{aq} + K_D \times V_{sed}} \quad (8-1)$$

معادله (۸-۱)، ارتباط مستقیم بین ماده استخراج شده در حلال آلی (n_{sed}) و غلظت اولیه نمونه (C_0) را نشان می دهد [۵۱، ۵۲].

۱-۶-۳ ویژگی های حلال استخراج کننده و پخش کننده

حلال استخراج کننده می بایست غیر قابل امتزاج با آب بوده و دانسیته بیشتری نسبت به آب داشته باشد. معمولاً حلال های هالوژن دار و سولفورمانند کلروفرم، کربن تتراکلرید، کلروبنزن، تتراکلرواتیلن و کربن دی سولفید دارای چنین شرایطی می باشند. در ضمن در مواردی که از

کروماتوگرافی گازی جهت اندازه‌گیری مواد استفاده می‌شود، حلال استخراج کننده باید با ستون مورد استفاده سازگار بوده و از نقطه جوش پایینی برخوردار باشد. حلال پخش کننده نیز باید قابلیت انحلال پذیری در هر دو حلال آبی و آلی را داشته باشد [۵۳،۵۴].

۱-۶-۴ معایب میکرواستخراج مایع مایع پخشی

حلال‌های مورد استفاده در روش DLLME حلال‌های هالوژن دار با چگالی بالاتر از آب، شدیداً سمی و از نظر زیست محیطی بسیار خطرناک می‌باشند. همچنین یکی از محدودیت‌های دیگر DLLME، ضریب تقسیم پایین آنالیت بین حلال آلی و محلول نمونه به واسطه حضور حلال پخش کننده در فاز آبی می‌باشد. در سال‌های اخیر روش‌های میکرواستخراج جدیدی برای غلبه بر این محدودیت‌ها معرفی شده است. در این روش‌ها، از حلال‌های استخراج با چگالی کم تر از آب استفاده شده است که سمیت کمتری نسبت به حلال‌های استخراج هالوژن دار دارند. همچنین از امواج فراصوت و سورفکتانت‌ها که از نظر زیست محیطی مناسب هستند، برای پخش نمودن حلال آلی در نمونه‌های آبی استفاده شده است [۵۵].

۱-۷ میکرواستخراج مایع - مایع پخشی بر اساس جامدسازی قطره آلی شناور و با کمک امواج

فراصوت

همان‌طور که در قبل گفته شده است، برای انجام یک آنالیز، آماده سازی نمونه یک مرحله‌ی ضروری بوده و امروزه بیشترین بهره را از امواج فراصوت در جهت بهبود کارایی در مرحله آماده سازی نمونه می‌برند. در این زمینه معمولاً از حمام‌های آبی و میله‌های الکترونیکی فراصوت به صورت سیستم‌های ناپیوسته یا پیوسته استفاده می‌شود [۵۶]. در سیستم ناپیوسته، برخلاف سیستم پیوسته، تابش بصورت پالسی و در یک مدت زمان مشخص به نمونه اعمال می‌گردد. در صورتیکه در سیستم‌های پیوسته، نمونه در کل زمان مورد نظر تحت تابش فراصوت قرار می‌گیرد.

اگرچه فراصوت کمتر در روش‌های پیوسته مورد استفاده قرار گرفته است، ولی با این حال مزایای بیشتری را در این روش‌ها فراهم آورده است. کنترل فرایند، کارایی، مصرف حلال و زمان فرایند از جمله پارامترهایی هستند که استفاده از فراصوت موجب بهبود آن‌ها در روش‌های پیوسته شده است. همچنین امواج فراصوت می‌توانند سرعت انتقال جرم را از فازی به فاز دیگر افزایش دهند. از طرفی باعث افزایش پدیده امولسیون شدن در مخلوط دو فاز می‌شوند و شاید به همین دلیل تجزیه‌گرها در استفاده از امواج فراصوت برای بهبود کارایی روش‌های استخراج مایع تردید داشته‌اند. در واقع کاربرد امواج فراصوت در روش‌های استخراج مایع اغلب باعث ایجاد یک امولسیون پایدار می‌شود که به دلیل زیاد بودن حجم کلی نمونه و در نتیجه ممکن نبودن عمل سانتریفیوژ، فرایند جداسازی فازها طولانی می‌شود. از طرفی می‌توان گفت که با افزایش بیشتر سرعت و کارایی استخراج با امواج فراصوت در روش‌های استخراج مایع از طرفی زمان جدایی فازها افزایش می‌یابد. بنابراین، باید دو فاکتور سرعت استخراج و زمان جدایی فازها در روش استخراج مایع مایع به کمک امواج فراصوت (UA-LLE)¹ بهینه شوند. بسیاری از گزارش‌هایی که در آن‌ها از روش UA-LLE استفاده شده است، به صورت ناپیوسته انجام شده‌اند. در این روش‌ها معمولاً یک ظرف حاوی نمونه و فاز گیرنده غیر قابل امتزاج در نمونه وارد حمام فراصوت می‌شود. امواج فراصوت در مدت زمان معینی اعمال شده و پس از جدا کردن فازها، فاز گیرنده برای آنالیز و یا مرحله بعدی آماده‌سازی نمونه به کار می‌رود. کاربردهای متعددی از این تکنیک برای استخراج انواع مختلف آنالیت‌ها در نمونه‌های مایع گزارش شده است [۵۷]. از طرفی روش دینامیک UA-LLE نیز برای استخراج مایع-مایع پیوسته از فاز آبی به آلی و بر عکس با استفاده از سیستم‌هایی که به این منظور طراحی شده‌اند، به کار رفته است. همان طور که ذکر شد، یکی از مشکلات موجود در UA-LLE نیاز به زمان‌های نسبتاً طولانی برای جداسازی فازها بود که به دلیل حجم کلی نسبتاً زیاد، استفاده از سانتریفیوژ در آن‌ها امکانپذیر نبود. همچنین، استفاده از حجم‌های زیاد از حلال آلی مشکلاتی نظیر

¹ Ultrasound assisted -liquid-liquid extraction (UA-LLE)

هزینه بالا، آلودگی محیط زیست و ایجاد یک فاز گیرنده رقیق حاوی آنالیت‌های مورد نظر را به همراه داشت [۵۸].

در سال ۲۰۰۷ یمینی و همکارانش روش میکرو استخراج فاز مایع جدیدی را براساس انجماد قطره آلی شناور^۱ (SFOD) ارائه کردند [۵۹]. در این روش، نمونه آبی در یک ظرف حاوی همزن قرار داده شده و در حالی که محلول هم زده می‌شود، چند میکرولیتر از یک حلال آلی مناسب با یک میکروسرنگ بر سطح محلول اضافه گردیده، سپس ظرف نمونه به حمام یخ منتقل می‌شود. کاهش ناگهانی درجه حرارت موجب انجماد حلال آلی در چند ثانیه می‌شود. سپس فاز استخراج شده‌ی جامد با استفاده از یک اسپاتول کوچک به یک ظرف مناسب منتقل و در درجه حرارت اتاق ذوب شده و اندازه‌گیری آنالیت با روش تجزیه‌ای مناسب انجام می‌گیرد.

لونگ^۲ [۶۰]، زو^۳ [۶۱] و همکارانشان، مزایای دو روش DLLME و SFOD را با هم آمیختند و یک روش پیش تغلیظ جدید به نام میکرواستخراج مایع - مایع پخشی بر اساس انجماد قطره آلی شناور را معرفی کردند. روش میکرواستخراج مایع - مایع پخشی بر اساس شناورسازی قطره جامد، در واقع شکل اصلاح شده‌ای از استخراج مایع - مایع سنتی است که به منظور کاهش مصرف حلال‌های آلی مضر و زمان استخراج طراحی و ابداع شده است. در این روش برخلاف روش SFOD، محلول هم زده نشده و مخلوط حلال‌های استخراج کننده و پخش کننده سریعاً به محلول نمونه تزریق می‌شود. بعد از تزریق، سانتریفیوژ برای شناورسازی فاز آلی در بالای فاز آبی استفاده می‌شود. سپس همانند روش SFOD، ظرف حاوی محلول نمونه در داخل ظرفی حاوی قطعات یخ قرار داده شده تا فاز آلی منجمد شود. مزیت این روش نسبت به روش SFOD، سطح تماس زیاد بین نمونه و حلال استخراج کننده است که به طور موثر انتقال جرم را بهبود بخشیده و سریعاً حالت تعادل را ایجاد می‌کند [۶۲].

¹ Solidification of floating organic droplet

² Leong

³ Xu

در روش SFOD و DLLME-SFOD حلال استخراج کننده باید شرایط زیر را داشته باشد:

الف) فراریت کمی داشته باشد تا در حین استخراج مقدار آن کاهش نیابد.

ب) قابلیت حل شدن آن در آب کم باشد.

ج) نقطه ذوب آن به دمای اتاق نزدیک باشد (در محدوده ۳۰-۱۰ درجه سانتیگراد)

د) برای اندازه‌گیری ترکیبات مورد نظر با دستگاه‌های تجزیه‌ای سازگار باشد [۶۳].

۸-۱ میکرواستخراج قطره آلی شناور جامد با کمک افزایش سورفکتانت و امواج فراصوت

سورفکتانت‌ها، ترکیبات آلی دوگانه دوستی^۱ هستند که شامل گروه‌های آب دوست و آب گریز می‌باشند و بنابراین در آب و حلال‌های آلی محلول هستند. سورفکتانت‌ها کشش سطحی بین روغن و آب را به‌وسیله جذب در سطح مشترک گاز-مایع کاهش می‌دهند. بسیاری از سورفکتانت‌ها می‌توانند در محلول همانند مایسل‌ها تجمع یابند. غلظت بحرانی مایسل^۲ (CMC) به‌صورت غلظتی از سورفکتانت تعریف می‌شود که در سطح بالاتر این غلظت، مایسل‌ها بصورت خودبخود تشکیل می‌شوند [۶۴]. همانطور که قبلاً گفته شد، یکی از محدودیت‌های DLLME ضریب تقسیم پایین آنالیت بین حلال آلی و محلول نمونه بواسطه حضور حلال پخش کننده در فاز آبی می‌باشد. در سال‌های اخیر روش‌های میکرواستخراج جدیدی معرفی شده است که سورفکتانت‌ها نقش عامل امولسیفایر را دارد. در این روش-ها، سورفکتانت‌ها که از نظر زیست محیطی مناسب هستند، برای پخش نمودن حلال آلی در نمونه‌های آبی استفاده شده است. در این روش، ابتدا مخلوطی از حجم کم و مشخصی از حلال استخراج و سورفکتانت به محلول حاوی آنالیت اضافه می‌گردد. همچنین محلول در معرض امواج فراصوت که باعث افزایش سطح تماس دو فاز می‌گردد، قرار می‌گیرد. پس از قرار گرفتن نمونه تحت امواج فراصوت و به دنبال آن سانتریفیوژ کردن محلول، حلال آلی که دارای چگالی کمتری نسبت به آب است در روی

¹ Amphiphile

² Critical micelle concentration

سطح شناور می‌گردد. سپس ظرف نمونه را در درون حمام یخ قرار داده تا حلال استخراج منجمد گردیده و در مرحله بعد قطره جامد را می‌توان به راحتی به وسیله یک اسپاتول کوچک جدا کرد. حلال استخراج منجمد شده در دمای محیط به سرعت ذوب شده و آن را می‌توان توسط روش مورد نظر آنالیز کرد. اولین مورد معرفی استفاده از سورفکتانت به عنوان عامل پخش کننده، به وسیله وو^۱ و همکارانش در سال ۲۰۱۰ معرفی شد [۶۵]. در این روش، تکنیک میکرواستخراج تقویت شده با سورفکتانت و با کمک امواج فراصوت^۲ (UA-SEME) برای اندازه‌گیری کربامات‌ها در نمونه‌های آبی توسعه داده شد. در این روش سورفکتانت (Tween 20) برای تسریع تشکیل امولسیون و همچنین کاهش زمان استخراج استفاده گردید.

۹-۱ میکرواستخراج مایع مایع پخشی معکوس (RP-DLLME)^۳

در روش میکرواستخراج مایع مایع پخشی معکوس، قطبیت حلال استخراج کننده در مقایسه با روش میکرواستخراج مایع مایع پخشی نرمال معکوس می‌گردد و آب، جایگزین حلال‌های آلی هالوژن دار سمی می‌گردد [۶۶]. در این روش به طور کلی، حجم کوچکی از محلول آبی، در یک حلال آلی سبک‌تر از آب با کمک یک حلال نسبتاً قطبی به عنوان حلال پخش کننده، پراکنده می‌شود. بنابراین فاز ته نشین شده، یک میکروقطره آبی است که می‌تواند به طور مستقیم به دستگاه HPLC تزریق شود. مزیت این روش زمان آنالیز کوتاه و عدم استفاده از حلال‌های کلردار سمی می‌باشد [۶۷].

۱۰-۱ روش‌های بهینه‌سازی^۴ پارامترها

روش‌های بهینه‌سازی، روش‌هایی هستند که سطوحی از متغیرهای موثر در آزمایش را مشخص می‌نمایند. به طوری که در این سطوح از متغیرها، پاسخ بهینه به دست آید. یک روش بهینه‌سازی خوب

¹ Qiuhua Wu

² Ultrasound assisted-surfactant enhanced emulsification microextraction

³ Reverse phase dispersive liquid liquid microextraction

⁴ Optimization method

باید دو ویژگی داشته باشد. اول اینکه شرایط تجربی را مشخص نماید که در آن شرایط پاسخ بهینه یا نزدیک به بهینه ایجاد شود و دوم اینکه تا حد ممکن تعداد آزمایش‌های کمتری جهت رسیدن به پاسخ بهینه نیاز داشته باشد. روش‌های متفاوتی برای بهینه‌سازی متغیرها وجود دارد که از بین آن‌ها می‌توان به موارد زیر اشاره کرد [۶۸]:

الف) روش تک‌متغیره^۱

ب) روش سیمپلکس^۲

ج) روش طراحی آزمایش (طراحی فاکتوریال)^۳

د) روش مربعات لاتین^۴

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

۱-۱۰-۱ روش تک‌متغیره

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

¹ One at a time

² Simplex

³ Factorial design

⁴ Latin squares

۱-۱۰-۲ طراحی آزمایش

طراحی آزمایش، الگوهایی برای انجام آزمایش‌ها به منظور به دست آوردن اطلاعات موثق درباره عوامل موثر بر آزمایش‌ها می‌باشند. به عبارت دیگر، علم طراحی آزمایش، علم طرح‌ریزی، اجرا، تجزیه آماری و نتیجه‌گیری در مورد آزمایش‌ها است. با اجرای طراحی آزمایش، می‌توان مقادیر بهینه نتایج اندازه‌گیری‌ها (پاسخ‌ها) و یا شرایطی که در آن، پاسخ‌های مغایر، از سازگاری مناسبی برخوردار هستند را تعیین نمود. طراحی آزمایش در زمینه‌های مختلف علم شیمی و علوم وابسته، از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد. در شیمی تجزیه نیز از طراحی آزمایش می‌توان برای بهینه‌سازی پارامترهای موثر بر روش‌های مختلف تجزیه‌ای شامل پیش‌تغلیظ و استخراج نمونه و به دست آوردن بهترین پاسخ استفاده کرد [۶۹].

۱-۱۰-۳ مراحل اصلی اجرای طراحی آزمایش

اولین مرحله در اجرای طرح‌های آزمایشی شامل انتخاب فاکتور یا فاکتورهای موثر بر پاسخ است. در صورتی که اطلاعات کافی در مورد فاکتورهای موثر موجود نباشد، لازم است اثر کلیه فاکتورهایی را که ممکن است موثر باشند، مورد بررسی قرار داده و سپس فاکتورهای موثر را انتخاب نمود که به این منظور، از طرح غربال‌گری^۱ استفاده می‌شود.

پس از انتخاب فاکتورهای موثر، می‌بایست مرزها و سطوح محدوده آزمایشی تعریف شوند. در این مرحله، سطوح فاکتورها و بنابراین محدوده آزمایشی یا سطوح فاکتورها، یعنی محدوده تغییرات متغیرهای مستقل، مشخص می‌شوند. تعریف صحیح مرزها و سطوح، بسیار ضروری است. انتخاب سطوح بسیار وسیع، آزمایشگر را وادار به انجام آزمایش در شرایط غیر مفید کرده و همچنین موجب دستیابی به

¹ Screening design

مدلهایی می‌شود که از دقت کافی جهت توصیف رابطه کمی متغیرهای وابسته و مستقل برخوردار نمی‌باشند [۶۹].

آخرین مرحله اجرای طراحی آزمایش، انتخاب شرایط بهینه بر اساس نتایج آزمایش‌ها و اغلب بر اساس مدلی که پاسخ را به فاکتورهای آزمایشی مرتبط می‌سازند، می‌باشد. با انجام آزمایش در شرایط بهینه پیش‌بینی شده، می‌توان کیفیت مدل‌های ایجاد شده را ارزیابی نمود. پس از اینکه نتایج آزمایش‌ها بر مبنای طراحی آزمایش به دست آمد، یک مدل ریاضی برای ارتباط بین فاکتورهای موثر و پاسخ ایجاد می‌شود تا بتوان بر مبنای آن رویه پاسخ^۱ را به دست آورد. در این مرحله می‌توان با استفاده از روش‌های مختلف مانند رگرسیون خطی چندتایی^۲، رگرسیون رویه پاسخ^۳، آنالیز جز اصلی^۴ و حداقل مربعات جزئی^۵ به جستجوی مدل ریاضی و توصیف رابطه بین فاکتورها و پاسخ مورد مطالعه پرداخت.

۴-۱۰-۱ طرح‌های متوالی

طرح‌های متوالی زمانی استفاده می‌شوند که مقدار بهینه یک پاسخ، مورد جستجو بوده و یافتن مدلی که پاسخ را به متغیرها ارتباط دهد، مد نظر نباشد. اگرچه نتایج به دست آمده از اجرای طرح‌های متوالی، امکان ترسیم بخشی از رویه پاسخ را فراهم می‌کنند (رویه پاسخ، نموداری از پاسخ به صورت تابعی از فاکتورهای آزمایشی را در اختیار قرار می‌دهد و به این ترتیب پیش‌بینی شرایط بهینه را ممکن می‌سازد) و مدل به دست آمده، لزوماً مدل مناسبی نمی‌باشد. در روش‌های متوالی صحت تعیین نقطه بهینه به مسیری که برای رسیدن به این نقطه طی می‌شود، وابسته است [۷۰، ۷۱].

¹ Response surface

² Multiple linear regression

³ Response surface regression

³ Principal components analysis

⁴ Partial Least Squares

۱-۱۰-۵ طرح‌های هم زمان

همانطور که قبلاً اشاره شده، بهینه‌سازی متوالی و هم زمان از جمله راهبردهای اصلی بهینه‌سازی چند متغیره محسوب می‌شوند. مجموعه طراحی آزمایش را که در راهبرد بهینه‌سازی همزمان مورد استفاده قرار می‌گیرند، طرح‌های هم زمان یا طراحی‌های فاکتوریل می‌نامند [۷۱]. این طرح‌ها به دو گروه اصلی تقسیم می‌شوند:

- ۱- طرح‌هایی که هدف از اجرای آن‌ها، تعیین فاکتورهای موثر بر پاسخ و تخمین اثر آن‌هاست.
- ۲- طرح‌هایی که با اجرای آن‌ها، امکان مدل‌سازی تابع پاسخ و در نتیجه ترسیم رویه پاسخ فراهم می‌شود.

جهت تعیین فاکتورهای موثر و تخمین اثر آن‌ها، از طرح‌های فاکتوریل دو سطحی^۱ استفاده می‌شود. در این طرح‌ها، هر یک از فاکتورها در دو سطح مورد مطالعه قرار می‌گیرند. در صورتی که آزمایش‌ها در کلیه ترکیب‌های فاکتوری^۲ ممکن از سطوح فاکتورها انجام گیرند، طرح فاکتوریل کامل می‌نامند. بدیهی است هنگامی که تعداد فاکتورها زیاد باشند، تعداد آزمایش‌ها به سرعت افزایش می‌یابد. در این موارد به جای انجام طرح فاکتوریل کامل، تنها کسری از آزمایش‌ها انجام می‌شود و لذا طرح‌های اخیر را طرح فاکتوریل ناقص یا کسری^۳ می‌نامند [۷۲].

طرح‌هایی که در آن‌ها بر مدل‌سازی تاکید می‌شود، مستلزم مطالعه هر یک از فاکتورها در بیش از دو سطح می‌باشند. هدف اصلی استفاده از این طرح‌ها، استخراج مدل و پاسخ مربوطه است. به همین دلیل گاه این طرح‌ها را طرح‌های رویه پاسخ نیز می‌نامند. طرح‌های مرکب مرکزی^۴ (CCD) از جمله معروف-ترین طرح‌هایی است که در آن‌ها، شرایط بهینه عملکرد با مدل‌سازی پاسخ به صورت تابعی از فاکتورهای

¹ Two level factorial design

² Factor combination

³ Fractional or incomplete factorial design

⁴ Central composite design

آزمایشی، تعیین می‌شوند. به منظور بهینه‌سازی شرایط و در صورتی که فاکتورهای موثر بر پاسخ مشخص نباشند، اغلب، با توجه به تعداد فاکتورهای مورد بررسی، از یک طرح غربالگری مناسب استفاده می‌شود. بدین منظور اگر تعداد فاکتورها بین ۲ تا ۴ فاکتور باشد، از طراحی فاکتوریال کامل یا کسری و اگر ۵ فاکتور یا بیشتر مورد بررسی قرار گیرد، از طراحی فاکتوریل کسری و یا طراحی پلاکت برمن^۱ استفاده خواهد شد. سپس با اجرای طرح‌های رویه پاسخ، تنها فاکتورهای موثر در بیش از دو سطح جهت به دست آوردن شرایط بهینه مدل مربوطه مورد مطالعه قرار می‌گیرند [۷۳].

۱-۱۰-۶ طرح‌های فاکتوریل دو سطحی

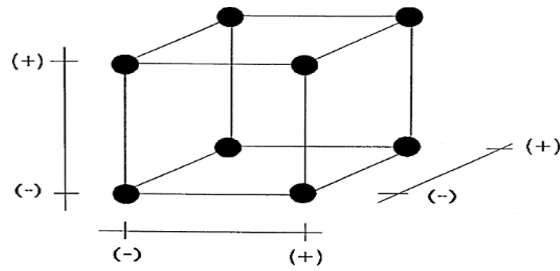
طرح‌های فاکتوریل دو سطحی به منظور پاسخ‌دهی به دو سوال مورد استفاده قرار می‌گیرند [۷۴]:

۱- آیا فاکتورهای مورد نظر و یا بر هم‌کنش‌های بین آن‌ها تاثیری بر پاسخ دارند؟

۲- میزان تاثیر فاکتورها و بر هم‌کنش آن‌ها بر پاسخ چقدر است؟

زمانی که تعداد فاکتورهای مورد مطالعه اندک باشند، یک طرح فاکتوریل کامل دو سطحی می‌تواند برای غربالگری مفید باشد. یک طرح فاکتوریل کامل دو سطحی تمام ترکیبات ممکن از تمام متغیرهای ورودی و سطوح آنها را شامل می‌شود. برای یک طرح فاکتوریل کامل با افزایش تعداد فاکتورها، تعداد آزمایش‌ها به صورت هندسی افزایش می‌یابد. از نقطه نظر هندسی، طرح فاکتوریل در گوشه‌های یک مکعب قرار می‌گیرد (شکل ۱-۱۰). اگر تعداد فاکتورها بیشتر از سه باشد، شکل هندسی طرح به صورت یک ابرمکعب خواهد بود که ذهن ما قادر به تجسم آن نیست اما از نظر ریاضی تغییر نمی‌کند [۷۵].

¹ Plackett Burman design



شکل (۱-۱۰): نمایش هندسی طرح فاکتوریل 2^3 [۷۵].

به منظور ارزیابی اثرات تعداد زیادی از فاکتورها، انجام تعداد زیادی آزمایش ضروری است که از لحاظ اقتصادی و عملی امکان پذیر نیست و در این حالت اغلب از کسری از طرح فاکتوریل کامل برای به دست آوردن اطلاعات مورد نظر استفاده می شود [۷۶]. در اغلب تحقیقات، منطقی است که فرض شود اثر برهم کنش های مرتبه سوم یا بالاتر بسیار کوچک است، بنابراین می توان اثر این برهم کنش ها را در مدل چند جمله ای حذف نمود [۷۷]. طرح فاکتوریل کسری با دو سطح و تعداد f فاکتور را می توان توسط 2^{f-v} آزمایش بررسی کرد که v تعداد کسرها می باشد. از آن جایی که تعداد آزمایش ها در طرح فاکتوریل کامل، با افزایش تعداد فاکتورها به طور نمایی زیاد می شود، معمولاً از طرح های فاکتوریل کسری استفاده می شود. محاسبه اثر فاکتورها برای طرح های فاکتوریل کسری نیز به طریق مشابه طرح های فاکتوریل کامل انجام می گیرد. البته باید توجه داشت که در این طرح ها، مجموع اثرات فاکتورهای اصلی و برهم کنش های چند فاکتوری محاسبه می شوند.

طراحی پلاکت برمن، طراحی است که در آن از کلیه برهم کنش ها صرف نظر می شود و فاکتورهای موثر با تعداد کمی آزمایش تعیین می شوند. این طرح بر اساس مدل چند جمله ای مرتبه اول است. این طراحی که در سال ۱۹۴۶ توسط پلاکت و برمن ابداع شد، یک طراحی فاکتوریل کسری دو سطحی است که برهم کنش های بین فاکتورها را در نظر نمی گیرد [۷۸]. تعداد آزمایش ها در این طرح هنگامی که نقطه مرکزی و تکرار وجود نداشته باشد عددی بین ۱۲ تا ۴۸ است که می بایست مضربی از ۴ هم باشد. به طور مثال ۱۲، ۲۰، ۲۴، ۲۸، ۳۶، ۴۰، ۴۴، ۴۸ تعداد آزمایش های تعریف شده در طرح پلاکت-

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

$$f = N - 1 \quad (9-1)$$

f = حداکثر تعداد فاکتورهای مورد بررسی

N = تعداد آزمایش های تعریف شده نرم افزار

هنگامی که در یک طراحی پلاکت- برمن نقاط مرکزی و تکرار وجود داشته باشد تعداد آزمایش ها از معادله زیر به دست می آید [۷۹].

$$N = 2(f - 3) \quad (10-1)$$

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

به منظور تعیین فاکتورها و برهم کنش های موثر بر پاسخ، از روش های مختلفی استفاده می شود. نمودار پارتو استاندارد شده^۱ یکی از این روش ها می باشد. در نمودار پارتو استاندارد شده، برای هر فاکتور یک میله وجود دارد که از مهم ترین فاکتور به کم اهمیت ترین آن مرتب می شوند.

۱-۱۰-۷ طرح های چند سطحی^۲

ترسیم رویه های پاسخ، مستلزم مدل سازی پاسخ به صورت تابعی از فاکتورها و برهم کنش های موثر است. طرح های آزمایشی با بیش از دو سطح، جهت ایجاد مدل های خمیده^۳ برای توصیف رابطه کمی

¹ Standardized Pareto chart

² Multi-level design

³ Curved models

پاسخ و فاکتورها به کار می‌روند. محدوده آزمایشی که طرح‌های چند سطحی متقارن توصیف می‌کنند، ممکن است کروی و یا مکعبی باشد و باید توجه داشت که برای پیش‌بینی پاسخ بهینه لازم است از برون‌یابی در خارج از ناحیه توصیف شده توسط طرح آزمایشی اجتناب شود. زیرا در غیر این صورت خطای پیش‌بینی بسیار زیاد بوده و حتی ممکن است مدل ایجاد شده، در خارج از محدوده آزمایشی معتبر نباشد. از جمله طرح‌های مکعبی می‌توان به طرح‌های فاکتوریل سه سطحی اشاره نمود. برخی از انواع طرح‌های مرکب مرکزی و همچنین طرح‌های باکس-بنکن^۱ (BBD) و دوهرلرت^۲ نیز از جمله طرح‌های کروی محسوب می‌شوند. طرح فاکتوریل سه سطحی کامل با 3^f آزمایش، طرح مکعبی محسوب می‌شود. از این طرح تنها در مواردیکه تعداد فاکتورها کم باشد، استفاده می‌گردد. به منظور حل مشکلات اقتصادی، جهت اجرای طرح‌های سه سطحی کامل در مطالعه اثر فاکتورهای متعدد، طرح‌های مرکب مرکزی مطرح شدند. این طرح‌ها از سه بخش تشکیل می‌شوند:

۱- طرح فاکتوریل دو سطحی کامل و یا کسری

۲- طرح ستاره‌ای^۳ که از آن، جهت افزایش تعداد سطوح فاکتورهای مورد مطالعه و توصیف روابط غیر خطی پاسخ و فاکتورها استفاده می‌شود.

۳- نقطه مرکزی^۴ که اغلب جهت تخمین خطای خالص^۵ آزمایش به کار می‌رود.

در طرح‌های مکعبی، اگرچه هر فاکتور در سه یا پنج سطح مورد مطالعه قرار می‌گیرد، اما تعداد آزمایش‌ها بسیار کمتر از طرح‌های فاکتوریل سه سطحی است.

¹ Box-Behnken design

² Doehlert design

³ Star design

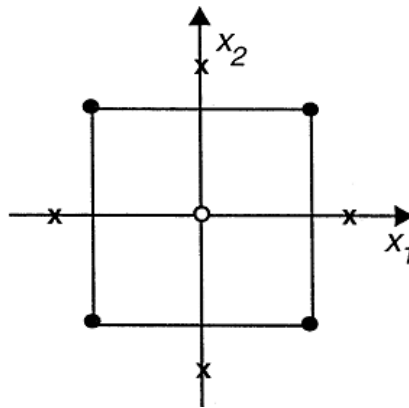
⁴ Center point

⁵ Pure error

طرح‌های مکعب مرکزی معمولاً شامل یک طرح فاکتوریل کامل یا فاکتوریل کسری با دو سطح، نقاط محوری اضافی و حداقل یک نقطه مرکزی از طرح آزمایشی است (شکل ۲-۲). تعداد آزمایش‌های طرح مرکب مرکزی توسط رابطه زیر به دست می‌آید [۷۶]:

$$N = 2^k + 2k + c_p \quad (11-1)$$

در این رابطه c_p تعداد نقاط مرکزی و k تعداد فاکتورها می‌باشد. ماتریس طرح مرکب مرکزی برای دو فاکتور در شکل ۱۱-۱ نشان داده شده است. فاصله نقاط محوری از نقطه مرکزی طرح با پارامتر α نمایش داده شده است. مقدار پارامتر α با تغییر تعداد فاکتورها متغیر است. بسته به مقدار α دو نوع CCD وجود دارد، مرکب مرکزی مرکز وجوه پر (CCF)^۱ با $\alpha = 1$ که فاکتورها را در سه سطح بررسی می‌کند و مرکب مرکزی محدود شده (CCC)^۲ با $\alpha > 1$ که فاکتورها را در پنج سطح بررسی می‌کند [۸۰].



شکل (۱۱-۱): طرح مرکب مرکزی برای دو فاکتور، (•) نقاط طرح فاکتوریل، (o) نقطه مرکزی، (x) نقاط محوری [۸۰].
طراحی آزمایش باکس-بنکن نیز از جمله طرح‌های اقتصادی چند سطحی می‌باشد که برای مطالعه اثر فاکتورهای متعدد مورد استفاده قرار می‌گیرد. این طرح شامل نقطه مرکزی یک مکعب و نقاط میانی اضلاع آن است و کروی و قابل چرخش^۳ است. این مدل در سال ۱۹۶۰ توسط باکس و بنکن ارائه شد.

¹ Central composite face-centered

² Central composite circumscribed

³ Rotatable

این طرح یک مدل مرتبه دوم سه سطحی و چرخش پذیر می باشد که برای مطالعه فاکتورهای متعدد مورد استفاده قرار می گیرد [۸۱]. تعداد آزمایش ها در این طرح از رابطه زیر به دست می آید:

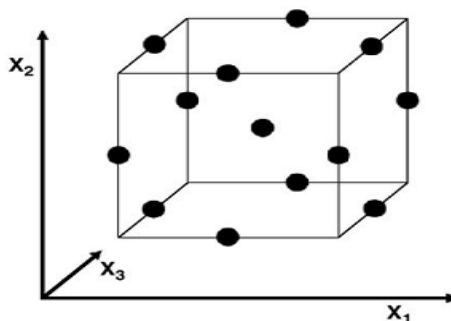
$$N = 2K(K - 1) + C_0 \quad (12-1)$$

که k تعداد فاکتورها و C_0 نیز تعداد نقاط مرکزی می باشد. شکل کلی این مدل به صورت یک معادله چندجمله ای درجه دوم می باشد که با معادله (۱۳-۱) نشان داده شده است:

$$y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j \quad (13-1)$$

که در این معادله، 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 باید به نحوی تنظیم شود، که بتوان برآوردی مناسب جهت تخمین ضرایب درجه اول و دوم مدل ریاضی انجام شود. در این طرح همچنین متغیرها در نقاط میانی یال ها و مرکز فضای طراحی قرار می گیرند و هیچ نقطه ای روی گوشه مکعب وجود ندارد [۸۲]، که در شکل (۱۲-۱) نمایی از طرح باکس- بنکن آورده شده است. از جمله فواید این طرح این است که نسبت به طرح مرکب مرکزی تعداد آزمایش کمتری داشته و همچنین این طرح از این جهت نسبت به طرح فاکتوریل سه سطحی بهتر است که عمدتاً برای تعداد متغیرهای زیاد به کار می رود.



شکل (۱۲-۱): طراحی آزمایش در روش باکس- بنکن [۸۲].

۱-۱۰-۸ تابع مطلوبیت^۱

تابع مطلوبیت (DF) یک روش معمول و مرسوم می‌باشد که برای تعیین بهترین سطوح بهینه برای فاکتورهای موثر بر پاسخ استفاده شده است. DF برای اولین بار توسط هانگتون^۲ معرفی گردید و سپس توسط درینگر^۳ و سویخ^۴ برای تعیین رابطه بین پاسخ‌های پیش‌بینی شده روی متغیرهای وابسته و همچنین مطلوبیت پاسخ بهینه گردید. DF دارای سه سطح (۰، ۰/۵ و ۱) می‌باشد. به‌طور کلی روش تابع مطلوبیت شامل ۳ مرحله می‌باشد [۲].

۱- پیش‌بینی پاسخ، براساس متغیرهای وابسته که به‌وسیله به‌دست آوردن پاسخ مشاهده شده مطابق معادله و همچنین براساس سطوح متغیرهای مستقل می‌باشد.

۲- یافتن سطوح متغیرهای مستقل، که به‌طور هم‌زمان پاسخ‌های پیش‌بینی شده مطلوب را بر روی متغیرهای وابسته ایجاد می‌نماید.

۳- به حداکثر رسانی مطلوبیت کل با توجه به متغیرهای قابل کنترل

بنابراین مزیت مهم استفاده از توابع مطلوبیت برای به‌دست آوردن پاسخ‌های کمی و کیفی به‌وسیله تبدیل ساده و سریع پاسخ‌های مختلف برای یک اندازه‌گیری می‌باشد.

بدین منظور، در ابتدا پاسخ (U)، به درون یک تابع مطلوبیت ویژه (df_i) تبدیل می‌شود که بین صفر تا یک متغیر است. مطلوبیت یک برای حداکثر پاسخ و مطلوبیت صفر برای یک موقعیت غیر مطلوب یا حداقل پاسخ تعریف شده است. درینگر و سویخ معادله را به‌صورت زیر فرض نمودند [۸۳]:

$$df_i = \left(\frac{u-\alpha}{\beta-\alpha}\right)^{wi} \quad \alpha \leq u \leq \beta \quad (13-1)$$

$$df_i = 1 \quad u > \beta$$

¹ Desirability function

² Hanngton

³ Derringer

⁴ Suich

$$df_i = 0$$

$$u < \alpha$$

در این معادله α و β بالاترین و پایین ترین مقدار به دست آمده برای پاسخ i و w_i وزن¹ می باشد. مقادیر مطلوبیت های منحصر بفرد برای مقادیر پیش بینی شده برای هر متغیر وابسته، درون تابع مطلوبیت کلی جمع می گردد که به وسیله محاسبه میانگین هندسی مقادیر مطلوبیت منحصر بفرد است:

$$DF = [df_1^{v_1} \times df_2^{v_2} \times \dots \times df_n^{v_n}]^{1/n}, 0 \leq v_i \leq 1$$

$$(i=1, 2, 3, \dots, n)$$

$$\sum_{i=1}^n v_i = 1$$

که df_i مطلوبیت پاسخ U_i را نشان می دهد و U_i اهمیت پاسخ ها را بیان می کند. با بررسی پروفایل مطلوبیت، تعیین می شود که چه سطوحی از متغیرهای پیش بینی کننده، می توانند پاسخ های پیش بینی شده بسیار مطلوب را بر روی متغیرهای مستقل، ایجاد کند.

۱-۱۰-۹ ایجاد مدل های آماری

پس از اینکه نتایج آزمایشات بر مبنای طرح آزمایشی به دست آمد، یک مدل ریاضی برای ارتباط بین فاکتورهای موثر و پاسخ ایجاد می شود تا بتوان بر مبنای آن رویه پاسخ را به دست آورد. در این مرحله می توان با استفاده از روش های مختلف مانند رگرسیون خطی چندتایی، رگرسیون رویه پاسخ، آنالیز جز اصلی و حداقل مربعات جزیی به جستجوی مدل ریاضی و توصیف رابطه ی بین فاکتورها و پاسخ مورد مطالعه پرداخت.

¹ Weight

فصل دوم

بخش تجربی

۱-۲ مواد شیمیایی

مشخصات مواد شیمیایی مورد استفاده برای انجام کارهای آزمایشگاهی مرتبط با موضوع این رساله در جدول (۱-۲) ارائه شده است. در این رساله، روش‌های میکرواستخراج مایع پخشی اصلاح شده برای پیش‌تخلیظ و اندازه‌گیری ترکیبات دارویی با روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا به کار برده شده است.

جدول (۱-۲): مواد شیمیایی مورد استفاده در این کار تحقیقاتی

نام ماده شیمیایی	فرمول شیمیایی	شرکت سازنده
پتاسیم دی هیدروژن فسفات دو آب	$\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	مرک ^۱
پتاسیم هیدروژن فسفات	K_2HPO_4	مرک
فسفریک اسید	H_3PO_4	مرک
متانول	CH_3OH	مرک
استون	$\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$	مرک
استونیتریل	CH_3CN	مرک
هیدروکلریک اسید	HCl	مرک
سدیم هیدروکسید	NaOH	مرک
۱-آندکانول	$\text{C}_{11}\text{H}_{24}\text{O}$	مرک
۱-دودکانول	$\text{C}_{12}\text{H}_{26}\text{O}$	مرک
۱۰ و ۱-دی کلرو دکان	$\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{Cl}_2$	مرک
سدیم دودسیل سولفات (SDS)	$\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$	مرک
Tween 80	$\text{C}_{64}\text{H}_{124}\text{O}_{26}$	مرک
Brij-35	$\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{20}\text{C}_{16}\text{H}_{33}$	فلوکا ^۲

¹ Merck

² Fluka

۲-۲ دستگاهها و تجهیزات مورد استفاده در این پروژه

جداسازی و اندازه‌گیری داروها در این پروژه با استفاده از سیستم کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا مدل ۱۱۰۰ Agilent مجهز به آشکارساز فرا بنفش چند طول موجی^۱ (Uv-MWD) انجام شد. همچنین یک رایانه مجهز به برنامه نرم افزاری کم استیشن^۲ برای پردازش داده‌های کروماتوگرافی مورد استفاده قرار گرفت. ستون مورد استفاده نیز از نوع C₁₈ (۴/۵ × ۱۵۰ میلی‌متر با اندازه ذرات ۵ میکرومتر) بود.

حمام آب فراصوت (BANDELIN الکترونیکی، DT510H، آلمان) برای پراکنش حلال آلی و یک دستگاه سانتریفیوژ (EBA Hettich، آلمان) برای ته نشین نمودن حلال آلی در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت. تنظیم و اندازه‌گیری pH محلول نمونه و فاز متحرک با استفاده از pH متر مترام^۳ ۷۸۰ 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 mg سارتوریوس^۴ مدل A200S ساخت کشور آلمان استفاده شد. برای برداشتن حجم معینی از حلال آلی از میکروپیپت-های ۱۰۰/۰ μL و ۱۰۰۰/۰ با حجم قابل تنظیم ساخت شرکت اپندورف^۵ مدل Research ۱۰۰ استفاده شد و همچنین برای برداشتن سورفکتانت و تزریق نمونه به HPLC از یک سرنگ اجیلنت ۱۰/۰ μL استفاده شد.

۳-۲ آماده سازی محلول‌ها

از محلول‌های پتاسیم دی هیدروژن فسفات و دی پتاسیم هیدروژن فسفات برای تهیه بافر-های فسفات (هر کدام با غلظت ۰/۰۶۷ M) در pH های مختلف (گستره ۹/۰-۴/۰) استفاده شد و سپس

¹ Ultraviolet-variable wavelength detector

² Agilent ChemStation

³ Metrohm

⁴ Sartorius

⁵ Eppendorf

pH محلول‌های بافر تهیه شده توسط دستگاه pH متر تنظیم گردید. برای pH های کمتر از ۴/۰، از محلول فسفریک اسید و سدیم دی هیدروژن فسفات برای تهیه محلول بافر استفاده شد.

محلول بافر استاتی از مخلوط کردن محلول استیک اسید ۱/۰ M و محلول سدیم هیدروکسید با غلظت ۱/۰ M تهیه گردید.

محلول بافر سیتراتی از مخلوط کردن سدیم سیترات ۰/۱۰ M و محلول سدیم هیدروکسید با غلظت ۱ M ۰/۱۰ تهیه گردید.

محلول بافر فتالاتی از مخلوط کردن محلول ۰/۲۰ M پتاسیم هیدروفتالات و محلول سدیم هیدروکسید با غلظت ۰/۱۰ M تهیه گردید. برای تهیه محلول سود ۱/۰ M ، مقدار ۴/۰ g از NaOH به دقت وزن شد و در یک بالن حجمی ۱۰۰/۰ mL با آب مقطر به حجم رسانیده و کاملاً یکنواخت گردید.

برای تهیه محلول اسید فسفریک ۱/۰ M ، ۶/۱ mL از اسید فسفریک ۸۵ درصد در یک بالن حجمی ۱۰۰/۰ mL با آب مقطر به حجم رسانیده و کاملاً یکنواخت گردید.

محلول $100/0 \text{ mg L}^{-1}$ سورفکتانت سدیم دودسیل سولفات (SDS) با چگالی $1/01 \text{ g cm}^{-3}$ ، به وسیله حل نمودن $10/0 \text{ }\mu\text{L}$ از SDS در یک بالن حجمی ۱۰۰/۰ mL به دست آمد.

محلول $100/0 \text{ mg L}^{-1}$ از سورفکتانت Tween 80 با چگالی $1/06 \text{ g cm}^{-3}$ ، به وسیله حل نمودن $7/63 \text{ }\mu\text{L}$ از Tween 80 در بالن ۱۰۰/۰ mL تهیه گردید.

برای تهیه محلول مادر نیترازپام و میدازولام با غلظت $4000/0 \text{ mg L}^{-1}$ ، $0/400 \text{ g}$ از داروی نیترازپام و میدازولام تهیه شده از شرکت داروسازی ابوریحان (تهران، ایران) در متانول حل شده و به حجم mL ۱۰/۰ میلی لیتر رسانده شد. محلول $100/0 \text{ mg L}^{-1}$ به صورت روزانه، از رقیق کردن محلول مادر که به وسیله متانول صورت می گرفت تهیه شد. محلول‌های رقیق تر به وسیله رقیق کردن این محلول توسط آب دو بار تقطیر تهیه گردید.

برای تهیه محلول مادر سرتالین، سیتالوپرام و دیازپام با غلظت $3000/0 \text{ mg L}^{-1}$ ، $0/0300 \text{ g}$ ، از داروهای سرتالین، سیتالوپرام تهیه شده از شرکت داروسازی نوکام (تهران، ایران) و دیازپام تهیه شده از شرکت داروسازی دکتر عبیدی (تهران، ایران) در متانول حل شده و به حجم $10/0 \text{ mL}$ رسانده شد. محلول $100/0 \text{ mg L}^{-1}$ 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 دو بار تقطیر تهیه گردید.

$0/0200$ گرم از رتینول استات (ویتامین A) و آلفا توکوفرول (ویتامین E) تهیه شده از شرکت سیگما در n-بوتانول حل و به حجم $10/0 \text{ mL}$ رسانده شد و به‌دین صورت محلول مادر ویتامین A و ویتامین E با غلظت $2000/0 \text{ mg L}^{-1}$ تهیه شد. محلول‌های رقیق‌تر به وسیله رقیق سازی روزانه با مخلوط اتانول-آب (۲-۸) آماده سازی گردید.

محلول $0/16 \text{ M}$ سورفکتانت Brij-35 در بالن $100/0 \text{ mL}$ تهیه گردید.

مخلوطی از بافر فسفاتی (pH برابر ۵/۵، با غلظت $0/06 \text{ M}$) و استونیتریل با نسبت (۱:۱) به عنوان فاز متحرک برای روش میکرواستخراج فاز مایع برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری مقادیر کم نیترازپام و میدازولام و همچنین سرتالین، سیتالوپرام و دیازپام مورد استفاده قرار گرفت.

مخلوط متانول-آب با نسبت حجمی ۱-۹ و سرعت جریان $1/0$ میلی لیتر بر دقیقه به‌عنوان فاز متحرک برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین E در روغن‌های خوراکی انتخاب گردید.

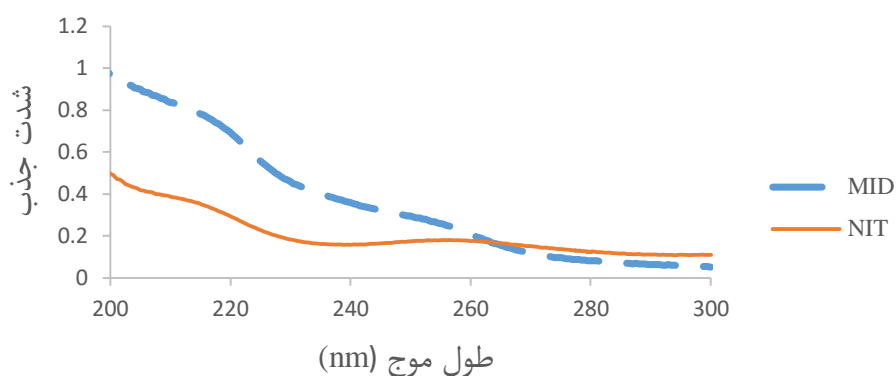
۲-۴ روش میکرواستخراج فاز مایع بر اساس قطره جامد با کمک سورفکتانت و امواج فراصوت برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری مقادیر کم نیترازپام و میدازولام در نمونه‌های حقیقی به‌وسیله

کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

با توجه به اینکه داروهای نیترازپام و میدازولام به‌علت آرامبخش و همچنین خواب‌آور بودن عموماً مورد سوء‌مصرف قرار می‌گیرند و به‌دلیل نقش آن‌ها بر سلامتی انسان، ارائه روشی ساده، حساس و گزینش‌پذیر برای اندازه‌گیری مقادیر کم از آن‌ها ضروری به‌نظر می‌رسد. همچنین از آنجا که غلظت‌های بالاتر از $5/0 \text{ mg mL}^{-1}$ در بدن انسان ایجاد مسمومیت و خطر می‌کند و این غلظت به‌طور مستقیم به‌روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا قابل اندازه‌گیری نمی‌باشد، ارائه روش میکرواستخراج ضروری به‌نظر می‌رسد. در این بخش، امکان استفاده از روش میکرواستخراج فاز مایع بر اساس قطره جامد با کمک سورفکتانت و امواج فراصوت برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری مقادیر کم نیترازپام و میدازولام در نمونه‌های حقیقی و اندازه‌گیری آن‌ها به‌وسیله کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا مورد بررسی قرار گرفته است.

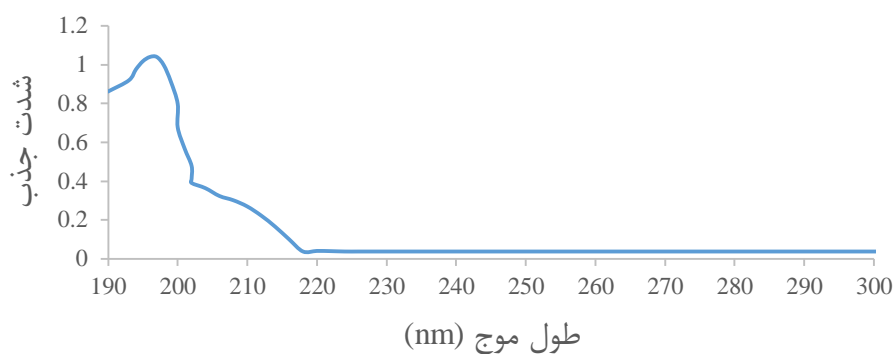
۲-۴-۱ ثبت طیف UV آنالیت‌ها و انتخاب بهترین طول موج

به‌منظور مشخص کردن بهترین طول موج برای آشکارسازی، طیف جذبی آنالیت‌ها در گستره $200\text{--}300 \text{ nm}$ ثبت شد. برای این منظور محلول‌های $5/0 \text{ mg L}^{-1}$ نیترازپام و میدازولام به‌صورت جداگانه در فاز متحرک تهیه گردید و سپس به‌داخل سل اسپکتروفوتومتر منتقل و طیف جذبی هر یک از آن‌ها نسبت به فاز متحرک به‌عنوان شاهد ثبت شد (شکل ۲-۱). با توجه به اینکه در طول موج 220 nm حداکثر جذب برای هر دو دارو دیده شده است، نتایج اندازه‌گیری در طول موج 220 nm ثبت گردید. در طول موج‌های پایین‌تر از 220 nm ، به‌دلیل جذب حلال (متانول) بررسی انجام نگرفت (شکل ۲-۲).



شکل (۱-۲): طیف جذبی نیترازپام و میدازولام، شرایط آزمایش: غلظت نیترازپام و میدازولام ($5/0 \text{ mg L}^{-1}$)، فاز

متحرک (مخلوطی از بافر فسفاتی pH برابر ۵/۵، با غلظت $0/06 \text{ M}$ و استونیتریل با نسبت (۱:۱))



شکل (۲-۲): طیف جذبی متانول نسبت به فاز متحرک (مخلوطی از بافر فسفاتی pH برابر ۵/۵، با غلظت $0/06 \text{ M}$ و

استونیتریل با نسبت (۱:۱))

۲-۴-۲ شرایط کروماتوگرافی برای اندازه‌گیری همزمان نیترازپام و میدازولام

جداسازی کروماتوگرافی با استفاده از شویش ایزوکراتیک^۱ (استفاده از یک نوع حلال در طول

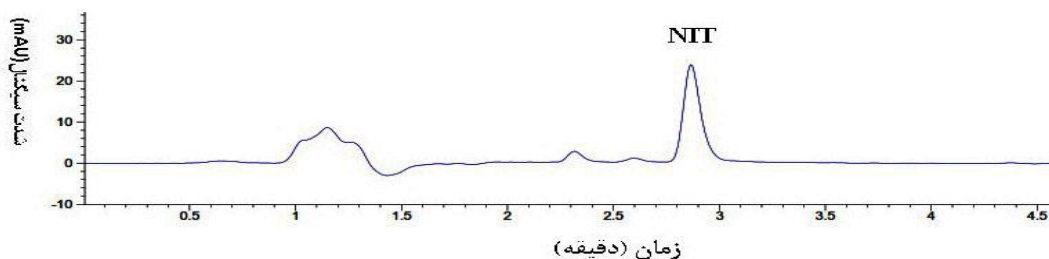
آنالیز) برای اندازه‌گیری همزمان نیترازپام و میدازولام صورت پذیرفت. بدین منظور مخلوطی از بافر

فسفاتی (pH برابر ۵/۵، با غلظت $0/06 \text{ M}$) و استونیتریل با نسبت (۱:۱) به‌عنوان فاز متحرک برای

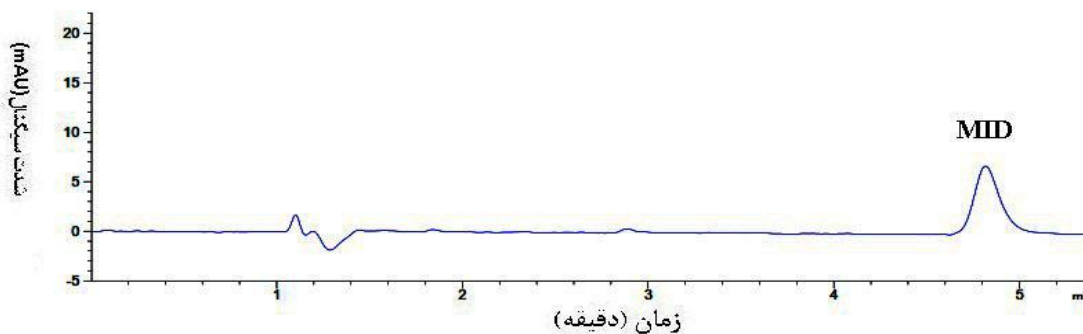
جداسازی و اندازه‌گیری مقادیر کم نیترازپام و میدازولام مورد استفاده قرار گرفت [۸۴]. جداسازی

¹ Isocratic

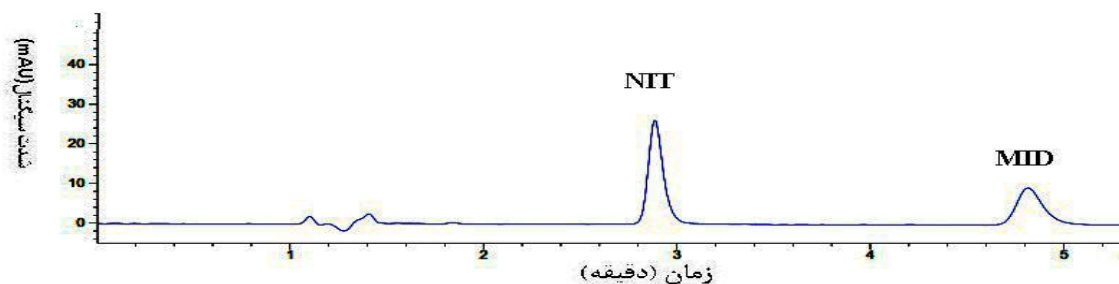
کروماتوگرافی در دمای اتاق با سرعت جریان ۱/۵ میلی لیتر بر دقیقه انجام پذیرفت. کروماتوگرام حاصل از محلول $5/0 \text{ mg L}^{-1}$ آبی نیترازپام و میدازولام و همچنین مخلوط آن‌ها در شکل‌های (۲-۳) تا (۲-۵) نشان داده شده است.



شکل (۲-۳): کروماتوگرام محلول آبی $5/0 \text{ mg L}^{-1}$ نیترازپام، ترکیب بافر فسفاتی با pH برابر با ۵/۵ و استونیتریل، با نسبت ۱:۱ به‌عنوان فاز متحرک، سرعت جریان ۱/۵ میلی لیتر بر دقیقه، حجم لوپ $5/0 \mu\text{L}$ در طول موج 220 nm



شکل (۲-۴): کروماتوگرام محلول آبی $5/0 \text{ mg L}^{-1}$ میدازولام، ترکیب بافر فسفاتی با pH برابر با ۵/۵ و استونیتریل، با نسبت ۱:۱ به‌عنوان فاز متحرک، سرعت جریان ۱/۵ میلی لیتر بر دقیقه، حجم لوپ $5/0 \mu\text{L}$ در طول موج 220 nm



شکل (۲-۵): کروماتوگرام محلول آبی $5/0 \text{ mg L}^{-1}$ نیترازپام و میدازولام، ترکیب بافر فسفاتی با pH برابر با ۵/۵ و استونیتریل، با نسبت ۱:۱ به عنوان فاز متحرک، سرعت جریان $1/5$ میلی‌لیتر بر دقیقه، حجم لوپ $5/0 \mu\text{L}$ در طول موج 220 nm

۳-۴-۲ روش کار در بهینه سازی پارامترهای موثر در اندازه‌گیری نیترازپام و میدازولام

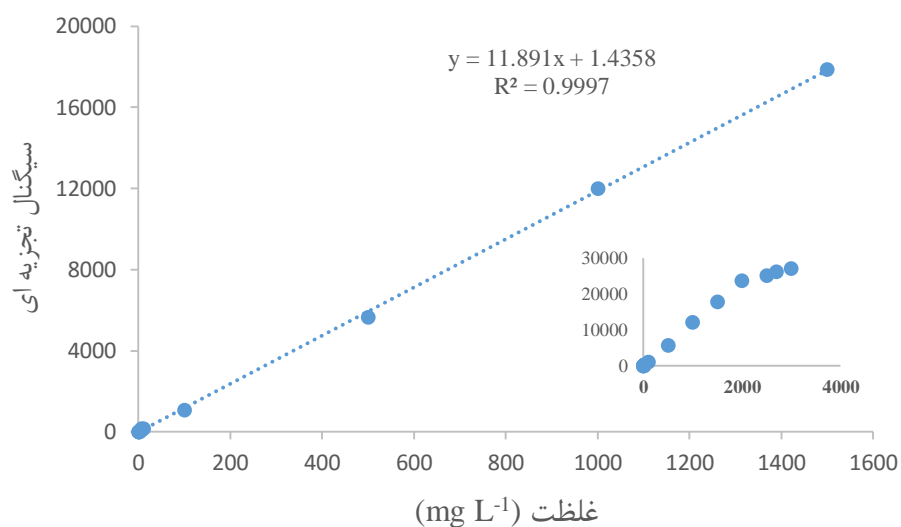
در یک لوله آزمایش $0/5 \text{ mL}$ از محلول $10/0 \text{ mg L}^{-1}$ نیترازپام و $0/5 \text{ mL}$ محلول mg L^{-1} $10/0$ میدازولام، $1/0 \text{ mL}$ محلول بافر، درصد وزنی حجمی مشخصی از محلول NaCl و حجم معینی از ۱-آندکانول به‌عنوان حلال استخراج و همچنین حجم مشخصی از محلول SDS و محلول Tween 80 با غلظت مشخص به‌عنوان پخش کننده به محلول نمونه اضافه شد و به حجم نهایی $10/0 \text{ mL}$ رسید. پس از آن، لوله آزمایش به مدت ۲۰ دقیقه در حمام فراصوت با فرکانس فراصوت 60 کیلو هرتز قرار داده شد تا یک محلول ابری متشکل از قطرات بسیار ریز ۱-آندکانول پراکنده در محلول آبی تشکیل شود که در این مرحله آنالیت‌ها در قطرات ریز حلال آلی استخراج شدند. سپس به‌منظور جلوگیری از پراکنده شدن حلال آلی در سطح، محلول نمونه با سرعت 3500 دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و قطرات حلال آلی (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 در حمام یخ قرار داده شد تا حلال آلی شناور به صورت قطره جامد درآید. سپس توسط یک قاشق پزشکی، قطره آلی منجمد شده به یک ویال مخروطی کوچک منتقل گردید که این حلال منجمد در دمای اتاق ذوب شده و سپس $5/0 \mu\text{L}$ از آن به دستگاه HPLC به‌وسیله سرنگ هامیلتون تزریق شد.

۲-۴-۵ منحنی کالیبراسیون مستقیم در اندازه‌گیری نیترازپام و میدازولام

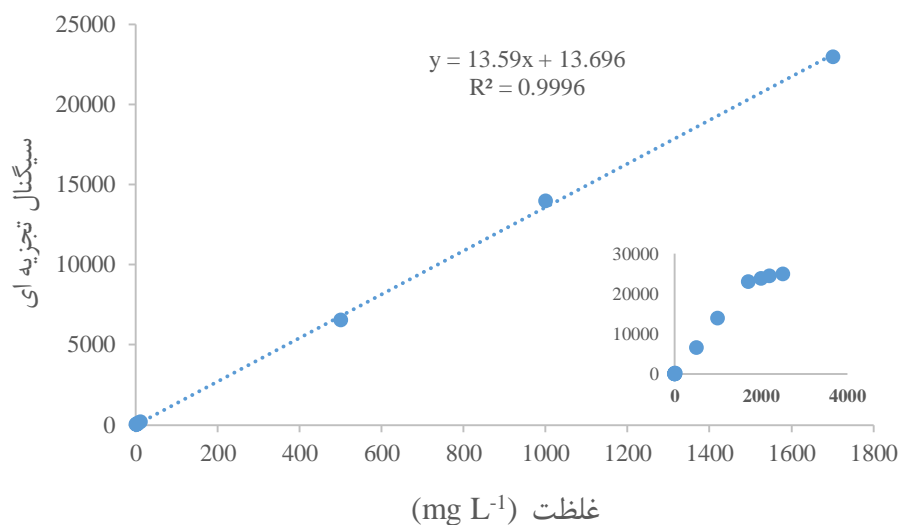
محلول‌هایی با غلظت‌های متفاوت از نیترازپام و میدازولام در محدوده غلظتی 0.2 mg L^{-1} تا 3000.0 mg L^{-1} با رقیق‌سازی از محلول مادر 4000.0 mg L^{-1} هر یک از داروها با متانول تهیه شدند. سپس برای مثال جهت تهیه محلول 1.0 mg L^{-1} هر یک از داروها، 0.1 mL از محلول 10.0 mg L^{-1} هر یک از داروها که در متانول تهیه شده است و 0.9 mL از حلال استخراج ۱-آندکانول به یک ویال 1.0 mL منتقل شدند. پس از یکنواخت نمودن، $50 \mu\text{L}$ از این محلول، توسط سرنگ هامیلتون به دستگاه HPLC تزریق گردید و سیگنال حاصل که سطح زیر پیک نمونه بود، ثبت گردید. منحنی‌های کالیبراسیون مربوطه نیز از رسم تغییرات سیگنال آنالیت بر حسب غلظت نیترازپام و میدازولام به دست آمد که نتایج حاصله در جدول (۲-۲) و شکل‌های (۲-۶) و (۲-۷) به ترتیب برای نیترازپام و میدازولام نشان داده شده است. منحنی‌های کالیبراسیون به دست آمده در محدوده غلظتی $0.2-1500 \text{ mg L}^{-1}$ برای نیترازپام و از $0.3-1700 \text{ mg L}^{-1}$ برای میدازولام خطی می‌باشد.

جدول (۲-۲): سیگنال مستقیم به دست آمده برای داروهای نیترازپام و میدازولام با غلظت‌های متفاوت

غلظت نیترازپام (mg L^{-1})	سیگنال تجزیه‌ای (سطح زیر منحنی) (mV.S)	غلظت میدازولام (mg L^{-1})	سیگنال تجزیه‌ای (سطح زیر منحنی) (mV.S)
۰/۲	۴	۰/۳	۱۳
۰/۵	۱۰	۰/۸	۱۷
۱/۰	۱۵	۱/۰	۲۰
۱/۵	۲۲	۱/۵	۲۸
۲/۰	۳۱	۲/۰	۴۱
۳/۰	۵۳	۳/۰	۵۲
۴/۰	۶۰	۴/۰	۷۱
۵/۰	۱۰۹	۵/۰	۹۰
۶/۰	۱۳۶	۱۰/۰	۱۹۷
۷/۰	۱۵۴	۵۰۰/۰	۶۵۴۷
۱۰/۰	۱۷۰	۱۰۰۰/۰	۱۳۹۸۷
۳۰/۰	۵۳۰	۱۷۰۰/۰	۲۲۹۷۴
۵۰۰/۰	۵۶۵۹	۲۰۰۰/۰	۲۳۸۷۴
۱۰۰۰/۰	۱۲۰۰۰	۲۲۰۰/۰	۲۴۵۱۷
۱۵۰۰/۰	۱۷۸۷۰	۲۵۰۰/۰	۲۵۰۱۶
۲۰۰۰/۰	۲۳۷۴۵	-	-
۲۵۰۰/۰	۲۵۱۲۶	-	-
۲۷۰۰/۰	۲۶۱۰۸	-	-
۳۰۰۰/۰	۲۷۰۲۵	-	-



شکل (۲-۶): منحنی کالیبراسیون مستقیم نیترازپام. غلظت‌های مختلفی از آنالیت در حجم ۱ mL در حلال ۱- آندکانول، بافر فسفات‌ی با pH برابر ۵/۵ و استونیتریل با نسبت ۱:۱ به عنوان فاز متحرک، سرعت جریان ۱/۵ میلی لیتر بر دقیقه و طول موج ۲۲۰ nm



شکل (۲-۷): منحنی کالیبراسیون مستقیم میدازولام. غلظت‌های مختلفی از آنالیت در حجم ۱ mL در حلال ۱- آندکانول، ترکیبات بافر فسفات‌ی با pH برابر ۵/۵ و استونیتریل با نسبت ۱:۱ به عنوان فاز متحرک، سرعت جریان ۱/۵ میلی لیتر بر دقیقه و طول موج ۲۲۰ nm

۲-۴-۶ بررسی و بهینه سازی فاکتورهای مؤثر در پیش تغلیظ و اندازه‌گیری نیترازپام و

میدازولام

به منظور فراهم نمودن بهترین شرایط جهت پیش تغلیظ و همچنین دستیابی به بهترین حساسیت، فاکتورهای مؤثر بر میکرواستخراج نیترازپام و میدازولام، مورد بررسی قرار گرفتند. به دلیل ناتوانی روش های بهینه‌سازی یک متغیر در یک زمان برای نشان دادن برهم‌کنش بین فاکتورها، می‌بایست از روش-های طراحی آزمایش که توانایی بیان این اثرات متقابل را دارند، استفاده نمود. بنابراین برای پیدا نمودن فاکتورهای مؤثر بر روش میکرواستخراج، ابتدا از روش بهینه‌سازی یک متغیر در یک زمان جهت تعیین سطوح متغیرهای مؤثر بر روش استفاده شد. سپس از روش طراحی پلاکت برمن جهت مشخص نمودن فاکتورهای مهم و مؤثر بر راندمان استخراج استفاده شد. فاکتورهای بررسی شده عبارتند از:

- (۱) pH نمونه
- (۲) نوع بافر
- (۳) حجم بافر
- (۴) حجم محلول نمونه
- (۵) نوع حلال استخراج‌کننده
- (۶) حجم حلال استخراج‌کننده
- (۷) نوع سورفکتانت
- (۸) غلظت سورفکتانت
- (۹) حجم سورفکتانت
- (۱۰) زمان استخراج
- (۱۱) اثر نمک (قدرت یونی)
- (۱۲) زمان سانتریفیوژ

فاکتورهای موثر بر پاسخ، ابتدا توسط روش بهینه‌سازی یک متغیر در یک زمان مورد بررسی قرار گرفتند (جدول (۲-۳)) و سپس با توجه به مقادیر بهینه، سطوح مورد نظر هر فاکتور برای روش طراحی آزمایش تعیین گردید. نتایج حاصل از بررسی روش بهینه‌سازی یک متغیر در یک زمان در پیوست ۱ آورده شده است. قابل ذکر است که در روش‌های میکرواستخراج فاز مایع، درصد بازیابی استخراج^۱ به صورت درصد نسبت مقدار استخراج شده در فاز آلی (n_{org}) به مقدار آنالیت کل (n_0) برحسب میکروگرم به دست می‌آید.

$$ER = \frac{n_{org}}{n_0} \times 100 \quad (۱-۲)$$

$$= \frac{C_{org} \times V_{org}}{C_0 \times V_{aq}} \times 100 \quad (۲-۲)$$

$$ER = \left(\frac{V_{org}}{V_{aq}} \right) \times PF \times 100 \quad (۳-۲)$$

در این معادله V_{org} و V_{aq} به ترتیب حجم فاز آلی و محلول نمونه بر حسب میلی‌لیتر و C_0 و C_{org} به ترتیب غلظت آنالیت در فاز آلی و غلظت ابتدایی آنالیت در محلول بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. فاکتور پیش تغلیظ^۲ نیز به صورت نسبت غلظت در فاز آلی به فاز آبی تعریف شده است.

¹ Extraction recovery percent (ER)

² Preconcentration factor (PF)

جدول (۲-۳): نتایج حاصل از بهینه‌سازی یک متغیر در یک زمان در پیش تغلیظ و اندازه‌گیری نیترازپام و میدازولام

فاکتور	محدوده مورد بررسی	مقدار بهینه
pH	۲/۰ - ۱۱/۰	۸/۰۰
نوع حلال استخراج‌کننده	۱-آندکانول، ۱-دودکانول، ۱ و ۱۰-دی کلرودکان	۱-آندکانول
حجم حلال استخراج‌کننده	۲۰/۰ - ۲۰۰/۰ μL	۳۰/۰ μL
حجم محلول نمونه	۵/۰ - ۲۰/۰ mL	۱۰/۰ mL
نوع سورفکتانت	Tween 80, CTAB, SDS	Tween 80 و SDS
غلظت سورفکتانت (SDS, Tween80)	۱۰/۰ - ۵۰/۰ mg mL^{-1}	۲۵/۰ mg mL^{-1}
حجم SDS (μL)	۱۰/۰ - ۲۰۰/۰	۱۰/۰
حجم Tween 80 (μL)	۱/۰ - ۷۰/۰	۱/۰
زمان استخراج	۱/۰ - ۲۰/۰ دقیقه	۱۵ دقیقه
اثر نمک (قدرت یونی)	٪ ۰/۰ - ۲/۰	٪ ۱/۵
نوع بافر	فسفاتی، فتالاتی، بوراکسی	فسفاتی
حجم بافر	۰/۵ - ۳/۰ mL	۱/۰ mL
زمان سانتریفیوژ (دقیقه)	۵/۰ - ۲۰/۰	۱۵

۷-۴-۲ بررسی و بهینه‌سازی فاکتورهای موثر بر پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری نیترازپام و

میدازولام به‌روش طراحی آزمایش

هدف از به‌کارگیری تکنیک‌های مختلف طراحی آزمایش، شناسایی فاکتورهای موثر در فرآیند، برهم‌کنش آن‌ها و تعیین مقادیر بهینه آن‌ها است. با کمک تکنیک‌های طراحی آزمایش 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 به حداقل رساند. همانطور که گفته شد، پارامترهایی نظیر pH، نوع حلال استخراج کننده، حجم حلال استخراج کننده، حجم محلول نمونه، نوع و غلظت و حجم سورفکتانت، اثر نمک، نوع بافر، حجم بافر و زمان سانتریفیوژ در میزان پاسخ آشکارساز و حساسیت روش موثر هستند. از طرف دیگر احتمال برهم کنش 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 است، بنابراین لازم است اثر فاکتورهای موثر بر حساسیت با استفاده از روش‌های طراحی آزمایش مورد بررسی قرار گیرد. بدین منظور از یک روش غربالگری با عنوان طراحی پلاکت-برمن برای تعیین فاکتورهای موثر و همچنین از روش بهینه‌سازی طرح باکس-بنکن برای به دست آوردن شرایط بهینه استفاده شد.

۲-۴-۷-۱ تعیین سطوح فاکتورها برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری همزمان نیترازپام و

میدازولام

برای بررسی و تشخیص فاکتورهای مهم و تاثیرگذار بر پاسخ، طراحی پلاکت-برمن انتخاب گردید لازم به ذکر است معمولاً پارامترهای مورد بررسی در روش‌های طراحی آزمایش، یک‌سری پارامتر-های اصلی می‌باشد. بنابراین اثر برخی پارامترهای دیگر از قبیل نوع سورفکتانت، نوع حلال استخراج، نوع و حجم بافر و حجم محلول نمونه، با توجه به تعداد زیاد آن‌ها به صورت یک متغیر در زمان بررسی گردید و همان نتایج مورد استفاده قرار گرفت. بنابراین سطوح سایر فاکتورهای باقی مانده (فاکتورهای غیر اصلی) بر مبنای اطلاعات به دست آمده از روش بهینه‌سازی یک متغیر در یک زمان مشخص شد. سطوح انتخاب شده برای فاکتورهای اصلی در جدول (۲-۴) آورده شده است. در این طراحی، نتایج بر حسب MER^1 ثبت شده است که بصورت حاصل ضرب درصد‌های بازیابی دو آنالیت تعریف می‌شود [۱۸۵]. شایان ذکر است که از روش‌های مختلفی همچون مجموع دو سیگنال، میانگین دو سیگنال به

¹ Multiple extraction recovery (MER)

دست آمده و همچنین حاصلضرب درصد بازیابی دو سیگنال برای آنالیز این طراحی می توان استفاده نمود که در نهایت با استفاده از تابع مطلوبیت می توان در مورد کارایی روش قضاوت نمود.

جدول (۲-۴) : نام و سطوح فاکتورهای موثر بر پیش تغلیظ و اندازه گیری نیترازپام و میدازولام در طراحی پلاکت برمن

فاکتور	نشانه	سطح بالا(+)	سطح پایین(-)
pH	A	۱۱/۰	۶/۰
حجم حلال استخراج کننده(μL)	B	۷۵/۰	۱۵/۰
حجم SDS (μL)	C	۲۰۰/۰	۱۰/۰
حجم Tween 80 (μL)	D	۷۰/۰	۱/۰
زمان استخراج(دقیقه)	E	۲۰	۱
اثر نمک(درصد وزنی-حجمی)	F	۱/۵	۰/۰۵

۲-۴-۷-۲ طراحی پلاکت برمن در تعیین فاکتورهای مهم برای پیش تغلیظ و اندازه گیری

همزمان نیترازپام و میدازولام

برای طراحی آزمایشها جهت غربال کردن فاکتورها و تعیین فاکتورهای موثر بر اندازه گیری نیترازپام و میدازولام از نرم افزار استت گرافیک^۱ ۰۵ (برای انجام طراحی پلاکت-برمن) و پردازش دادهها استفاده شد. تعداد آزمایشها هنگامی که ۶ فاکتور مورد بررسی و همچنین یک تکرار، ۱۲ آزمایش می باشد. طراحی آزمایش برای فاکتورهای اصلی که شامل pH، حجم حلال استخراج کننده، اثر حجم سورفکتانت (SDS و Tween 80)، اثر نمک و زمان استخراج هستند، در دو سطح انجام شدند. نتایج حاصل در جدول (۲-۵) آورده شده است.

¹ Statgraphics 05

جدول (۲-۵): طرح پلاکت برمن و نتایج به دست آمده با ۶ فاکتور برای پاسخ در پیش تغلیظ و اندازه‌گیری نیترازپام و

میدازولام

ردیف	A	B	C	D	E	F	درصد بازیابی نیترازپام	درصد بازیابی میدازولام	MER
۱	+	-	+	+	-	+	۶۷	۶۹	۰/۴۶۱
۲	+	+	-	+	+	-	۳۲	۳۳	۰/۱۰۶
۳	-	+	+	+	-	+	۲۷	۲۸	۰/۰۷۴
۴	-	+	+	-	+	-	۱۷	۱۸	۰/۰۳۰
۵	+	+	-	+	-	-	۲۵	۲۴	۰/۰۶۰
۶	+	-	-	-	+	+	۸۳	۸۳	۰/۶۹۱
۷	-	+	-	-	-	+	۲۳	۲۴	۰/۰۵۵
۸	+	-	+	-	-	-	۶۴	۶۵	۰/۴۱۳
۹	-	-	-	-	-	-	۴۱	۴۴	۰/۱۸۴
۱۰	-	-	+	+	+	-	۴۰	۳۷	۰/۱۴۹
۱۱	-	-	-	+	+	+	۳۷	۳۹	۰/۱۴۴
۱۲	+	+	+	-	-	+	۴۱	۳۸	۰/۱۵۷

پس از انجام آزمایش‌های طراحی شده، داده‌های حاصل، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نتایج مربوط

به ضرایب به دست آمده در جدول (۲-۶) آورده شده است.

جدول (۲-۶): جدول ضرایب حاصل از طراحی پلاکت- برمن برای پیش تغلیظ و اندازه‌گیری همزمان نیترازپام و

میدازولام

فاکتور	ضریب	خطای استاندارد ضریب ^۱
ثابت	۰/۲۲۵۸	۰/۰۱۶۴
A	۰/۱۸۴۹	۰/۰۳۲۸
B	-۰/۲۸۴۵	۰/۰۳۲۸
C	-۰/۰۲۳۴	۰/۰۳۲۸
D	-۰/۰۷۲۹	۰/۰۳۲۸
E	۰/۰۳۴۴	۰/۰۳۲۸
F	۰/۱۲۹۰	۰/۰۳۲۸

¹ Standard error coefficient

اثر هر فاکتور از رابطه (۴-۲) محاسبه می‌شود:

$$E_x = \frac{\sum Y(+1) - \sum Y(-1)}{\frac{N}{2}} \quad (۴-۲)$$

در این رابطه E_x اثر فاکتور x و Y پاسخ اندازه‌گیری شده است. $\sum Y(+1)$ و $\sum Y(-1)$ به ترتیب مجموع پاسخ‌های فاکتور x در سطح $+1$ یا سطح -1 هستند و N تعداد آزمایش‌های طراحی شده است [۸۳]. مقدار مثبت هر اثر نشان می‌دهد که با افزایش سطح یک متغیر از پایین به بالا مقدار پاسخ افزایش می‌یابد و مقدار منفی یک اثر نشان دهنده آن است که با افزایش سطح یک متغیر از پایین به بالا مقدار پاسخ کاهش می‌یابد [۷۷].

مقدار ضریب هر متغیر از تقسیم اثر آن بر دو به دست می‌آید:

$$\text{Coefficient} = \text{Effect}/2 \quad (۵-۲)$$

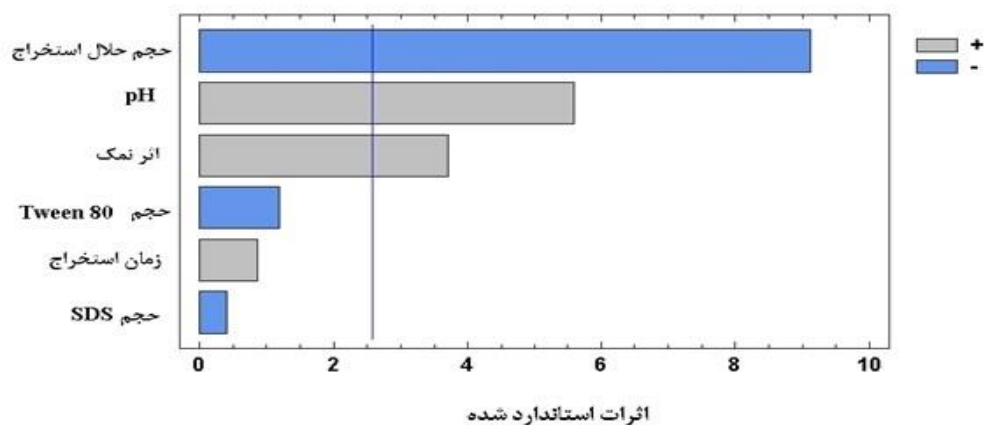
بزرگی ضرایب، وابستگی اثرات متغیرها را با تابع پاسخ نشان می‌دهد. همچنین برای هر ضریب رگرسیون برآورد شده، انحراف استاندارد اندازه‌گیری می‌شود که با استفاده از آن می‌توان دقت مدل را در تخمین ضریب سنجید. خطای استاندارد کوچک‌تر نشانه دقت تخمین بالاتر است. خطای استاندارد ضریب همیشه مقداری مثبت است. همچنین عبارت ثابت در جدول ضرایب رگرسیون به این معناست که اگر همه ضرایب پاسخ صفر باشند، این مقدار ثابت باید نشان دهنده پاسخ مورد بررسی باشد. به عبارت دیگر برآورد میانگین جمعیت در مقادیر مرجع و یا صفر می‌باشد.

از نمودار پارتو، برای تعیین اهمیت اثرات فاکتورها استفاده می‌شود که در آن از آزمون t استفاده شده است. در این نمودار یک خط مبنا وجود دارد که همان t بحرانی جدول می‌باشد. مقدار عددی این خط مبنا براساس درجه آزادی در سطح اطمینان ۹۵٪ از جدول t محاسبه می‌شود. با توجه به اینکه درجه آزادی در این مطالعه ۱۱ می‌باشد، t بحرانی در سطح اطمینان ۹۵٪ برابر با ۱/۷۹۶ می‌باشد. فاکتورهایی که مقدار t آنها سمت راست خط مبنا قرار گرفته‌اند دارای اثر معنادار در سطح اطمینان ۹۵٪ می‌باشند.

نمودار پارتو برای شش فاکتور مورد بررسی در طرح پلاکت-برمن در شکل (۲-۷) نشان داده شده است. همانطور که در شکل (۲-۸) 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.

تعداد درجات آزادی نیز از رابطه (۲-۶) به دست می‌آید:

$$(۲-۶) \quad \text{تعداد کل برهمکنش‌ها} - (۱ - \text{تعداد کل آزمایش‌ها در طرح}) = \text{درجه آزادی}$$



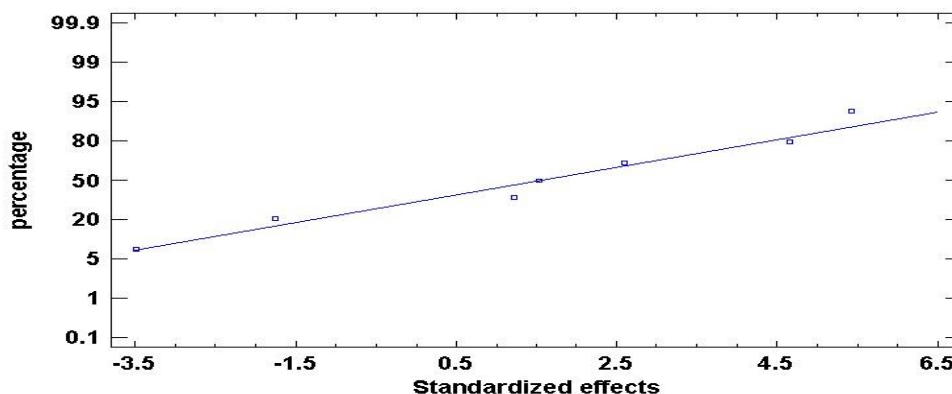
شکل (۲-۸): نمودار پارتو برای طراحی پلاکت برمن در پیش تغلیظ و اندازه‌گیری نیترازپام و میدازولام
($t_{critical}=1.796$)

همانطور که در قسمت ۱-۱۰-۵ توضیح داده شده است طراحی پلاکت برمن، طراحی است که در آن از کلیه برهم‌کنش‌ها صرف‌نظر می‌شود بنابراین در رابطه (۲-۶)، تعداد کل برهم‌کنش‌ها صفر در نظر گرفته می‌شود.

از آنجایی که در محاسبه‌ی آماره‌های F و t برای آزمون‌های رگرسیون و همچنین در محاسبه فواصل اطمینان، از فرض نرمال بودن خطاها استفاده می‌کنیم، انحراف‌های بزرگ از توزیع نرمال می‌تواند روی صحت و اعتبار نتایج به دست 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 و اگر باقی مانده‌ها دارای توزیع نرمال باشند، عموماً نقاط باید روی یک خط راست قرار گیرند و در صورتی که نقاط از خط راست منحرف شده باشند ممکن است فرض نرمال بودن معتبر نباشد. نمودار احتمال و آزمون‌های برازش مانند آماره اندرسن-دارلینگ^۱ را می‌توان برای تعیین نرمال بودن باقی مانده‌ها به کار برد، در صورتی که مقدار احتمال از سطح α ی مورد نظر کمتر باشد داده‌ها از توزیع نرمال پیروی نمی‌کنند [۸۶].

نمودار احتمال نرمال که در شکل (۲-۹) نشان داده شده است، روش مفیدی برای فرض نرمال بودن مشاهدات محسوب می‌شود. در این نمودار هر نقطه نشان دهنده اثر هر متغیر می‌باشد. هر چه این نقاط از خط مبنا فاصله بیشتری داشته باشند دارای اثر بزرگتری هستند و میزان اهمیت آن‌ها نیز بیشتر است. اگر توزیع باقیمانده‌ها نرمال باشد، آنگاه نقاط باید روی یک خط راست قرار گیرند. انحرافات اساسی از خط مستقیم اشاره بر این دارد که توزیع نرمال نیست. [۸۶].



شکل (۲-۹): نمودار احتمال نرمال در طراحی پلاکت برمن بر پیش تغلیظ و اندازه‌گیری نیترازپام و میدازولام

¹ Anderson-Darling

۲-۴-۷-۳ تعیین شرایط بهینه فاکتورهای موثر به روش طراحی باکس بنکن برای پیش تغلیظ

و اندازه‌گیری همزمان نیترازپام و میدازولام

با توجه به نتایج به دست آمده از طراحی پلاکت برمن در قسمت قبل، سه فاکتور pH، حجم حلال استخراج و اثر نمک به‌عنوان مهم‌ترین فاکتورهای موثر بر میزان پاسخ اندازه‌گیری شده برای نیترازپام و میدازولام تعیین شدند. در این قسمت برای تعیین مقادیر بهینه هر کدام از این فاکتورها از روش بهینه‌سازی باکس-بنکن استفاده شد. در این طراحی، مطالعه هر یک از فاکتورها در بیش از دو سطح لازم می‌باشد و فاکتورهای موثر به دست آمده از طراحی پلاکت-برمن در سه سطح بالا، میانی و پایین مورد بررسی قرار می‌گیرند.

لازم به ذکر است که در تمام آزمایش‌هایی که بر اساس طراحی باکس-بنکن انجام می‌شود، سایر فاکتورهای غیرموثر با توجه به علامت اثرشان (۱+ نشان دهنده سطح بالا و ۱- نشان دهنده سطح پایین) در طراحی پلاکت برمن، ثابت باقی می‌مانند. بنابراین در آزمایش‌های انجام شده مدت زمان استخراج ۲۰ دقیقه، حجم SDS، $10/0 \mu\text{L}$ و حجم Tween 80 نیز $1/0 \mu\text{L}$ در نظر گرفته شد. سایر پارامترها مطابق نتایج به دست آمده از روش یک متغیر در یک زمان که در جدول ۲-۳ بیان شده است، بوده است. سطوح بالا و پایین فاکتورهای مورد بررسی در طراحی باکس بنکن، همانند سطوح تعریف شده برای طراحی پلاکت برمن انتخاب گردید، با این تفاوت که در طراحی باکس-بنکن فاکتورها در سه سطح بررسی می‌شوند.

تعداد آزمایش‌ها در طراحی باکس-بنکن، هنگامی که ۳ فاکتور در یک بلوک و با ۳ نقطه مرکزی مورد بررسی قرار گیرد، مطابق معادله (۱-۱۲) برابر با ۱۵ آزمایش می‌باشد. در جدول (۲-۷) طراحی مورد

نظر و سیگنال‌های ثبت شده به صورت MER و همچنین مقدار پیش‌بینی شده^۱ و باقیمانده^۲ در آزمایش‌های انجام شده مطابق با طراحی باکس-بنکن آمده است.

جدول (۷-۲): طرح باکس-بنکن با ۳ فاکتور و سه نقطه مرکزی برای اندازه‌گیری نیترازپام و میدازولام

ردیف	pH	حجم حلال استخراج	درصد نمک	درصد بازیابی نیترازپام	درصد بازیابی میدازولام	MER	Predicted MER	Residual
۱	-	-	۰	۶۴	۶۸	۰/۴۳۰	۰/۳۸۹	۰/۰۴۱
۲	۰	۰	۰	۹۱	۹۶	۰/۸۷۹	۰/۸۶۵	۰/۰۱۳
۳	+	+	۰	۷۷	۸۱	۰/۶۲۵	۰/۶۵۸	-۰/۰۳۳
۴	۰	-	+	۹۳	۹۷	۰/۹۰۶	۰/۷۱۶	۰/۱۸۹
۵	+	۰	+	۶۲	۶۸	۰/۴۲۱	۰/۶۴۳	-۰/۲۲۳
۶	۰	۰	۰	۸۷	۹۱	۰/۷۹۲	۰/۸۶۶	-۰/۰۷۳
۷	+	-	۰	۶۲	۶۸	۰/۴۲۵	۰/۵۴۸	-۰/۱۲۲
۸	-	+	۰	۸	۱۵	۰/۰۱۰	۰/۱۹۹	-۰/۱۸۹
۹	۰	+	-	۴۳	۴۷	۰/۲۰۳	۰/۱۹۶	۰/۰۰۷
۱۰	۰	+	+	۶۴	۶۸	۰/۴۳۸	۰/۵۲۶	-۰/۰۸۸
۱۱	-	۰	-	۴۰	۴۵	۰/۱۸۱	۰/۱۵۴	۰/۰۲۶
۱۲	-	۰	+	۷۶	۷۹	۰/۶۰۷	۰/۴۸۵	۰/۱۲۲
۱۳	۰	-	-	۴۹	۵۶	۰/۲۷۸	۰/۳۸۵	-۰/۱۰۸
۱۴	+	۰	-	۶۱	۶۳	۰/۳۸۸	۰/۳۱۳	۰/۰۷۵
۱۵	۰	۰	۰	۹۵	۹۶	۰/۹۲۶	۰/۸۶۶	۰/۰۶۰

°: سطح بالا

-: سطح پایین

۰: سطح میانی

جدول (۸-۲) ضرایب رگرسیون و سایر پارامترهای آماری مربوط به فاکتورهای داده شده در مدل که شامل خود فاکتورها و برهم کنش‌های آنها می‌باشد را نشان می‌دهد. مقدار t با تقسیم ضریب بر خطای استاندارد محاسبه می‌شود که معنی دار بودن اختلاف ضریب از صفر را نشان می‌دهد. یک فرض آماری، یک جمله یا نظریه ای را در مورد پارامترهای یک توزیع احتمال یا پارامترهای یک مدل بیان می‌کند.

^۱ Predicted MER

^۲ Residual

آزمون‌های فرض شامل دو نوع فرضیه می‌باشند: فرضیه صفر که با H_0 نشان داده می‌شود، بیان می‌کند اختلاف بین کمیت‌های مورد مقایسه وجود ندارد که معمولاً در آزمون‌های درستی فرضیه صفر بررسی می‌شود. فرضیه متقابل که با H_1 نشان داده می‌شود، فرضیه ای است که بیان می‌کند دو کمیت یکسان نیستند. به منظور آزمون یک فرض نیاز است آماره مناسبی محاسبه و در نهایت فرض H_0 پذیرش و یا رد شود. در بخشی از این روش، مجموعه ای از مقادیر آماره آزمون که منجر به رد H_0 می‌شود را تعیین می‌کنیم. این مجموعه از مقادیر را ناحیه بحرانی یا ناحیه رد آزمون می‌نامند. معمولاً آماره آزمون، زمانی که فرض H_0 رد می‌شود معنادار تلقی می‌شود. کلیه نرم افزارهای آماری ارزیابی آزمون فرض را بر مبنای معیاری تحت عنوان P-value قرار داده‌اند. مقدار P را می‌توان به عنوان کوچک‌ترین سطح معنادار که منجر به رد فرض H_0 می‌شود، تعریف نمود. اگر مقدار P از احتمال خطای نوع اول (α) بزرگتر یا مساوی باشد فرض H_0 را می‌پذیریم. در غیر این صورت فرض H_0 را رد می‌کنیم. در صورت معلوم بودن مقدار P تصمیم گیرنده قادر خواهد بود تا میزان معنادار بودن داده را تعیین کند. همانطور که قبلاً 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. بنابراین برهمکنش دوتایی pH، حجم حلال استخراج و مقدار درصد نمک دارای مقدار P کمتر از ۰/۰۵ بوده و به طور آماری معنی دار می‌باشند و سایر برهم‌کنش‌ها به دلیل دارا بودن P بالاتر از ۰/۰۵ معنی دار نیستند. همانگونه که از نتایج مشاهده شده است، بالاترین درصد بازیابی در سطح میانی pH و با حجم پایین از حلال استخراج و درصد بالای نمک به دست آمده است. با توجه به ساختار این ترکیبات در محیط‌های قلیایی به دلیل تشکیل پیوند هیدروژنی، عدم توازن در توزیع بار ایجاد می‌شود و بنابراین این ترکیبات امکان ورود به فاز آلی را ندارند و میزان استخراج کاهش می‌یابد [۶ و ۸]. از طرف دیگر در pH‌های پایین هم احتمال پروتونه شدن ترکیب وجود دارد، در نتیجه یون تشکیل می‌شود که منجر به کاهش استخراج می‌شود. بنابراین با در نظر گرفتن برهم‌کنش‌ها در طرح باکس بنکن $pH=7/88$ به عنوان pH بهینه انتخاب شد. همچنین با در نظر گرفتن برهم‌کنش میان فاکتورها در طرح باکس بنکن، با افزایش حجم حلال استخراج تا حدود $30/0 \mu L$ ، با توجه به ثابت بودن

حجم فاز آبی، امکان تماس دو فاز بیشتر شده و لذا راندمان استخراج افزایش می‌یابد و بنابراین سیگنال تجزیه‌ای و درصد بازیابی نیز به تدریج افزایش می‌یابند. اما در حجم‌های بالاتر از ۳۰/۰ μL ، حلال استخراج به دلیل افزایش حجم و در نتیجه کاهش غلظت، سیگنال کاهش می‌یابد. اثر افزودن نمک را می‌توان به‌عنوان نتیجه دو اثر رقابتی بزرگ در نظر گرفت که یکی تاثیر salting-out و دیگری اثر مقاومت ویسکوزیته [۸۷] می‌باشد، 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 بازده استخراج شود. با این حال، در غلظت 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. بنابراین استفاده از مقدار بهینه اثر نمک (۱/۳۶٪) سبب افزایش راندمان استخراج می‌گردد.

جدول (۲-۸): پارامترهای آماری برای طرح باکس بنکن انجام شده برای پاسخ پیش تغلیظ و اندازه‌گیری نیترازپام و

میدازولام

عبارت	ضریب	خطای استاندارد ضریب	t	P
ثابت	۰/۸۷۹۷	۰/۰۷۵۷	۱۱/۴۳	۰/۰۰۰۰۲۵
A	۰/۰۷۸۹	۰/۰۴۶۴	۱/۷۰	۰/۱۵۰
B	-۰/۰۹۵۴	۰/۰۴۶۴	-۲/۰۶	۰/۰۹۶
F	۰/۱۶۵۲	۰/۰۴۶۴	۳/۵۶	۰/۰۱۶
AA	-۰/۲۷۵۱	۰/۰۶۸۳	-۴/۰۳	۰/۰۱۰
BB	-۰/۲۱۸۱	۰/۰۶۸۳	-۳/۱۹	۰/۰۲۴
FF	-۰/۱۹۱۳	۰/۰۶۸۳	-۲/۸۰	۰/۰۳۸
AB	۰/۱۵۵۰	۰/۰۶۵۶	۲/۳۶	۰/۰۶۵
AF	-۰/۰۹۸۳	۰/۰۶۵۶	-۱/۵۰	۰/۱۹۴
BF	-۰/۰۹۸۳	۰/۰۶۵۶	-۱/۵۰	۰/۱۹۴

۲-۴-۷-۴ ارزیابی مدل برای پیش تغلیظ و اندازه‌گیری همزمان نیترازپام و میدازولام

برای اطمینان از اینکه مدل به دست آمده، توانایی پیش‌بینی 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 [۸۸].

✓ پاسخ به دست آمده به خوبی با مدل توضیح داده شود.

✓ داده پرت وجود نداشته باشد.

✓ توزیع باقی‌مانده‌ها نرمال باشد.

✓ تغییرات خطاها مستقل باشد.

✓ واریانس ثابت باشد.

در این پژوهش، برای ارزیابی مدل به دست آمده از روش تحلیل واریانس و بررسی باقی‌مانده‌ها استفاده گردید که در این ارزیابی‌ها از طریق شاخص‌های کمی صحت نتایج ارائه شده توسط مدل مورد سنجش قرار می‌گیرند.

همچنین برای ارزیابی مدل ارائه شده، از ضریب تعیین^۱ و ضریب تعیین تعدیل شده^۲ استفاده می‌گردد. 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:

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

¹ Determinaton coefficient

² Adjusted R squard

که در این رابطه $SS_{Residual}$ مجموع مربعات باقی مانده، SS_{model} مجموع مربعات مدل و SS_{total} مجموع مربعات کل می باشد. SS_{model} و $SS_{Residual}$ از رابطه زیر محاسبه می شوند:

$$SS_{residual} = \sum_{i=1}^n (y_i - f(x_i))^2 \quad (۸-۲)$$

$$SS_{model} = \sum_{i=0}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2 \quad (۹-۲)$$

در این روابط، y_i مقدار آم متغیر پیش بینی شده، x_i مقدار آم متغیر اصلی، $f(x_i)$ تابع مقدار پیش بینی شده y_i است. \hat{y}_i نیز به عنوان آامین پاسخ برآورد شده می باشد. همچنین مقدار SS_{total} مجموع SS_{model} و $SS_{residual}$ می باشد.

مقدار ضریب تعیین (R^2) برای پاسخ اندازه گیری همزمان نیترازیام و میدازولام ۹۲/۱۴ درصد می باشد که نشان می دهد ۹۲/۱۴ درصد تغییرات در متغیر وابسته می تواند توسط متغیر مستقل توضیح داده شود. ضریب تعیین تعدیل شده پارامتری است که برای ارزیابی و مقایسه مدل های مختلف با تعداد متفاوت متغیر پیش بینی شده استفاده می شود. اما از آنجایی که R^2 (ضریب تعیین) تعداد پارامترهای موجود در مدل را به حساب نمی آورد، مقدار R^2 تعدیل شده محاسبه می شود 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 می شود [۸۹].

$$Adjusted R^2 = 1 - \left[\frac{\left(\frac{SS_{Residual}}{D.F_{Residual}} \right)}{\left(\frac{SS_{Residual} + SS_{model}}{D.F_{Residual} + D.F_{model}} \right)} \right] \quad (۱۰-۲)$$

که در این رابطه $D.F_{Residual}$ درجه آزادی باقی مانده و $D.F_{model}$ درجه آزادی مدل می باشد. درجه آزادی مدل، برابر با تعداد ضرایب منهای یک می باشد. همچنین درجه آزادی باقیمانده، برابر با اختلاف درجه آزادی کل و درجه آزادی مدل است. برخلاف R^2 ، مقدار R^2 تعدیل شده (که مقدار آن برابر با ۷۸/۴٪ می باشد) ممکن است با اضافه شدن پارامتر کوچکتر شود.

۲-۴-۷-۴-۱ تحلیل واریانس

با در نظر گرفتن عوامل اصلی، مدل ریاضی برای پاسخ مربوط به پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری نیترازپام و میدازولام طبق معادله (۲-۱۱) پیشنهاد شده است. برای بررسی صحت مدل ارائه شده به صورت معادله درجه دوم، تحلیل واریانس انجام شد که نتایج در جدول (۲-۹) نشان داده شده است. همانطور که مشخص است عبارات pH، حجم حلال استخراج، اثر نمک، برهمکنش AA، BB، AB، AF، BF و FF دارای مقدار P کمتر از ۰/۰۵ بوده و از نظر آماری معنی‌دار هستند و نقش مهمی بر روی تعیین مقدار بهینه دارند.

(۲-۱۱)

$$ER = 0.8797 + 0.0789A - 0.0954B + 0.1652F - 0.2751A^2 - 0.2181B^2 - 0.1913F^2 + 0.1550AB - 0.0983AF - 0.0983BF$$

جدول (۲-۹): تحلیل واریانس برای مدل پیشنهادی مربوط به پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری همزمان نیترازپام و میدازولام

منبع	مجموع مربعات	درجه آزادی	مجموع مربعات میانگین	آماره F	مقدار P
A	۰/۰۴۹۷۷	۱	۰/۰۴۹۷۷	۱۵/۶۶	۰/۰۱۶۷
B	۰/۰۷۲۷۷	۱	۰/۰۷۲۷۷	۵۰/۴۵	۰/۰۰۲۱
F	۰/۲۱۸۴۶	۱	۰/۲۱۸۴۶	۱۳۴/۳۵	۰/۰۰۰۳
AA	۰/۲۷۹۴	۱	۰/۲۷۹۴	۲۳/۷۶	۰/۰۰۰۴
AB	۰/۰۹۶۱۰	۱	۰/۰۹۶۱۰	۴۳/۱۴	۰/۰۰۲۸
AF	۰/۰۳۶۱	۱	۰/۰۳۶۱	۳۳/۶۳	۰/۰۰۴۴
BB	۰/۱۷۵۶	۱	۰/۱۷۵۶	۹۸/۸۱	۰/۰۰۰۶
BF	۰/۰۳۸۶	۱	۰/۰۳۸۶	۱۳/۹۶	۰/۰۲۰۲
FF	۰/۱۳۵۲	۱	۰/۱۳۵۲	۵۵/۷۹	۰/۰۰۱۷
Lack of fit	۰/۰۷۶۸	۳	۰/۰۲۵۶	۲/۷۷	۰/۱۶۷۷
Pure error	۰/۰۰۹۲	۲	۰/۰۰۴۶		
Total error	۱/۱۱۴۸	۱۴			

یک مدل زمانی عدم برازش^۱ نشان می‌دهد که نتواند به صورت مناسب رابطه بین فاکتورها و متغیر پاسخ را نشان دهد. برای اینکه بتوان تعیین کرد مدل به صورت صحیح می‌تواند داده‌ها را برازش کند باید به مقدار p توجه کرد. اگر مقدار p کمتر از $0/05$ باشد می‌توان نتیجه گرفت مدل به خوبی داده‌ها را برازش نمی‌کند. با توجه به نتایج حاصل شده، مقدار p به دست آمده مربوط به عدم برازش مدل بیشتر از $0/05$ می‌باشد ($P=0/1677$) که نشان می‌دهد بین مدل و داده‌های تجربی تطابق خوبی وجود دارد. همچنین آزمون F یا آزمون فیشر در واقع آزمون معنی دار بودن آماری در تحلیل رگرسیون ساده و چند متغیره است و برابر با نسبت میانگین مربعات رگرسیون^۲ (MSR) به میانگین مربعات باقیمانده‌ها (MSE) است. بیان ریاضی آن به صورت معادله (۱۲-۲) می‌باشد:

$$F = \frac{MSR}{MSE} = \frac{SSR/D.F_m}{SSE/D.F_{res}} \quad (12-2)$$

$D.F_m$ درجه آزادی مدل، p تعداد متغیرهای مستقل مدل، n تعداد کل ترکیبات مربوط به مدل (تعداد کل آزمایش‌ها) و $D.F_{res}$ نیز درجه آزادی باقیمانده‌ها است. SSR و SSE نیز در روابط (۸-۲) و (۹-۲) توضیح داده شدند. هر چه مقدار نسبت میانگین مربع فاکتور به باقی مانده بیشتر باشد، مقدار F بیشتر است که با توجه به مقادیر به دست آمده در جدول (۹-۲) مقدار F مربوط به اثرات مربع پارامترها برای نیترازیام و میدازولام بیشتر و در نتیجه تاثیر آن فاکتورها بر پاسخ بیشتر است. مقدار میانگین مربعات تعدیل شده^۳ $Adj MS$ نیز از تقسیم مجموع مربعات تعدیل شده^۴ $Adj SS$ بر درجه آزادی به دست می‌آید که در محاسبه آماره F به کار می‌رود.

¹ Lack-of-fit

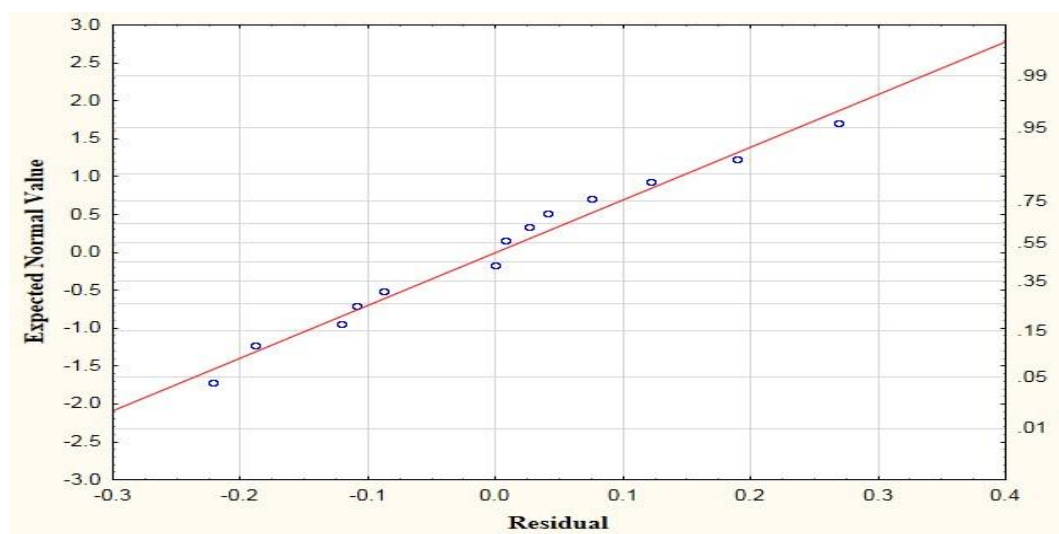
² Mean square regression

³ Adjusted mean squares

⁴ Adjusted sum of squares

۲-۴-۷-۴-۲ نمودار احتمال نرمال باقی مانده‌ها^۱

نمودار مربوط به توزیع باقی مانده‌ها و بررسی نرمال بودن این توزیع در شکل (۲-۱۰) نشان داده شده است که مقدار پاسخ پیش بینی شده توسط طراحی در مقابل مقدار باقیمانده (که تفاوت میان مقدار واقعی و مقدار پیش بینی شده می باشد) رسم شده است. این شکل نشان می دهد توزیع باقی مانده‌ها نرمال است.



شکل (۲-۱۰): نمودار باقی مانده‌ها برای پیش تغلیظ و اندازه گیری نیترازپام و میدازولام در طراحی باکس-بنکن

۲-۴-۷-۴-۳ نمودار باقی مانده‌ها در مقابل مقادیر برازش شده^۲

رسم نمودار باقی مانده‌ها در مقابل مقادیر برازش شده متناظر نمایشگر یک الگوی تصادفی باقی مانده‌ها در طرفین خط صفر است. اگر مدل برازش شده مناسب باشد این نمودار بایستی نسبت به خط باقی مانده صفر متقارن بوده و نقاط حول این خط تقریباً به طور یکنواخت پراکنده شده باشند [۹۰]. این وضعیت ثابت بودن واریانس خطاها را نشان می دهد. اگر نقطه‌ای دورتر از سایر نقاط واقع شود،

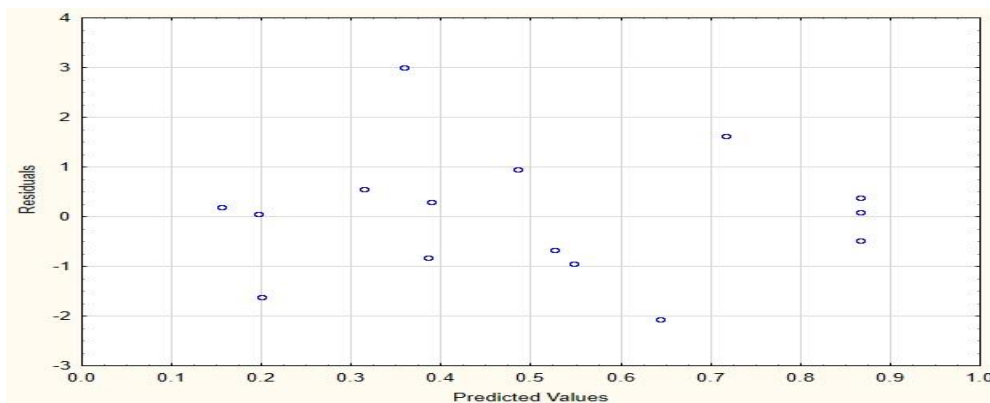
¹ Normal probability of plot

² Residuals versus fits

ممکن است آن نقطه، نقطه پرت باشد و همچنین ممکن است هیچ الگوی قابل تشخیصی در نمودار باقی مانده‌ها پیدا نشود. موارد زیر مشخص کننده خطای غیر تصادفی هستند:

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

بنابراین اگر مدل صحیح و مفروضات برقرار باشد، باقیمانده‌ها نباید ساختار خاصی از خود نشان دهند. با توجه به نمودارهای باقیمانده‌ها در مقابل مقادیر برآزش شده حاصل از طرح (شکل ۲-۱۱)، پراکندگی در دو طرف خط صفر تقریباً یکسان است و خطای غیر تصادفی وجود ندارد.



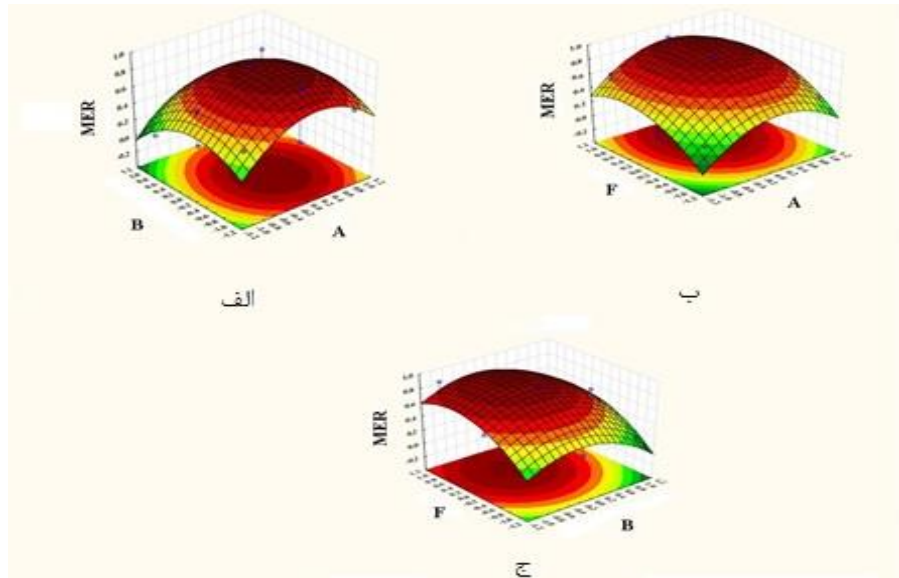
شکل (۲-۱۱): نمودار باقیمانده در مقابل مقدار برآزش برای پیش تغلیظ و اندازه‌گیری نیترازپام و میدازولام در طراحی

باکس-بنکن

۲-۴-۷-۴-۴ منحنی‌های رویه پاسخ

تجسم فضایی معادله پیش‌بینی شده می‌تواند به وسیله منحنی رویه پاسخ به دست آید. این نمایش گرافیکی، یک سطح n بعدی در فضای $(n+1)$ بعدی است. 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

امکان پذیر است. شکل (۲-۱۲، الف، ب و ج) این منحنی‌ها را برای اندازه‌گیری همزمان نیترازپام و میدازولام نشان می‌دهند.



شکل (۲-۱۲ الف): منحنی سطح رویه حجم حلال استخراج (B) در مقابل pH (A) برای اندازه‌گیری همزمان نیترازپام و میدازولام (ب): منحنی سطح رویه اثر نمک (F) در مقابل pH (A) برای اندازه‌گیری همزمان نیترازپام و میدازولام، (ج): منحنی سطح رویه اثر نمک (F) در مقابل حجم حلال استخراج (B) برای اندازه‌گیری همزمان نیترازپام و میدازولام

همانطور که در شکل (۲-۱۲) الف دیده شده است، با افزایش حجم حلال استخراج تا حدود $30/0 \mu\text{L}$ افزایش درصد بازیابی را داریم اما در حجم‌های بالاتر کاهش درصد بازیابی دیده می‌شود. بنابراین با توجه به برهمکنش‌های موجود حجم استخراج $29/1 \mu\text{L}$ به‌عنوان مقدار بهینه انتخاب گردید. در شکل (۲-۱۲) ب، با افزایش مقدار نمک تا $1/36$ درصد، افزایش سیگنال تجزیه ای را داشتیم و بنابراین مقدار $1/36\%$ به‌عنوان مقدار بهینه انتخاب شد. با توجه به مدل ریاضی پیشنهادی و منحنی رویه پاسخ، شرایط بهینه اندازه‌گیری نیترازپام و میدازولام با استفاده از نرم‌افزار statistica 12 محاسبه و نتایج آن در جدول (۲-۱۰) گزارش شده است. لازم به ذکر است که تعدادی از فاکتورها، به‌صورت یک متغیر در زمان بهینه شدند که می‌توان به نوع حلال استخراج کننده، نوع سورفکتانت، نوع بافر، حجم بافر، زمان سانتریفیوژ

و حجم محلول اشاره نمود. همچنین استفاده از ترکیب دو سورفکتانت می تواند سبب افزایش پراکنش حلال استخراج در حلال آبی گردد. مقایسه نتایج حاصل از روش یک متغیر در زمان و طراحی آزمایش نشان می دهد که شرایط بهینه به دست آمده از روش طراحی آزمایش با استفاده از مدل باکس- بنکن، تا حدودی با روش یک متغیر در زمان تفاوت دارد. علت این تفاوت را نیز می توان بر هم کنش بین فاکتورهای موثر برپیش تغلیظ و اندازه گیری نیترازپام و میدازولام نسبت داد. نتایج مربوط به مقایسه شرایط بهینه سازی یک متغیر در زمان و روش طراحی آزمایش و همچنین شرایط بهینه نهایی برای اندازه گیری همزمان نیترازپام و میدازولام در جدول های (۲-۱۰) و (۲-۱۱) آورده شده است.

جدول (۲-۱۰): مقایسه شرایط بهینه سازی یک متغیر در زمان و طراحی آزمایش برای پیش تغلیظ و اندازه گیری

همزمان نیترازپام و میدازولام

مقادیر بهینه با روش طراحی آزمایش	مقادیر بهینه با روش یک متغیر در زمان	فاکتور
۷/۸۸	۸/۰۰	pH
۲۹/۱	۳۰/۰	حجم حلال استخراج کننده (μL)
۱۰/۰	۱۰/۰	حجم SDS (μL)
۱/۰	۱/۰	حجم Tween 80 (μL)
۲۰ دقیقه	۱۵ دقیقه	زمان استخراج
٪۱/۳۶	٪۱/۵	اثر نمک (قدرت یونی)
۱۸۵۳/۰۳	۱۶۴۰/۰	میانگین سطح زیر پیک
۹۲/۶	۸۲/۰	درصد بازیابی

جدول (۲-۱۱): شرایط بهینه نهایی سیستم برای اندازه‌گیری نیترازپام و میدازولام

مقدار بهینه	فاکتور
۷/۸۸	pH
۱-آندکانول	نوع حلال استخراج‌کننده
۲۹/۱	حجم حلال استخراج‌کننده (μL)
۱۰/۰	حجم محلول (mL)
Tween 80 و SDS	نوع سورفکتانت
۲۵/۰	غلظت سورفکتانت ($\mu\text{g L}^{-1}$)
۱۰/۰	حجم SDS (μL)
۱/۰	حجم Tween 80 (μL)
۲۰/۰ دقیقه	زمان استخراج
۱/۳۶٪	اثر نمک (قدرت یونی)
فسفاتی	نوع بافر
۱/۰	حجم بافر (mL)
۱۰/۰ دقیقه	زمان سانتریفیوژ

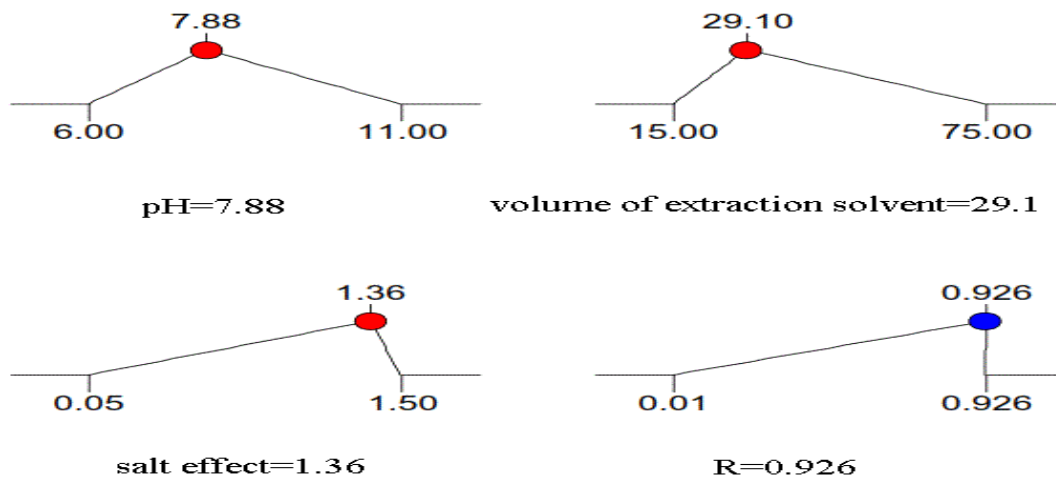
۲-۴-۷-۴-۵ تابع مطلوبیت^۱

پروفایل مقدار پیش بینی شده و مطلوبیت در نرم افزار دیزاین اکسپرت^۲ برای بهینه‌سازی فرایند استفاده شده است. مطلوبیت ویژه که معیاری است از نزدیکی مقادیر برازش شده (در شرایط بهینه پارامترها) به مقدار مطلوب، مشخص می‌کند که چگونه تغییر شرایط موجب بهینه‌سازی یک پاسخ می‌شود. در حالیکه، به کمک مطلوبیت مرکب می‌توان تشخیص داد که چگونه تغییرات اعمال شده منجر به بهینه‌سازی چند پاسخ می‌شود. تابع مطلوبیت شامل تعیین DF برای هر متغیر وابسته به

¹ Desirability function (DF)

² Design expert 07

وسیله تعیین مقدار پیش بینی شده در گستره صفر تا یک رسم گردید (شکل ۲-۱۳). با توجه به نتایج طراحی باکس بنکن و بالاترین مقدار MER که از نتایج به دست آمده است، مطلوبیت یک برای حداکثر پاسخ و مطلوبیت صفر برای حداقل پاسخ و ۰/۵ برای حالت حدواسط بیان شده است. مقادیر بهینه هر فاکتور مهم که از طراحی باکس بنکن به دست آمده است و درجه مطلوبیت آن در شکل ۲-۱۲ نشان داده شده است.



شکل (۲-۱۳): پروفایل مطلوبیت برای فاکتورهای موثر در طراحی باکس بنکن در اندازه‌گیری همزمان نیترازپام و

میدازولام

این تصاویر به‌طور اجمالی نشان می‌دهد که چگونه تغییرات در سطح هر متغیر، پاسخ و همچنین مطلوبیت کلی پاسخ‌ها را تغییر می‌دهد. براساس این محاسبات و درجه مطلوبیت ۰/۹۹۷ و MER ۰/۹۲۵، شرایط بهینه مطلوب به دست آمد.

۲-۴-۸ رسم منحنی کالیبراسیون پیش‌تغلیظ برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری همزمان

نیترازپام و میدازولام

به‌منظور رسم منحنی کالیبراسیون پیش‌تغلیظ، محلول‌های نمونه با غلظت‌های متفاوت از نیترازپام و میدازولام تهیه شد و در شرایط بهینه مورد بررسی قرار گرفت. به‌دین منظور، به یک لوله

آزمایش حجم‌های مختلفی از نمونه نیترازپام و میدازولام استاندارد در گستره غلظتی 0.8 mg L^{-1} - 0.0005 mg L^{-1} ، 1.0 mL محلول بافر، $1/36\%$ وزنی حجمی از محلول NaCl (0.136 g) نمک در حجم 1.0 mL و $29/1 \mu\text{L}$ - 1 آندکانول به عنوان حلال استخراج و همچنین $1.0 \mu\text{L}$ از محلول SDS و $1.0 \mu\text{L}$ از محلول Tween 80 با غلظت 25 mg L^{-1} به عنوان عامل پخش کننده به محلول نمونه اضافه و به حجم نهایی 1.0 mL رسید. پس از آن، لوله آزمایش در حمام فراصوت با فرکانس فراصوت KHz 60 در 25 درجه سانتی گراد قرار داده شد تا یک محلول ابری از قطرات بسیار ریز 1 - آندکانول پراکنده در محلول آبی تشکیل شود. در این مرحله آنالیت‌ها در قطرات ریز حلال آلی استخراج شدند. سپس محلول نمونه با سرعت 3500 دور در دقیقه به مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ و قطرات حلال آلی (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 در حمام یخ قرار داده شد تا حلال آلی شناور به صورت قطره جامد درآید. سپس قطره آلی منجمد شده به یک ویال مخروطی توسط یک قاشق پزشکی کوچک منتقل گردید که در دمای اتاق ذوب شده و سپس $5.0 \mu\text{L}$ از آن توسط سرنگ هاملتون به دستگاه HPLC تزریق شد.

براساس نتایج جدول ۲-۱۲ منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ دارای دامنه خطی در محدوده غلظتی 0.0005 mg L^{-1} تا $6/5$ با ضریب تعیین $R^2 = 0.9995$ برای نیترازپام و دامنه خطی در محدوده غلظتی 0.0008 mg L^{-1} تا $5/5$ با ضریب تعیین $R^2 = 0.9996$ برای میدازولام به دست آمد. معادله بهترین خط برای وابستگی سیگنال به غلظت مربوط به استخراج نیترازپام و میدازولام به صورت روابط (۲-۱۳) و (۲-۱۴) می‌باشد.

جدول (۲-۱۲): داده‌های مربوط به منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ نیترازپام و میدازولام

غلظت نیترازپام (mg L ⁻¹)	سیگنال تجزیه‌ای (سطح زیر منحنی) (mV.S)	غلظت میدازولام (mg L ⁻¹)	سیگنال تجزیه‌ای (سطح زیر منحنی) (mV.S)
0.5×10^{-3}	۵	0.8×10^{-3}	۱۳
0.1×10^{-1}	۴۰	0.1×10^{-2}	۱۷
0.5×10^{-1}	۱۸۷	0.8×10^{-2}	۴۰
0.8×10^{-1}	۳۱۸	0.1×10^{-1}	۵۱
۰/۱	۳۷۸	۰/۱	۴۰۰
۰/۵	۱۷۲۰	۰/۵	۱۹۸۵
۰/۸	۲۸۸۴	۱/۰	۴۰۰۸
۱/۰	۳۶۵۸	۱/۵	۶۴۵۰
۱/۵	۵۵۲۱	۲/۰	۸۱۰۷
۲/۰	۷۷۵۸	۳/۰	۱۲۶۳۷
۳/۰	۱۰۹۵۸	۴/۰	۱۶۵۲۰
۴/۰	۱۵۱۲۵	۵/۰	۲۰۲۵۴
۴/۵	۱۶۵۴۸	۵/۵	۲۲۸۵۷
۵/۰	۱۸۸۹۷	۶/۰	۲۳۹۲۱
۵/۵	۲۰۱۰۲	۶/۵	۲۴۱۶۵
۶/۰	۲۲۱۲۵	۷/۰	۲۴۳۲۷
۶/۵	۲۳۵۱۴	۷/۵	۲۴۷۱۲
۷/۰	۲۴۰۰۴	۸/۰	۲۴۹۵۳
۸/۰	۲۴۶۸۲	-	-

$$Y = 370.4/4 C_{NIT} + 3/10 \quad (13-2)$$

$$Y = 4121/7 C_{MID} + 8/3 \quad (14-2)$$

۹-۴-۲ بررسی اثر گونه‌های مزاحم برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری همزمان نیترازپام و

میدازولام

برای بررسی قابلیت کاربرد روش میکرواستخراج قطره آلی شناور جامد با کمک افزایش سورفکتانت و امواج فراصوت در اندازه‌گیری همزمان نیترازپام و میدازولام در نمونه‌های حقیقی، اثر مزاحمت‌های احتمالی در پیش‌تغلیظ این داروها و اندازه‌گیری آن‌ها با استفاده از HPLC مورد استفاده قرار گرفت. 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 $\bar{A} \pm 3S_A$ می‌باشد که در این رابطه \bar{A} میانگین و S_A انحراف استانداردهای سیگنال‌های تجزیه‌ای است. برای بررسی اثر مزاحمت احتمالی، هر گونه با نسبت ۱۰۰۰ برابر وزنی-حجمی نسبت به نیترازپام و میدازولام به محلول اولیه اضافه شد. سپس عمل استخراج انجام گرفت و سیگنال تجزیه‌ای مربوط به هر دارو به دست آمد. اگر سیگنال تجزیه‌ای به دست آمده در حضور گونه مورد نظر در دامنه $\bar{A} \pm 3S_A$ قرار می‌گرفت به این معنا بود که گونه مورد نظر با نسبت موجود مزاحم نیست. در غیر این صورت نسبت وزنی-حجمی گونه مزاحم آنقدر کاهش داده می‌شد تا سیگنال تجزیه‌ای در دامنه $\bar{A} \pm 3S_A$ قرار گیرد. نتایج حاصل از این بررسی در جدول (۲-۱۳) 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 وزنی نسبت به نیترازپام و میدازولام حضور داشتند مزاحم نبودند.

جدول (۲-۱۳): نتایج حاصل از بررسی اثر گونه‌های مزاحم در پیش‌تغلیظ نیترازپام و میدازولام با غلظت $1/0 \text{ mg L}^{-1}$

نسبت غلظت گونه به غلظت آنالیت (وزنی/وزنی)	گونه‌های مورد بررسی	آنالیت
۱۰۰۰	گلوکز، لاکتوز، متیونین، تیو اوره، آلانین، سیتالوپرام، ویتامین B ₁ و B ₆	نیترازپام
۵۰۰	سرتالین، اگزالات	
۳۰۰	ونلافاکسین	
۱۰۰۰	ویتامین B ₁ و B ₆ ، گلوکز، لاکتوز، متیونین، تیو اوره، آلانین، سیتالوپرام، سرتالین، ونلافاکسین، اگزالات	میدازولام

۲-۴-۱۰ ارقام شایستگی روش برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری همزمان نیترازپام و میدازولام

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 (۲-۱۵) استفاده شد:

$$\text{LOD} = \frac{K S_{bl}}{m} \quad (2-15)$$

که در این رابطه S_{bl} انحراف استاندارد سیگنال شاهد، m شیب منحنی کالیبراسیون پیش‌تغلیظ و K ضریب اطمینان می‌باشد. همچنین بر طبق استدلال کیزر^۱، مقدار منطقی و قابل قبول برای این ضریب ثابت عدد $K = 3/0$ است [۶۶].

با ۶ بار اندازه‌گیری تکراری روی محلول شاهد، طبق شرایط بهینه و با قرار دادن مقادیر در رابطه (۲-۱۲) مقدار حد تشخیص روش برای نیترازپام $0/017 \mu\text{g L}^{-1}$ به دست آمد. به طور مشابه برای داروی میدازولام، حد تشخیص به دست آمده برابر با $0/086 \mu\text{g L}^{-1}$ می‌باشد. همچنین حد اندازه‌گیری^۲

¹ Kaiser logic

² Limit of quantification

(LOQ) بصورت ۱۰ برابر انحراف استاندارد سیگنال شاهد بر شیب منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ به دست می‌آید که برای نیترازپام $0.056 \mu\text{g L}^{-1}$ و برای میدازولام $0.283 \mu\text{g L}^{-1}$ می‌باشد.

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 ۲-۱۶ محاسبه می‌شود که S_C انحراف استاندارد غلظت و C میانگین غلظت می‌باشد.

$$\%RSD = \frac{S_C}{C} \times 100 \quad (2-16)$$

برای بررسی دقت و صحت روش، غلظت‌های متفاوتی از نیترازپام و میدازولام در دامنه خطی منحنی کالیبراسیون انتخاب و در شرایط بهینه، عمل استخراج بر روی آن‌ها انجام گرفت. برای هر یک از غلظت‌های انتخاب شده، ۳ بار اندازه‌گیری تکراری انجام گرفت و با استفاده از سیگنال‌های به دست آمده برای هر نمونه و منحنی‌های کالیبراسیون، مقدار نیترازپام و میدازولام معادل با هر سیگنال محاسبه شد. همانطور که در جدول (۲-۱۴) و (۲-۱۵) نشان داده شده است مقادیر t و درصد انحراف نسبی به ترتیب نشان دهنده صحت و دقت خوب روش است. لازم به ذکر است که در سطح اطمینان ۹۵٪ مقدار t بحرانی برای ۲ درجه آزادی برابر ۴/۳۰ است.

همچنین فاکتور پیش تغلیظ (PF)، به صورت نسبت شیب منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ بر شیب منحنی کالیبراسیون مستقیم تعریف می‌شود. براساس نتایج به دست آمده مقدار فاکتور پیش تغلیظ برای نیترازپام و میدازولام، به ترتیب ۳۱۵ و ۳۰۲ با درصد بازیابی میانگین ۹۰٪ با حجم قطره آلی در حدود $29 \mu\text{L}$ به دست آمد.

جدول (۲-۱۴): بررسی دقت و صحت در شرایط بهینه به دست آمده برای نیترازپام

درصد بازیابی	مقدار t	% RSD	نیترازپام اندازه گیری شده (mg L ⁻¹) ± SD*	نیترازپام موجود در محلول آبی (mg L ⁻¹)
۱۰۴/۰	۱/۳۸	۴/۸۰	۰/۱۰۴ ± ۰/۰۰۵	۰/۱۰۰
۱۰۰/۴	۰/۴۳	۱/۵۹	۰/۵۰۲ ± ۰/۰۰۸	۰/۵۰۰
۱۰۶/۰	۲/۵۵	۳/۷۷	۱/۰۶ ± ۰/۰۴	۱/۰۰

*Standard deviation (سه اندازه گیری)

t_{critical}=4.30 (95% confidence interval)

جدول (۲-۱۵): بررسی دقت و صحت در شرایط بهینه به دست آمده برای میدازولام

درصد بازیابی	مقدار t	% RSD	میدازولام اندازه گیری شده (mg L ⁻¹) ± SD*	میدازولام موجود در محلول آبی (mg L ⁻¹)
۱۰۳/۰	۱/۰۵	۴/۸۵	۰/۱۰۳ ± ۰/۰۰۵	۰/۱۰۰
۱۰۱/۲	۱/۰۲	۱/۹۸	۰/۵۰۶ ± ۰/۰۱۰	۰/۵۰۰
۱۰۳/۰	۱/۷۰	۲/۹۱	۱/۰۳ ± ۰/۰۳	۱/۰۰

*Standard deviation (سه اندازه گیری)

t_{critical}=4.30 (95% confidence interval)

۲-۴-۱۱ اندازه گیری نیترازپام و میدازولام در نمونه های حقیقی

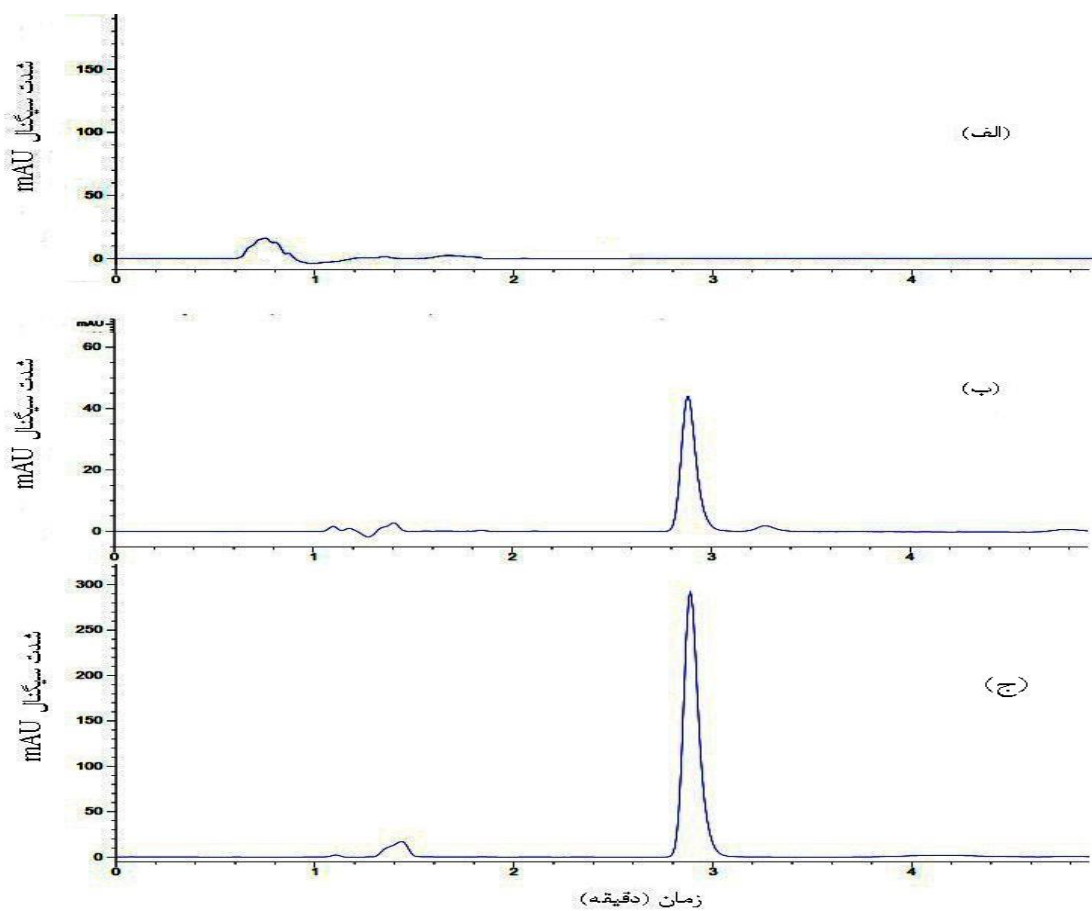
برای بررسی کارایی روش پیشنهادی به منظور استفاده در نمونه های حقیقی با بافت های مختلف، این روش برای جداسازی، پیش تغلیظ و اندازه گیری نیترازپام و میدازولام در قرص نیترازپام و آمپول میدازولام و همچنین نمونه سرم با اعمال شرایط بهینه به کار گرفته شد.

ابتدا ۳ عدد قرص نیترازپام ۵/۰ mg پودر و توزین شد، سپس یک سوم این مقدار معادل ۵/۰ میلی گرم ماده موثره نیترازپام در بالن حجمی ۵۰/۰ mL با مقداری متانول حل و پس از صاف کردن آن با آب مقطر به حجم رسانده شد، در این مرحله ۱ mL از این محلول در بالن حجمی ۱۰۰ mL با آب

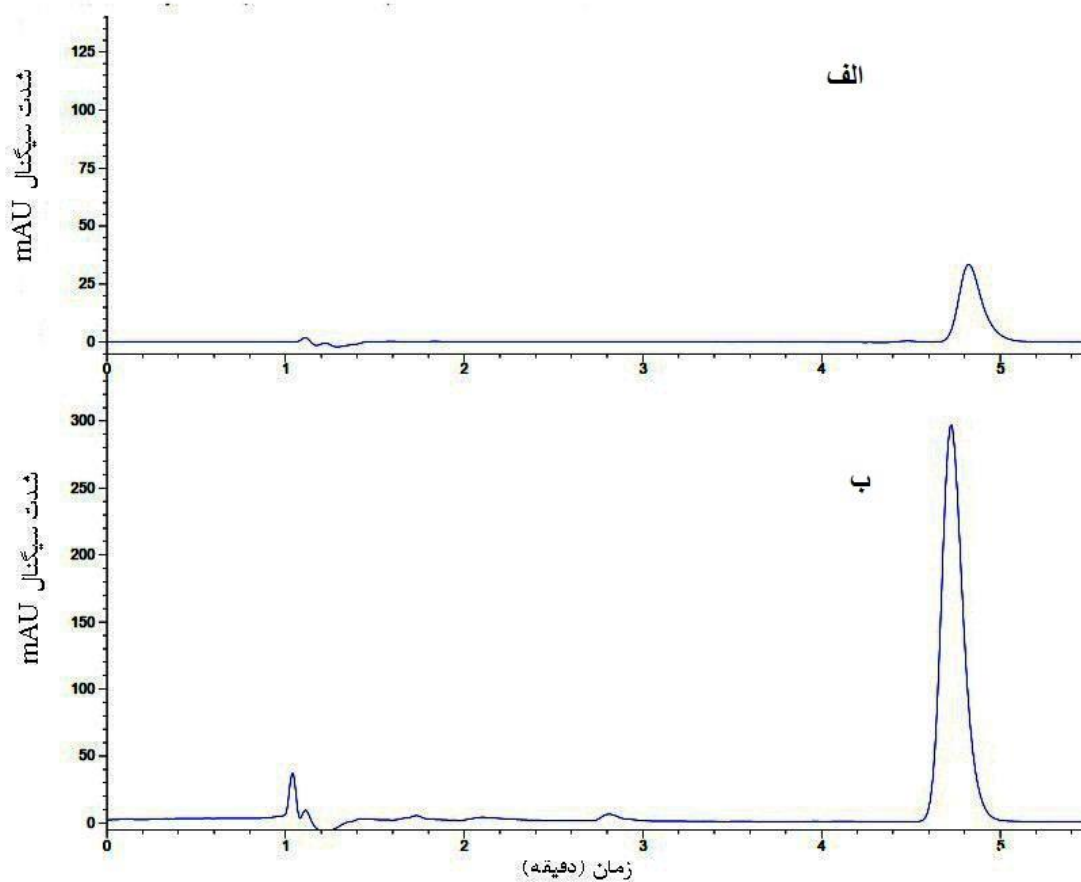
مقطر به حجم رسانده شد. سپس به یک میلی‌لیتر از این محلول حجم‌های مشخص و متفاوتی از نمونه استاندارد داروی مورد نظر اضافه و به حجم نهایی ۱۰ mL رسانده و تحت شرایط بهینه به دست آمده مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. بنابراین، ابتدا به محلول نمونه حاوی یک میلی‌لیتر نمونه‌ی قرص هیچ ماده‌ی استاندارد اضافه نشد و طبق شرایط بهینه شده و در حجم ۱۰ mL، عمل استخراج انجام و سیگنال تجزیه‌ای به دست آمد. در مراحل بعدی، به ترتیب ۰/۱، ۰/۵ و ۱/۰ از محلول استاندارد mg L⁻¹ ۱۰/۰ نیترازپام به محلول نمونه اضافه و پس از انجام پیش تغلیظ سیگنال تجزیه‌ای محاسبه شد و با استفاده از منحنی کالیبراسیون، غلظت نیترازپام تعیین شد. هر اندازه‌گیری ۳ بار تکرار گردید که نتایج آن در جدول (۲-۱۶) و شکل (۲-۱۴) آمده است. نتایج نشان می‌دهد که درصد بازیابی برای پیش تغلیظ و اندازه‌گیری نیترازپام در نمونه قرص نیترازپام ۹۸/۰-۱۰۳/۰ درصد با انحراف استاندارد نسبی قابل قبول ۲/۷-۳/۵ درصد می‌باشد.

آماده‌سازی آمپول میدازولام mg ۱۵/۰ در ۳/۰ mL، ساخت شرکت کاسپین تامین (تهران، ایران)، نیز به صورت مشابه انجام گرفت. ۵/۰ mL از آمپول (از دو آمپول) در بالن حجمی ۲۵۰/۰ mL در متانول حل و به حجم رسانده شد. سپس ۱/۰ mL از این محلول به بالن ۱۰۰/۰ mL منتقل و با آب مقطر به حجم رسانده شد. به یک میلی‌لیتر از این محلول حجم‌های مشخص و متفاوتی از نمونه استاندارد میدازولام اضافه و به حجم نهایی ۱۰ mL رسانده و تحت شرایط بهینه به دست آمده مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. به این صورت که ابتدا محلول نمونه حاوی یک میلی‌لیتر نمونه‌ی آمپول هیچ ماده‌ی استاندارد اضافه نشد و سیگنال مربوط به دست آمد. در مرحله بعدی، به ترتیب ۰/۱، ۰/۵ و ۱/۰ از محلول استاندارد میدازولام با غلظت mg L⁻¹ ۱۰/۰ به محلول نمونه اضافه، به حجم ۱۰ mL رسانده و پس از انجام پیش تغلیظ سیگنال تجزیه‌ای محاسبه شد. هر اندازه‌گیری ۳ بار تکرار گردید که نتایج آن در جدول (۲-۱۶) و شکل (۲-۱۵) آمده است. نتایج نشان می‌دهد که درصد بازیابی پیش تغلیظ و اندازه‌گیری میدازولام ۱۰۴/۰-۱۰۰/۶ درصد با انحراف استاندارد نسبی قابل قبول ۱/۶۶-۱/۱۲ درصد می‌باشد.

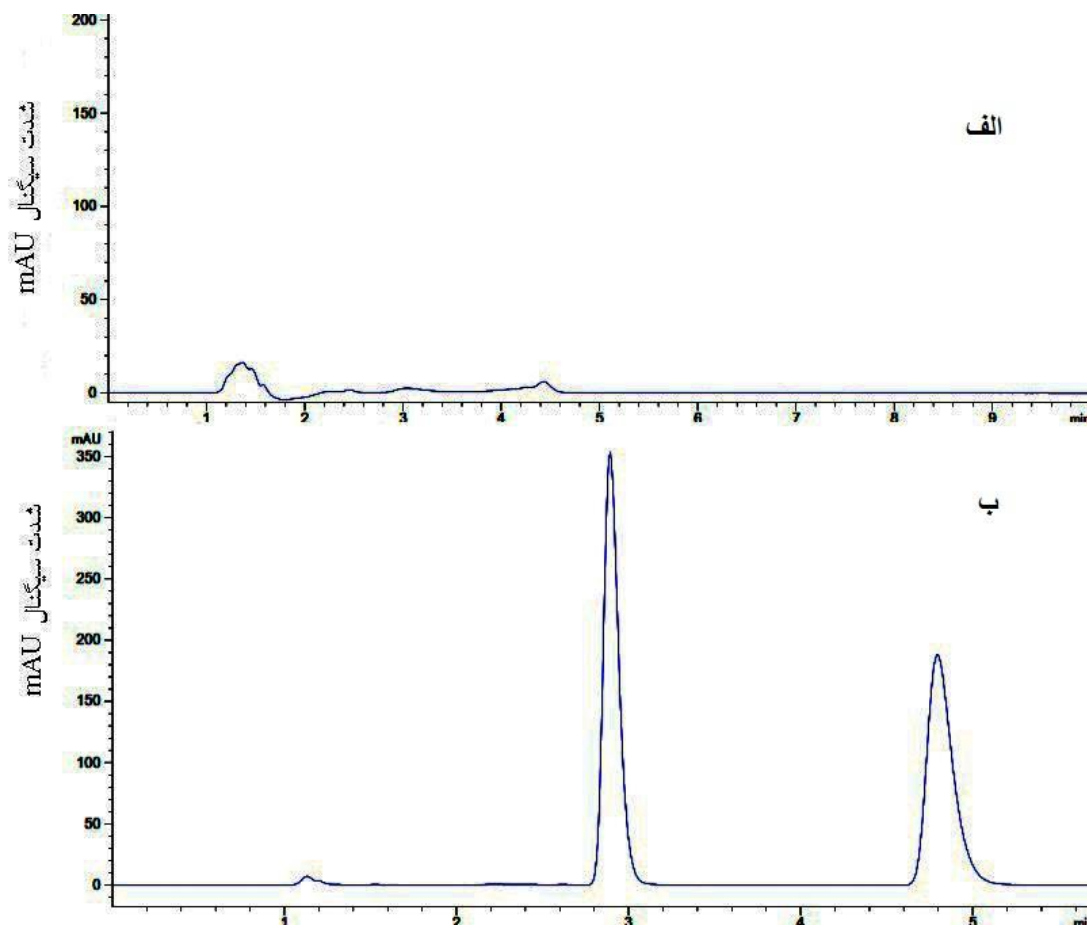
نحوه آماده سازی سرم نیز به این صورت بود که ابتدا ۱/۲ mL استونیتریل به ۲/۰ mL سرم به منظور جدا کردن پروتئین‌های موجود در آن اضافه گردید. سپس به مدت ۱۰/۰ دقیقه در سانتریفیوژ با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد. سپس محلول رویی آن برداشته و به بالن حجمی ۲۵/۰ mL منتقل شد و در انتها یک میلی‌لیتر از این محلول به لوله آزمایش ۱۰/۰ mL انتقال داده شد و آنالیز نمونه در سه غلظت متفاوت از استاندارد داروهای نیترازپام و میدازولام انجام گردید که نتایج آن در جدول (۲-۱۷) آورده شده است [۹۱]. نتایج نشان می‌دهد که درصد بازیابی برای پیش تغلیظ و اندازه‌گیری نیترازپام در نمونه سرم ۱۰۸/۰-۱۰۲/۴ درصد با انحراف استاندارد نسبی قابل قبول ۳/۸۲-۱/۹۵ درصد بوده و نیز درصد بازیابی روش برای پیش تغلیظ و اندازه‌گیری میدازولام در نمونه سرم ۱۰۸/۱-۱۰۰/۶ درصد با انحراف استاندارد نسبی قابل قبول ۳/۹۳-۱/۰۱ درصد می‌باشد. کروماتوگرام حاصل از نمونه سرم شاهد که در آن هیچ یک از داروهای مذکور در نمونه سرم وجود نداشته است، و نمونه سرم حاوی ۰/۱ میلی گرم بر لیتر از نیترازپام و میدازولام در شکل (۲-۱۶ الف، ب) نشان داده شده است.



شکل (۲-۱۴): الف: کروماتوگرام شاهد. ب) کروماتوگرام حاصل از نمونه قرص قبل از اسپایک استاندارد نیترازپام. ج: کروماتوگرام نمونه قرص حاوی 0.5 mg L^{-1} استاندارد نیترازپام. (شرایط آزمایش: حجم محلول نمونه 1.0 mL ، حجم حلال استخراج کننده (۱-آندکانول) $29/1 \text{ } \mu\text{L}$ ، غلظت سورفکتانت $25/00 \text{ mg L}^{-1}$ ، زمان استخراج $20/0$ دقیقه، زمان سانتریفیوژ کردن $10/0$ دقیقه، در طول موج 220 nm).



شکل (۲-۱۵): الف: کروماتوگرام حاصل از نمونه آمپول میدازولام قبل از اسپایک استاندارد میدازولام. ب: کروماتوگرام نمونه آمپول حاوی 0.5 mg L^{-1} استاندارد میدازولام. (شرایط آزمایش: حجم محلول نمونه 1.0 mL ، حجم حلال استخراج کننده (۱-آندکانول) $29.1 \mu\text{L}$ ، غلظت سورفکتانت 25.00 mg L^{-1} ، زمان استخراج 20.0 دقیقه، زمان سانتریفیوژ کردن 10.0 دقیقه، در طول موج 220 nm).



شکل (۲-۱۶): الف: کروماتوگرام حاصل از نمونه سرم شاهد ب: کروماتوگرام نمونه سرم حاوی نیترازپام و میدازولام از هر کدام 0.5 mg L^{-1} . (شرایط آزمایش: غلظت نیترازپام و میدازولام 1.0 mg L^{-1} ، حجم محلول نمونه $1.0/0 \text{ mL}$ ، حجم حلال استخراج کننده (۱-آندکانول) $29/1 \text{ } \mu\text{L}$ ، غلظت سورفکتانت $25/00 \text{ mg L}^{-1}$ ، زمان استخراج $20/0$ دقیقه، زمان سانتریفیوژ $10/0$ دقیقه، در طول موج 220 nm).

جدول (۲-۱۶): نتایج اندازه‌گیری همزمان نیترازپام و میدازولام در نمونه‌های قرص و آمپول

درصد بازایی	مقدار t تجربی	RSD% (n=3)	آنالیت اندازه‌گیری شده \pm SD (mg L ⁻¹)	آنالیت اضافه شده (mg L ⁻¹)	نمونه
-	-	-	۰/۰۹۶±۰/۰۰۲	۰/۰	
۹۸/۰	۰/۴۳	۲/۷	۰/۱۹۸±۰/۰۰۸	۰/۱۰۰	قرص نیترازپام
۱۰۳/۰	۱/۳۱	۲/۸	۰/۶۱۱±۰/۰۲۰	۰/۵۰۰	
۱۰۱/۴	۰/۶۱	۳/۵	۱/۱۱±۰/۰۴	۱/۰۰	
-	-	-	۰/۰۹۶±۰/۰۰۱	۰/۰	
۱۰۴/۰۰	۴/۰۸	۱/۶	۰/۳۰۸±۰/۰۰۵	۰/۱	آمپول میدازولام
۱۰۲/۱	۳/۱۸	۱/۱۲	۰/۷۱۱±۰/۰۰۸	۰/۵	
۱۰۰/۶	۰/۶۸	۱/۶۶	۱/۲۰۴±۰/۰۲۰	۱/۰	

مقدار برچسب روی قرص نیترازپام = ۵/۰ mg

مقدار اندازه‌گیری شده = ۴/۸ mg

مقدار برچسب روی آمپول میدازولام = ۱۵/۰ mg

مقدار اندازه‌گیری شده = ۱۴/۴ mg

$t_{critical}=4.30$ (95% confidence interval)

جدول (۲-۱۷): نتایج اندازه‌گیری همزمان نیترازپام و میدازولام در نمونه سرم خون

درصد بازایی	مقدار t تجربی	RSD% (n=3)	آنالیت اندازه‌گیری شده \pm SD (mg L ⁻¹)	آنالیت اضافه شده (mg L ⁻¹)	نمونه
-	-	-	ND*	۰/۰	
۱۰۸/۰	۰/۳۵	۳/۷۰	۰/۱۰۸±۰/۰۰۴	۰/۱۰۰	نیترازپام
۱۰۲/۴	۲/۱	۱/۹۵	۰/۵۱۲±۰/۰۱۰	۰/۵۰۰	
۱۰۴/۸	۲/۱۸	۳/۸۲	۱/۰۵±۰/۰۴	۱/۰۰	
-	-	-	ND	۰/۰	
۱۰۴/۰	۲/۷۲	۲/۴۰	۰/۱۰۴±۰/۰۰۳	۰/۱۰۰	میدازولام
۱۰۰/۶	۱/۰۰	۱/۰۱	۰/۵۰۳±۰/۰۰۵	۰/۵۰۰	
۱۰۸/۱	۳/۹۳	۳/۲۳	۱/۰۸۱±۰/۰۳۵	۱/۰۰	

* Not detected

$t_{critical}=4.30$ (95% confidence interval)

۲-۴-۱۲ مقایسه روش پیشنهادی با برخی روش های به کار گرفته شده برای پیش تغلیظ و

اندازه گیری همزمان نیترازپام و میدازولام

در جدول ۲-۱۸ تعدادی از روش های پیش تغلیظ و اندازه گیری نیترازپام و میدازولام آورده شده است. با توجه به اینکه تا به حال هیچ مقاله ای مبنی بر پیش تغلیظ و اندازه گیری همزمان نیترازپام و میدازولام گزارش نشده است، لذا مقالاتی که به اندازه گیری مستقیم این دو دارو مربوط می شد، برای مقایسه در جدول زیر آورده شده است. در این جدول پارامترهای مختلف، مانند حد تشخیص، حد اندازه گیری، دامنه خطی و فاکتور پیش تغلیظ برای مقایسه آورده شده است. مقایسه ارقام شایستگی گزارش شده برای این روش ها با روش پیشنهادی نشان می دهد که به جز در روش مرجع [۹۴]، حد تشخیص روش پیشنهادی نسبت به همه روش های گزارش شده بهتر می باشد. همچنین با توجه به نتایج، گستره خطی روش ارائه شده نسبت به همه روش های ارائه شده بهتر می باشد.

جدول (۲-۱۸): مقایسه روش پیشنهادی با برخی از روش‌های گزارش شده برای اندازه‌گیری نیترازپام و میدازولام

مرجع	گستره خطی ($\mu\text{g L}^{-1}$)	حد تشخیص ($\mu\text{g L}^{-1}$)	روش	آنالیت/ماتریکس
۳	-	۰/۱۱	Molecularly imprinted SPE/ LC-MS	نیترازپام / مو
۵	-	۰/۵ (NIT) ۰/۸ (MID)	LC-MS	نیترازپام و میدازولام / ادرار
۱۱	-	۰/۲	Supported LE-LC-MS	میدازولام / پلاسما
۱۲	-	۵/۰	LC-MS	میدازولام / پلاسما
۹۲	۰/۰۱-۰/۱۵	-	Flow injection fluorimetric	نیترازپام / محصولات دارویی
۹۳	۵/۰-۲۰۰/۰	۰/۲۵	LC-MS	نیترازپام / ادرار
۹۴	۰/۰۱-۰/۱۵۰	۰/۰۳۶۳	Capillary electrophoresis	نیترازپام / ادرار
۹۵	-	۰/۳۳-۱۶/۵	LLE- LC-MS/MS	نیترازپام و میدازولام / مو
۹۶	-	۱/۸(NIT) ۴/۱ (MID)	Solid supported LLE-UPLC- MS	نیترازپام و میدازولام / پلاسما
۹۷	۰/۰۵-۱۰/۰	۷/۹-۱۹/۶	HPLC	میدازولام / سرم
کار حاضر	$۰/۸ - ۵/۵ \times ۱۰^۳$ $۰/۵ - ۶/۵ \times ۱۰^۳$	۰/۰۱۷۳ (NIT) ۰/۰۸۶(MID)	UA-SEME-SFOD-HPLC	نیترازپام و میدازولام / سرم

۲-۵ روش میکرواستخراج مایع پخشی مبتنی بر انجماد قطره آلی شناور همراه با امواج فراصوت برای پیش تغلیظ مقادیر سرتالین، سیتالوپرام و دیازپام در نمونه‌های حقیقی و اندازه-

گیری به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

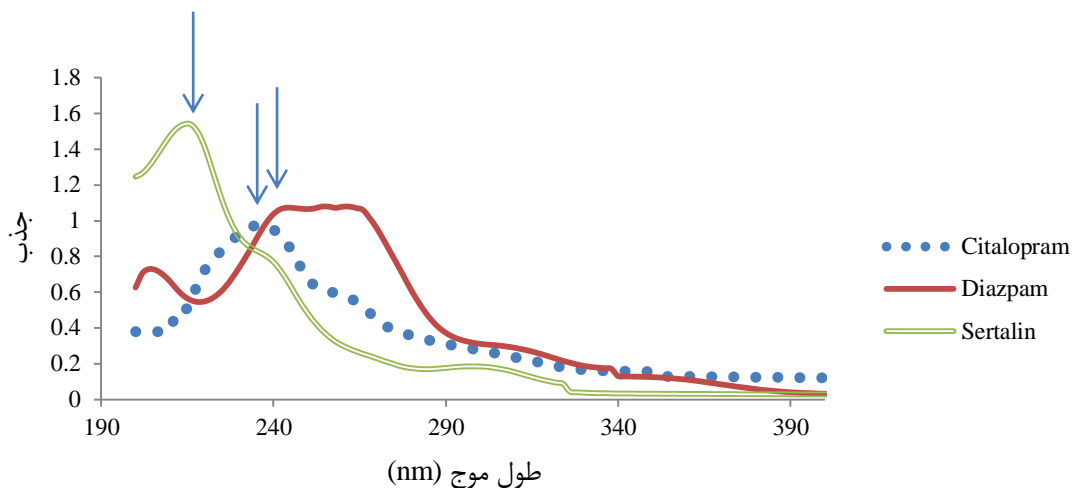
با توجه به اهمیت و کاربرد داروهای آرامبخش سرتالین، سیتالوپرام و دیازپام و نقش آن‌ها بر سلامتی انسان و اینکه معمولاً بیماران مبتلا به افسردگی از مشکل بی‌خوابی رنج می‌برند، این داروها مورد سوءمصرف قرار می‌گیرند. همچنین از آنجا که غلظت‌های بالاتر از $5/0 \text{ mg mL}^{-1}$ برای سیتالوپرام و دیازپام و $20/0 \text{ mg mL}^{-1}$ برای سرتالین در بدن انسان ایجاد مسمومیت و خطر می‌کنند و این غلظت‌ها به‌طور مستقیم و به‌روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا قابل اندازه‌گیری نمی‌باشند، ارائه روش میکرواستخراج ضروری به‌نظر می‌رسد. بنابراین در این مطالعه روشی ساده، حساس و گزینش‌پذیر برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری مقادیر کم از این داروها ارائه شده است. در این پژوهش، روش میکرواستخراج مایع مایع پخشی مبتنی بر انجماد قطره آلی شناور و به‌همراه امواج فراصوت و روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا برای پیش‌تغلیظ مقادیر کم این داروها در نمونه‌های حقیقی و آنالیز آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

۲-۵-۱ ثبت طیف‌های UV و انتخاب بهترین طول موج برای اندازه‌گیری سرتالین، سیتالوپرام

و دیازپام

برای تعیین طول موج‌های ماکزیمم جذب داروهای سرتالین، سیتالوپرام و دیازپام، طیف جذبی محلول‌های این داروها ثبت گردید. به این ترتیب که در یک بالن حجمی $10/0 \text{ mL}$ محلول داروهای مورد نظر با غلظت $5/0 \text{ mg L}^{-1}$ با فاز متحرک تعیین شده تهیه شد. پس از یکنواخت کردن محلول، مقداری از آن به داخل سل اسپکتروفتومتر منتقل و طیف جذبی آن نسبت به فاز متحرک در

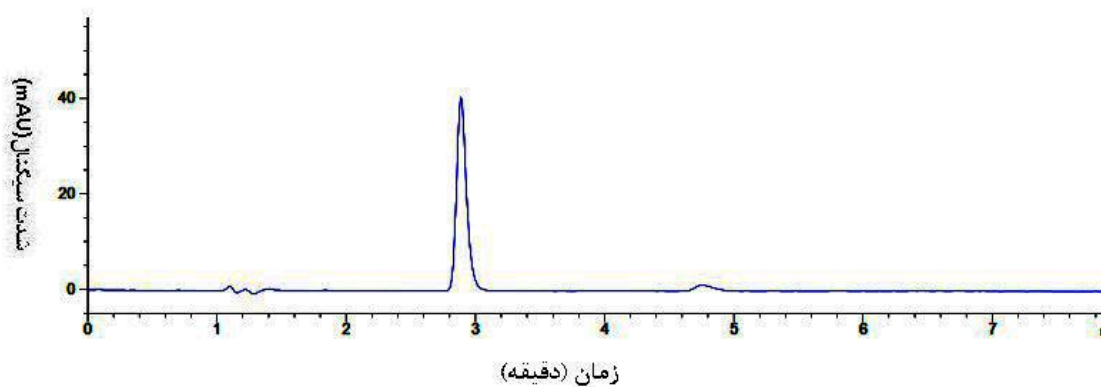
ناحیه ۴۰۰-۲۰۰ nm، ثبت شد. با توجه به طیف جذبی این داروها که در شکل ۲-۱۷ نشان داده شده است، اندازه‌گیری‌ها در طول موج جذبی ۲۳۰ nm، ۲۴۰ و ۲۱۰ به ترتیب برای سیتالوپرام، دیاپام و سرتالین، انجام پذیرفت.



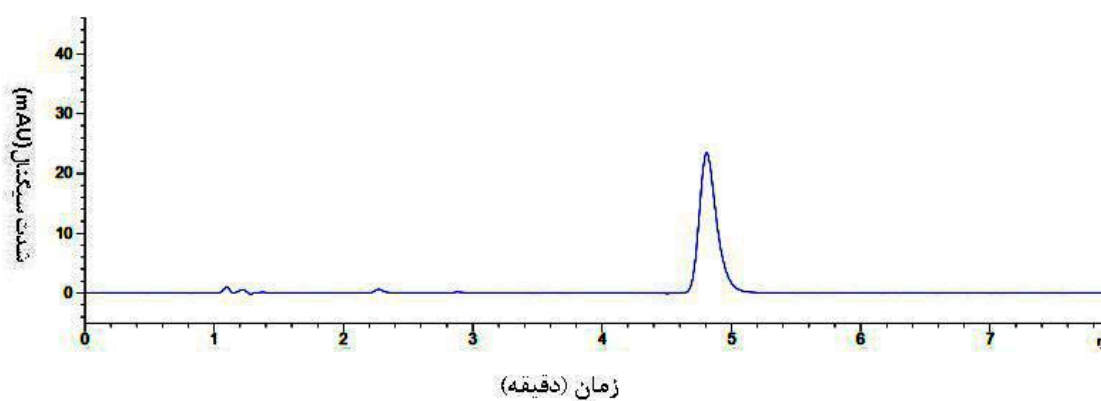
شکل (۲-۱۷): طیف جذبی سیتالوپرام، دیاپام و سرتالین، شرایط آزمایش: غلظت سیتالوپرام، دیاپام و میدازولام (۵/۰ mg L⁻¹)، حلال فاز متحرک (مخلوطی از بافر فسفاتی (pH برابر ۵/۵، با غلظت ۰/۰۶ M) و استونیتریل با نسبت ۱:۱).

۲-۵-۲ شرایط کروماتوگرافی برای اندازه‌گیری همزمان سیتالوپرام، دیاپام و سرتالین

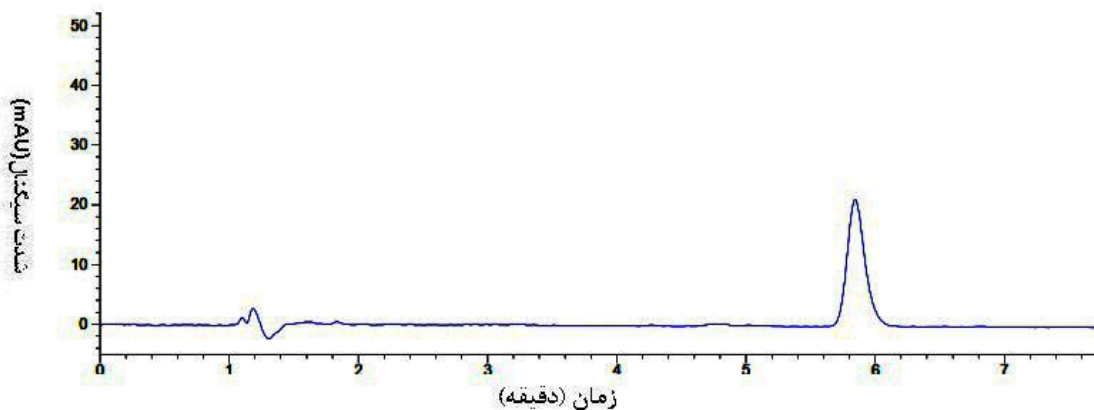
جداسازی کروماتوگرافی با استفاده از شویش ایزوکراتیک برای اندازه‌گیری همزمان سیتالوپرام، دیاپام و سرتالین صورت پذیرفت. به‌دین منظور مخلوطی از بافر فسفاتی (pH برابر ۵/۵، با غلظت ۰/۰۶ M) و استونیتریل با نسبت (۱:۱) و سرعت ۱/۰ میلی لیتر بر دقیقه به‌عنوان فاز متحرک برای جداسازی داروهای سرتالین، سیتالوپرام و دیاپام مورد استفاده قرار گرفت [۸۴]. کروماتوگرام مربوط به محلول ۵/۰ mg L⁻¹ سرتالین، سیتالوپرام و دیاپام و مخلوط آن‌ها در شکل‌های (۲-۱۸) تا (۲-۲۱) نشان داده شده است.



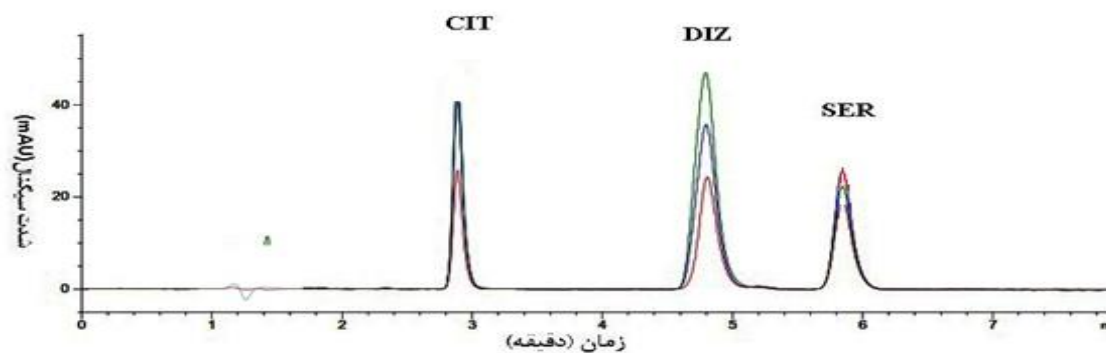
شکل (۲-۱۸) کروماتوگرام محلول آبی $5/0 \text{ mg L}^{-1}$ سیتالوپرام. ترکیب بافر فسفاتی با pH برابر با ۵/۵ و استونیتریل، با نسبت ۱:۱ به عنوان فاز متحرک، سرعت جریان $1/0$ میلی لیتر بر دقیقه، حجم لوپ $5/0 \text{ }\mu\text{L}$ در طول موج 230 nm



شکل (۱۹-۲) کروماتوگرام محلول آبی $5/0 \text{ mg L}^{-1}$ دیازپام. ترکیب بافر فسفاتی با pH برابر با ۵/۵ و استونیتریل، با نسبت ۱:۱ به عنوان فاز متحرک، سرعت جریان $1/0$ میلی لیتر بر دقیقه، حجم لوپ $5/0 \text{ }\mu\text{L}$ در طول موج 240 nm



شکل (۲۰-۲) کروماتوگرام محلول $5/0 \text{ mg L}^{-1}$ سرتالین. ترکیب بافر فسفاتی با pH برابر با ۵/۵ و استونیتریل، با نسبت ۱:۱ به عنوان فاز متحرک، سرعت جریان $1/0$ میلی لیتر بر دقیقه، حجم لوپ $5/0 \text{ }\mu\text{L}$ در طول موج 210 nm



شکل (۲۱-۲) کروماتوگرام محلول حاوی سیتالوپرام، دیازپام، سرتالین هر کدام با غلظت $5/0 \text{ mg L}^{-1}$. ترکیب بافر فسفاتی با $\text{pH} = 5/5$ و استونیتریل، با نسبت ۱:۱ به عنوان فاز متحرک، سرعت جریان $1/0$ میلی لیتر بر دقیقه، حجم لوپ $5/0 \text{ }\mu\text{L}$ در طول موجهای 230 (رنگ آبی)، 240 (رنگ سبز) و 210 (رنگ قرمز) برای سیتالوپرام، دیازپام، سرتالین به ترتیب.

۲-۵-۳ روش کار در بهینه‌سازی پارامترهای موثر در اندازه‌گیری سیتالوپرام، دیازپام و

سرتالین

در یک لوله آزمایش ۰/۵ mL از محلول $10/0 \text{ mg L}^{-1}$ هر یک از داروها و ۲/۰ mL بافر با pH مورد نظر اضافه و توسط آب مقطر به حجم نهایی ۱۰/۰ mL رسانده شد. سپس مخلوط همگنی از حلال آلی پخش‌کننده و حلال آلی استخراج‌کننده سبک تر از آب (۱-آندکانول) توسط سرنگ یک میلی‌لیتری به سرعت به نمونه آبی تزریق گردید. در نتیجه، محلول کدر یا ابری تشکیل گردید که این کدورت به علت پخش ذرات ریز حلال استخراج‌کننده به درون محلول آبی می‌باشد. در مرحله بعد لوله آزمایش در مدت زمان معین در حمام فراصوت با قدرت ۶۰ kHz قرار داده شد. سپس به منظور جداسازی بهتر دو فاز، لوله آزمایش در دستگاه سانتریفیوژ با سرعت ۳۰۰۰ دور بر دقیقه قرار داده شد. پس از اتمام عمل استخراج، لوله آزمایش به حمام یخ منتقل گردید و بعد از گذشت حدود ۳۰ دقیقه، قطره آلی منجمد که در حدود ۳۰ μL است، در سطح محلول تشکیل گردید. سپس قطره آلی منجمد شده توسط اسپاتول به یک ویال منتقل و ۵/۰ μL از آن به دستگاه HPLC تزریق شد.

با بررسی نتایج حاصل از اثر امواج فراصوت بر بازده استخراج در جدول (۲-۱۹) مشخص شده است که سیگنال تجزیه‌ای آنالیت‌های مورد بررسی در اثر استفاده امواج فراصوت به‌عنوان عامل کمک‌کننده در پخش حلال استخراج، افزایش می‌یابد، زیرا حمام فراصوت باعث افزایش انتقال جرم آنالیت از فاز آبی به فاز آلی می‌شود. در نتیجه تلفیق این دو روش با هم (استفاده از حلال پخش‌کننده با حمام فراصوت) منجر به افزایش راندمان استخراج ترکیبات دارویی مورد نظر می‌شود.

جدول (۲-۱۹) نتایج مربوط به مقایسه اثر امواج فراصوت بر اندازه گیری همزمان سیتالوپرام، دیازپام و سرتالین*

آنالیت	سیگنال تجزیه‌ای قبل از استفاده از امواج فراصوت	سیگنال تجزیه‌ای بعد از استفاده از امواج فراصوت
سیتالوپرام	۵۶۲	۷۶۵
دیازپام	۶۱۱	۸۱۲
سرتالین	۵۴۱	۷۶۵

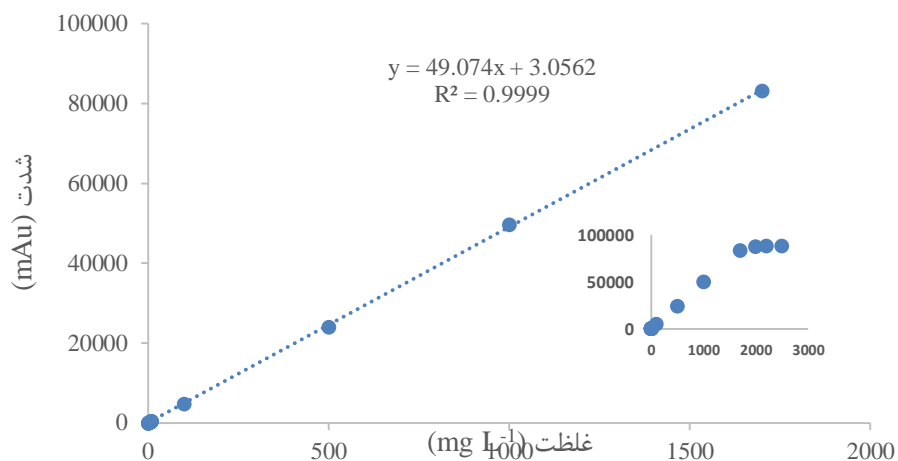
*شرایط آزمایش: غلظت سیتالوپرام و دیازپام و سرتالین 0.5 mg L^{-1} ، در pH برابر ۸/۵، حجم محلول نمونه ۱۰/۰ میلی لیتر، حجم حلال استخراج کننده (۱-آندکانول) ۵۰/۰ میکرولیتر، حجم حلال پخش کننده $1000.0 \mu\text{L}$ ، زمان استخراج ۱۵ دقیقه، زمان سانتریفیوژ کردن ۱۵ دقیقه، در طول موج ۲۳۰، ۲۴۰ و ۲۱۰ به ترتیب برای سیتالوپرام، دیازپام و سرتالین.

۴-۵-۲ منحنی کالیبراسیون مستقیم در اندازه گیری سیتالوپرام، دیازپام و سرتالین

برای به دست آوردن منحنی کالیبراسیون مستقیم این داروها، محلول‌هایی با غلظت‌های متفاوت از سیتالوپرام، دیازپام و سرتالین در محدوده غلظتی 0.2 mg L^{-1} تا 2000.0 با رقیق‌سازی از محلول 2000.0 mg L^{-1} تهیه شده در متانول تهیه شدند. سپس، رقیق‌سازی در حلال استخراج در حجم 1.0 mL ، مطابق روش گفته شده در قسمت ۲-۴-۵ صورت پذیرفت و در نهایت $50 \mu\text{L}$ از حلال حاوی آنالیت به دستگاه HPLC تزریق گردید و سیگنال حاصل که سطح زیر پیک هر نمونه بود ثبت گردید. منحنی‌های کالیبراسیون مربوطه نیز از رسم تغییرات سیگنال آنالیت بر حسب غلظت به دست آمد که نتایج آن در جدول (۲-۲۰) و شکل‌های (۲-۲۲)، (۲-۲۳) و (۲-۲۴) به ترتیب برای سیتالوپرام، دیازپام و سرتالین نشان داده شده است. براساس نتایج به دست آمده منحنی کالیبراسیون برای سیتالوپرام در محدوده غلظتی $0.3-1700 \text{ mg L}^{-1}$ ، برای دیازپام در محدوده غلظتی $1500-1000 \text{ mg L}^{-1}$ و برای سرتالین در محدوده غلظتی $0.2-1000 \text{ mg L}^{-1}$ خطی می‌باشد.

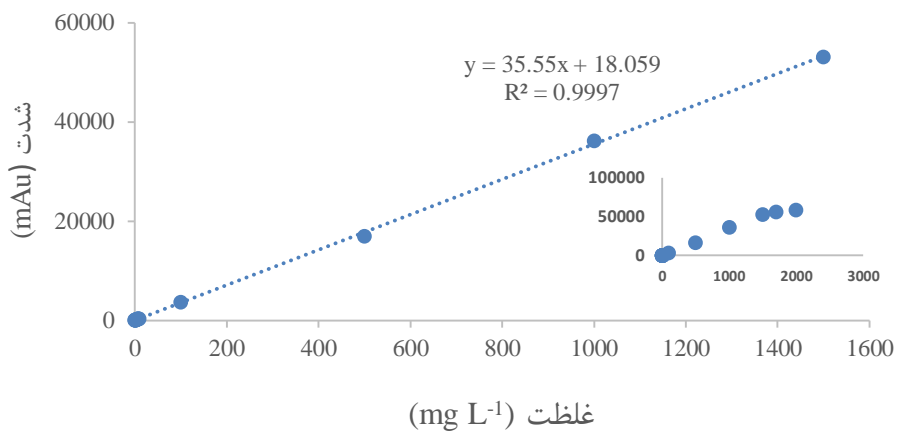
جدول (۲-۲۰): سیگنال‌های مستقیم به‌دست آمده برای داروهای سیتالوپرام، دیازپام و سرتالین با غلظت‌های متفاوت

غلظت سیتالوپرام (mg L ⁻¹)	سیگنال تجزیه‌ای (سطح زیر منحنی) (mV.S)	غلظت دیازپام (mg L ⁻¹)	سیگنال تجزیه‌ای (سطح زیر منحنی) (mV.S)	غلظت سرتالین (mg L ⁻¹)	سیگنال تجزیه‌ای (سطح زیر منحنی) (mV.S)
۰/۳	۱۸	۰/۳	۲۰	۰/۲	۴۸
۰/۵	۲۷	۰/۸	۵۲	۰/۵	۷۰
۱/۰	۵۵	۱/۰	۶۵	۱/۰	۹۵
۲/۰	۱۲۵	۲/۰	۱۰۳	۲/۰	۱۴۲
۳/۰	۲۱۰	۳/۰	۱۴۸	۳/۰	۱۸۵
۴/۰	۱۸۵	۴/۰	۲۰۶	۴/۰	۲۲۵
۵/۰	۲۶۵	۵/۰	۲۲۵	۵/۰	۲۷۵
۶/۰	۲۹۰	۶/۰	۲۹۰	۶/۰	۳۴۰
۷/۰	۳۴۴	۷/۰	۳۰۱	۷/۰	۳۹۰
۸/۰	۳۹۰	۸/۰	۳۱۵	۸/۰	۴۵۰
۹/۰	۴۵۰	۱۰/۰	۳۴۱	۹/۰	۴۷۰
۱۰/۰	۴۹۰	۱۰۰/۰	۲۸۶۲	۱۰/۰	۵۳۰
۱۰۰/۰	۴۸۹۲	۵۰۰/۰	۱۶۹۵۸	۱۰۰/۰	۴۹۰۰
۵۰۰/۰	۲۴۱۲۵	۱۰۰۰/۰	۳۶۲۵۴	۵۰۰/۰	۲۴۴۵۰
۱۰۰۰/۰	۴۹۶۵۱	۱۵۰۰/۰	۵۳۱۴۵	۱۰۰۰/۰	۴۸۸۵۰
۱۷۰۰/۰	۸۳۲۱۴	۱۷۰۰/۰	۵۶۱۴۸	۱۷۰۰/۰	۸۳۲۱۴
۲۰۰۰/۰	۸۷۴۵۸	۲۰۰۰/۰	۵۸۴۸۵	۱۸۰۰/۰	۸۴۱۵۷
۲۲۰۰/۰	۸۷۹۶۵	-	-	۲۰۰۰/۰	۸۶۹۷۱
۲۵۰۰/۰	۸۸۱۰۶	-	-	۲۵۰۰/۰	۸۹۵۱۲



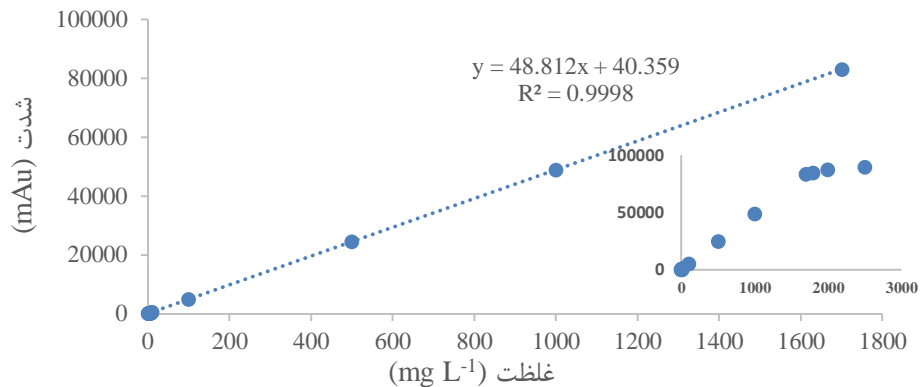
شکل (۲-۲۲): منحنی کالیبراسیون مستقیم سیتالوپرام. غلظت‌های مختلفی از آنالیت در حجم ۱/۰ mL در حلال ۱-
 آندکانول، ترکیب بافر فسفاتی با pH برابر ۵/۵ و استونیتریل با نسبت ۱:۱ به‌عنوان فاز متحرک،

سرعت جریان ۱/۰ میلی لیتر بر دقیقه در ۲۳۰ nm



شکل (۲-۲۳): منحنی کالیبراسیون مستقیم دیازپام. غلظت‌های مختلفی از آنالیت در حجم ۱/۰ mL در حلال ۱-
 آندکانول، ترکیب بافر فسفاتی با pH برابر ۵/۵ و استونیتریل با نسبت ۱:۱ به‌عنوان فاز متحرک،

سرعت جریان ۱/۰ میلی لیتر بر دقیقه در ۲۴۰ nm



شکل (۲-۲۴): منحنی کالیبراسیون مستقیم سرتالین. غلظت‌های مختلفی از آنالیت در حجم ۱/۰ mL در حلال ۱-

آندکانول، ترکیب بافر فسفاتی با pH برابر ۵/۵ و استونیتریل با نسبت ۱:۱ به‌عنوان فاز متحرک، سرعت جریان ۱/۰

میلی لیتر بر دقیقه در ۲۱۰ nm

۲-۵-۵ بررسی و بهینه‌سازی متغیرهای موثر در پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری سیتالوپرام، دیازپام

و سرتالین

در این پروژه، به‌منظور فراهم نمودن بهترین شرایط برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری سیتالوپرام، دیازپام و سرتالین، پارامترهای مؤثر بر میکرواستخراج این داروها، مورد بررسی قرار گرفتند. در بررسی فاکتورهای مهم، ابتدا از روش بهینه‌سازی یک متغیر در یک زمان، جهت تعیین سطوح متغیرهای مؤثر بر روش و سپس از طراحی پلاکت برمن جهت مشخص نمودن فاکتورهای مؤثر در استخراج استفاده شد. پس از مشخص شدن فاکتورهای مؤثر، از طراحی مرکب مرکزی مرکز وجوه پر (CCF) برای بهینه‌سازی فاکتورهای مؤثر بر استخراج استفاده شد. سطوح مورد بررسی و همچنین مقادیر بهینه بررسی یک متغیر در یک زمان در جدول ۲-۲۱ آورده شده است. همچنین نتایج کامل حاصل از بررسی‌های یک متغیر در زمان در پیوست ۲ آورده شده است.

جدول (۲-۲۱): نتایج حاصل از بهینه‌سازی یک متغیر در یک زمان در اندازه‌گیری سیتالوپرام، دیازپام و سرتالین

مقدار بهینه	محدوده مورد بررسی یا نوع فاکتور	فاکتور
۸/۰۰	۲/۰-۹/۰	pH
۱۰/۰ mL	۵/۰-۲۰/۰ mL	حجم محلول
فسفاتی	فتالاتی، سیتراتی، فسفاتی	نوع بافر
۲/۰ mL	۰/۵-۳/۵ mL	حجم بافر
۱-آندکانول	۱-آندکانول، ۱-دودکانول، ۱-دی کلرودکان	نوع حلال استخراج
۳۰/۰ μL	۱۵/۰-۱۰۰/۰ μL	حجم حلال استخراج
اتانول	استون-اتانول	نوع حلال پخش کننده
۱۰۰۰ μL	۵۰۰-۱۵۰۰ μL	حجم حلال پخش کننده
۱۰/۰ دقیقه	۱/۰-۲۰/۰ دقیقه	زمان استخراج
۰/۰۵ %	۰/۰-۱/۰ %	قدرت یونی (اثر نمک)

با توجه به تعداد فاکتورهای مورد بررسی، طراحی پلاکت برمن برای بررسی و تشخیص فاکتورهای مهم و تاثیرگذار بر پاسخ، انتخاب گردید. مقادیر بهینه مربوط به روش یک متغیر در زمان، برای فاکتورهای نوع و حجم بافر، حجم محلول و همچنین زمان سانتریفیوژ به دلیل تغییرات اندک سیگنال‌های تجزیه‌ای، انتخاب گردید. همچنین با استفاده از نتایج حاصل از روش بهینه‌سازی یک متغیر در یک زمان، سطوح بالا و پایین هر یک از فاکتورها مشخص گردید. سطوح انتخاب شده برای فاکتورها در جدول ۲-۲۲ آورده شده است.

جدول (۲-۲۲): تعیین سطح فاکتورهای موثر بر پیش تغلیظ و اندازه‌گیری سیتالوپرام، دیازپام و سرتالین

علامت	فاکتور	سطح بالا (+)	سطح پایین (-)
A	pH	۹/۰	۴/۰
B	نوع حلال استخراج	۱-آندکانول	۱۰ و ۱ دی کلرودکان
C	حجم حلال استخراج (μL)	۲۰۰/۰	۱۵/۰
D	نوع حلال پخش کننده	اتانول	استون
E	حجم حلال پخش کننده (μL)	۱۰۰۰/۰	۳۰۰/۰
F	زمان فراصوت (دقیقه)	۱۰	۱
G	اثر نمک (% W/V)	۰/۵	۰

۲-۵-۶ طراحی پلاکت برمن در اندازه‌گیری سیتالوپرام، دیازپام و سرتالین

برای طراحی آزمایش‌ها به منظور تعیین تاثیرگذارترین فاکتورها بر پیش تغلیظ و اندازه‌گیری سرتالین، سیتالوپرام و دیازپام، از نرم‌افزار Statgraphics 05 برای انجام طراحی پلاکت برمن و پردازش داده‌ها استفاده شد. با توجه به مطالبی که ذکر شد، تعداد آزمایش‌ها در طراحی پلاکت برمن هنگامی که ۷ فاکتور مورد بررسی باشد ۱۲ آزمایش خواهد بود. جدول ۲-۲۳ آزمایش‌های این طراحی را نشان می‌دهد.

برای به دست آوردن پاسخ در این طراحی، از پاسخ چندگانه^۱ (R_m) استفاده شده است [۹۸ و ۹۹]. برای مثال برای اولین آزمایش، پاسخ بصورت رابطه (۲-۱۷) محاسبه می‌گردد:

$$R_m = \frac{1053}{2765} + \frac{990}{1480} + \frac{973}{1452} = 1.95 \quad (2-17)$$

که در این رابطه، هر سیگنال بر بزرگترین سیگنال به دست آمده از هر آنالیت تقسیم می‌گردد.

¹ Multiple response

جدول (۲-۲۳): طراحی پلاکت برمن و نتایج به دست آمده از آن در اندازه گیری سیتالوپرام (CIT) ، دیازپام (DIZ) و

سرتالین (CIT)

ردیف	A	B	C	D	E	F	G	مساحت سطح زیر پیک			R _m
								CIT	DIZ	SER	
۱	+	+	-	+	-	-	-	۱۰۵۳	۹۹۰	۹۷۳	۱/۹۵
۲	-	+	+	-	-	+	-	۳۳۴	۲۹۷	۲۸۱	۰/۵۱
۳	-	-	-	+	-	+	+	۲۷۱	۲۶۵	۲۳۸	۰/۴۴
۴	-	-	-	-	-	-	-	۲۱۰	۱۹۷	۱۷۶	۰/۳۳
۵	+	-	+	+	-	-	+	۵۲۸	۴۷۶	۴۱۹	۰/۸۰
۶	-	+	+	+	+	-	+	۳۵۰	۳۴۷	۳۳۵	۰/۵۹
۷	-	+	-	-	+	-	+	۵۵۷	۵۲۷	۵۱۳	۰/۹۱
۸	+	+	+	-	-	+	+	۷۶۵	۷۲۱	۷۵۴	۱/۲۸
۹	+	+	-	+	+	+	-	۲۷۶۵	۱۴۸۰	۱۴۵۲	۳/۰۰
۱۰	-	-	+	+	+	+	-	۲۶۷	۲۴۴	۲۵۶	۰/۴۳
۱۱	+	-	+	-	+	-	-	۳۴۶	۳۳۲	۳۲۴	۰/۵۷
۱۲	+	-	-	-	+	+	+	۶۱۰	۵۹۱	۵۸۹	۱/۰۲

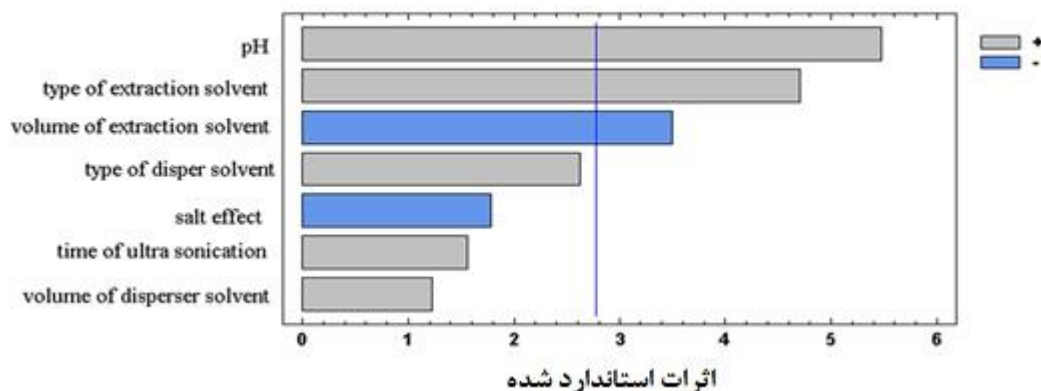
در ادامه نتایج به دست آمده توسط نرم افزار Statgraphics 05، مورد تحلیل قرار گرفته و فاکتورهای

موثر به ترتیب اهمیت مشخص می شوند. نتایج مربوط به ضرایب حاصل از طراحی پلاکت برمن در

جدول ۲-۲۴ نشان داده شده است.

جدول (۲-۲۴): جدول ضرایب حاصل از طراحی پلاکت برمن در اندازه گیری سیتالوپرام، دیازپام و سرتالین

فاکتور	اثر	ضریب
ثابت	۰/۹۸۵۸	۰/۰۰۷۶
A	۰/۹۰۱۶	۰/۱۸۰۳
B	۰/۷۷۵۰	۰/۱۸۰۳
C	-۰/۵۷۸۳	۰/۱۸۰۳
D	۰/۴۳۱۶	۰/۱۸۰۳
E	۰/۲۵۵۰	۰/۱۸۰۳
F	۰/۲۹۱۶	۰/۱۸۰۳
G	-۰/۲۰۱۶	۰/۱۸۰۳



شکل (۲-۲۵): نمودار پارتو حاصل از طراحی پلاکت برمن در اندازه‌گیری سیتالوپرام، دیازپام و سرتالین

بر اساس نتایج حاصل از مرحله غربالگری (شکل ۲-۲۵)، فاکتورهای pH، نوع و حجم حلال استخراج به عنوان فاکتورهای مهم و موثر بر پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری سیتالوپرام، دیازپام و سرتالین انتخاب شدند. در ادامه توسط طراحی مرکب مرکزی مرکز وجوه پر (CCF)، مقادیر بهینه این فاکتورهای مهم تعیین می‌شوند. در طراحی CCF هر فاکتور در سه سطح بالا، میانی و پایین مورد بررسی قرار می‌گیرد. این سطوح با توجه به نتایج حاصل از بهینه‌سازی تغییر یک متغیر در یک زمان، تعیین شد. در تمام آزمایش‌های انجام شده در طرح CCF، فاکتورهای غیر مهم ثابت در نظر گرفته شدند. مقادیر این فاکتورها با توجه به ضرایب آن‌ها در طراحی پلاکت برمن که در جدول ۲-۲۴ نشان داده شد، انتخاب شدند. برای متغیرهایی که دارای ضریب مثبت بودند از سطح بالای آن‌ها و برای متغیرهایی که دارای ضریب منفی بودند از سطح پایین آن‌ها در انجام آزمایش‌های طراحی شده استفاده شد. همچنین برای فاکتورهای نوع و حجم بافر، حجم محلول، زمان سانتریفیوژ از مقادیر بهینه حاصل از روش یک متغیر در یک زمان استفاده شد.

۲-۵-۷ تعیین شرایط بهینه فاکتورهای موثر به روش طراحی مرکب مرکزی مرکز وجوه پر در

اندازه گیری سیتالوپرام، دیازپام و سرتالین

برای طراحی آزمایش‌ها و نیز بررسی برهم‌کنش بین فاکتورهای مهم و همچنین برای تعیین مقدار بهینه این فاکتورها از نرم‌افزار Statgraphics 05 برای ایجاد آزمایش‌های طراحی مرکب مرکزی مرکز وجوه پر استفاده شد. سطوح به کار برده شده برای طراحی CCF، در جدول ۲-۲۵ نشان داده شده است. در طراحی CCF، تعداد آزمایش‌ها هنگامی که ۲ فاکتور با یک تکرار و ۳ نقطه مرکزی وجود دارد طبق رابطه (۱-۱۱)، برابر با ۱۱ آزمایش می‌باشد (جدول ۲-۲۶). همچنین پارامتر نوع نوع حلال استخراج به دلیل اینکه یک فاکتور کیفی می‌باشد، از سطح بالای آن در ادامه طراحی استفاده می‌شود و در طراحی CCF نمی‌آید. پارامترهای آماری برای طراحی CCF انجام شده برای پاسخ پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری سرتالین، سیتالوپرام و دیازپام در جدول ۲-۲۶ نشان داده شده است.

جدول (۲-۲۵): تعیین سطح فاکتورهای موثر بر پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری سیتالوپرام، دیازپام و سرتالین

علامت	فاکتور	سطح بالا (+)	سطح میانی (۰)	سطح پایین (-)
A	pH	۹/۰	۶/۵	۴/۰
C	حجم حلال استخراج (μL)	۲۰۰/۰	۱۰۷/۵	۱۵/۰

جدول (۲-۲۶): ماتریس طراحی CCF با ۲ فاکتور، ۳ نقطه مرکزی در اندازه‌گیری سیتالوپرام، دیازپام و سرتالین

ردیف	A	C	مساحت سطح زیر پیک			R _m
			CIT	DIZ	SER*	
۱	-	.	۳۶۲	۳۱۰	۲۹۷	۰/۰۵
۲	+	.	۱۶۷۲۱	۱۳۱۲۱	۱۵۴۳۱	۲/۴۸
۳	-	+	۲۸۵۰	۲۱۰۰	۳۳۱۰	۰/۴۵
۴	-	-	۴۲۵۶	۴۱۳۴	۴۵۰۰	۰/۷۱
۵	+	+	۴۱۰۰	۳۹۸۰	۴۳۱۰	۰/۶۸
۶	.	+	۳۱۰	۴۵۱	۳۲۵	۰/۰۶
۷	.	.	۱۲۱۵۰	۱۴۸۷۰	۱۷۵۴۲	۲/۴
۸	.	-	۱۴۳۶۵	۱۵۳۱۰	۱۸۳۸۷	۲/۶۸
۹	+	-	۱۸۱۰۰	۱۷۲۲۰	۱۹۴۰۰	۳/۰
۱۰	.	.	۱۲۱۵۰	۱۴۸۷۰	۱۷۵۴۲	۲/۴
۱۱	.	.	۱۲۱۵۰	۱۴۸۷۰	۱۷۵۴۲	۲/۴

* سطح زیر پیک کروماتوگرام

جدول (۲-۲۷): پارامترهای آماری برای طراحی CCF انجام شده برای پاسخ پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری سرتالین،

سیتالوپرام و دیازپام

فاکتور	اثر	ضریب	خطای استاندارد ضریب
میانگین	۱/۱۸۴۷	۱/۱۸۴۷	۰/۱۸۰۵
A	۱/۲۶۶۷	۰/۶۳۳۳	۰/۲۸۷۳
C	-۱/۶۶۳۳	-۰/۸۳۱۷	۰/۲۷۸۳
AA	-۰/۶۳۳۶	-۰/۳۱۶۸	۰/۴۴۲۱
AC	-۱/۰۳۵۰	-۰/۵۱۷۵	۰/۳۵۱۸
CC	۰/۵۱۶۳۱	-۰/۲۵۸۱	۰/۴۴۲۱

با استفاده از ضرایب داده شده در جدول ۲-۲۷ ساده‌ترین مدل برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری این آنالیت‌ها به صورت رابطه (۲-۱۸) پیشنهاد می‌شود.

$$R_m = 1/1184 + 0/633A - 0/831C - 0/3168A^2 - 0/5175AC - 0/258C^2 \quad (2-18)$$

مقدار R^2 در این روش نشان می‌دهد که ۹۲/۸۷٪ تغییرات در پاسخ می‌تواند توسط مدل توضیح داده شود و نیز مشخص می‌شود که بین نتایج تجربی و پیش‌بینی شده توافق خوبی وجود دارد. از آنجایی که در ضریب تعیین تعداد پارامترهای مدل در نظر گرفته نمی‌شود از ضریب تعیین تعدیل شده استفاده می‌شود. همچنین میزان ضریب تعیین تعدیل شده (R^2_{adj})^۱ برای مدل ارائه شده، ۸۵/۵۷٪ به دست آمده است. نتایج تجربی حاصل از انجام آزمایش‌های طراحی شده، به وسیله روش ANOVA مورد تجزیه و بررسی قرار گرفتند که نتایج آن در جدول ۲-۲۸ نشان داده شده است.

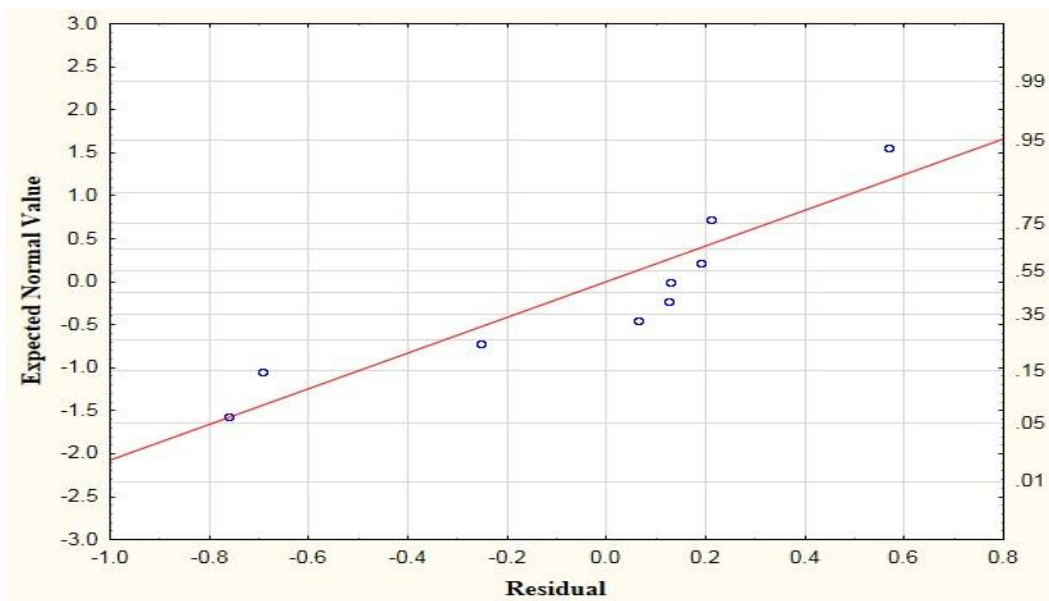
جدول (۲-۲۸): تحلیل واریانس برای مدل پیشنهادی مربوط به پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری سیتالوپرام، دیازپام و سرتالین

منبع	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	آماره F	آماره t
A	۴/۰۰۱۷	۱	۴/۰۰۱۷	۱۲/۱۱	۰/۰۱۷۶
C	۴/۴۸۹۳	۱	۴/۴۸۹۳	۱۳/۵۸	۰/۰۱۴۲
AA	۱۰/۰۰۵۴	۱	۱۰/۰۰۵۴	۳/۰۴	۰/۱۴۱۰
AC	۱/۰۷۱۲	۱	۰/۱۳۱۶	۱/۰۷۱۲	۳/۲۴
CC	۰/۴۶۶۱	۱	۰/۲۲۰۸	۰/۴۶۶۱	۱/۹۵
Lack of fit	۰/۶۱۹۱	۳	۰/۳۲۹۰	۰/۲۰۶۴	۱/۹۹
Total error	۱/۶۵۱۹	۵	۰/۰۰۲۴		
total	۸/۵۸۳۶	۱۰			

همانگونه که نتایج نشان می‌دهد (جدول ۲-۲۷ و ۲-۲۸) pH و حجم حلال استخراج بالاترین اثر را روی بازده استخراج دارد. همچنین برهمکنش بین حلال استخراج و pH نیز دارای اثر منفی بر بازده

^۱ Adjusted Determination Coefficient

استخراج هستند. با توجه ساختار این ترکیبات [۹، ۱۷ و ۱۹]، این داروها، در محیط‌های قلیایی به دلیل عدم توازن در توزیع بار، امکان ورود این داروها به فاز آلی وجود ندارد و میزان بازده استخراج کاهش می‌یابد. از طرف دیگر در pHهای پایین هم احتمال پروتونه شدن ترکیب وجود دارد، در نتیجه تشکیل یون می‌دهند که منجر به کاهش بازده استخراج می‌شود. بنابراین با در نظر گرفتن برهم کنش‌های بین فاکتورهای موثر بر بازده استخراج در CCF، $pH=8/53$ به عنوان pH بهینه انتخاب شد. همچنین حجم حلال استخراج نقش مهمی در افزایش کارایی استخراج دارد. با افزایش حجم حلال استخراج از μL ۱۵/۰ تا ۳۰/۰، با توجه به ثابت بودن حجم فاز آبی، امکان تماس دو فاز بیشتر شده و لذا سیگنال تجزیه‌ای به تدریج افزایش می‌یابد. اما علت کاهش سیگنال تجزیه‌ای در حجم‌های بالاتر به این دلیل است که احتمالاً مقدار آنالیت استخراج شده تغییر نکرده و با توجه به افزایش حجم حلال آلی، نمونه رقیق شده و سیگنال تجزیه‌ای کاهش می‌یابد. اما به دلیل ماهیت نوع آنالیت‌های مطالعه شده، به راحتی درون حلال آلی استخراج می‌شوند. جدول ۲-۲۹ شرایط بهینه به دست آمده توسط روش‌های یک متغیر در یک زمان و طراحی آزمایش برای پاسخ پیش تغلیظ و اندازه‌گیری همزمان سیتالوپرام و دیازپام و سرتالین را نشان می‌دهد. نمودار مربوط به توزیع باقی‌مانده‌ها و بررسی نرمال بودن این توزیع در شکل (۲-۲۵) نشان داده شده است که مقدار پاسخ پیش بینی شده توسط طراحی در مقابل مقدار باقیمانده (که تفاوت میان مقدار واقعی و مقدار پیش بینی شده می‌باشد) رسم شده است. این شکل نشان می‌دهد توزیع باقی‌مانده‌ها نرمال است. قابل ذکر است که معمولاً مقادیر به دست آمده از مدل با مقادیر واقعی یکسان نبوده و مقدار باقیمانده را ایجاد می‌کند. به عبارت دیگر، مقادیر باقی‌مانده از اختلاف مقدار واقعی و مقدار پیش بینی شده پاسخ به دست می‌آید که در نمودار احتمال نرمال ترسیم شده است. برای آزمایش‌های آماری، باقیمانده‌ها به صورت توزیع نرمال و غیر وابسته هستند و واریانس خطا ثابت فرض می‌شود. اگر باقی‌مانده‌ها به طور نرمال توزیع شوند، همه آن‌ها به طور اختصاصی در این صفحه روی خط می‌افتند. در شکل (۲-۲۶) انحرافات از نمودار خطی خیلی کم بوده که این نرمال بودن فرضیه‌ها را اثبات می‌کند. برای الگوهای غیرخطی فرم S شکل مشاهده می‌شود.



شکل (۲-۲۶): نمودار احتمال نرمال برای پاسخ پیش تغلیظ و اندازه گیری سیتالوپرام، دیازپام و سرتالین

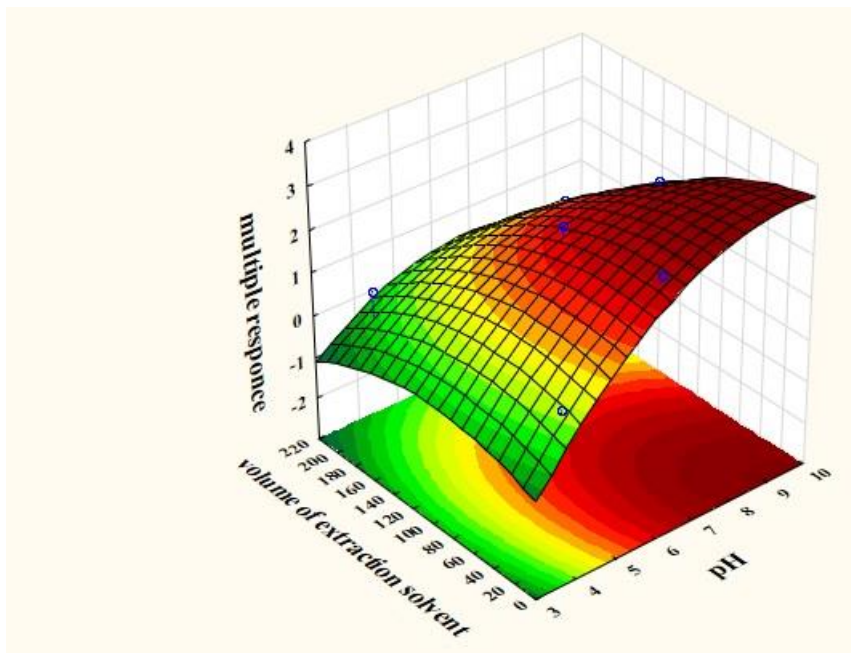
جدول (۲-۲۹): مقایسه شرایط بهینه به دست آمده توسط روش‌های یک متغیر در یک زمان و طراحی آزمایش در

اندازه گیری سیتالوپرام، دیازپام و سرتالین

مقادیر بهینه طراحی CCF	مقادیر بهینه یک متغیر در یک زمان	فاکتور
۸/۵۳	۸/۰	pH
۱-آندکانول	۱-آندکانول	نوع حلال استخراج
۳۰/۰ μL	۲۵/۰ μL	حجم حلال استخراج
اتانول	اتانول	نوع حلال پخش کننده
۱۰۰۰ μL	۹۰۰ μL	حجم حلال پخش کننده
۱۰ دقیقه	۱۰ دقیقه	زمان استخراج
۰	۰/۰۵	قدرت یونی (درصد وزنی-حجمی)
۵۹۲۹/۰	۵۲۷۸/۰	میانگین سیگنال تجزیه‌ای (سطح زیر پیک کروماتوگرام)

از منحنی‌های سه بعدی رویه پاسخ برای نشان دادن رابطه و برهم‌کنش بین متغیرها و نیز اثر این متغیرها روی پاسخ استفاده می‌شود. هر منحنی رویه پاسخ، اثر دو متغیر مستقل را نشان می‌دهد در حالی که سایر متغیرها در سطح صفر (سطح میانی) ثابت نگه داشته می‌شوند (شکل ۲-۲۷). بر اساس

نمودار رویه پاسخ مدل مربوطه، در مقدار میانی pH، با افزایش مقدار حجم حلال استخراج تا ۳۰/۰ میکرولیتر مقدار پاسخ افزایش یافته و پس از آن میزان پاسخ تا حدودی کم می‌گردد که به دلیل کاهش غلظت دارو در فاز آلی و به دلیل افزایش حجم حلال استخراج می‌باشد. همچنین با افزایش مقدار pH تا ۸/۵۳ پاسخ افزایش یافته و پس از آن ثابت می‌شود. بنابراین مقدار pH ۸/۵۳ به عنوان مقدار بهینه انتخاب گردید.

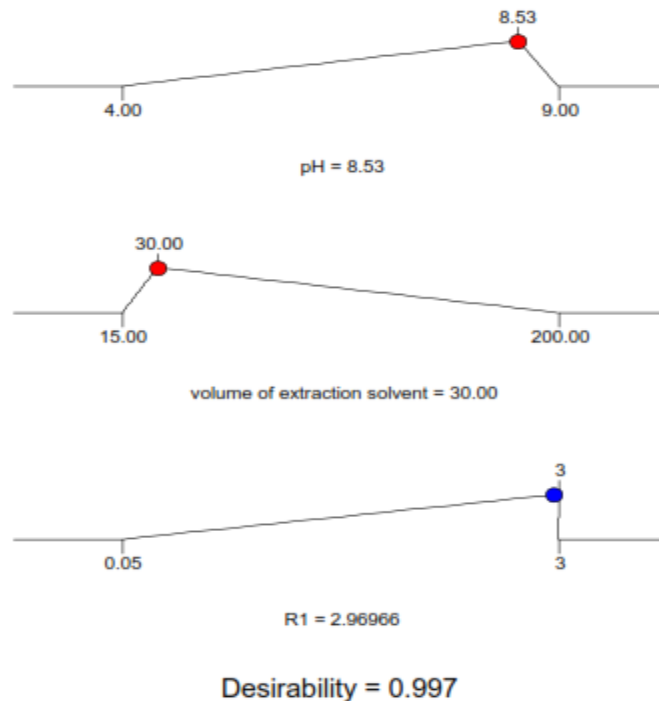


شکل (۲-۲۷): منحنی رویه پاسخ پیش تغلیظ و اندازه‌گیری سیتالوپرام، دیازپام و سرتالین در مقابل pH (A) و حجم حلال استخراج (C)

پروفایل مقدار پیش بینی شده و مطلوبیت در نرم افزار دیزاین اکسپرت ۱۰۷ برای بهینه سازی فرایند استفاده شد. تابع مطلوبیت پاسخ شامل تعیین تابع مطلوبیت برای هر متغیر وابسته به وسیله تعیین مقدار پیش بینی شده در گستره صفر تا یک رسم گردید. مطلوبیت یک برای حداکثر پاسخ و مطلوبیت صفر برای حداقل پاسخ و ۰/۵ برای حالت حدواسط بیان شده است. در شکل ۲-۲۸ مقادیر بهینه هر

¹Design expert 07

فاکتور مهم که از طراحی CCF به دست آمده است و درجه مطلوبیت آن نشان داده شده است. این تصاویر به طور اجمالی نشان می دهد که چگونه تغییرات در سطح هر متغیر، پاسخ و همچنین مطلوبیت کلی پاسخ ها را تغییر می دهد. براساس این محاسبات و درجه مطلوبیت ۰/۹۹۷ و ۲/۹۶ Rm ، شرایط بهینه مطلوب (جدول ۲-۲۹) به دست آمد.



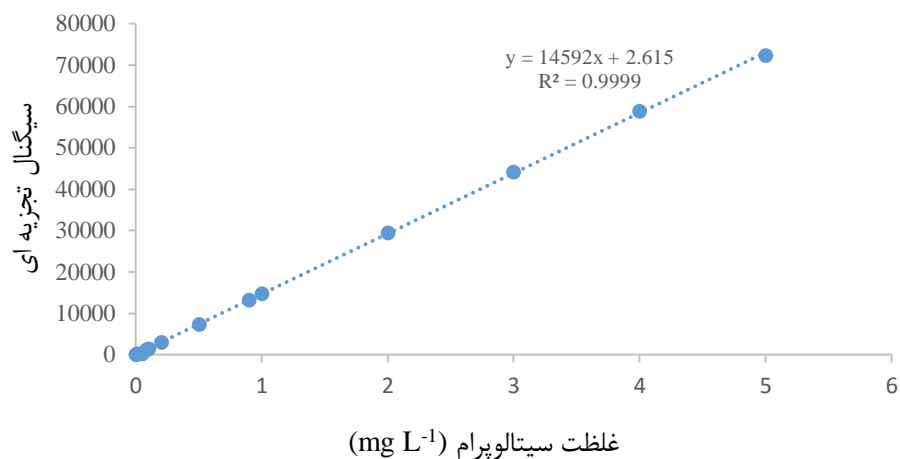
شکل (۲-۲۸): پروفایل مطلوبیت برای طراحی CCF در اندازه گیری همزمان سیتالوپرام، دیازپام و سرتالین

۲-۵-۸ رسم منحنی های کالیبراسیون پیش تغلیظ در اندازه گیری سیتالوپرام، دیازپام و

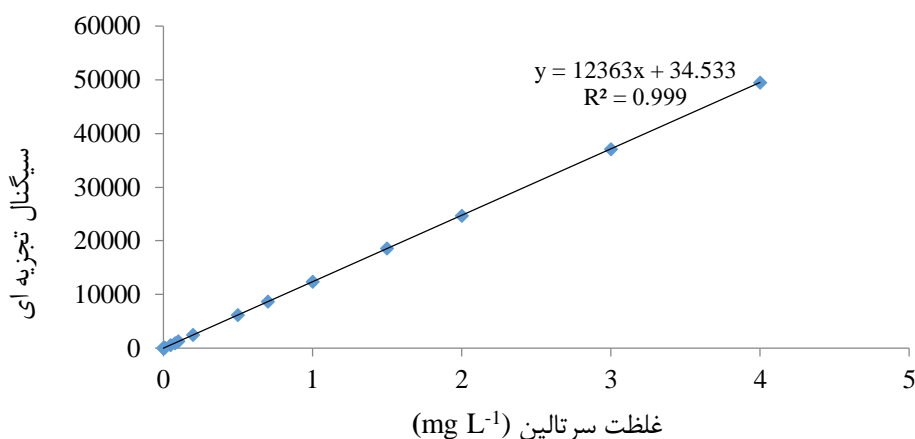
سرتالین

به منظور رسم منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ، محلول های نمونه با غلظت های متفاوت از هر آنالیت تهیه و تحت شرایط بهینه مورد آزمایش قرار گرفت که نتایج آن در جدول (۲-۳۰) نشان داده شده است. روش کار به این صورت است که در یک لوله آزمایش غلظت های مختلف هر یک از داروها

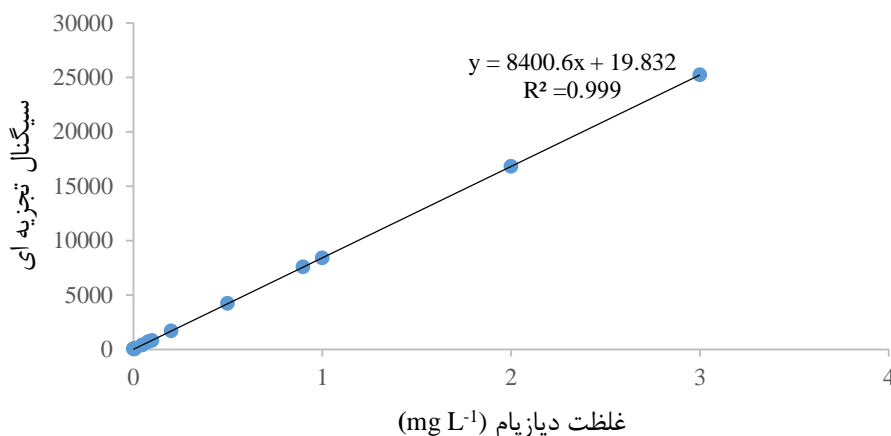
در گستره غلظتی $0.0006-6/0 \text{ mg L}^{-1}$ برای سیتالوپرام، $0.0008-5/0 \text{ mg L}^{-1}$ برای دیازپام و $0.0008-5/0 \text{ mg L}^{-1}$ برای سرتالین و $2/0 \text{ mL}$ بافر فسفاتی با $8/53 \text{ pH}$ و توسط آب مقطر به حجم نهایی $10/0 \text{ mL}$ رسانده شد. سپس مخلوط همگنی شامل $1000 \mu\text{L}$ اتانول $30 \mu\text{L}$ از ۱-آندکانول توسط سرنگ به سرعت به نمونه آبی تزریق گردید. در نتیجه، محلول کدر یا ابری (حاوی محلول آبی، حلال آلی استخراج کننده و حلال آلی پخش کننده) تشکیل می شود که این کدورت به علت پخش ذرات ریز حلال استخراج کننده به درون محلول آبی می باشد. در مرحله بعد لوله آزمایش به مدت ۱۰ دقیقه در حمام فراصوت با قدرت 60 kHz قرار داده شد. سپس به منظور جداسازی بهتر دو فاز، لوله آزمایش در دستگاه سانتریفیوژ با سرعت 3000 دور بر دقیقه قرار گرفت. پس از اتمام عمل استخراج، لوله آزمایش به حمام یخ منتقل گردید و بعد از گذشت حدود ۲۰ دقیقه، قطره آلی منجمد، در سطح محلول تشکیل گردید. سپس قطره آلی منجمد شده توسط اسپاتول به یک ویال منتقل و به دستگاه HPLC تزریق شد.



شکل (۲-۲۹): منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ سیتالوپرام. غلظت های مختلفی از آنالیت در شرایط بهینه، ترکیب فاز متحرک: بافر فسفاتی با $5/5 \text{ pH}$ و استونیتریل با نسبت ۱:۱ به عنوان فاز متحرک، سرعت جریان $1/0$ میلی لیتر بر دقیقه در 230 nm .



شکل (۲-۳۰): منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ سرتالین. غلظت‌های مختلفی از آنالیت در شرایط بهینه، ترکیب فاز متحرک: بافر فسفات‌ی با pH برابر ۵/۵ و استونیتریل با نسبت ۱:۱ به‌عنوان فاز متحرک، سرعت جریان ۱/۰ میلی لیتر بر دقیقه در ۲۳۰ nm



شکل (۲-۳۱): منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ دیازپام. غلظت‌های مختلفی از آنالیت در شرایط بهینه، ترکیب فاز متحرک: بافر فسفات‌ی با pH برابر ۵/۵ و استونیتریل با نسبت ۱:۱ به‌عنوان فاز متحرک، سرعت جریان ۱/۰ میلی لیتر بر دقیقه در ۲۳۰ nm.

با توجه به نتایج شکل‌های (۲-۲۹) تا (۲-۳۱)، دامنه خطی منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ برای سیتالوپرام در محدوده غلظتی ۵/۰-۰/۰۱۳ mg L⁻¹ با ضریب تعیین $R^2=0/9998$ ، برای دیازپام در محدوده غلظتی ۴/۰-۰/۰۲۷ mg L⁻¹ با ضریب تعیین $R^2=0/9999$ و برای سرتالین در محدوده غلظتی ۴/۰-۰/۰۱۲ mg L⁻¹ با ضریب تعیین $R^2=0/9999$ می‌باشد.

۹-۵-۲ بررسی اثر گونه‌های مزاحم در اندازه‌گیری سیتالوپرام، دیازپام و سرتالین

به منظور بررسی قابلیت کاربرد روش میکرواستخراج مایع پخشی پخشی مبتنی بر انجماد قطره آلی شناور توسط امولسیون‌سازی با امواج فراصوت، در نمونه‌های حقیقی، اثر مزاحمت‌های احتمالی در پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری سیتالوپرام، دیازپام و سرتالین مورد بررسی قرار گرفت.

جدول (۲-۳۰): نتایج حاصل از بررسی اثر گونه‌های مزاحم در پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری سیتالوپرام

نسبت غلظت گونه به غلظت (درصد وزنی-وزنی)	گونه‌های مورد بررسی
۱۰۰۰	نیکوتین آمید، گلوکز، متیونین، میدازولام و نیترازپام
۴۰۰	لاکتوز، آلانین، ویتامین B1
۳۰۰	تیواوره، ویتامین B6

جدول (۲-۳۱): نتایج حاصل از بررسی اثر گونه‌های مزاحم در پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری دیازپام

نسبت غلظت گونه به غلظت (درصد وزنی-وزنی)	گونه‌های مورد بررسی
۱۰۰۰	نیکوتین آمید، گلوکز، متیونین، میدازولام و نیترازپام
۴۰۰	لاکتوز، آلانین، ویتامین B6، ویتامین B1
۳۰۰	تیواوره و کلرودیازوپوکساید

جدول (۲-۳۲): نتایج حاصل از بررسی اثر گونه‌های مزاحم در پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری سرتالین

نسبت غلظت گونه به غلظت (درصد وزنی-وزنی)	گونه‌های مورد بررسی
۱۰۰۰	نیکوتین آمید، گلوکز، متیونین،
۴۰۰	لاکتوز، آلانین
۳۰۰	ویتامین B1، ویتامین B6، تیواوره

با توجه به نتایج جدول (۲-۳۰)، (۲-۳۱) و (۲-۳۲) مشخص گردید که بسیاری از گونه‌های مورد بررسی، در پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری سیتالوپرام، دیازپام و سرتالین ایجاد مزاحمت نمی‌کنند.

۲-۵-۱۰ ارقام شایستگی روش در اندازه‌گیری سیتالوپرام، دیازپام و سرتالین

مطابق توضیحات ارائه شده در قسمت ۲-۴-۱۰، حد اندازه‌گیری روش برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری سیتالوپرام، دیازپام و سرتالین به ترتیب $1/3$ ، $2/7$ و $1/2$ به دست آمد. همچنین حد تشخیص روش برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری سیتالوپرام، دیازپام و سرتالین به ترتیب $0/4$ ، $0/8$ و $0/4$ به دست آمد.

نتایج مربوط به دقت در جداول (۲-۳۳)، (۲-۳۴) و (۲-۳۵) آمده است. مقادیر t و درصد انحراف نسبی به ترتیب نشان دهنده صحت و دقت خوب روش است (در سطح اطمینان ۹۵٪ مقدار t بحرانی برای ۲ درجه آزادی برابر ۴/۳۰ است).

جدول (۲-۳۳): نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت روش برای سیتالوپرام

درصد بازیابی	مقدار t	RSD%	سیتالوپرام اندازه‌گیری شده (mg L^{-1}) \pm SD*	سیتالوپرام موجود در محلول آبی (mg L^{-1})
۱۰۴/۰	۱/۷۳	۳/۸	$0/104 \pm 0/004$	۰/۱۰۰
۹۹/۲	۲/۲۲	۱/۵	$0/491 \pm 0/007$	۰/۵۰۰
۱۰۱/۲	۱/۴۸	۱/۴	$1/012 \pm 0/014$	۱/۰۰۰

*Standard deviation (سه اندازه‌گیری)

$t_{\text{critical}}=4.30$ (95% confidence interval)

جدول (۲-۳۴): نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت روش برای دیازپام

درصد بازیابی	مقدار t	RSD%	دیازپام اندازه‌گیری شده (mg L^{-1}) \pm SD*	دیازپام موجود در محلول آبی (mg L^{-1})
۹۸/۰	۱/۷۰	۲/۰۴	$0/098 \pm 0/002$	۰/۱۰۰۰
۱۰۰/۶	۰/۵۸	۱/۷۸	$0/503 \pm 0/009$	۰/۵۰۰۰
۱۰۱/۰	۰/۵۶	۳/۰۶	$1/01 \pm 0/03$	۱/۰۰۰

*Standard deviation (سه اندازه‌گیری)

$t_{\text{critical}}=4.30$ (95% confidence interval)

جدول (۲-۳۵): نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت روش برای سرتالین

درصد بازیابی	مقدار t	RSD%	سرتالین اندازه گیری شده (mg L ⁻¹) ± SD*	سرتالین موجود در محلول آبی (mg L ⁻¹)
۱۰۳/۰	۱/۷۰	۲/۹۱	۰/۱۰۳ ± ۰/۰۰۳	۰/۱۰۰
۹۹/۲	۰/۶۲	۲/۲۱	۰/۴۹۶ ± ۰/۰۱۱	۰/۵۰۰
۱۰۳/۰	۲/۵۷	۱/۹۸	۱/۰۳ ± ۰/۰۲	۱/۰۰

*Standard deviation (سه اندازه گیری)
t_{critical}=4.30 (95% confidence interval)

فاکتور پیش تغلیظ (PF)، که به صورت نسبت شیب منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ بر شیب منحنی کالیبراسیون مستقیم تعریف می شود، برای سیتالوپرام، دیازپام و سرتالین به ترتیب ۲۳۶، ۲۹۷ و ۲۵۳ با درصد بازیابی میانگین ۷۹٪ به دست آمد. قابل ذکر است که حجم قطره آلی جمع آوری شده در حدود ۳۰ μL بوده است.

۲-۵-۱۱ اندازه گیری سیتالوپرام، دیازپام و سرتالین در نمونه های حقیقی

به منظور بررسی توانایی روش پیشنهادی، در اندازه گیری سیتالوپرام، دیازپام و سرتالین در نمونه های حقیقی با بافت های متفاوت، از این روش برای پیش تغلیظ و اندازه گیری سیتالوپرام، دیازپام و سرتالین در نمونه های قرص، ادرار و سرم خون استفاده شد.

برای این منظور، ابتدا ۳ عدد قرص پودر و در هاون عقیق همگن گردید. سپس یک سوم مقدار پودر شده در بالن حجمی ۲۵۰ mL با متانول حل و به حجم رسانیده شد. در این مرحله ۱ mL از این محلول در بالن حجمی ۱۰۰ mL با آب مقطر به حجم رسانده شد. سپس به یک میلی لیتر از این محلول حجم های مشخص و متفاوتی از نمونه استاندارد داروی مورد نظر اضافه و به حجم نهایی ۱۰ mL رسانده و تحت شرایط بهینه به دست آمده مورد اندازه گیری قرار گرفت. بنابراین، ابتدا به محلول حاوی یک میلی لیتر نمونه قرص، هیچ ماده ای استاندارد اضافه نشد و طبق شرایط بهینه شده و در حجم ۱۰ mL عمل استخراج انجام و سیگنال تجزیه ای به دست آمد. در مراحل بعدی، به ترتیب ۰/۱، ۰/۵ و ۱/۰ از محلول استاندارد ۱۰/۰ mg L⁻¹ داروی مورد نظر به محلول نمونه اضافه و پس از انجام پیش تغلیظ

در شرایط بهینه، سیگنال تجزیه‌ای محاسبه و با استفاده از منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ، غلظت آن تعیین شد. هر اندازه‌گیری ۳ بار تکرار گردید که نتایج آن در جدول (۲-۳۶) و شکل‌های (۲-۳۲)، (۲-۳۳) و (۲-۳۴) آمده است.

نحوه آماده سازی سرم به این صورت بود که ابتدا ۱/۲ mL استونیتریل به ۲/۰ mL 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. سپس محلول رویی آن جدا و به بالن حجمی ۲۵/۰ میلی‌لیتری منتقل گردید. سپس یک میلی‌لیتر از این محلول به لوله آزمایش ۱۰/۰ mL انتقال داده شد و آنالیز نمونه در چهار غلظت متفاوت از استاندارد داروهای سیتالوپرام، دیازپام و سرتالین استاندارد در گستره خطی هر یک از داروها در حجم کلی ۱۰/۰ mL، با استفاده از منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ انجام گردید که نتایج آن در جدول (۲-۳۷) و شکل ۲-۳۵ آورده شده است.

برای آماده سازی ادرار ۲/۰ mL ادرار با ۰/۵ mL استونیتریل در یک لوله آزمایش ۱۰/۰ mL مخلوط گردید. پس از سانتریفیوژ با سرعت ۴۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه، محلول رویی با آب مقطر به حجم نهایی ۱۰/۰ mL رسانده شد و سپس با روش افزایش استاندارد و با استفاده از منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ، مورد آنالیز قرار گرفت که نتایج مربوط به نمونه ادرار مربوط به فرد سالم و فرد بیماری که داروهای مورد نظر را مصرف می‌کند، در جدول (۲-۳۷) و شکل ۲-۳۶ آورده شده است.

جدول (۲-۳۶): نتایج اندازه‌گیری سیتالوپرام و دیازپام و سرتالین در نمونه‌های قرص

آنالیت	غلظت اضافه شده ($\mu\text{g L}^{-1}$)	غلظت اندازه‌گیری شده ($\mu\text{g L}^{-1}$)	RSD (%) (n=3)	درصد بازیابی	میلی گرم قرص
سیتالوپرام	۰	۲۰۰۰/۰	۳/۱۱	-	
	۵۰۰/۰	۲۵۳۰/۰	۱/۱۰	۱۰۶/۰۰	*۵۰۰/۰۰
	۱۰۰۰/۰	۳۰۵۰/۰	۲/۲۱	۱۰۵/۰۰	
دیازپام	۰	۲۰/۰	۲/۲۱	-	
	۵۰۰/۰	۵۷۸/۰	۴/۱۱	۱۱۱/۶۰	**۵/۰۰
	۱۰۰۰/۰	۱۰۱۰/۰	۱/۶۱	۹۹/۰۰	
سرتالین	۰	۷۰/۰	۱/۸۳	-	
	۵۰۰/۰	۵۷۰/۰	۲/۱۰	۹۹/۸۴	***۱۷/۵
	۱۰۰۰/۰	۱۰۶۱/۰	۱/۲۵	۹۸/۸۲	

*مقدار برچسب روی قرص سیتالوپرام بر حسب میلی‌گرم = ۵۰۰ میلی‌گرم

**مقدار برچسب روی قرص دیازپام بر حسب میلی‌گرم = ۵ میلی‌گرم

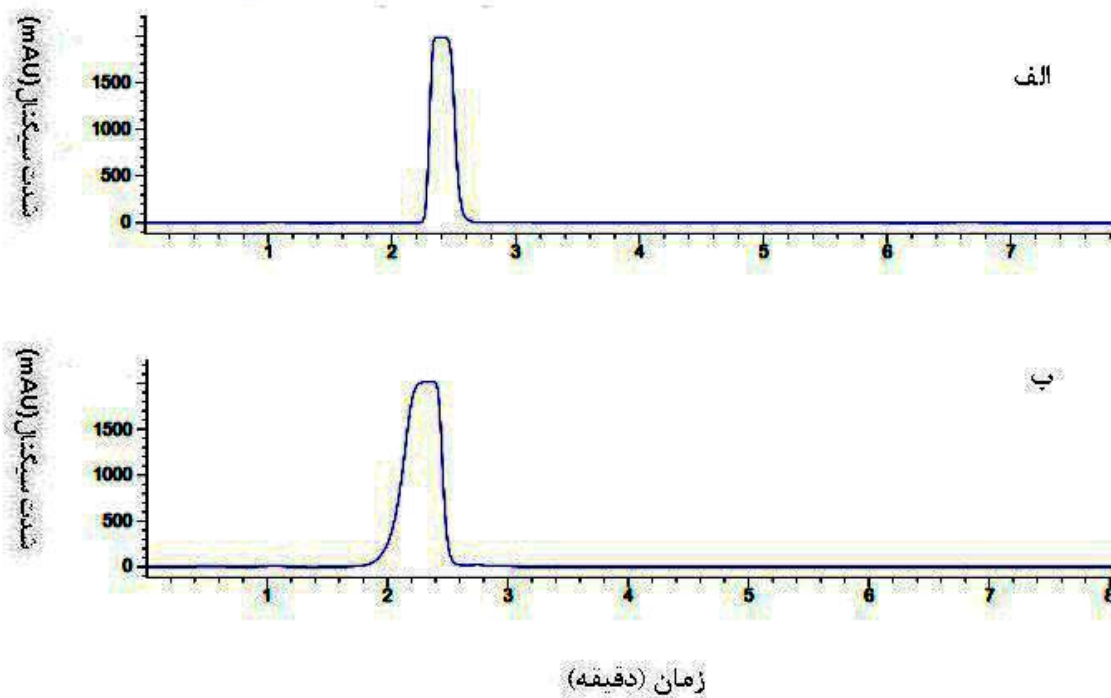
***مقدار برچسب روی قرص سرتالین بر حسب میلی‌گرم = ۲۰ میلی‌گرم

جدول (۲-۳۷): نمونه‌های حقیقی سرم و ادرار برای اندازه‌گیری سیتالوپرام و دیازپام و سرتالین

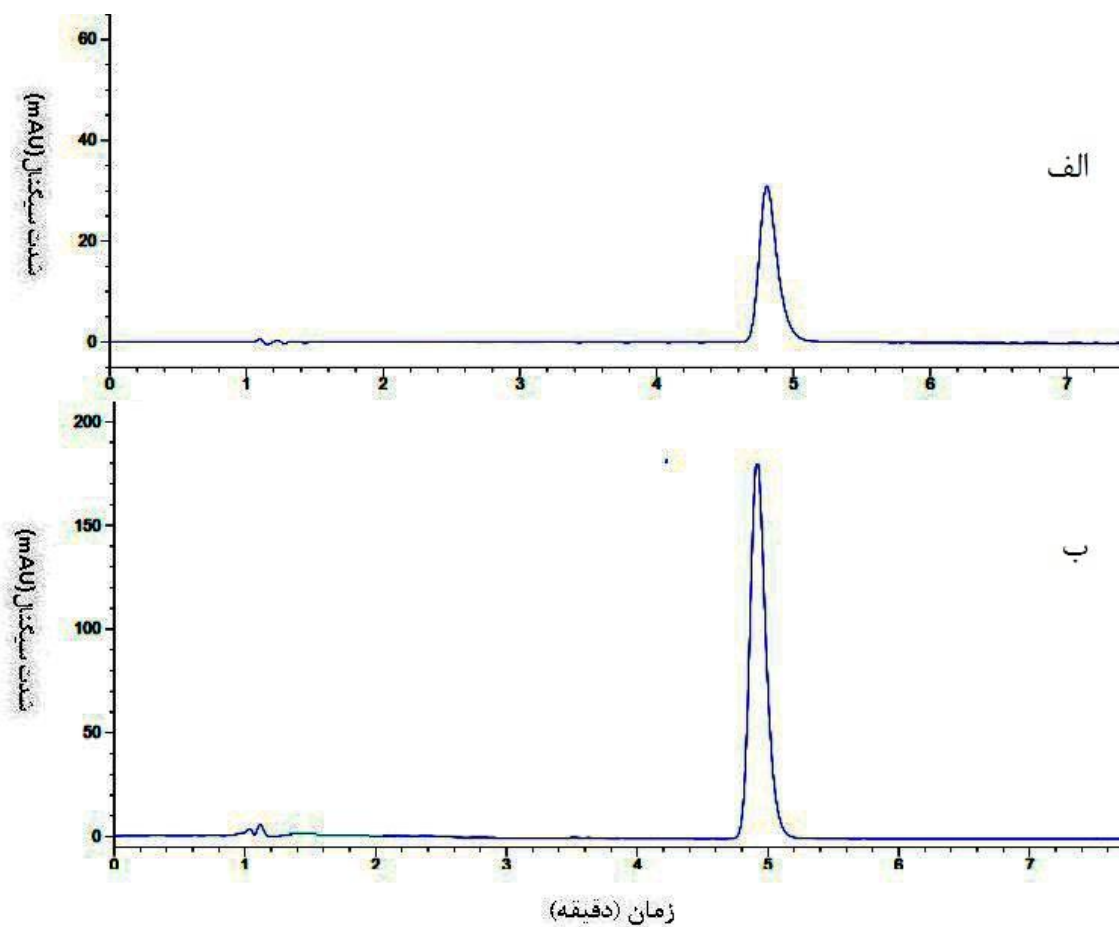
آنالیت	غلظت اضافه شده ($\mu\text{g L}^{-1}$)	غلظت اندازه‌گیری شده ($\mu\text{g L}^{-1}$)	RSD (%) (n=3)	درصد بازیابی
نمونه سرم				
سیتالوپرام	۰	-	-	-
	۵/۰۰	۵/۰۴	۱/۶۰	۱۰۰/۸۰
	۲۰/۰۰	۱۹/۱۰	۲/۵۰	۹۵/۵۰
	۲۵/۰۰	۲۴/۸۴	۲/۶۰	۹۹/۳۶
دیازپام	۰	-	-	-
	۵/۰۰	۴/۹۸	۱/۲۰	۹۹/۶۰
	۲۰/۰۰	۲۰/۱۷	۳/۵۰	۱۰۰/۸۰
	۲۵/۰۰	۲۶/۰۲	۱/۸۰	۱۰۴/۱۰
سرتالین	۰	-	-	-
	۵/۰۰	۴/۹۹	۱/۴۰	۹۹/۹۰
	۲۰/۰۰	۲۰/۲۰	۱/۵۰	۱۰۱/۰۰
	۲۵/۰۰	۲۶/۷۱	۲/۳۳	۱۰۶/۸۴
سرتالین	۴۰/۰۰	۴۱/۵۴	۳/۲۱	۱۰۳/۸۵

نمونه ادرار (اسپایک شده)

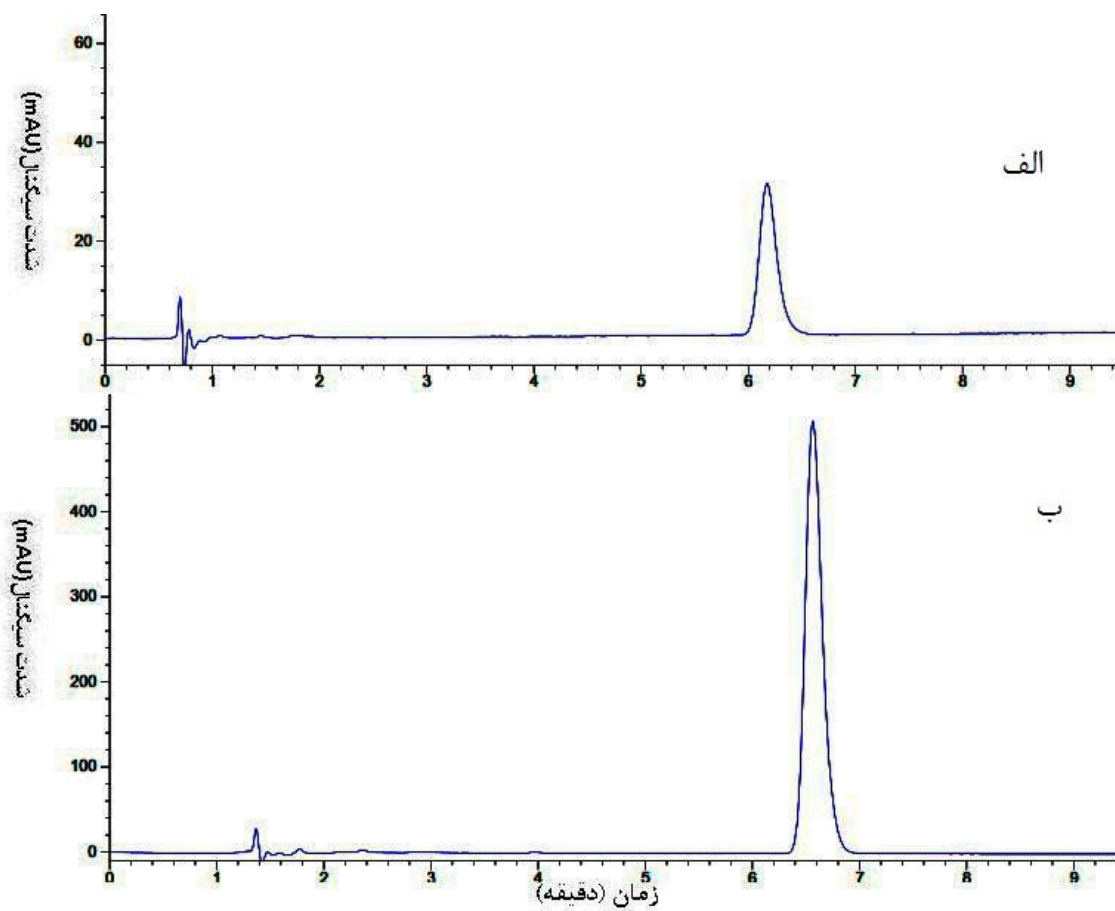
	*	-	-	-
	۵/۰۰	۵/۱۷	۴/۵۰	۱۰۳/۵۰
سیتالوپرام	۲۰/۰۰	۲۰/۸۳	۱/۶۴	۱۰۴/۱۵
	۲۵/۰۰	۱۹/۹۰	۳/۹۸	۹۹/۵۰
	۴۰/۰۰	۳۹/۲۲	۲/۷۰	۹۸/۰۵
	*	-	-	-
	۵/۰۰	۴/۹۶۰	۱/۹	۹۹/۱۶
دیازپام	۲۰/۰۰	۱۹/۸۲	۲/۳۰	۹۹/۱۰
	۲۵/۰۰	۲۵/۱۳	۲/۲۰	۱۰۰/۵۲
	۴۰/۰۰	۴۰/۱۱	۲/۱۲	۱۰۰/۳۰
	*	-	-	-
	۵/۰۰	۵/۳۴	۳/۷۰	۱۰۶/۸۰
سرتالین	۲۰/۰۰	۲۰/۱۹	۲/۵۰	۱۰۰/۹۵
	۲۵/۰۰	۲۴/۵۴	۱/۸۷	۹۸/۱۶
	۴۰/۰	۴۱/۰۵	۳/۱۲	۱۰۲/۶۵
نمونه ادرار (بیمار)				
	*	۱/۴۰۰	۲/۱۰	-
سیتالوپرام	۵/۰۰	۶/۴۰	۳/۹۰	۱۰۰/۰۰
	۱۰/۰۰	۱۱/۷۰	۳/۴۰	۱۰۳/۰۰
	۱۵/۰۰	۱۵/۵۳	۳/۵۰	۹۴/۲۰
	*	۱۶/۰۰	۲/۵۰	-
دیازپام	۵/۰۰	۲۰/۸۰	۵/۶۰	۹۶/۰۰
	۱۰/۰۰	۲۴/۵۰	۲/۷۰	۸۵/۰۰
	۱۵/۰۰	۳۰/۳۴	۳/۱۲	۹۵/۶۰
	*	-	-	-
سرتالین	۵/۰۰	۵/۲۰	۳/۵۰	۱۰۴/۰۰
	۱۰/۰۰	۱۰/۱۰	۴/۴۰	۱۱۰/۱۰
	۱۵/۰۰	۱۵/۲۵	۳/۸۱	۱۰۱/۶۶



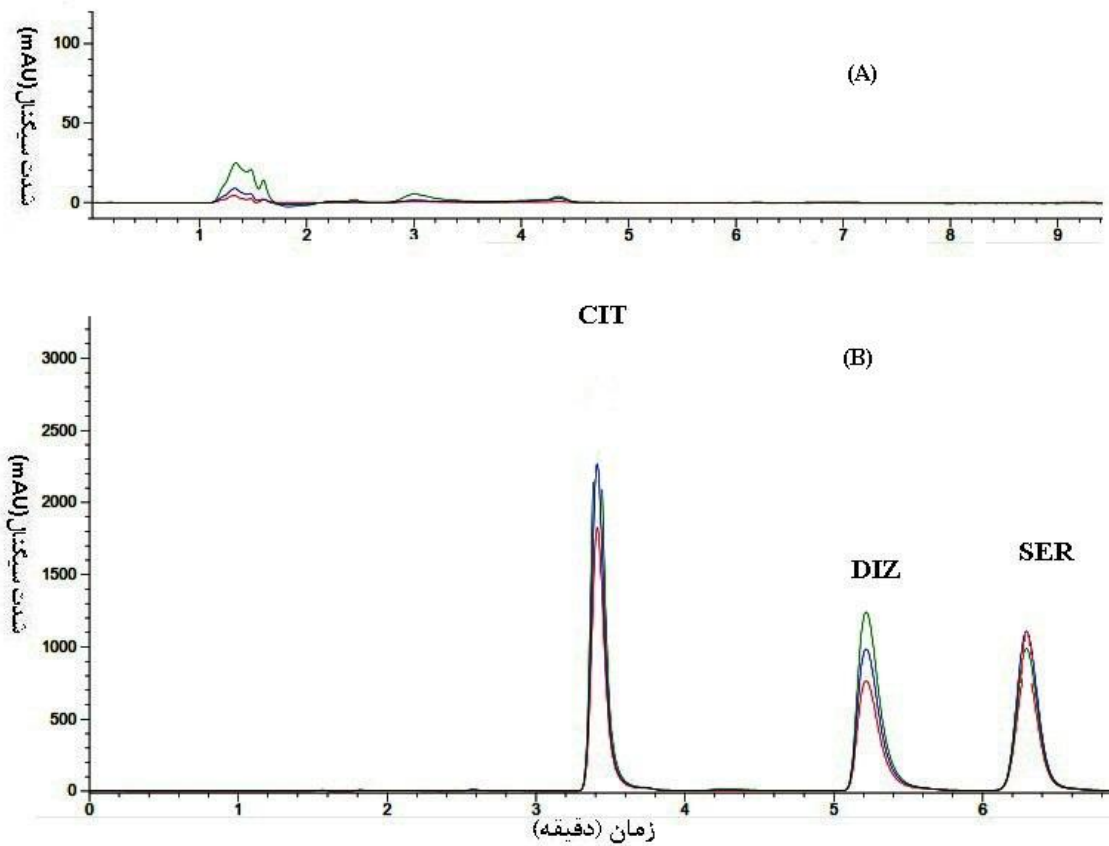
شکل (۲-۳۲): کروماتوگرام (الف): کروماتوگرام حاصل از نمونه قرص سیتالوپرام قبل از اسپایک استاندارد، (ب) بعد از اسپایک استاندارد سیتالوپرام با غلظت $5.0 \mu\text{g L}^{-1}$. شرایط آزمایش: حجم محلول نمونه 1.0 mL ، حجم حلال استخراج کننده (۱-آندکانول) $30 \mu\text{L}$ ، حجم حلال پخش کننده $100 \mu\text{L}$ ، زمان استخراج 10 دقیقه، زمان سانتریفیوژ کردن 10 دقیقه، در طول موج 230 nm



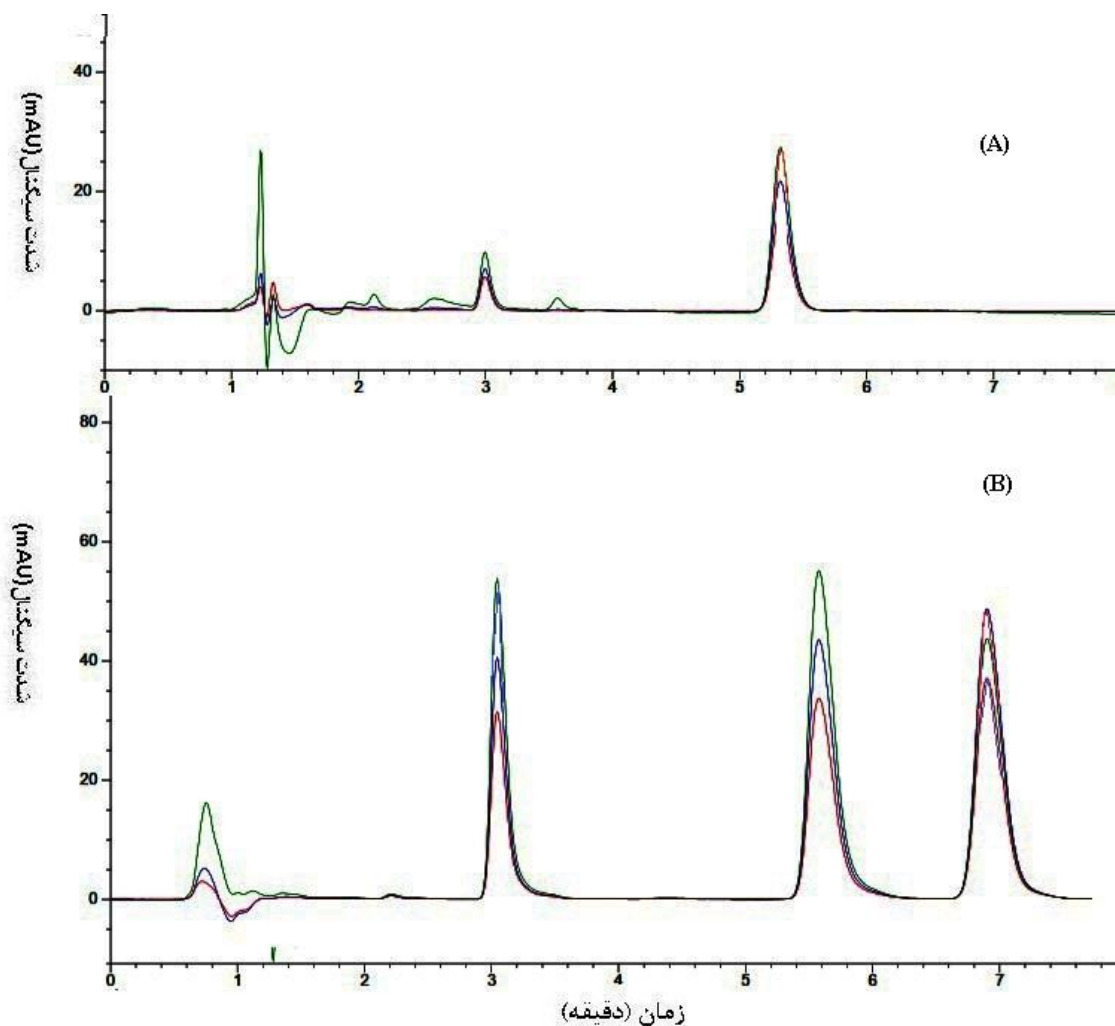
شکل (۲-۳۳): کروماتوگرام (الف) کروماتوگرام حاصل از نمونه قرص دیازپام قبل از اسپایک استاندارد، (ب) بعد از اسپایک استاندارد دیازپام با غلظت $500 \mu\text{g L}^{-1}$. شرایط آزمایش: حجم محلول نمونه 1.0 mL ، حجم حلال استخراج کننده (۱-آندکانول $30 \mu\text{L}$ ، حجم حلال پخش کننده $1000 \mu\text{L}$ ، زمان استخراج 10 دقیقه، زمان سانتریفیوژ کردن 10 دقیقه، در طول موج 240 nm



شکل (۲-۳۴): کروماتوگرام (الف) کروماتوگرام حاصل از نمونه قرص سرتالین قبل از اسپایک استاندارد، (ب) بعد از اسپایک استاندارد سرتالین با غلظت $5.0 \mu\text{g L}^{-1}$. شرایط آزمایش: حجم محلول نمونه 1.0 mL ، حجم حلال استخراج کننده (۱-آندکانول) $30 \mu\text{L}$ ، حجم حلال پخش کننده $1000 \mu\text{L}$ ، زمان استخراج 10 دقیقه، زمان سانتریفیوژ کردن 10 دقیقه، در طول موج 210 nm



شکل (۲-۳۵): کروماتوگرام نمونه (A) شاهد سرم انسان بدون مصرف دارو، (B) سرم حاوی 0.5 mg L^{-1} سیتالوپرام و دیازپام و سرتالین. شرایط آزمایش: غلظت سیتالوپرام و دیازپام و سرتالین 0.5 mg L^{-1} ، حجم محلول نمونه 1.0 mL ، حجم حلال استخراج کننده (۱-آندکانول) $30.0 \text{ }\mu\text{L}$ ، حجم حلال پخش کننده $100.0 \text{ }\mu\text{L}$ ، زمان استخراج 1.0 دقیقه، زمان سانتریفیوژ کردن 1.0 دقیقه، در طول موج‌های 230 nm (رنگ آبی)، 240 nm (رنگ سبز) و 210 nm (رنگ قرمز) برای سیتالوپرام، دیازپام، سرتالین به ترتیب.



شکل (۲-۳۶): کروماتوگرام نمونه (A) ادرار فرد بیمار، (B) ادرار حاوی $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$ سیتالوپرام و دیازپام و سرتالین. شرایط آزمایش: غلظت سیتالوپرام و دیازپام و سرتالین $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$ ، حجم محلول نمونه 1.0 mL ، حجم حلال استخراج کننده (۱-آندکانول) $30.0 \mu\text{L}$ ، حجم حلال پخش کننده $1000.0 \mu\text{L}$ ، زمان استخراج 10.0 دقیقه، زمان سانتریفیوژ کردن 10.0 دقیقه، در طول موج‌های 230 nm (رنگ آبی)، 240 nm (رنگ سبز) و 210 nm (رنگ قرمز) برای سیتالوپرام، دیازپام، سرتالین به ترتیب.

۱۲-۵-۲ مقایسه روش پیشنهادی با برخی روش‌های به‌کار گرفته شده در اندازه‌گیری

سیتالوپرام، دیازپام و سرتالین

در جدول ۲-۳۸ تعدادی از روش‌های پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری برخی از داروهای سیتالوپرام، دیازپام و سرتالین آورده شده است. در این جدول پارامترهای مختلف، مانند حد تشخیص، دامنه خطی و فاکتور پیش‌تغلیظ برای مقایسه آورده شده است. مقایسه ارقام شایستگی گزارش شده برای این روش‌ها با روش پیشنهادی نشان می‌دهد که روش پیشنهادی نسبت به برخی از روش‌های گزارش شده بهتر می‌باشد. روش ارائه شده دارای حدتشخیص بهتر نسبت به مراجع ۲۳، ۱۰۱، ۱۲۰ و ۱۰۳ می‌باشد. همچنین انحراف استاندارد نسبی بهتری نسبت به مراجع ۲۲، ۲۳، ۱۰۲ و ۱۰۳ گزارش شده است.

جدول (۲-۳۸) : مقایسه روش پیشنهادی با سایر روش‌های انجام شده برای اندازه‌گیری سیتالوپرام، دیازپام و سرتالین

روش استخراج	آنالیت/ماتریس	گستره خطی ($\mu\text{g L}^{-1}$)	حد تشخیص ($\mu\text{g L}^{-1}$)	RSD%	فاکتور پیش‌تغلیظ	مرجع
SPE/HPLC-FLD	سیتالوپرام/ پلاسمای خون	۱۲-۱۶۰۰	-	۱/۱-۸/۸	-	۲۲
SPE/HPLC-DAD	سیتالوپرام/ ادرار	۰/۰۵-۲/۰	۱۳/۰	۱۰/۰<	-	۲۳
SPE/HPLC-UV	دیازپام/ پلاسمای موش و بافت مغز	۲/۵-۱۲۵	۰/۸	۲/۱-۳/۵	-	۱۰۰
UADLLME/ HPLC-PDA	دیازپام/ پلاسمای خون	۱۰/۰-۵۰۰۰/۰	۲/۸	۰/۸<	-	۱۰۱
LPME/ capillary electrophoresis	سیتالوپرام/ پلاسمای خون	۲۰/۰-۱۰۰۰۰/۰	۵/۰	۱۱/۰<	۲۵	۱۰۲
DLLME/ capillary electrophoresis	سرتالین/ ادرار	۳/۰۶-۳۰۶/۰	۱/۵	۳/۵-۸/۷	۱۳۳	۱۰۳
UA-SFOD- DLLME/ HPLC- MWD	دیازپام، سرتالین و	۱/۳-۵۰/۰	۰/۳۹ CIT	۱/۱۰-۵/۶	۴۴۵	روش پیشنهادی
	سیتالوپرام/ ادرار و	۲/۷-۴۰/۰	۰/۸۰ DIZ		۳۴۴	
	پلاسمای خون	۱/۲-۴۰/۰	۰/۳۶ SER		۳۸۳	

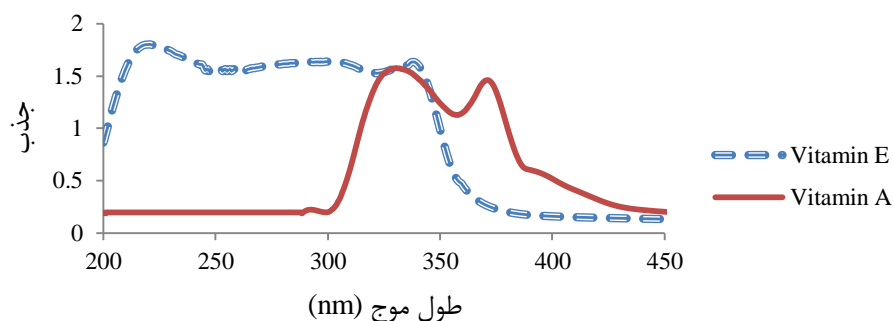
۲-۶ روش میکرواستخراج مایع پخشی معکوس برای پیش تغلیظ و اندازه‌گیری ویتامین

A و E در روغن‌های گیاهی

با توجه به اهمیت ویتامین‌های محلول در چربی و نقش آن‌ها بر سلامتی و رشد انسان، روشی ساده، حساس و گزینش‌پذیر برای اندازه‌گیری مقادیر کم ویتامین A و E در روغن‌های گیاهی ارائه شد. در این پژوهش روش میکرواستخراج مایع پخشی معکوس به‌همراه روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا برای پیش تغلیظ و اندازه‌گیری مقادیر کم این ویتامین‌ها در روغن‌های گیاهی خوراکی مورد بررسی قرار گرفت.

۲-۶-۱ ثبت طیف UV-Vis ویتامین A و ویتامین E

برای تعیین طول موج‌های دارای جذب ماکزیمم ویتامین‌های A و E، طیف جذبی محلول‌های این داروها ثبت گردید. بدین منظور محلول $5/0 \text{ mg L}^{-1}$ ویتامین A و ویتامین E در فاز متحرک با مخلوط ۱:۹ آب مقطر- متانول به‌عنوان حلال تهیه و طیف جذبی این ویتامین‌ها نسبت به فاز متحرک به‌عنوان شاهد در گستره $200\text{--}450 \text{ nm}$ ثبت گردید (شکل ۲-۳۷). به دلیل رسیدن به حساسیت بیشتر، اندازه‌گیری‌ها در دو طول موج ماکزیمم 216 nm و 326 nm به‌ترتیب برای ویتامین E و ویتامین A، انجام پذیرفت.

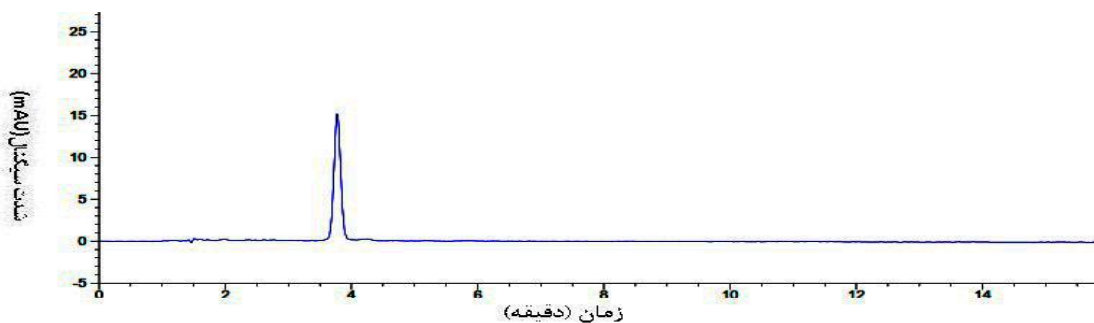


شکل (۲-۳۷): طیف جذبی ویتامین A و ویتامین E، شرایط: غلظت ویتامین A و ویتامین E هر یک $5/0 \text{ mg L}^{-1}$.

حلال مخلوط ۱:۹ آب مقطر- متانول

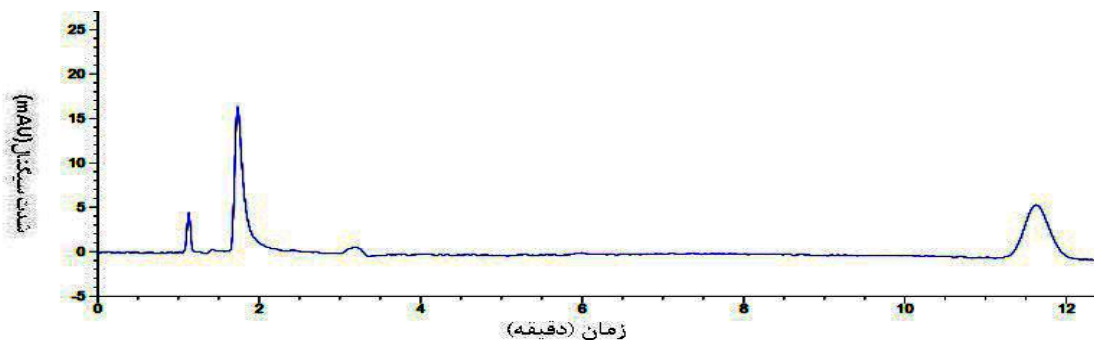
۲-۶-۲ شرایط کروماتوگرافی برای اندازه گیری ویتامین A و ویتامین E

برای اندازه گیری همزمان ویتامین A و ویتامین E در روغن های خوراکی، از سیستم کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالای فاز معکوس (RP-HPLC) استفاده شد. به این منظور مخلوط ۱:۹ آب مقطر- متانول و سرعت جریان ۱/۰ میلی لیتر بر دقیقه به عنوان فاز متحرک استفاده گردید [۳۸]. کروماتوگرام حاصل از محلول $10/0 \text{ mg L}^{-1}$ ویتامین A و ویتامین E و مخلوط آن ها در شکل های (۲-۳۸) تا (۲-۴۰) نشان داده شده است. قابل ذکر است که در کروماتوگرام مربوط به ویتامین E، دو پیک مشاهده می گردد که اولین پیک مربوط به توکوتری انول و دومین پیک مربوط به آلفا توکوفرول می باشد که نوع مورد بررسی در مطالعه روغن های خوراکی آلفا توکوفرول می باشد که در زمان بازداری در حدود ۱۱ دقیقه دیده شده است.

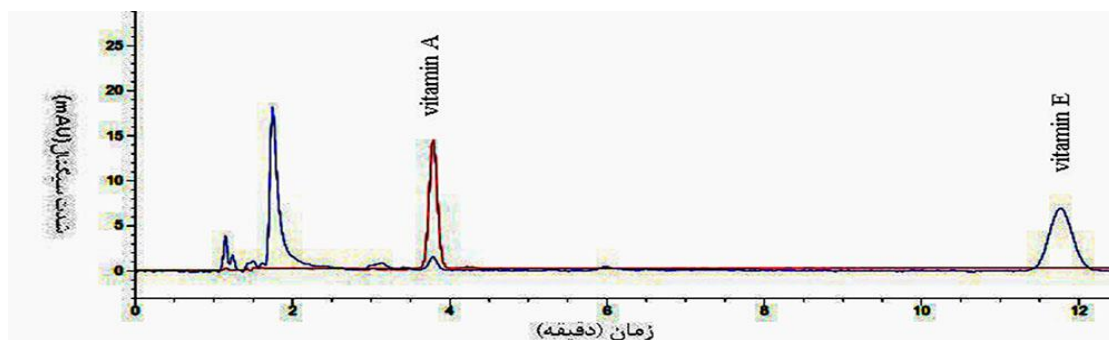


شکل (۲-۳۸): کروماتوگرام مربوط به استاندارد ویتامین A با غلظت $10/0 \text{ mg L}^{-1}$. فاز متحرک: مخلوط ۱:۹ آب

مقطر- متانول در طول موج 326 nm .



شکل (۲-۳۹): کروماتوگرام مربوط به استاندارد ویتامین E با غلظت 1.0 mg L^{-1} . فاز متحرک: مخلوط ۱:۹ آب مقطر - متانول در طول موج 216 nm .



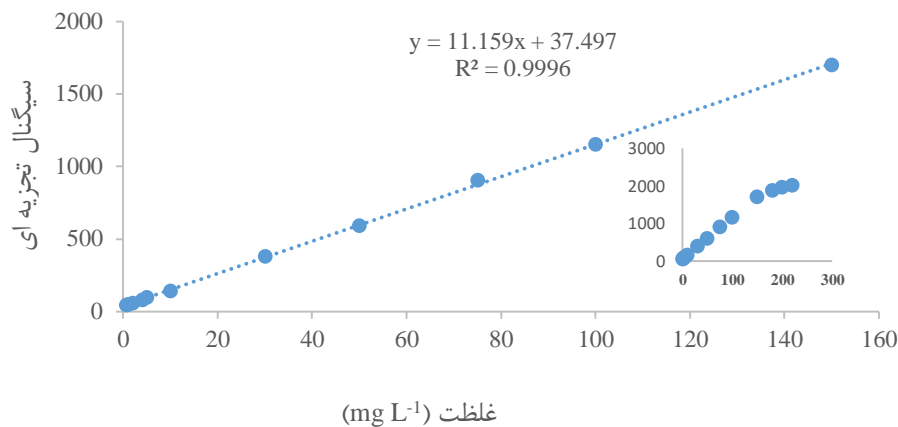
شکل (۲-۴۰): کروماتوگرام مربوط به مخلوط استاندارد ویتامین A و E هر یک با غلظت 1.0 mg L^{-1} . فاز متحرک: مخلوط ۱:۹ آب مقطر - متانول در طول موج 326 nm (رنگ قرمز برای اندازه‌گیری ویتامین A) و 216 nm (رنگ آبی برای اندازه‌گیری ویتامین E).

۲-۶-۳ رسم منحنی کالیبراسیون مستقیم در پیش تغلیظ و اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین E

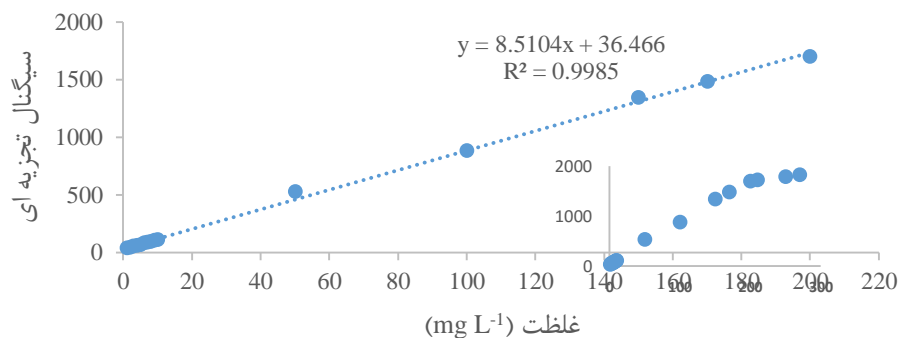
E

محلول‌هایی با غلظت‌های متفاوت از ویتامین A و ویتامین E در محدوده غلظتی 0.5 mg L^{-1} تا 250.0 mg L^{-1} با رقیق‌سازی از محلول 2000.0 mg L^{-1} این ویتامین‌ها که در n-بوتانول حل شده است، با مخلوط آب-اتانول (۲-۸) در حجم 1.0 mL تهیه شدند. سپس $50 \mu\text{L}$ از محلول به‌طور مستقیم به دستگاه HPLC تزریق گردید و سیگنال حاصل که سطح زیر پیک نمونه بود به‌عنوان سیگنال تجزیه‌ای، ثبت گردید. منحنی‌های کالیبراسیون مربوطه نیز از رسم تغییرات سیگنال آنالیت بر حسب غلظت این

دو ویتامین به دست آمد که نتایج آن در شکل‌های (۴۱-۲) و (۴۲-۲) برای ویتامین A و ویتامین E نشان داده شده است. براساس نتایج به دست آمده، منحنی کالیبراسیون در محدوده $150/0 \text{ mg L}^{-1}$ - $0/6$ برای ویتامین A و در محدوده $200/0$ - $1/0$ mg L^{-1} برای ویتامین E خطی می‌باشد.



شکل (۴۱-۲): منحنی کالیبراسیون مستقیم ویتامین A. غلظت‌های مختلفی از آنالیت در مخلوط آب-اتانول (۸-۲)، ترکیب متانول-آب مقطر با نسبت حجمی ۹:۱ به‌عنوان فاز متحرک، سرعت جریان $1/0$ میلی لیتر بر دقیقه در طول موج 326 nm .



شکل (۴۲-۲): منحنی کالیبراسیون مستقیم ویتامین E. غلظت‌های مختلفی از آنالیت در مخلوط آب-اتانول (۸-۲)، ترکیب متانول-آب مقطر با نسبت حجمی ۹:۱ به‌عنوان فاز متحرک، سرعت جریان $1/0$ میلی لیتر بر دقیقه در طول موج 216 nm .

۲-۶-۴ روش کار در پیش تغلیظ و اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین E در روغن خوراکی

۱۴/۰ mL روغن خوراکی حاوی ویتامین‌های A و E، با ۱/۰ mL سیکلوهگزان به‌عنوان عامل رقیق‌کننده در یک لوله آزمایش یکنواخت گردید. مخلوط آب-اتانول با نسبت ۲-۸ به‌عنوان حلال استخراج‌کننده و ۱ و ۴ دی‌اکسان به‌عنوان حلال پخش‌کننده توسط یک سرنگ به سرعت به درون لوله آزمایش تزریق گردید. محلول ابری تشکیل شده در به مدت ۱۰ دقیقه حمام فراصوت قرار گرفت تا محلول استخراج‌کننده به درون محلول روغن پخش شود. پس از سانتریفیوژ نمونه به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۳۵۰۰ دور بر دقیقه، ۵/۰ μL از حلال ته‌نشین شده به دستگاه HPLC تزریق و مورد آنالیز قرار گرفت.

۲-۶-۵ بررسی و بهینه‌سازی متغیرهای موثر در پیش تغلیظ و اندازه‌گیری ویتامین A و

ویتامین E

در این پروژه، به‌منظور فراهم نمودن بهترین حساسیت و در نتیجه بهترین پاسخ، پارامترهای مؤثر بر میکرواستخراج ویتامین‌ها، مورد بررسی قرار گرفتند. در بررسی فاکتورهای مؤثر، ابتدا از روش بهینه‌سازی یک متغیر در یک زمان، جهت تعیین سطوح متغیرهای مؤثر بر روش و سپس از طرح فاکتوریل کامل جهت مشخص نمودن فاکتورهای مهم در استخراج استفاده شد. پس از مشخص شدن فاکتورهای مهم، از طراحی باکس بنکن (BBD) برای بهینه‌سازی فاکتورهای مؤثر بر استخراج استفاده شد. فاکتورهایی که مورد بررسی قرار گرفتند عبارتند از:

۱- pH محلول استخراج

۲- حجم محلول نمونه

۳- نوع بافر

۴- حجم محلول استخراج

۵- ترکیب درصد حلال استخراج

۶- نوع حلال پخش کننده

۷- حجم حلال پخش کننده

۸- زمان استخراج

۹- زمان سانتریفیوژ

فاکتورهای معرفی شده توسط روش بهینه‌سازی یک متغیر در یک زمان مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج کامل مربوط به بهینه‌سازی یک متغیر در زمان در پیوست ۳ آمده است. با توجه به مقادیر بهینه هر فاکتور (جدول ۲-۳۹) در بهینه‌سازی یک متغیر در زمان، سطوح مورد نظر برای روش طراحی آزمایش تعیین گردید. قابل ذکر است که در مراحل بهینه‌سازی پارامترها به روش یک متغیر در یک زمان غلظت ویتامین‌های مورد بررسی برابر 0.5 mg L^{-1} بوده است.

جدول (۲-۳۹): نتایج حاصل از بهینه‌سازی یک متغیر در یک زمان اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین E

فاکتور	محدوده بررسی	مقدار بهینه
pH حلال استخراج	۲-۷	۴/۰
حجم محلول	۵/۰-۱۵/۰ mL	۱۵/۰ mL
نوع بافر	استاتی، فسفاتی	استاتی
حجم محلول استخراج (μL)	۵۰-۲۰۰	۱۰۰
ترکیب درصد حلال استخراج (آب-اتانول)	۴.۶ - ۱.۹	۸:۲
نوع حلال پخش کننده	۴و۱ دی‌اکسان، استون و THF	۴و۱ دی‌اکسان
حجم حلال پخش کننده	۵۰-۳۰۰ μL	۱۰۰ μL
زمان استخراج	۱۰-۳۰ دقیقه	۱۵ دقیقه
زمان سانتریفیوژ	۱۰-۲۰ دقیقه	۱۵ دقیقه

۲-۶-۶ بررسی و بهینه‌سازی فاکتورهای موثر بر پیش تغلیظ و اندازه‌گیری ویتامین A و

ویتامین E به روش طراحی آزمایش

به دلیل برهمکنش‌های احتمالی بین فاکتورهای مورد بررسی، شرایط حاصل از بهینه‌سازی تغییر یک متغیر در یک زمان نمی‌تواند شرایط بهینه واقعی باشد. بنابراین لازم است اثر فاکتورهای موثر بر فرایند به روش‌های بهینه‌سازی همزمان مورد بررسی قرار گیرد. در این پروژه از روش طراحی فاکتوریل کامل برای بررسی برهم‌کنش‌ها و تعیین فاکتورهای موثر استفاده گردید. در ادامه، مراحل انجام کار در بهینه‌سازی همزمان متغیرها به روش طراحی فاکتوریل کامل آورده شده است. لازم به ذکر است که برای فاکتورهای حجم محلول نمونه، نوع حلال استخراج، زمان سانتریفیوژ، نوع بافر و حلال پخش‌کننده از مقادیر بهینه حاصل از روش یک متغیر در یک زمان استفاده شد. سطوح انتخاب شده برای فاکتورها در جدول ۲-۴۰ آورده شده است.

جدول (۲-۴۰): تعیین سطح فاکتورهای موثر بر پیش تغلیظ و اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین E

علامت	فاکتور	سطح بالا (+)	سطح پایین (-)
A	pH حلال استخراج	۴/۵	۲/۰
B	ترکیب درصد حلال استخراج (آب-اتانول)	۴:۶	۸:۲
C	زمان استخراج (دقیقه)	۲۰	۱۰
D	حجم حلال پخش‌کننده (μL)	۱۵۰/۰	۵۰/۰

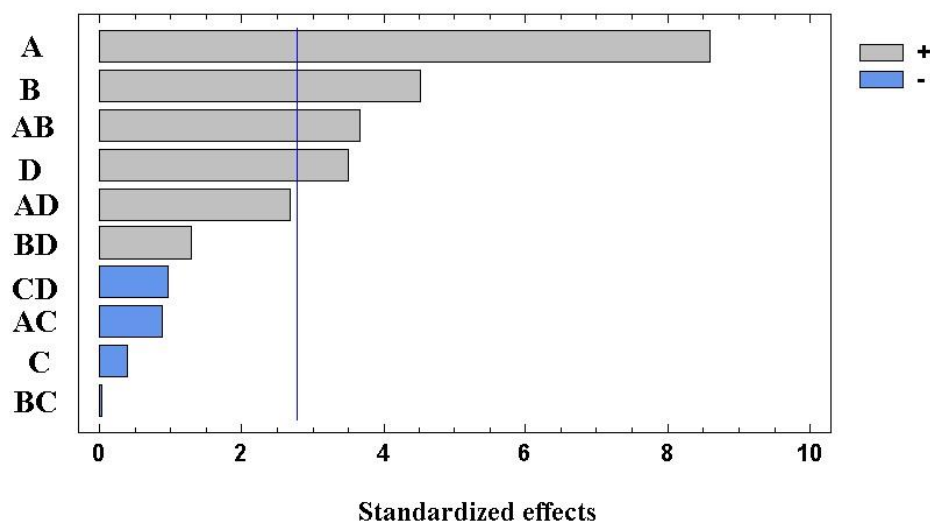
برای طراحی آزمایش‌ها به منظور تعیین تاثیرگذارترین فاکتورها بر پیش تغلیظ و اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین E، از نرم‌افزار statistica 12 برای انجام طرح فاکتوریل کامل و پردازش داده‌ها استفاده شد. تعداد آزمایش‌ها در طرح فاکتوریل کامل هنگامی که ۴ فاکتور مورد بررسی باشد، ۱۶ آزمایش خواهد بود. قابل ذکر است که در این طراحی، پاسخ بصورت حاصلضرب درصدهای بازیابی هر یک از آنالیت‌های

مورد بررسی بوده است. جدول ۲-۴۱ آزمایش‌های این طراحی را نشان می‌دهد. تمامی آزمایش‌ها تحت شرایط مشخص شده در طرح فاکتوریل کامل و بصورت زیر انجام شد.

جدول (۲-۴۱): طرح فاکتوریل کامل و نتایج به دست آمده از آن برای اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین E

ردیف	pH	ترکیب درصد حلال استخراج (تانول-آب)	زمان استخراج	حجم حلال پخش کننده	درصد بازیابی ویتامین A	درصد بازیابی ویتامین E	MER
۱	-	+	-	-	۱۰	۱۵	۰/۰۱۶
۲	+	+	+	-	۳۲	۵۱	۰/۱۶۷
۳	+	+	-	+	۴۵	۷۰	۰/۳۱۵
۴	+	-	+	+	۲۵	۳۶	۰/۰۹۲
۵	-	-	-	+	۴	۴	۰/۰۰۱۶
۶	-	-	+	-	۷	۸	۰/۰۰۵۶
۷	-	+	+	+	۱۷	۲۴	۰/۰۴۲
۸	+	-	-	-	۲۲	۲۳	۰/۰۵۱
۹	-	-	+	+	۱۲	۱۵	۰/۰۱۸
۱۰	-	+	+	-	۴	۵	۰/۰۰۴
۱۱	+	-	+	-	۲۲	۲۴	۰/۰۵۴
۱۲	+	+	+	+	۴۴	۵۳	۰/۲۳۵
۱۳	+	+	-	-	۳۲	۳۹	۰/۱۲۵
۱۴	+	-	-	+	۳۴	۴۱	۰/۱۳۸
۱۵	-	-	-	-	۴	۶	۰/۰۰۲۴
۱۶	-	+	-	+	۱۲	۱۵	۰/۰۱۸

در ادامه نتایج به دست آمده مورد تحلیل قرار گرفته و فاکتورهای موثر به ترتیب اهمیت مشخص می‌شوند. بنابراین از نمودار پارتو برای بررسی و ارزیابی اثر فاکتورهای به کار برده شده در این طراحی استفاده شد (شکل (۲-۴۳)). در این نمودار طول هر ستون متناسب با اهمیت هر یک از فاکتورها می‌باشد. خط عمودی در نمودار پارتو، سطح اطمینان ۹۵٪ را به‌عنوان حد معنی‌داری اثرات، نشان می‌دهد.



شکل (۲-۴۳): نمودار پارتو حاصل از طرح فاکتوریل کامل برای اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین E

بر اساس نتایج حاصل از مرحله غربالگری، فاکتورهای pH، ترکیب درصد حلال استخراج، حجم حلال پخش کننده و برهم‌نش pH و ترکیب درصد حلال استخراج (AB) به‌عنوان فاکتورهای مهم و موثر بر پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین E انتخاب شدند. در ادامه توسط طراحی باکس بنکن (BBD)، مقادیر بهینه این فاکتورهای مهم تعیین می‌شوند. در طراحی BBD هر فاکتور در سه سطح بالا، میانی و پایین مورد بررسی قرار می‌گیرد. این سطوح، مشابه سطوح بالا و پایین انتخاب شده برای طراحی فاکتوریل کامل می‌باشد. در تمام آزمایش‌های انجام شده در طراحی BBD، فاکتور غیر مهم (زمان استخراج) ثابت و ۱۰ دقیقه در نظر گرفته شد که علامت آن مشابه با علامت آن در نمودار پارتو طراحی FFD می‌باشد.

در طراحی باکس بنکن، تعداد آزمایش‌ها هنگامی که ۳ فاکتور با ۳ نقطه مرکزی وجود دارد، طبق رابطه (۱-۱۲) برابر با ۱۵ آزمایش می‌باشد. جدول ۲-۴۴ ماتریس طراحی باکس بنکن و مقادیر MER برای دو آنالیت را نشان می‌دهد.

جدول (۲-۴۲): ماتریس طرح BBD با ۳ فاکتور، ۳ نقطه مرکزی برای اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین E

ردیف	A	B	D	درصد بازیابی ویتامین A	درصد بازیابی ویتامین E	MER
۱	+	-	۰	۱۷	۲۴	۰/۰۴۱
۲	۰	+	-	۳۳	۴۷	۰/۱۵۵۱
۳	-	۰	-	۱۹	۱۴	۰/۰۲۷
۴	۰	۰	۰	۳۸	۵۵	۰/۲۰۹
۵	۰	۰	۰	۳۸	۵۴	۰/۲۰۵
۶	-	+	۰	۱۹	۲۷	۰/۰۵۱
۷	+	۰	+	۳۱	۴۲	۰/۱۳۰
۸	-	۰	+	۱۸	۲۶	۰/۰۴۷
۹	۰	+	+	۴۸	۶۷	۰/۳۲۲
۱۰	+	۰	-	۳۳	۴۷	۰/۱۵۵
۱۱	-	-	۰	۱۶	۲۴	۰/۰۳۸
۱۲	۰	-	+	۲۲	۳۲	۰/۰۷۰
۱۳	۰	۰	۰	۳۸	۵۴	۰/۲۰۵
۱۴	+	+	۰	۷۰	۹۴	۰/۶۵۸
۱۵	۰	-	-	۲۲	۲۸	۰/۰۶۲

نتایج تجربی حاصل از انجام آزمایش‌های طراحی شده، به وسیله روش ANOVA مورد تجزیه و بررسی قرار گرفتند. به‌منظور به دست آوردن مدل تجربی برای پیش‌بینی پاسخ، رابطه‌های خطی و درجه دوم و برهم‌کنش‌ها و داده‌های به دست‌آمده از آزمایش‌ها پردازش شده و ضرایب رگرسیونی مربوط به پاسخ ویتامین A و ویتامین E در جدول ۲-۴۳، نشان داده شده است. همچنین تحلیل واریانس برای مدل پیشنهادی مربوط به پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین E در جدول ۲-۴۴ نشان داده شده است.

جدول (۲-۴۳): پارامترهای آماری برای طراحی BBD انجام شده برای پاسخ اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین E

عبارت	ضریب	خطای استاندارد ضریب	t	P
ثابت	۰/۱۴۴۸	۰/۰۶۱۸	۲/۳۴۳	۰/۰۶۶
A	۰/۱۰۲۶	۰/۰۳۷۸	۲/۷۱۱	۰/۰۴۲
B	۰/۱۲۱۸	۰/۰۳۷۸	۳/۲۲۰	۰/۰۲۳
D	۰/۰۲۱۲	۰/۰۳۷۸	۰/۵۶۱	۰/۵۹۹
AA	-۰/۰۰۵۲	۰/۰۵۵۷	-۰/۰۹۳	۰/۹۳۰
BB	۰/۰۵۷۳	۰/۰۵۵۷	۱/۰۲۹	۰/۳۵۱
DD	-۰/۰۴۹۹	۰/۰۵۵۷	-۰/۸۹۶	۰/۴۱۱
AB	۰/۱۵۱۰	۰/۰۵۳۵	۲/۸۲۱	۰/۰۳۷
AD	-۰/۰۱۱۲	۰/۰۵۳۵	-۰/۲۱۰	۰/۸۴۲
BD	۰/۰۳۹۷	۰/۰۵۳۵	۰/۷۴۳	۰/۴۹۱

جدول (۲-۴۴): تحلیل واریانس برای مدل پیشنهادی مربوط به پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین E

منبع	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	آماره F	مقدار P
A	۰/۰۳۱۵	۱	۰/۰۳۱۵	۱۸۳۸۶/۳۲	۰/۰۰۰۱
B	۰/۰۳۱۷	۱	۰/۰۳۱۷	۱۸۵۲۵/۶۲	۰/۰۰۰۱
D	۰/۰۰۵۱	۱	۰/۰۰۵۱	۲۹۷۸/۲۹	۰/۰۰۰۳
AA	۰/۰۰۰۴	۱	۰/۰۰۰۴	۲۳۳/۴۳	۰/۰۰۴۳
AB	۰/۰۳۳۷	۱	۰/۰۳۳۷	۱۹۷۱۰/۱۰	۰/۰۰۰۱
AD	۰/۰۰۰۳	۱	۰/۰۰۰۳	۲۱۷/۴۴	۰/۰۰۴۶
BB	۰/۰۰۰۳	۱	۰/۰۰۰۳	۱۷۲/۶۳	۰/۰۰۵۷
BD	۰/۰۰۹۴	۱	۰/۰۰۹۴	۵۴۹۰/۲۸	۰/۰۰۰۲
DD	۰/۰۱۳۱	۱	۰/۰۱۳۱	۷۶۶۶/۶۷	۰/۰۰۰۱
Lack of fit	۰/۰۲۰۳	۳	۰/۰۳۱۵	۳۹۶۲/۳۸	۰/۳۰۰۰
Pure error	۰/۰۰۰۰۰۳۴	۲	۰/۰۰۰۰۰۱۷۱۳		
Total error	۰/۱۴۶۲	۱۴			

با استفاده از ضرایب به دست آمده در جدول (۲-۴۳)، ساده‌ترین مدل برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین E به صورت معادله (۲-۱۹) پیشنهاد می‌شود.

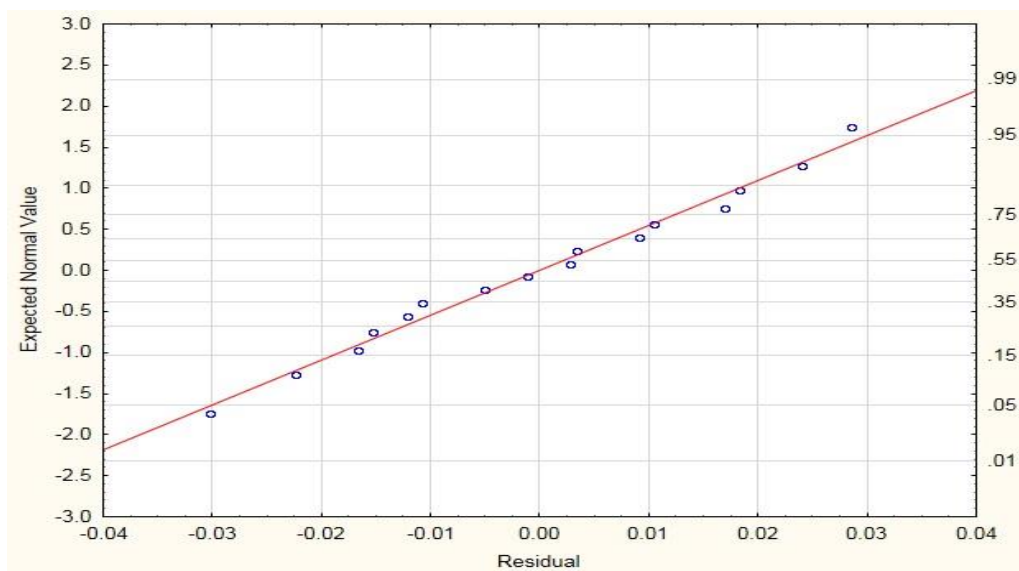
(۱۹-۲)

$$\text{Response} = 0.144 + 0.1026 A + 0.1219 B + 0.0212 D - 0.0051 A^2 + 0.151 AB - 0.0112 AD + 0.0573 B^2 + 0.0397 BD - 0.0499 D^2$$

با توجه به نتایج به دست آمده، به نظر می‌رسد، با افزایش مقدار اتانول در ترکیب حلال استخراج کننده، امکان برهمکنش با آنالیت‌ها بیشتر شده و باعث می‌شود که این ترکیبات راحت تر به درون فاز آبی استخراج شوند. همچنین در حجم‌های کمتر از $110/0 \mu\text{L}$ از حلال پخش کننده، پخش شدن حلال استخراج کننده خوب صورت نمی‌گیرد و قطرات ریز برای استخراج به خوبی و به اندازه کافی تشکیل نمی‌شود. این امر منجر به کاهش سطح تماس بین دو فاز روغن و آبی می‌گردد. در نتیجه میزان انتقال آنالیت به فاز آبی کمتر و بازده استخراج نیز کاهش می‌یابد. اما به نظر می‌رسد که کاهش سیگنال‌های تجزیه‌ای در حجم‌های بالاتر از $110/0 \mu\text{L}$ می‌تواند ناشی از انحلال حلال استخراج باشد که این امر منجر به کاهش بازده استخراج می‌گردد.

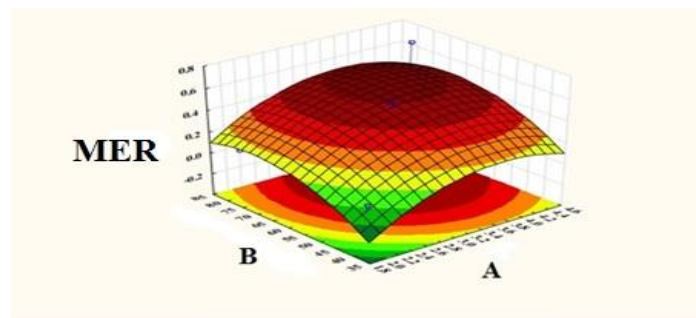
نمودار احتمال نرمال برای پاسخ پیش تغلیظ و اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین E در شکل

۴۴-۲ نشان می‌دهند که توزیع خطاها تقریباً نرمال است.



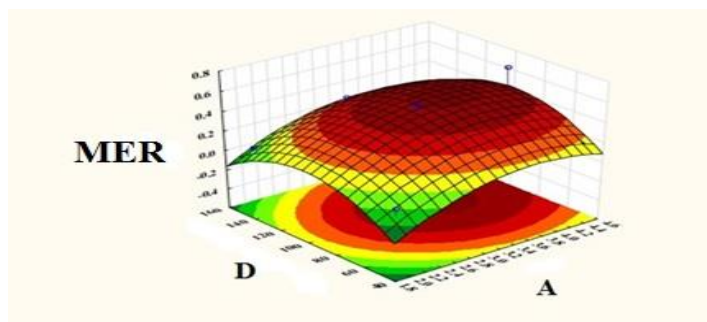
شکل (۴۴-۲): نمودار احتمال نرمال برای پیش تغلیظ و اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین E

از منحنی‌های سه بعدی سطح پاسخ برای نشان دادن رابطه و برهم‌کنش بین متغیرها و نیز اثر این متغیرها روی پاسخ استفاده می‌شود. هر منحنی رویه پاسخ، اثر دو متغیر مستقل را نشان می‌دهد در حالی که سایر متغیرها در سطح صفر (سطح میانی) ثابت نگه داشته می‌شوند. شکل ۲-۴۵، ۲-۴۶ و ۲-۴۷ منحنی رویه پاسخ را برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین E نشان می‌دهد. بر اساس نمودار سطح پاسخ مدل مربوطه در شکل ۲-۴۵، در مقدار میانی حجم حلال پخش‌کننده، تا حجم حلال آلی $80/0 \mu\text{L}$ مقدار پاسخ افزایش یافته و پس از آن میزان پاسخ تا حدودی کم می‌گردد که این افزایش سیگنال به علت قطبی شدن محلول استخراج می‌باشد. همچنین همانطور که در شکل ۲-۴۶ نشان داده شده است، با افزایش مقدار pH تا $4/4$ پاسخ افزایش یافته و پس از آن مقدار آن کاهش می‌یابد. بنابراین مقدار pH $4/4$ به عنوان مقدار بهینه انتخاب گردید. همچنین مطابق شکل ۲-۴۷، در مقدار میانی حلال استخراج، با افزایش حجم حلال پخش‌کننده، تا $110 \mu\text{L}$ ، میزان پاسخ افزایش می‌یابد. در حجم‌های کمتر حلال پخش‌کننده، پخش شدن حلال استخراج‌کننده خوب صورت نمی‌گیرد و قطرات ریز برای استخراج به خوبی و به اندازه کافی تشکیل نمی‌شود.



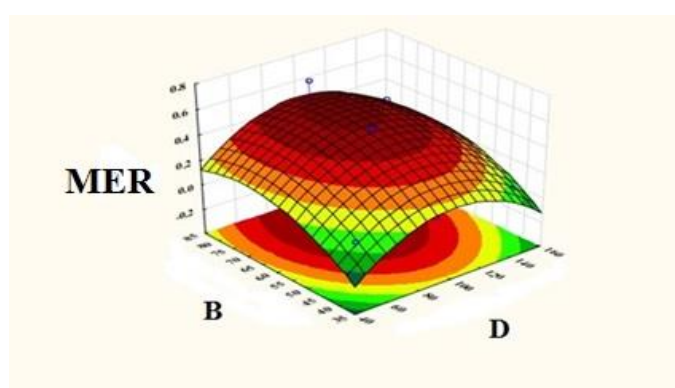
شکل (۲-۴۵): منحنی رویه پاسخ برای pH (A) در برابر ترکیب درصد محلول استخراج (B) برای اندازه‌گیری ویتامین

A و ویتامین E



شکل (۲-۴۶): منحنی رویه پاسخ برای pH (A) در برابر حجم حلال پخش کننده (D) برای اندازه‌گیری ویتامین A و

ویتامین E



شکل (۲-۴۷): منحنی رویه پاسخ برای حجم حلال پخش کننده (D) در مقابل ترکیب درصد محلول استخراج (B)

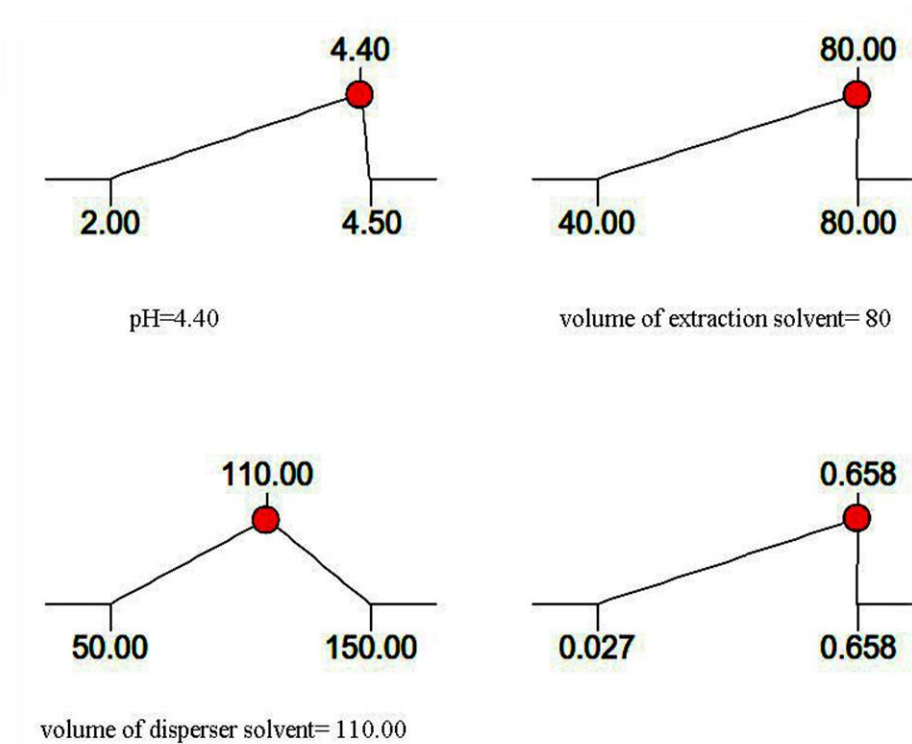
برای اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین E

با توجه به مدل ریاضی پیشنهادی، شرایط بهینه پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین E محاسبه شد. نتایج در جدول ۲-۴۵ گزارش شده است. مقایسه این نتایج، با نتایج حاصل از روش یک متغیر در یک زمان نشان می‌دهد که شرایط بهینه به دست آمده از روش طراحی آزمایش با استفاده از مدل BBD، تا حدودی متفاوت از شرایط بهینه حاصل از روش یک متغیر در یک زمان است که نشان‌دهنده این است که بین فاکتورهای موثر بر سیگنال پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین E (pH و ترکیب درصد حلال استخراج) برهم‌کنش وجود داشته است و در نتیجه شرایط به دست آمده از روش طراحی آزمایش باید به مقادیر بهینه واقعی نزدیک‌تر باشد، زیرا تمام برهم‌کنش‌ها در نظر گرفته شده است.

جدول (۲-۴۵): شرایط بهینه نهایی سیستم برای اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین E

فاکتور	مقدار بهینه طراحی آزمایش	مقدار بهینه یک متغیر در زمان
pH	۴/۴	۴/۰
حجم محلول نمونه (mL)	۱۵/۰	۱۵/۰
نوع حلال استخراج‌کننده	اتانول-آب	اتانول-آب
ترکیب درصد حلال استخراج‌کننده	۲-۸	۲-۸
نوع حلال پخش‌کننده	۴و۱ دی اکسان	۴و۱ دی اکسان
حجم حلال پخش‌کننده	۱۱۰/۰	۱۰۰/۰
زمان استخراج	۱۰ دقیقه	۱۵ دقیقه
نوع بافر	استاتی	استاتی
زمان سانتریفیوژ	۱۵ دقیقه	۱۵ دقیقه
میانگین سیگنال تجزیه‌ای	۶۴۹/۵	۵۳۶/۰

پروفایل مقدار پیش‌بینی شده و مطلوبیت در نرم‌افزار design expert07 برای بهینه‌سازی فرایند استفاده شده است. تابع مطلوبیت پاسخ شامل تعیین تابع مطلوبیت برای هر متغیر وابسته به وسیله تعیین مقدار پیش‌بینی شده در گستره صفر تا یک رسم گردید. با توجه به نتایج طراحی باکس بنکن و نقاط بهینه به دست آمده، مطلوبیت یک برای حداکثر پاسخ و مطلوبیت صفر برای حداقل پاسخ و ۰/۵ برای حالت حدواسط بیان شده است. در شکل ۲-۴۸ نشان داده شده است که چگونه تغییرات در سطح هر متغیر، پاسخ و همچنین مطلوبیت کلی پاسخ‌ها را تغییر می‌دهد. براساس این محاسبات و درجه مطلوبیت ۰/۹۳۹ و MER ۰/۵۳۸، شرایط بهینه مطلوب به دست آمد.

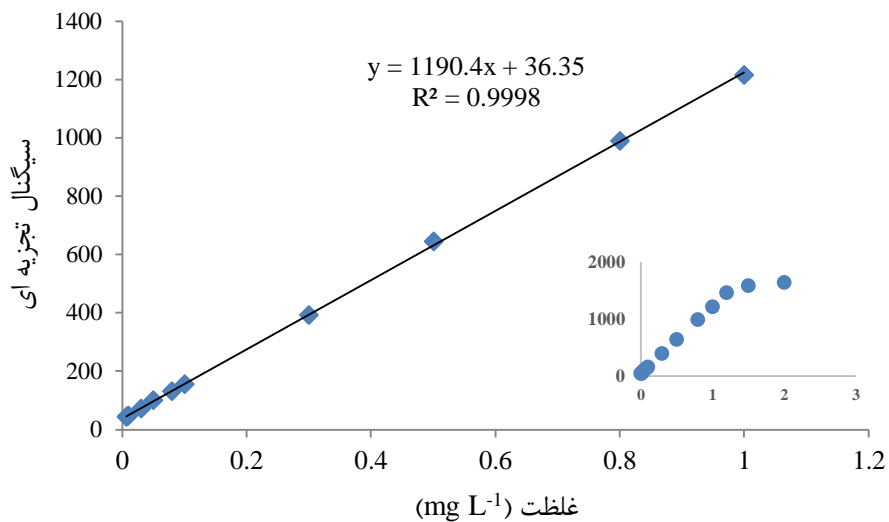


شکل (۲-۴۸): پروفایل مطلوبیت برای طراحی باکس بنکن در اندازه گیری همزمان ویتامین A و ویتامین E

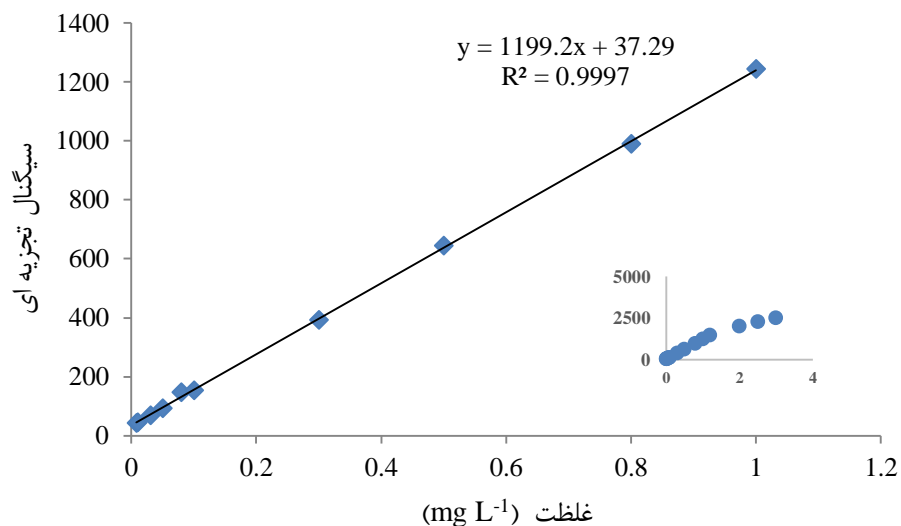
۲-۶-۷ رسم کالیبراسیون پیش تغلیظ برای اندازه گیری ویتامین A و ویتامین E

به منظور رسم منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ، محلول های نمونه با غلظت های متفاوت در گستره $0.05-2.0 \text{ mg L}^{-1}$ از ویتامین A و E تهیه شد و در شرایط بهینه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل در شکل های ۲-۴۹ و ۲-۵۰ نشان داده شده است. بدین منظور $14/0 \text{ mL}$ روغن حاوی ویتامین های A و E با $1/0 \text{ mL}$ سیکلو هگزان به عنوان رقیق کننده در یک لوله آزمایش یکنواخت گردید. $100/0 \mu\text{L}$ از مخلوط آب-تانول با نسبت حجمی ۲-۸ به عنوان حلال استخراج کننده و $110/0$ دی اکسان به عنوان حلال پخش کننده به سرعت به درون لوله آزمایش تزریق گردید. محلول ابری تشکیل شده به مدت ۱۰ دقیقه در حمام فراصوت قرار گرفت تا محلول استخراج کننده به درون محلول روغن پخش شود. پس از سانتریفیوژ نمونه با سرعت 3500 دور بر دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه، $5/0 \mu\text{L}$ از حلال ته نشین شده که در حدود $100/0 \mu\text{L}$ بود، به دستگاه HPLC تزریق و مورد

آنالیز قرار گرفت. با توجه به نتایج به دست آمده دامنه خطی منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ برای ویتامین A در محدود ۱/۰-۰/۰۰۶ mg L⁻¹ با ضریب تعیین R²=۰/۹۹۹۸ و برای ویتامین E در محدوده ۱/۲-۰/۰۰۷۵ mg L⁻¹ با ضریب تعیین R²=۰/۹۹۹۷ می باشد.



شکل (۲-۴۹): منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ ویتامین A



شکل (۲-۵۰): منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ ویتامین E

۲-۶-۸ ارقام شایستگی روش برای اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین E

مطابق قسمت ۲-۴-۱۰، در این روش پیشنهادی، حد تشخیص روش برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین E به ترتیب $1/6 \mu\text{g L}^{-1}$ و $2/3$ به‌دست آمد. حد کمی روش برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین E به ترتیب $5/9 \mu\text{g L}^{-1}$ و $7/6$ به‌دست آمد.

نتایج مربوط به دقت در جداول (۲-۴۶) و (۲-۴۷) آمده است. مقادیر t و درصد انحراف نسبی به‌ترتیب نشان‌دهنده دقت و صحت خوب روش است (سطح اطمینان ۹۵٪ مقدار t بحرانی برای ۲ درجه آزادی برابر ۴/۳۰ است).

جدول (۲-۴۶): نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت روش برای ویتامین A

درصد بازیابی	مقدار t	RSD%	ویتامین A اندازه‌گیری شده (mg L^{-1}) \pm SD*	ویتامین A در روغن (mg L^{-1})
۹۸/۲	۱/۴۵	۲/۴۴	0.049 ± 0.001	۰/۰۵۰
۹۸/۱	۲/۵۰	۱/۴۲	0.098 ± 0.001	۰/۱۰
۱۰۰/۶	۱/۶۰	۲/۱۹	0.51 ± 0.01	۰/۵۰

*Standard deviation (سه اندازه‌گیری)

$t_{\text{critical}}=4.30$ (95% confidence interval)

جدول (۲-۴۷): نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت روش برای ویتامین E

درصد بازیابی	مقدار t	RSD%	ویتامین E اندازه‌گیری شده (mg L^{-1}) \pm SD*	ویتامین E در روغن (mg L^{-1})
۱۰۲/۰	۱/۴۲	۲/۳۵	0.051 ± 0.001	۰/۰۵۰
۹۸/۸	۰/۸۸	۲/۳۳	0.099 ± 0.002	۰/۱۰
۹۸/۴	۱/۰۵	۲/۶۴	0.49 ± 0.01	۰/۵۰

*Standard deviation (سه اندازه‌گیری)

$t_{\text{critical}}=4.30$ (95% confidence interval)

بر اساس نتایج به دست آمده، فاکتور پیش‌تغلیظ (PF)، که به صورت نسبت شیب منحنی کالیبرا سیون پیش‌تغلیظ بر شیب منحنی کالیبرا سیون مستقیم تعریف می‌شود، برای ویتامین A و ویتامین E به ترتیب ۱۰۶ و ۱۴۱ با درصد بازیابی میانگین ۸۱/۵ درصد به‌دست آمد.

۲-۶-۹ بررسی اثر گونه‌های مزاحم برای اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین E

به منظور بررسی قابلیت کاربرد روش پیشنهادی، در نمونه‌های حقیقی، اثر مزاحمت‌های احتمالی در پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری ویتامین A و E مورد بررسی قرار گرفت (جدول (۲-۴۸)). بنابراین حضور این ویتامین‌های محلول در چربی هیچ نوع مزاحمتی در پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری ویتامین‌های A و E ندارد.

جدول (۲-۴۸): نتایج حاصل از بررسی اثر گونه‌های مزاحم در پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری ویتامین A و E

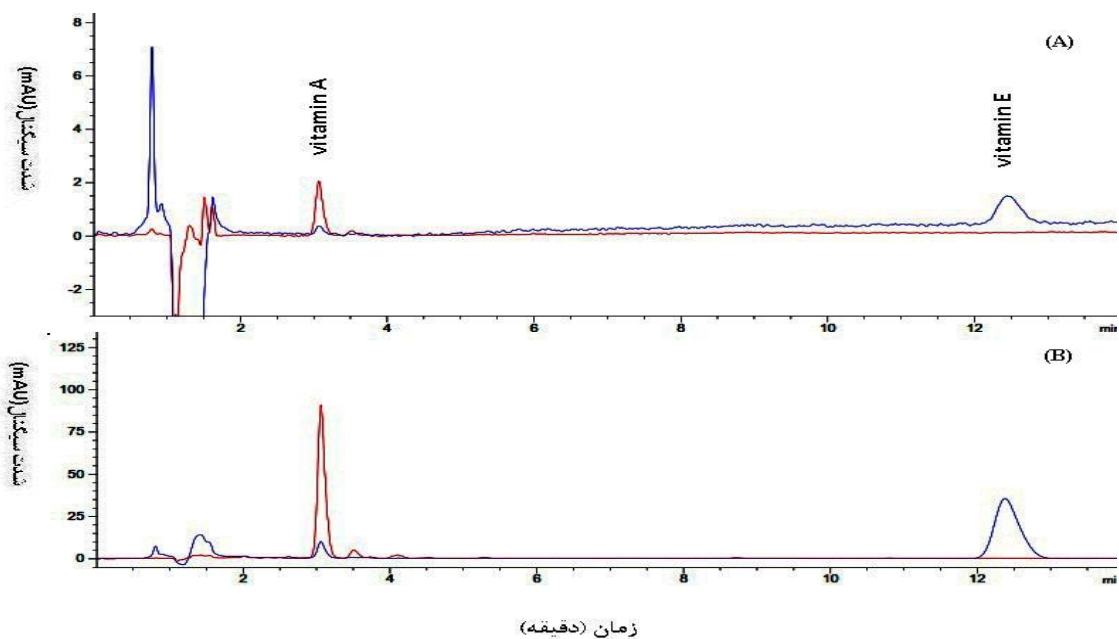
نسبت غلظت گونه به غلظت (وزنی-وزنی)	گونه‌های مورد بررسی
۱۰۰۰	ویتامین D ، ویتامین K

۲-۶-۱۰ اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین E در نمونه‌های روغن

به منظور بررسی توانایی روش پیشنهادی، در اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین E در نمونه‌های حقیقی، از این روش برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین E در نمونه‌های روغن استفاده شد.

در این روش ۸ نمونه از روغن‌های گیاهی مختلف با روش افزایش استاندارد در سه غلظت متفاوت از استاندارد و با استفاده از منحنی کالیبراسیون پیش‌تغلیظ ویتامین A و ویتامین E تحت شرایط بهینه مورد تجزیه قرار گرفت که نتایج آن در جدول (۲-۴۹) آورده شده است. بدین منظور ۱۴/۰ mL روغن حاوی ویتامین‌های A و E با ۱/۰ mL سیکلوهگزان به‌عنوان رقیق‌کننده در یک لوله آزمایش یکنواخت گردید. ۱۰۰/۰ μ L از مخلوط آب-اتانول با نسبت حجمی ۲-۸ به‌عنوان حلال استخراج‌کننده و ۱۱۰/۰ μ L دی‌اکسان به‌عنوان حلال پخش‌کننده به سرعت به درون لوله آزمایش تزریق گردید. محلول ابری تشکیل شده به مدت ۲۰ دقیقه در حمام فراصوت قرار گرفت تا محلول استخراج‌کننده به

درون محلول روغن پخش شود. پس از سانتریفیوژ نمونه با سرعت ۳۵۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه، ۵/۰ μL از حلال ته نشین شده، به دستگاه HPLC تزریق و مورد آنالیز قرار گرفت. همچنین با توجه به نتایج اندازه‌گیری همزمان این ویتامین‌ها در حضور هم تغییری در سیگنال یکدیگر ایجاد نمی‌کنند، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که اندازه‌گیری همزمان این ویتامین‌ها در نمونه حقیقی روغن، امکان پذیر می‌باشد. شکل ۲-۵۱ کروماتوگرام به دست آمده از نمونه روغن زیتون سنتی را تحت شرایط بهینه نشان می‌دهد.



شکل (۲-۵۱): کروماتوگرام نمونه (A) روغن زیتون سنتی، (B) روغن زیتون حاوی 0.1 mg L^{-1} ویتامین A و ویتامین E. شرایط آزمایش:، حجم محلول نمونه ۱۵/۰ mL، ۱۰۰/۰ μL حلال استخراج کننده (آب-تانول) نسبت حجمی ۲-۸، حجم حلال پخش کننده ۱۱۰/۰ μL ، زمان استخراج ۱۰/۰ دقیقه، زمان سانتریفیوژ کردن ۱۵/۰ دقیقه، در طول موج ۳۲۶ nm (رنگ قرمز برای اندازه‌گیری ویتامین A) و ۲۱۶ nm (رنگ آبی برای اندازه‌گیری ویتامین E)

جدول (۲-۴۹): نتایج نمونه های حقیقی برای اندازه گیری همزمان ویتامین A و ویتامین E

نمونه	آنالیت اضافه شده	Vitamin A			Vitamin E		
		آنالیت اندازه گیری شده ($\mu\text{g L}^{-1}$)	درصد بازیابی	RSD	آنالیت اندازه گیری شده ($\mu\text{g L}^{-1}$)	درصد بازیابی	RSD
	.	۹/۱۸	-	۲/۱۴	۹/۹۱۰	-	۲/۶۳
روغن زیتون سنتی	۱۰/۰۰	۱۸/۸۵	۹۶/۷۰	۱/۸۵	۱۹/۶۷	۹۷/۶۰	۲/۲۵
	۵۰/۰۰	۵۸/۲۲	۹۸/۰۸	۴/۰۳	۵۹/۱۴	۹۸/۴۶	۳/۱۵
	۱۰۰/۰	۱۰۸/۶۰	۹۹/۴۲	۳/۲۴	۱۰۸/۱۱	۹۸/۲۰	۱/۷۸
	.	۸/۳۵	-	۱/۴۶	۹/۳۴۰	-	۳/۱۴
روغن زیتون تجاری (اویلا)	۱۰/۰۰	۱۷/۸۱	۹۴/۶۰	۳/۱۵	۱۹/۶۳	۱۰۲/۹۰	۱/۶۳
	۵۰/۰۰	۵۷/۱۲	۹۷/۵۴	۲/۹۲	۵۹/۸۱	۱۰۰/۹۴	۴/۱۲
	۱۰۰/۰	۱۰۶/۱۱	۹۷/۷۶	۲/۷۳	۱۰۸/۷۰	۹۹/۳۸	۲/۹۱
	.	۷/۱۵۰	-	۳/۷۲	۸/۱۱۰	-	۴/۱۲
روغن هسته انگور (فامیلا)	۱۰/۰۰	۱۶/۲۰	۹۰/۵۰	۱/۹۷	۱۷/۲۵	۹۱/۴۰	۲/۶۳
	۵۰/۰۰	۵۶/۵۱	۹۸/۷۲	۱/۳۷	۵۷/۵۳	۹۸/۸۴	۳/۱۲
	۱۰۰/۰	۱۰۶/۷۰	۹۹/۶۰	۲/۱۴	۱۰۷/۴۰	۹۹/۳۱	۲/۴۳
	.	۶/۱۴۰	-	۱/۷۶	۸/۴۲	-	۳/۰۴
روغن ذرت (فامیلا)	۱۰/۰۰	۱۵/۴۰	۹۲/۶۰	۴/۱۵	۱۷/۷۸	۹۳/۶۰	۱/۸۶
	۵۰/۰۰	۵۵/۱۸	۹۸/۰۸	۲/۴۸	۵۷/۴۲	۹۸/۰۰	۵/۱۲
	۱۰۰/۰	۱۰۵/۸۰	۹۹/۶۷	۱/۹۴	۱۰۷/۶۰	۹۹/۱۹	۳/۱۵
	.	N.D	-	-	N.D	-	-
روغن آفتابگردان (لادن)	۱۰/۰۰	۹/۹۷۱	۹۹/۷۱	۳/۷۶	۹/۸۴	۹۸/۴۰	۲/۴۸
	۵۰/۰۰	۴۹/۶۱	۹۹/۲۲	۲/۸۷	۴۹/۱۳	۹۸/۲۶	۴/۳۷
	۱۰۰/۰	۹۹/۷۶	۹۹/۷۶	۴/۲۰	۹۹/۵۴	۹۹/۵۴	۱/۱۱
	.	۶/۳۱۰	-	۲/۱۰	۷/۵۲۰	-	۱/۸۴
روغن کنجد (اویلا)	۱۰/۰۰	۱۵/۶۲	۹۳/۱۰	۲/۹۴	۱۷/۵۴	۱۰۰/۲۰	۱/۴۱
	۵۰/۰۰	۵۵/۹۱	۹۹/۲۰	۱/۳۴	۵۶/۸۱	۹۸/۵۸	۱/۶۵
	۱۰۰/۰	۱۰۵/۲	۹۸/۹۴	۳/۱۰	۱۰۶/۶	۹۹/۱۳	۲/۸۳
	.	۶/۱۱۰	-	۲/۶۵	۸/۲۴۰	-	۴/۱۲
روغن کرچک (سنتی)	۱۰/۰۰	۱۵/۱۳	۹۰/۲۰	۱/۸۲	۱۸/۰۲	۹۷/۸۰	۴/۵۶
	۵۰/۰۰	۵۵/۳۱	۹۸/۴۰	۳/۱۷	۵۷/۹۴	۹۹/۴۰	۳/۱۵
	۱۰۰/۰	۱۰۴/۱	۹۸/۰۳	۳/۵۳	۱۰۷/۳۰	۹۹/۰۷	۳/۲۷
	.	ND	-	-	۸/۱۸۰	-	۳/۷۵
روغن کلزا (اویلا)	۱۰/۰۰	۹/۸۲۰	۹۸/۲۰	۳/۱۳	۱۷/۸۳	۹۶/۵۰	۳/۱۸
	۵۰/۰۰	۴۹/۷۱	۹۹/۴۲	۱/۶۵	۵۷/۷۵	۹۹/۱۴	۴/۰۴
	۱۰۰/۰	۹۸/۶۳	۹۸/۶۳	۱/۷۲	۱۰۸/۰۰	۹۹/۸۵	۲/۵۶

۱۱-۶-۲ مقایسه روش پیشنهادی با برخی روش های به کار گرفته شده برای اندازه گیری

همزمان ویتامین A و ویتامین E

در جدول ۲-۵۰ تعدادی از روش های پیش تغلیظ و اندازه گیری ویتامین A و ویتامین E آورده شده است. در این جدول پارامترهای مختلف، مانند حد تشخیص، دامنه خطی و فاکتور پیش تغلیظ برای مقایسه آورده شده است. مطالعه حاضر دارای گستره خطی بهتر نسبت به مراجع ۴۱، ۱۰۴ و ۱۰۵ دارد. همچنین بررسی نتایج نشان می دهد که حد تشخیص روش پیشنهادی بهتر از مراجع شماره ۴۰، ۴۱ و ۱۰۴ می باشد.

جدول (۲-۵۰): مقایسه روش پیشنهادی با برخی از روش های گزارش شده برای اندازه گیری ویتامین A و ویتامین E

مرجع	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LDR ($\mu\text{g L}^{-1}$)	روش	ماتریکس	آنالیت
۳۷	۱/۱۷	۰/۱۵-۱/۵	Micellar liquid chromatography	شربت مولتی ویتامین	ویتامین A ویتامین E
۳۸	۰/۱۳	۰/۵-۲۰۰/۰	Capillary liquid chromatography-pressurized liquid extraction-DLLME	محصولات بهداشتی	ویتامین E
۳۹	۰/۲	۵/۰-۲۵۰۰/۰	HPLC-FL	روغن گیاهی	ویتامین E
۴۰	۸/۸	۵۰/۰ - ۱۸/۰ $\times 10^3$	HPLC-FLD	گیاهان دارای برگ سبز	ویتامین E
۴۱	۳/۰	۰/۵ $\times 10^2$ - ۴/۰ $\times 10^3$	HPLC-UV	سرم انسان	ویتامین A ویتامین E
۴۲	۰/۲	۰/۵-۵۰۰/۰	Fiber solid phase extraction-HPLC	شربت مولتی ویتامین	ویتامین E
۱۰۴	۵۰/۰	۱۰/۰-۵۰۰/۰	HPLC-DAD	شیر و نوشیدنی	ویتامین A ویتامین E
۱۰۵	۰/۲	۳۰۰/۰-۷۰۰/۰	HPLC-PDA	سرم انسانی	ویتامین A ویتامین E
مطالعه حاضر	۱/۶	۶/۰-۱۰۰۰/۰	UA-RP-DLLME-HPLC	نمونه روغن	ویتامین A ویتامین E
	۲/۳	۷/۵-۱۲۰۰/۰			

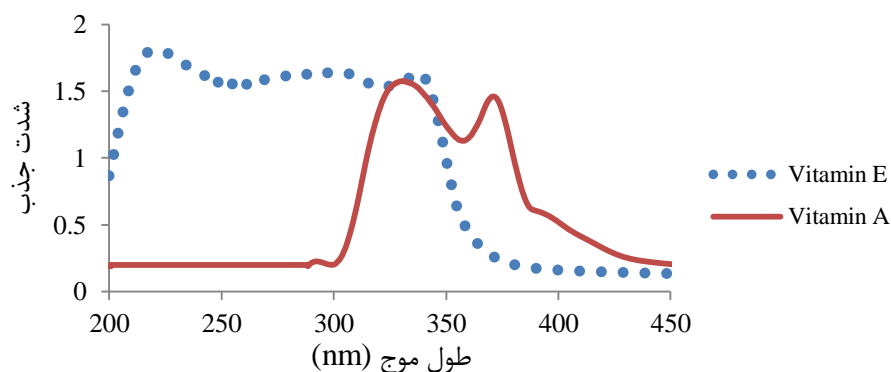
۲-۷ روش میکرواستخراج مایع مایع پخشی معکوس با کمک فاز غنی شده از سورفکتانت

و به کمک امواج فراصوت برای پیش تغلیظ و اندازه گیری مقادیر کم ویتامین A و E

با توجه به اهمیت ویتامین‌های محلول در چربی و نقش آن بر سلامتی انسان، روشی ساده و گزینش‌پذیر برای اندازه‌گیری مقادیر کم ویتامین A و E ارائه شد. در این پژوهش روش میکرواستخراج مایع مایع پخشی معکوس با کمک فاز غنی شده از سورفکتانت و به کمک امواج فراصوت به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری مقادیر کم این ویتامین‌ها در روغن‌های خوراکی برای آنالیز آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

۲-۷-۱ ثبت طیف UV-Vis برای ویتامین A و ویتامین E

برای تعیین طول موج‌های دارای جذب ماکزیمم ویتامین‌های A و E، طیف جذبی محلول‌های این داروها ثبت گردید. بدین منظور محلول $5/0 \text{ mg L}^{-1}$ ویتامین A و ویتامین E در فاز متحرک با مخلوط ۱:۹ آب مقطر- متانول (به عنوان حلال) تهیه و طیف جذبی این ویتامین‌ها نسبت به فاز متحرک به‌عنوان شاهد در گستره $200-450 \text{ nm}$ ثبت گردید (شکل ۲-۵۲). به دلیل رسیدن به حساسیت بیشتر، اندازه‌گیری‌ها در دو طول موج ماکزیمم 216 و 326 nm به ترتیب برای ویتامین E و ویتامین A، انجام پذیرفت.

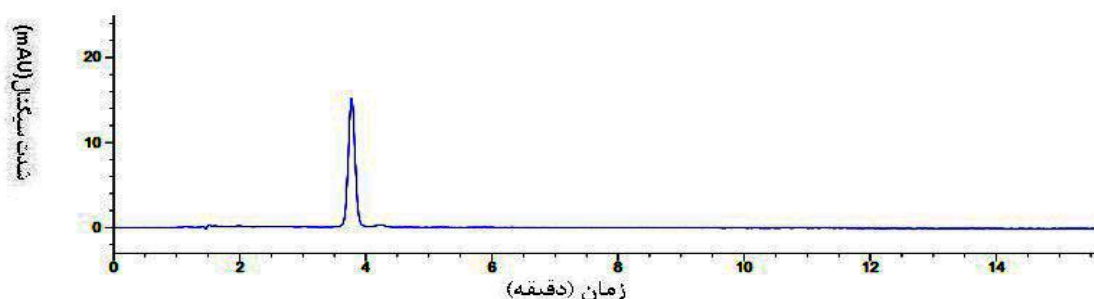


شکل (۲-۵۲): طیف جذبی ویتامین A و ویتامین E، شرایط: غلظت ویتامین A و ویتامین E با غلظت $5/0 \text{ mg L}^{-1}$.

حلال مخلوط ۱:۹ ترکیب آب مقطر- متانول

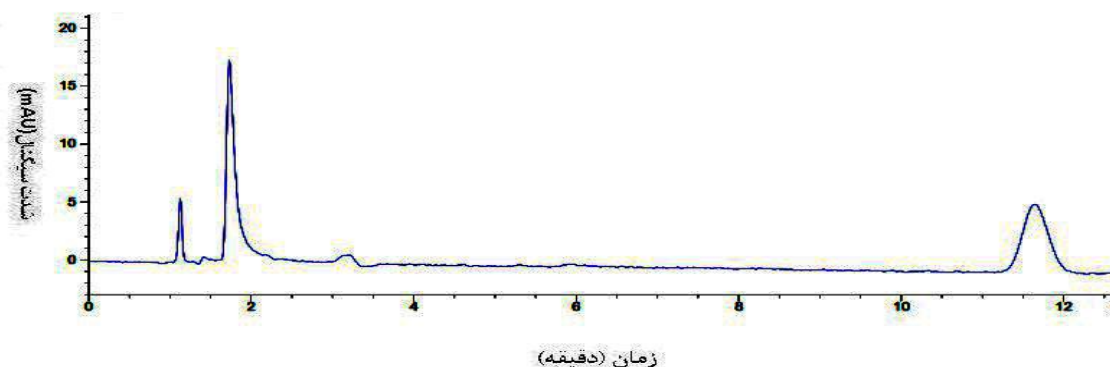
۲-۷-۲ شرایط کروماتوگرافی برای اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین E

برای اندازه‌گیری همزمان ویتامین A و ویتامین E در روغن‌های خوراکی، از سیستم کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالای فاز معکوس (RP-HPLC) استفاده شد. از مخلوط متانول-آب با نسبت حجمی ۹:۱ و سرعت جریان ۱/۰ میلی لیتر بر دقیقه به عنوان فاز متحرک انتخاب گردید [۳۸]. کروماتوگرام حاصل از محلول $10/0 \text{ mg L}^{-1}$ ویتامین A و ویتامین E و مخلوط آن‌ها در سه غلظت در شکل‌های (۲-۵۳) تا (۲-۵۷) نشان داده شده است.



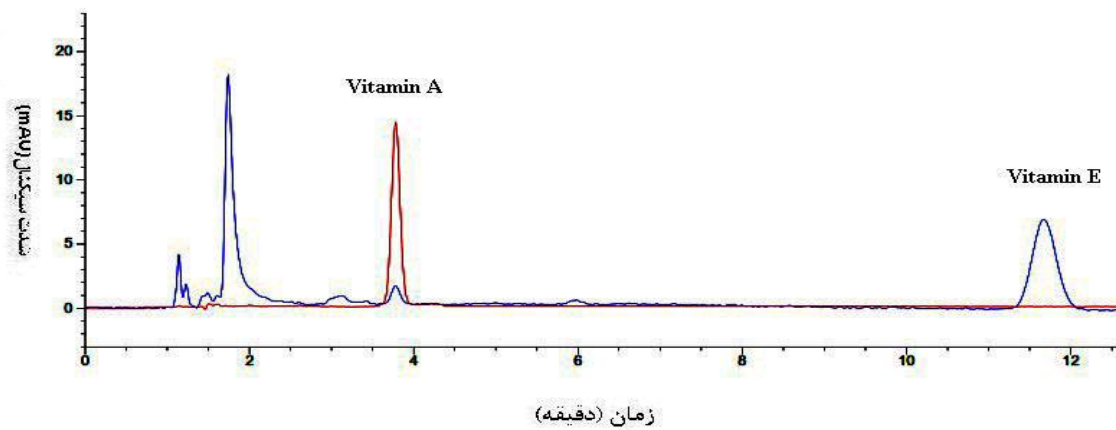
شکل (۲-۵۳): کروماتوگرام مربوط به استاندارد ویتامین A با غلظت $10/0 \text{ mg L}^{-1}$. فاز متحرک: مخلوط ۹:۱ ترکیب

متانول-آب مقطر در طول موج ۳۲۶ nm

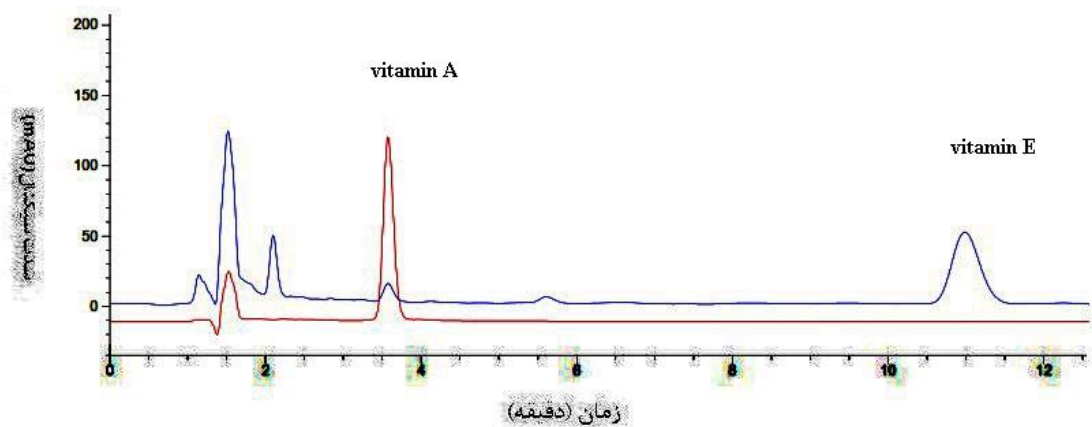


شکل (۲-۵۴): کروماتوگرام مربوط به استاندارد ویتامین E با غلظت $10/0 \text{ mg L}^{-1}$. فاز متحرک: مخلوط ۹:۱ ترکیب

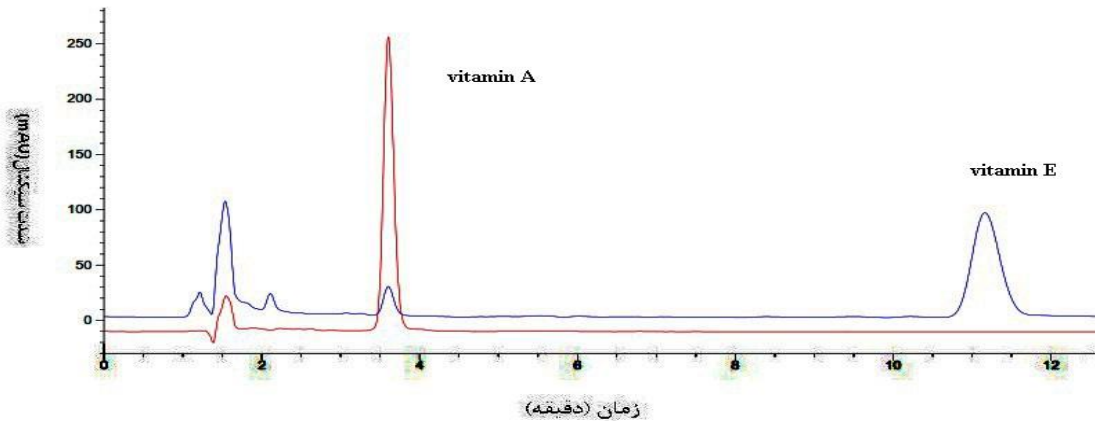
متانول-آب مقطر در طول موج ۲۱۶ nm



شکل (۲-۵۵): کروماتوگرام مربوط به استاندارد مخلوط ویتامین A و E هر یک با غلظت 1.0 mg L^{-1} فاز متحرک: مخلوط ۱:۹ ترکیب متانول- آب مقطر در طول موج 326 nm (رنگ قرمز برای اندازه‌گیری ویتامین A) و 216 nm (رنگ آبی برای اندازه‌گیری ویتامین E)



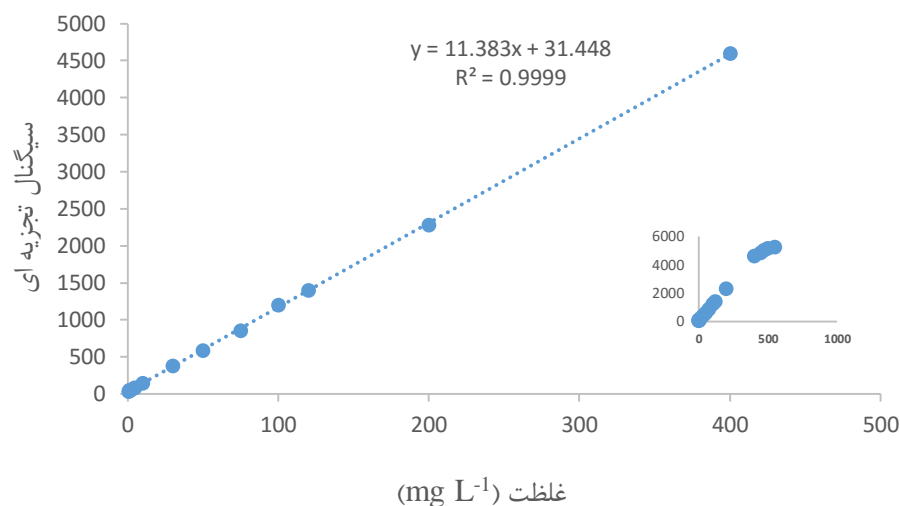
شکل (۲-۵۶): کروماتوگرام مربوط به استاندارد مخلوط ویتامین A و E هر یک با غلظت 5.0 mg L^{-1} فاز متحرک: مخلوط ۱:۹ ترکیب متانول- آب مقطر در طول موج 326 nm (رنگ قرمز برای اندازه‌گیری ویتامین A) و 216 nm (رنگ آبی برای اندازه‌گیری ویتامین E)



شکل (۲-۵۷): کروماتوگرام مربوط به استاندارد مخلوط ویتامین A و E هر یک با غلظت $1.0 \times 10^{-1} \text{ mg L}^{-1}$. فاز متحرک: مخلوط ۱:۹ ترکیب متانول- آب مقطر در طول موج ۳۲۶ nm (رنگ قرمز برای اندازه‌گیری ویتامین A) و ۲۱۶ nm (رنگ آبی برای اندازه‌گیری ویتامین E)

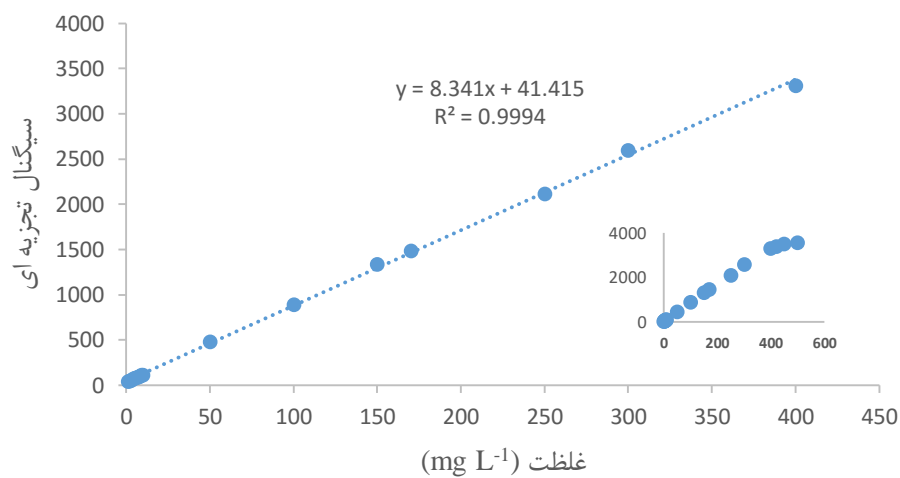
۳-۷-۲ رسم منحنی کالیبراسیون مستقیم برای اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین E

محلول‌هایی با غلظت‌های متفاوت از ویتامین A و ویتامین E در محدوده غلظتی 0.5 mg L^{-1} تا 50.0 mg L^{-1} آن‌ها با رقیق‌سازی از محلول 200.0 mg L^{-1} تهیه شده در n-بوتانول (به‌عنوان حلال) با محلول 0.16 mol L^{-1} Brij-35 (بعنوان فاز استخراجی) تهیه شدند. سپس ۵/۰ میکرولیتر از محلول به طور مستقیم به دستگاه HPLC تزریق گردید و سیگنال حاصل که سطح زیر پیک نمونه بود، ثبت گردید. منحنی‌های کالیبراسیون مربوطه نیز از رسم تغییرات سیگنال آنالیت بر حسب غلظت این دو ویتامین به‌دست آمد که در محدوده غلظتی $0.6-40.0 \text{ mg L}^{-1}$ برای ویتامین A و $4.0-40.0 \text{ mg L}^{-1}$ برای ویتامین E خطی می‌باشد. نتایج این بررسی به ترتیب در شکل‌های (۲-۵۸) و (۲-۵۹) برای ویتامین A و ویتامین E نشان داده شده است.



شکل (۲-۵۸): منحنی کالیبراسیون مستقیم ویتامین A. غلظت‌های مختلفی از آنالیت در محلول 0.16 mol L^{-1} Brij-35، محلول متانول- آب مقطر ۹:۱ به عنوان فاز متحرک، سرعت جریان $1/0$ میلی لیتر بر دقیقه و طول موج 326 nm

۳۲۶.



شکل (۲-۵۹): منحنی کالیبراسیون مستقیم ویتامین E. غلظت‌های مختلفی از آنالیت در محلول 0.16 mol L^{-1} Brij-35، ترکیب متانول- آب مقطر ۹:۱ به عنوان فاز متحرک، سرعت جریان $1/0$ میلی لیتر بر دقیقه و طول موج 216 nm .

۲-۷-۴ روش کار در پیش تغلیظ و اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین E

۴/۰ mL روغن خوراکی (روغن آفتابگردان لادن) با ۱/۰ mL سیکلوهگزان به‌عنوان رقیق کننده در یک لوله آزمایش یکنواخت گردید. محلول استخراج (محلول سورفکتانت) به سرعت به درون لوله آزمایش تزریق گردید. محلول تشکیل شده به مدت ۱۵ دقیقه در حمام فراصوت قرار گرفت تا محلول سورفکتانت به درون محلول روغن پخش شود. پس از سانتریفیوژ نمونه با سرعت ۳۵۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه، ۵/۰ μL از فاز غنی شده از سورفکتانت که در واقع نقش حلال استخراج را دارد، به دستگاه HPLC تزریق و مورد آنالیز قرار گرفت.

۲-۷-۵ بررسی و بهینه‌سازی متغیرهای موثر در پیش تغلیظ و اندازه‌گیری ویتامین A و

ویتامین E

در این پروژه، از روش میکرواستخراج مایع مایع پخش‌ی معکوس با فاز آبی غنی شده از سورفکتانت و با کمک امواج فراصوت برای پیش تغلیظ و اندازه‌گیری ویتامین A و E در روغن های خوراکی استفاده شد. بنابراین، به منظور فراهم نمودن بهترین شرایط جدا سازی، پارامترهای مؤثر بر میکرواستخراج ویتامین ها، مورد بررسی قرار گرفتند. فاکتورهایی که مورد بررسی قرار گرفتند عبارتند از:

- ۱- نوع سورفکتانت
- ۲- حجم محلول نمونه
- ۳- غلظت سورفکتانت
- ۴- حجم سورفکتانت
- ۵- زمان استخراج
- ۶- درصد اسید افزوده شده

در بررسی فاکتورهای مؤثر، ابتدا از روش بهینه‌سازی یک متغیر در یک زمان، جهت تعیین سطوح متغیرهای مؤثر بر روش و سپس از طراحی فاکتوریل کامل جهت مشخص نمودن فاکتورهای مهم در استخراج استفاده شد. پس از مشخص شدن فاکتورهای مهم، از طراحی مکعب مرکزی (CCD) برای بهینه‌سازی فاکتورهای مؤثر بر استخراج استفاده شد. با توجه به مقادیر بهینه هر فاکتور که در جدول ۲-۵۱ گزارش شده است، سطوح مورد نظر برای روش طراحی آزمایش تعیین گردید. همچنین نتایج کامل بهینه‌سازی یک متغیر در یک زمان در پیوست ۴ ارائه شده است. قابل ذکر است که در مراحل بهینه‌سازی پارامترها به روش یک متغیر در یک زمان غلظت ویتامین‌های مورد بررسی برابر 0.5 mg L^{-1} میلی‌گرم بر لیتر بوده است.

جدول (۲-۵۱): نتایج حاصل از بهینه‌سازی یک متغیر در یک زمان در پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری ویتامین‌های A و E

فاکتور	محدوده بررسی	مقدار بهینه
نوع سورفکتانت	SDS, Brij-35, CTAB, Tween 80, triton-x100	Brij-35
غلظت سورفکتانت (mol L^{-1})	۰/۱-۰/۵	۰/۲
حجم سورفکتانت (μL)	۲۰-۱۰۰	۳۰
درصد اسید افزوده شده	۰-۲۰/۰ (درصد حجمی-حجمی)	۰
زمان استخراج (دقیقه)	۱-۱۵	۱۰

۲-۷-۶ بهینه‌سازی فاکتورهای مؤثر بر پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین E با

روش طراحی آزمایش

با توجه به مطالعات انجام شده فاکتورهای نظیر غلظت و نوع سورفکتانت، حجم سورفکتانت، زمان استخراج و درصد اسید افزوده شده در میزان پاسخ آشکارساز مؤثر می‌باشند. قابل ذکر است برای بررسی اثر pH، از فاکتور افزایش اسید استیک به صورت مستقیم استفاده گردید. از طرفی احتمال

برهم‌کنش بین متغیرها وجود دارد و در نتیجه شرایط حاصل از بهینه‌سازی تغییر یک متغیر در یک زمان نمی‌تواند شرایط بهینه واقعی باشد. بنابراین لازم است اثر فاکتورهای موثر بر فرایند به روش‌های بهینه‌سازی همزمان مورد بررسی قرار گیرد. در این پروژه از روش طراحی فاکتوریل برای بررسی برهم‌کنش‌ها و بهینه‌سازی فاکتورهای موثر بر فرایند استفاده گردید. بهینه‌سازی به روش طراحی فاکتوریل مستلزم یافتن مهم‌ترین فاکتورهای موثر و بهینه‌سازی آن‌ها می‌باشد. در ادامه، مراحل انجام کار در بهینه‌سازی همزمان متغیرها به روش طراحی فاکتوریل آورده شده است. لازم به ذکر است که برای فاکتور نوع سورفکتانت از مقادیر بهینه حاصل از روش یک متغیر در یک زمان استفاده شد. با استفاده از نتایج حاصل از روش بهینه‌سازی یک متغیر در یک زمان، سطوح بالا و پایین هریک از فاکتورها مشخص گردید. سطوح انتخاب شده برای فاکتورها در جدول ۲-۵۲ آورده شده است.

جدول (۲-۵۲): تعیین سطح فاکتورهای موثر بر پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین E

علامت	فاکتور	سطح بالا (+)	سطح پایین (-)
A	حجم سورفکتانت (μL)	۷۵/۰	۲۵/۰
B	غلظت سورفکتانت (M)	۰/۵	۰/۱
C	زمان استخراج (دقیقه)	۱۵	۱
D	درصد اسید افزوده شده (حجمی-حجمی)	۲۰/۰	۰

برای طراحی آزمایش‌ها به منظور تعیین فاکتورهای مهم بر پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین E، از طراحی فاکتوریل کامل استفاده گردید و برای پردازش داده‌ها نیز از نرم‌افزار Statgraphic 05 استفاده شد. تعداد آزمایش‌ها در طراحی فاکتوریل کامل هنگامی که ۴ فاکتور مورد بررسی باشد، با توجه به فرمول تعداد آزمایشات برابر با 2^n ، ۱۶ آزمایش خواهد بود که در جدول ۲-۵۳ آزمایش‌های این طراحی آورده شده است (n تعداد فاکتورهای مورد بررسی است). تمامی آزمایش‌ها تحت شرایط مشخص

شده در طرح فاکتوریل کامل انجام و پاسخ به صورت MER که حاصل ضرب درصد بازیابی دو آنالیت می باشد، ثبت گردید.

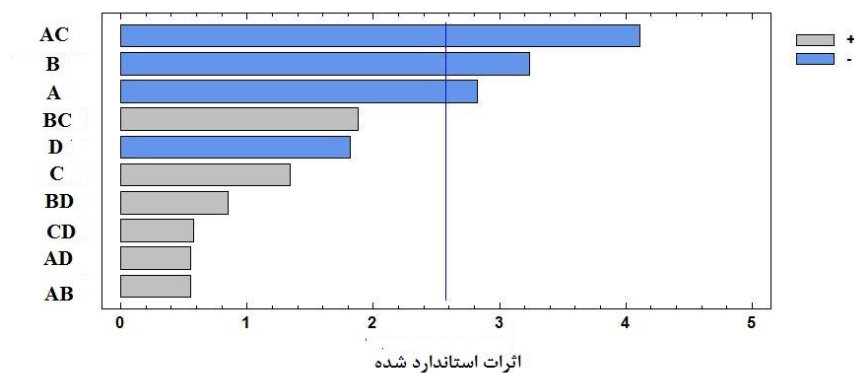
در ادامه نتایج به دست آمده مورد تحلیل قرار گرفته و فاکتورهای موثر به ترتیب اهمیت مشخص می شوند که نتایج مربوط به ضرایب حاصل از طراحی فاکتوریل در جدول ۲-۵۴ نشان داده شده است. شکل ۲-۶۰ نمودار پارتو حاصل از طراحی فاکتوریل کامل را نشان می دهد. نمودار پارتو نشان می دهد که فاکتورهای حجم و غلظت سورفکتانت و همچنین برهمکنش بین حجم سورفکتانت و زمان استخراج دارای پارامتر P کمتر از ۰/۰۵ و جزو فاکتورهای موثر بر پیش تغلیظ و اندازه گیری همزمان ویتامین A و ویتامین E می باشند.

جدول (۲-۵۳): طراحی فاکتوریل کامل و نتایج آن برای اندازه گیری همزمان ویتامین A و ویتامین E

ردیف	A	B	C	D	% Recovery vitamin A	% Recovery vitamin E	MER
۱	+	-	+	+	۲۹	۳۵	۰/۱۰
۲	+	-	+	-	۳۰	۳۷	۰/۱۳
۳	+	-	+	+	۵۲	۵۷	۰/۳۱
۴	+	+	+	-	۶۴	۶۵	۰/۴۰
۵	+	-	+	-	۶۴	۷۵	۰/۴۸
۶	+	+	+	+	۲۵	۳۶	۰/۰۹
۷	+	+	+	-	۱۷	۳۰	۰/۰۵
۸	+	-	+	+	۶۳	۷۲	۰/۴۵
۹	+	-	-	+	۳۲	۳۸	۰/۱۲
۱۰	+	+	+	+	۵۱	۵۶	۰/۳۰
۱۱	+	+	-	-	۳۷	۴۲	۰/۱۵
۱۲	+	+	+	-	۳۶	۴۰	۰/۱۴
۱۳	-	+	-	+	۲۶	۳۹	۰/۱۰
۱۴	-	-	-	-	۶۲	۷۱	۰/۴۴
۱۵	+	-	-	-	۶۱	۶۳	۰/۳۸
۱۶	+	+	-	+	۲۴	۳۵	۰/۰۸۷

جدول (۲-۵۴): جدول ضرایب حاصل از طرح فاکتوریل کامل برای اندازه‌گیری همزمان ویتامین A و ویتامین E

منبع	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	ارزش F	مقدار P
A	۰/۰۵۶۷	۱	۰/۰۵۶۷	۷/۹۸	۰/۰۳۶۹
B	۰/۰۷۴۶	۱	۰/۰۷۴۶	۱۰/۵۰	۰/۰۲۲۹
C	۰/۰۱۲۸	۱	۰/۰۱۲۸	۱/۸۰	۰/۲۳۷۰
D	۰/۰۲۳۴	۱	۰/۰۲۳۴	۳/۳۰	۰/۱۲۸۸
AB	۰/۰۰۲۱	۱	۰/۰۰۲۱	۰/۳۱	۰/۶۰۳۱
AC	۰/۱۲۰۲	۱	۰/۱۲۰۲	۱۶/۹۱	۰/۰۰۹۲
AD	۰/۰۰۲۲	۱	۰/۰۰۲۲	۰/۳۱	۰/۶۰۳۱
BC	۰/۰۲۵۰	۱	۰/۰۲۵۰	۳/۵۲	۰/۱۱۹۴
BD	۰/۰۰۵۲	۱	۰/۰۰۵۲	۰/۷۲	۰/۴۳۳۶
CD	۰/۰۰۲۳	۱	۰/۰۰۲۳	۰/۳۳	۰/۵۹۱۹
Total error	۰/۰۳۵۵	۵	۰/۰۰۷۱		
Total (corr.)	۰/۳۶۰۴	۱۵			



شکل (۲-۶۰): نمودار پارتو حاصل از طرح فاکتوریل کامل برای اندازه‌گیری همزمان ویتامین A و ویتامین E
 بنابراین بر اساس نتایج حاصل از مرحله غربالگری، فاکتورهای غلظت و حجم سورفکتانت به عنوان فاکتورهای مهم و موثر بر پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری ویتامین‌های A و E شناخته شدند. در ادامه، توسط طراحی مکعب مرکزی (CCD) با α مساوی با ۱/۴۱۴، مقادیر بهینه این فاکتورهای مهم تعیین می‌شوند. در طراحی CCD هر فاکتور در سه سطح بالا، میانی و پایین مورد بررسی قرار می‌گیرد. این سطوح با

توجه به نتایج حاصل از بهینه‌سازی تغییر یک متغیر در یک زمان، تعیین شد. در تمام آزمایش‌های انجام شده در طراحی CCD، فاکتورهای غیر مهم ثابت در نظر گرفته شدند. بنابراین استخراج با زمان استخراج ۱۵ دقیقه و بدون افزایش اسید انجام پذیرفت. مقادیر این فاکتور با توجه به ضرایب آن‌ها در طرح فاکتوریل کامل انتخاب شدند. سطوح بالا و پایین در طراحی CCD، مشابه طراحی فاکتوریل کامل می‌باشد با این تفاوت که بررسی‌ها در ۵ سطح انجام می‌پذیرد. در این طراحی، تعداد آزمایش‌ها هنگامی که ۲ فاکتور با ۳ نقطه مرکزی وجود دارد طبق رابطه (۱-۱۱)، برابر با ۱۱ آزمایش می‌باشد. جدول ۲-۵۵ ماتریس طراحی CCD و همچنین مقادیر MER برای دو آنالیت را نشان می‌دهد.

جدول (۲-۵۵): طراحی CCD و نتایج آن برای پیش تغلیظ و اندازه‌گیری همزمان ویتامین A و ویتامین E

Run	A	B	درصد بازیابی ویتامین A	درصد بازیابی ویتامین E	MER
۱	۰	۰	۶۱	۷۲	۰/۴۴۲
۲	۰	۰	۶۱	۷۳	۰/۴۴۲
۳	+ ۱/۴۱۴	۰	۶۱	۱۰	۰/۰۰۶۱
۴	۰	- ۱/۴۱۴	۴۲	۴۹	۰/۲۰۶۴
۵	۰	+ ۱/۴۱۴	۳۷	۴۹	۰/۱۸۰۴
۶	+	+	۱۰	۱۲	۰/۰۱۲
۷	- ۱/۴۱۴	۰	۴۰	۵۷	۰/۲۲۹۵
۸	۰	۰	۶۱	۷۲	۰/۴۴۲
۹	-	-	۶۵	۹۳	۰/۵۸۸
۱۰	+	-	۲۳	۲۰	۰/۰۴۶۲
۱۱	-	+	۲۹	۳۸	۰/۱۱۲

به‌منظور به دست آوردن مدل تجربی برای پیش‌بینی پاسخ، رابطه‌های خطی و درجه دوم و برهم‌کنش‌ها و داده‌های به دست آمده از آزمایش‌ها پردازش شده مربوط به پاسخ ویتامین‌های A و E در جدول ۲-۵۶، نشان داده شده است. براساس نتایج به دست آمده، غلظت و حجم سورفکتانت از فاکتورهای مهم و دارای اثر منفی بر روی پاسخ می‌باشد و سبب افزایش راندمان استخراج می‌شود. بنابراین با کاهش غلظت Brij-35 و همچنین کاهش حجم محلول سورفکتانت سیگنال تجزیه‌ای

حاصل افزایش می یابد. غلظت سورفکتانت از این نظر مهم است که می تواند امولسیون و فرایند انتقال جرم را تحت تاثیر قرار دهد. با انتخاب غلظت های پایین Brij-35، بازده استخراج افزایش یافت. با توجه به نتایج به دست آمده، در غلظت های بالاتر و در حدود 0/5 M، تقریباً جدایی فاز پس از سانتریفیوژ اتفاق نمی افتد زیرا با افزایش غلظت سورفکتانت کشش سطحی بین دو فاز، کاهش یافته و باعث افزایش حلالیت قطره استخراج در محلول نمونه و کاهش بازده استخراج می شود. برای بررسی صحت مدل ارائه شده به صورت معادله درجه دوم، تحلیل واریانس انجام شد که نتایج در جدول (۲-۵۷) نشان داده شده است. همانطور که مشخص است عبارات حجم حلال استخراج و برهمکنش AA و BB دارای مقدار P کمتر از 0/05 بوده و از نظر آماری معنی دار هستند و نقش مهمی بر روی تعیین مقدار بهینه دارند.

جدول (۲-۵۶): پارامترهای آماری برای طراحی CCD انجام شده برای پاسخ پیش تغلیظ و اندازه گیری ویتامین A و

ویتامین E

عبارت	ضریب	خطای استاندارد ضریب	t	P
ثابت	0/4420	0/0539	8/19	0/001
A	-0/1197	0/0330	-3/62	0/015
B	-0/0683	0/0330	-2/07	0/093
AA	-0/11536	0/0392	-3/91	0/011
BB	-0/1158	0/0392	-2/94	0/032
AB	0/1104	0/0466	2/36	0/064

با استفاده از ضرایب داده شده در جدول (۲-۵۷) ساده ترین مدل برای پیش تغلیظ و اندازه گیری

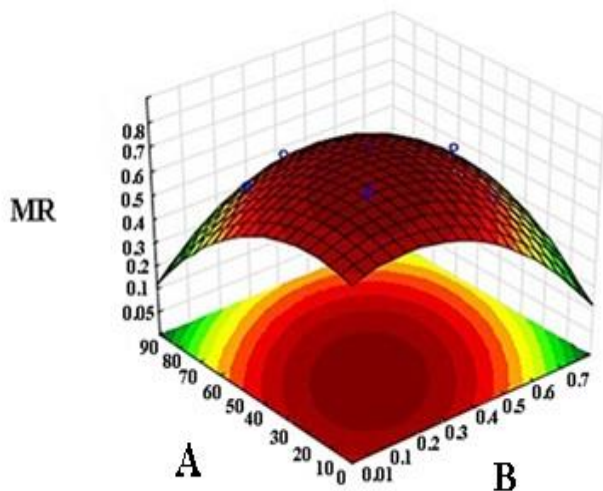
ویتامین A و ویتامین E صورت زیر پیشنهاد می شود.

$$MER = 0.442 - 0.068B - 0.1197A - 0.1158B^2 + 0.1104AB - 0.1536A^2$$

جدول (۲-۵۷): تحلیل واریانس برای مدل پیشنهادی مربوط به پیش تغلیظ و اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین E

منبع	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	ارزش F	ارزش P
Model	۰/۳۶	۵	۰/۰۷۳	۸/۳۷	۰/۰۱۷۹
B	۰/۰۳۷	۱	۰/۰۳۷۳۹	۴/۲۹	۰/۰۹۳۱
A	۰/۱۱	۱	۰/۱۱۴۶۵۷	۱۳/۱۵	۰/۰۱۵۱
BB	۰/۰۷۶	۱	۰/۱۰۵۷۳۱	۸/۶۹	۰/۰۳۲۰
AB	۰/۰۴۹	۱	۰/۰۴۸۷۹۶۳	۵/۷۶۰۱	۰/۰۶۴۳
AA	۰/۱۳	۱	۰/۱۸۶۶۹۱	۱۵/۲۸	۰/۰۱۱۳
Lack of fit	۰/۰۴۴	۳	۰/۰۱۴۵۳۲		۰/۱۷۶
Pure Error	۰/۰۰۰۰۶۳۹	۲	۰/۰۰۰۰۰۹۹		
Total error	۰/۴۱	۱۰			

از منحنی‌های سطح رویه پاسخ برای نشان دادن رابطه و برهم‌کنش بین متغیرها و نیز اثر این متغیرها روی پاسخ استفاده می‌شود. هر منحنی رویه پاسخ، اثر دو متغیر مستقل را نشان می‌دهد در حالی که سایر متغیرها در سطح صفر (سطح میانی) ثابت نگه داشته می‌شوند. شکل ۲-۶۱ منحنی رویه پاسخ را برای پیش تغلیظ و اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین E نشان می‌دهد. همانگونه که در شکل سطح رویه نشان داده شده است، در مقدار میانی حجم سورفکتانت، با افزایش غلظت سورفکتانت تا M ۰/۱۶، میزان پاسخ افزایش می‌یابد. اما با افزایش بیشتر غلظت سورفکتانت میزان این پاسخ کاهش می‌یابد.



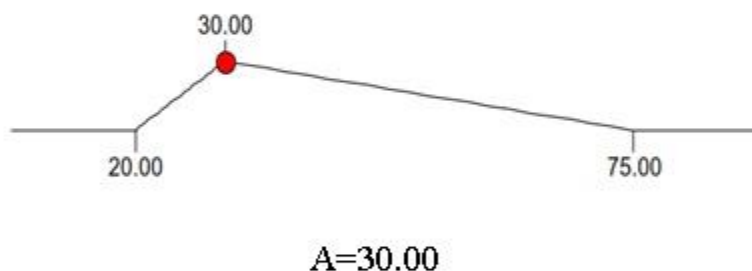
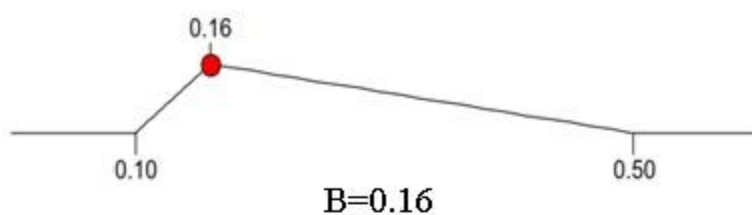
شکل (۲-۶۱): منحنی روبه پاسخ برای اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین E

با توجه به مدل ریاضی پیشنهادی، شرایط بهینه پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین E با استفاده از نرم‌افزار دیزاین اکسپرت محاسبه شد. نتایج مربوط به شرایط بهینه در جدول ۲-۵۸ گزارش شده است. مقایسه این نتایج، با نتایج حاصل از روش یک متغیر در یک زمان نشان می‌دهد که شرایط بهینه به دست آمده از روش طراحی آزمایش با استفاده از مدل CCD، تا حدودی متفاوت از شرایط بهینه حاصل از روش یک متغیر در یک زمان است که نشان‌دهنده این است که بین فاکتورهای موثر بر سیگنال پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین E برهم‌کنش وجود داشته است و در نتیجه شرایط به دست آمده از روش طراحی آزمایش باید به مقادیر بهینه واقعی نزدیک‌تر باشد، زیرا تمام برهم‌کنش‌ها در نظر گرفته شده است.

جدول (۲-۵۸): شرایط بهینه نهایی سیستم برای اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین E

مقدار بهینه یک متغیر در زمان	مقدار بهینه طراحی آزمایش	فاکتور
Brij-35	Brij-35	نوع سورفکتانت
۰/۲۰	۰/۱۶	غلظت سورفکتانت (M)
۳۰/۰	۳۰/۰	حجم سورفکتانت (μL)
.	.	درصد اسید افزوده شده
۱۰	۱۵	زمان استخراج (دقیقه)
۵۹۳/۰	۶۶۶/۰	میانگین سیگنال تجزیه ای

شکل ۲-۶۲ پروفایل مقدار پیش بینی شده و مطلوبیت را برای بهینه سازی فرایند نشان می‌دهد. تابع مطلوبیت پاسخ شامل تعیین DF برای هر متغیر وابسته به وسیله تعیین مقدار پیش بینی شده در گستره صفر تا یک رسم گردید. با توجه به نتایج طراحی CCD، بالاترین و پایین‌ترین مقدار MER و همچنین نقاط بهینه به دست آمده، مطلوبیت یک برای حداکثر پاسخ و مطلوبیت صفر برای حداقل پاسخ و ۰/۵ برای حالت حدواسط بیان شده است. این تصاویر به طور اجمالی نشان می‌دهد که چگونه تغییرات در سطح هر متغیر، پاسخ و همچنین مطلوبیت کلی پاسخ‌ها را تغییر می‌دهد. براساس این محاسبات و درجه مطلوبیت ۰/۹۴۴ و MER ۰/۵۸۸ برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری همزمان این ویتامین‌ها در روغن‌های خوراکی به دست آمد.

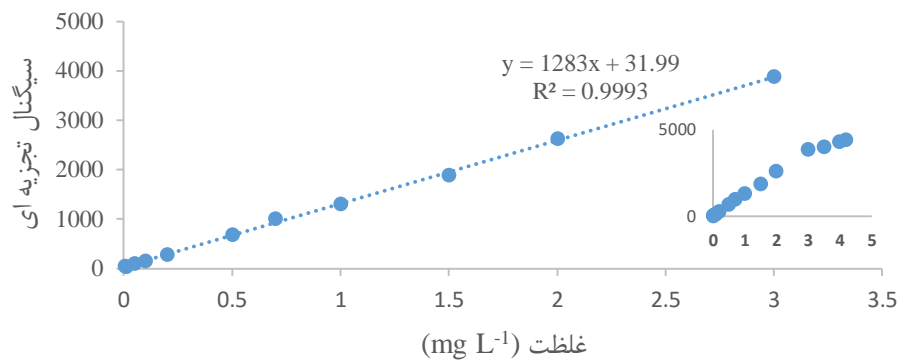


شکل (۲-۶۲): پروفایل مقدار پیش بینی شده و مطلوبیت برای اندازه گیری ویتامین A و ویتامین E

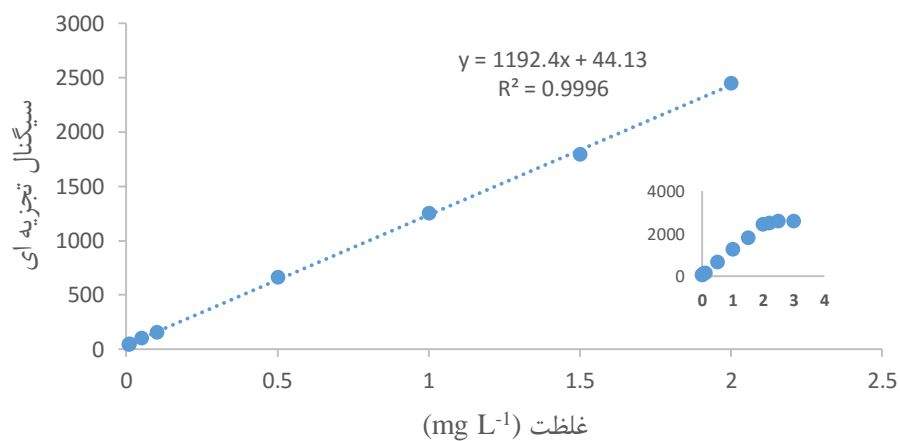
۲-۷-۷ رسم منحنی پیش تغلیظ برای اندازه گیری همزمان ویتامین A و ویتامین E

به منظور رسم منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ، محلول‌های نمونه‌های روغن با غلظت‌های متفاوت در گستره $5/0 - 0/005 \text{ mg L}^{-1}$ از ویتامین‌های A و E تهیه شد و در شرایط بهینه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل در شکل‌های ۲-۶۳ و ۲-۶۴ نشان داده شده است. بدین منظور، $4/0 \text{ mL}$ روغن خوراکی که به آن از محلول مادر $2000/0 \text{ mg L}^{-1}$ از ویتامین‌های A و E در گستره $5/0 - 0/005 \text{ mg L}^{-1}$ به روغن اضافه شد و با $1/0 \text{ mL}$ سیکلوهگزان به عنوان رقیق کننده در یک لوله آزمایش یکنواخت گردید. $30/0 \text{ }\mu\text{L}$ محلول Brij-35 $0/16$ مولار به عنوان حلال استخراج به سرعت به درون لوله آزمایش

تزریق گردید. محلول ابری تشکیل شده به مدت ۱۰ دقیقه در حمام فراصوت در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد قرار گرفت تا محلول استخراج کننده به درون محلول روغن پخش شود. پس از سانتریفیوژ نمونه با سرعت ۳۵۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه، $5/0 \mu\text{L}$ از حلال ته نشین شده به دستگاه HPLC تزریق و مورد آنالیز قرار گرفت (در حدود $30/0 \mu\text{L}$ از فاز استخراج آبی در انتهای لوله آزمایش ته نشین شد). بر اساس نتایج به دست آمده، ویتامین A در گستره $3/0-0/005 \text{ mg L}^{-1}$ و ویتامین E در گستره $2/0-0/008 \text{ mg L}^{-1}$ خطی می باشد.



شکل (۲-۶۳): منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ ویتامین A



شکل (۲-۶۴): منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ ویتامین E

۲-۷-۸ ارقام شایستگی روش برای اندازه‌گیری همزمان ویتامین A و ویتامین E

مطابق توضیحات ارائه شده در قسمت ۲-۴-۱۰، حد تشخیص روش برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین E به ترتیب $0.95 \mu\text{g L}^{-1}$ و 0.71 به دست آمد. حد کمی روش برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین E به ترتیب $3/34 \mu\text{g L}^{-1}$ و $2/34$ به دست آمد. نتایج مربوط به دقت در جداول (۲-۵۹) و (۲-۶۰) آمده است. مقادیر t و درصد انحراف نسبی به ترتیب نشان دهنده دقت و صحت خوب روش است (سطح اطمینان ۹۵٪ مقدار t بحرانی برای ۲ درجه آزادی برابر $4/30$ است).

جدول (۲-۵۹): نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت روش برای ویتامین A

درصد بازیابی	مقدار t	RSD%	ویتامین A اندازه‌گیری شده (mg L^{-1}) \pm SD*	ویتامین A در روغن (mg L^{-1})
۹۸/۰	۰/۸۵	۵/۰۳	0.49 ± 0.02	۰/۰۵۰
۹۶/۰	۳/۱۸	۲/۲۹	0.96 ± 0.02	۰/۱۰
۹۸/۰	۳/۵۰	۱/۰۲	0.490 ± 0.005	۰/۵۰

*Standard deviation (سه اندازه‌گیری)
 $t_{\text{critical}}=4.30$ (0.95 of confidence limit)

جدول (۲-۶۰): نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت روش برای ویتامین E

درصد بازیابی	مقدار t	RSD%	ویتامین E اندازه‌گیری شده (mg L^{-1}) \pm SD*	ویتامین E در روغن (mg L^{-1})
۹۸/۰	۰/۸۳	۴/۲	0.49 ± 0.02	۰/۰۵۰
۹۳/۰	۲/۴۱	۳/۱۱	0.93 ± 0.03	۰/۱۰
۱۰۲/۰	۰/۸۳	۴/۱۱	0.51 ± 0.02	۰/۵۰

*Standard deviation (سه اندازه‌گیری)
 $t_{\text{critical}}=4.30$ (0.95 of confidence limit)

بر اساس نتایج به دست آمده، فاکتور پیش‌تغلیظ (PF)، که به صورت نسبت شیب منحنی کالیبرا سیون پیش‌تغلیظ بر شیب منحنی کالیبرا سیون مستقیم تعریف می‌شود، برای ویتامین A و

ویتامین E به ترتیب ۱۱۳ و ۱۳۸ با درصد بازیابی ۶۵٪ و ۹۱٪ به دست آمد.

۹-۷-۲ بررسی اثر گونه‌های مزاحم برای اندازه‌گیری همزمان ویتامین A و ویتامین E

به منظور بررسی قابلیت کاربرد روش پیشنهادی، در نمونه‌های حقیقی، اثر مزاحمت‌های احتمالی در پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری ویتامین A و E مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۲-۶۱). بنابراین حضور این ویتامین‌های محلول در چربی هیچ نوع مزاحمتی در پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری ویتامین‌های A و E ندارد.

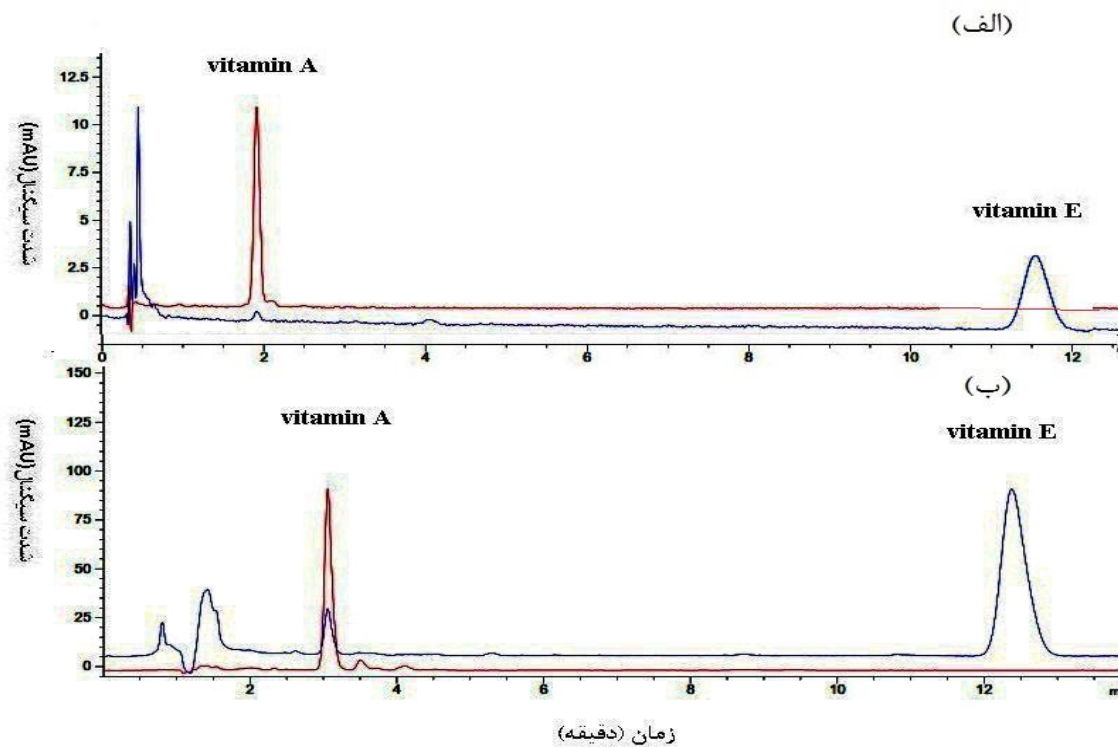
جدول (۲-۶۱): نتایج حاصل از بررسی اثر گونه‌های مزاحم در پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری ویتامین A و E

نسبت غلظت گونه به غلظت (وزنی-وزنی)	گونه‌های مورد بررسی
۱۰۰۰	ویتامین D، ویتامین K

۱۰-۷-۲ اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین E در نمونه‌های روغن

به منظور بررسی توانایی روش پیشنهادی، در اندازه‌گیری ویتامین‌های A و E در نمونه‌های حقیقی، از این روش برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین E در نمونه‌های روغن استفاده شد. بدین منظور، ۴/۰ mL روغن خوراکی حاوی ویتامین‌های A و E با ۱/۰ mL سیکلوهگزان به عنوان رقیق کننده در یک لوله آزمایش به حجم ۵/۰ mL یکنواخت گردید. ۳۰/۰ μ L محلول Brij-35 با غلظت ۰/۱۶ M به عنوان حلال استخراج به سرعت به درون لوله آزمایش تزریق گردید. محلول ابری تشکیل شده به مدت ۱۵ دقیقه در حمام فرا صوت در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد قرار گرفت تا محلول استخراج کننده به درون محلول روغن پخش شود. پس از سانتریفیوژ نمونه با سرعت ۳۵۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه، ۵/۰ μ L از حلال ته نشین شده به دستگاه HPLC تزریق و مورد

آنالیز قرار گرفت. در این روش ۸ نمونه از روغن‌های گیاهی مختلف با استفاده از منحنی کالیبراسیون در سه غلظت متفاوت از استاندارد ($1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ، ۵۰ و ۱۰۰) و با سه تکرار ویتامین A و ویتامین E انجام گردید که نتایج آن در جدول (۲-۶۲) آورده شده است. نمونه استاندارد از محلول مادر mg L^{-1} ۲۰۰۰/۰ از ویتامین‌های A و E در سه غلظت بیان شده به روغن اضافه شد. شکل ۲-۶۵ کروماتوگرام نمونه روغن زیتون سنتی را در شرایط بهینه نشان می‌دهد. با توجه به نتایج به دست آمده این روش قابلیت جداسازی این ویتامین‌ها را در روغن‌های گیاهی را دارد.



شکل (۲-۶۵): کروماتوگرام نمونه (A) روغن زیتون سنتی، (B) روغن زیتون سنتی با افزایش غلظت 1 mg L^{-1} ویتامین A و ویتامین E. شرایط آزمایش: حجم نمونه 50 mL ، حجم حلال استخراج کننده $300 \mu\text{L}$ با غلظت 1 M ، زمان استخراج 10 min ، در طول موج 326 nm (رنگ قرمز برای اندازه‌گیری ویتامین A) و 216 nm (رنگ آبی برای اندازه‌گیری ویتامین E)

جدول (۲-۶۲): نتایج نمونه های حقیقی برای اندازه گیری همزمان ویتامین A و ویتامین E

نمونه	آنالیت اضافه شده	Vitamin A			Vitamin E		
		آنالیت	درصد	RSD	آنالیت	درصد	RSD
		اندازه	بازیابی		اندازه	بازیابی	
	($\mu\text{g L}^{-1}$)	گیری شده ($\mu\text{g L}^{-1}$)			گیری شده ($\mu\text{g L}^{-1}$)		
	.	۷/۱۱	-	۱/۶۲	۸/۲۴	-	۱/۲۹
روغن زیتون	۱۰/۰۰	۱۷/۳۱	۱۰۲/۰۰	۱/۷۶	۱۸/۳۰	۱۰۰/۶۰	۱/۲۶
	۵۰/۰۰	۵۶/۹۶	۹۹/۷۰	۲/۸۳	۵۸/۷۸	۱۰۱/۰۸	۰/۶۸
	۱۰۰/۰	۱۰۷/۷۵	۱۰۰/۶۴	۱/۰۷	۱۰۸/۹۸	۱۰۰/۷۴	۱/۳۹
روغن زیتون سنتی	.	۶/۵۴	-	۴/۴۸	۸/۴۵	-	۰/۹۹
	۱۰/۰۰	۱۶/۴۶	۹۹/۲۰	۲/۳۷	۱۸/۶۴	۱۰۴/۰۰	۲/۲۸
	۵۰/۰۰	۵۶/۸۲	۱۰۰/۵۶	۱/۴۸	۵۸/۷۱	۱۰۰/۵۲	۱/۵۷
تجاری (اتکا)	۱۰۰/۰	۱۰۷/۰۴	۱۰۰/۵۰	۰/۷۷	۱۰۸/۹۶	۱۰۰/۵۱	۰/۶۱
	.	۸/۸۶	-	۲/۷۲	۹/۰۶	-	۳/۷۶
	۱۰/۰۰	۱۹/۱۳	۱۰۲/۷۰	۱/۱۸	۱۹/۲۷	۱۰۲/۱۰	۱/۴۱
روغن هسته انگور (فامیلا)	۵۰/۰۰	۵۹/۳۱	۱۰۰/۹۰	۱/۲۷	۵۸/۹۹	۹۹/۸۶	۱/۲۶
	۱۰۰/۰	۱۰۹/۹۸	۱۰۱/۱۲	۲/۲۴	۱۰۹/۰۵	۹۹/۹۹	۰/۶۱
	.	۷/۱۱	-	۱/۶۲	۸/۲۴	-	۱/۲۹
روغن ذرت	۱۰/۰۰	۱۷/۳۱	۱۰۲/۰	۱/۱۳	۱۸/۳۱	۱۰۰/۷۰	۱/۲۶
	۵۰/۰۰	۵۶/۹۶	۹۹/۷۰	۲/۸۳	۵۸/۷۸	۱۰۱/۰۸	۰/۶۷
	۱۰۰/۰	۱۰۷/۷۵	۱۰۰/۶۴	۱/۰۷	۱۰۸/۹۸	۱۰۰/۷۴	۱/۳۹
روغن آفتابگردان (لادن)	.	N.D	-	-	N.D	-	-
	۱۰/۰۰	۹/۹۷۰	۹۷/۱۰	۳/۷۶	۹/۹۸۳	۹۸/۳	۲/۴۸
	۵۰/۰۰	۴۹/۹۱	۹۹/۸۲	۲/۲۲	۴۹/۷۳	۹۹/۴۶	۴/۳۷
روغن کنجد (فامیلا)	۱۰۰/۰	۹۹/۹۶	۹۹/۹۶	۳/۲۱	۹۹/۹۱	۹۹/۹۱	۱/۱۱
	.	<LOD	-	-	۹/۱۷	-	۱/۷۹
	۱۰/۰۰	۱۰/۳۲	۱۰۳/۲۰	۳/۶۹	۱۹/۱۹	۱۰۰/۲۰	۰/۷۹
روغن کرچک (سنتی)	۵۰/۰۰	۵۰/۴۰	۱۰۰/۸۰	۱/۴۲	۵۸/۶۳	۹۸/۹۲	۰/۷۷
	۱۰۰/۰	۱۰۰/۲۳	۱۰۰/۲۳	۰/۸۶	۱۰۹/۶۳	۱۰۰/۴۶	۰/۵۲
	.	۶/۲۵	-	۱/۸۰	۹/۴۲	-	۲/۱۲
روغن کرچک (سنتی)	۱۰/۰۰	۱۶/۶۴	۱۰۳/۹۴	۲/۵۲	۱۹/۸۵	۱۰۴/۳۰	۱/۳۸
	۵۰/۰۰	۵۶/۵۶	۱۰۰/۶۲	۱/۴۹	۵۸/۹۳	۹۹/۰۲	۱/۰۳

	۱۰۰/۰	۱۰۷/۱۰	۱۰۰/۸۵	۱/۱۷	۱۱۰/۲۶	۱۰۰/۸۴	۱/۱۱
	.	<LOD	-	-	<LOD	-	-
روغن کلزا	۱۰/۰۰	۹/۶۴	۹۶/۴۰	۴/۷۱	۱۰/۲۵	۱۰۲/۵۰	۲/۵۶
(اویلا)	۵۰/۰۰	۵۰/۸۵	۱۰۱/۷۰	۱/۴۳	۵۱/۱۰	۱۰۲/۲۰	۱/۸۴
	۱۰۰/۰	۱۰۰/۵۲	۱۰۰/۵۲	۰/۹۵	۱۰۱/۴۸	۱۰۱/۴۸	۰/۸۱

۲-۷-۱۱ مقایسه روش پیشنهادی با برخی روش های به کار گرفته شده برای اندازه گیری

همزمان ویتامین A و ویتامین E

در جدول ۲-۶۳ تعدادی از روش های پیش تغلیظ و اندازه گیری ویتامین A و ویتامین E آورده شده است. در این جدول پارامترهای مختلف، مانند حد تشخیص، دامنه خطی و فاکتور پیش تغلیظ برای مقایسه آورده شده است. مقایسه ارقام شایستگی گزارش شده برای این روش ها با روش پیشنهادی نشان می دهد که روش پیشنهادی نسبت به برخی از روش های گزارش شده بهتر می باشد. بنابراین روش حاضر نسبت به مراجع ۳۷، ۴۰، ۴۱ و ۱۰۴ دارای حد تشخیص بهاری می باشد. همچنین روش بیان شده گستره خطی بهتری نسبت به مراجع ۳۷، ۴۲ و ۱۰۴ دارد.

جدول (۲-۶۳): مقایسه روش پیشنهادی با برخی از روش‌های گزارش شده برای اندازه‌گیری ویتامین A و ویتامین E

مرجع	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LDR ($\mu\text{g L}^{-1}$)	روش	ماتریکس	آنالیت
۳۷	۱/۱۷ ۴/۵۲	۰/۱۵-۱/۵ ۲/۰ -۸/۰	Micellar liquid chromatography	شربت مولتی ویتامین	ویتامین A ویتامین E
۳۸	۰/۱۳	۰/۵-۲۰۰/۰	Capillary liquid chromatography-pressurized liquid extraction-DLLME	محصولات بهداشتی	ویتامین E
۳۹	۰/۲	۵/۰-۲۵۰۰/۰	HPLC-FL	روغن گیاهی	ویتامین E
۴۰	۸/۸	۵۰/۰ -۱۸/۰ $\times 10^3$	HPLC-FLD	گیاهان دارای برگ سبز	ویتامین E
۴۱	۳/۰ ۲۹/۰	۰/۵ $\times 10^3$ - ۴/۰ $\times 10^3$ ۱۰/۰ $\times 10^3$ - ۲۰۰/۰	HPLC-UV	سرم انسان	ویتامین A ویتامین E
۴۲	۰/۲	۰/۵-۵۰۰/۰	Fiber solid phase extraction-HPLC	شربت مولتی ویتامین	ویتامین E
۱۰۴	۵۰/۰ ۶۰۰/۰	۱۰/۰-۵۰۰/۰ ۲/۰ $\times 10^3$ - ۴۰/۰ $\times 10^3$	HPLC-DAD	شیر و نوشیدنی	ویتامین A ویتامین E
۱۰۵	۰/۲ ۲۰/۰	۳۰۰/۰-۷۰۰/۰ ۵۰۰۰/۰-۱۰۰۰۰/۰	HPLC-PDA	سرم انسانی	ویتامین A ویتامین E
کار حاضر	۰/۹۵ ۰/۷۱	۵/۰-۲۰۰۰/۰ ۸/۰-۳۰۰۰/۰	FOS-RP-DLLME-HPLC	نمونه روغن	ویتامین A ویتامین E

فصل سوم

نتیجه گیری

۳-۱ نتیجه گیری

در اولین قسمت این پروژه، برای اولین بار پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری همزمان نیترازپام و میدازولام در نمونه های ادرار، سرم خون و همچنین محصولات دارویی با روش میکرواستخراج فاز مایع بر اساس قطره جامد با کمک سورفکتانت و امواج فراصوت و به روش HPLC انجام پذیرفت. روش انجام شده، سریع، ساده و با مصرف کم حلال آلی همراه است. همچنین در این روش پیشنهادی از مخلوط دو سورفکتانت SDS و Tween 80 به عنوان عامل پخش کننده استفاده شده است. این روش حد تشخیص پایین و گستره وسیع خطی را با فاکتور پیش‌تغلیظ قابل قبول و همچنین زمان آنالیز کوتاه پیشنهاد می‌دهد. بنابراین این روش، به‌عنوان یک تکنیک قدرتمند برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری همزمان نیترازپام و میدازولام در نمونه‌های حقیقی به‌کار برده می‌شود

در دومین قسمت این پروژه، امکان استفاده از روش میکرو استخراج مایع مایع پخشی مبتنی بر قطره آلی شناور جامد به‌وسیله امواج فراصوت برای جداسازی و پیش‌تغلیظ همزمان سیتالوپرام، دیازپام و سرتالین و اندازه‌گیری به‌وسیله HPLC برای اولین بار در این کار تحقیقاتی مورد بررسی قرار گرفته است. در این روش حلال استخراج با چگالی کمتر از آب و همچنین سمیت کمتر نسبت به حلال های استخراج کلردار با زمان استخراج کوتاه‌تر استفاده شده است. همچنین نتایج درصد بازیابی حاصل از اندازه‌گیری سیتالوپرام، دیازپام و سرتالین در نمونه‌های مختلف قرص، سرم و ادرار، نشان دهنده صحت بالای روش است. قابل ذکر است که تا به حال اندازه‌گیری همزمان این سه دارو با این روش بیان شده انجام نشده است.

سومین قسمت این پروژه، برای نخستین بار امکان استفاده از روش میکرواستخراج پخشی پخشی فاز مایع معکوس به همراه امواج فراصوت و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری مقادیر کم ویتامین A و ویتامین E مورد بررسی قرار گرفت. از مزایای روش پیشنهادی می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

✓ زمان استخراج کوتاه

✓ مصرف بسیار کم حلال استخراج سمی

✓ دامنه خطی وسیع

✓ دقت و صحت بالا

✓ هزینه پایین

در چهارمین قسمت این پروژه، تکنیک میکرو استخراج مایع پخشی معکوس با کمک فاز غنی شده از سورفکتانت و به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، سریع و ارزان برای پیش تغلیظ و اندازه گیری این ویتامین ها با مقادیر بسیار پایین مورد بررسی قرار گرفت. فاکتور پیش تغلیظ بالا و حذف حلال آلی از مزایای اصلی این روش می باشد. با بهینه سازی پارامترهای مؤثر بر فرایند استخراج و رسم منحنی کالیبراسیون و محاسبه ارقام شایستگی حاصل از این روش، مشخص می شود که این روش همراه با اندازه گیری به وسیله کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا مجهز به آشکارساز ماوراء بنفش (HPLC-UV) یک شیوه مناسب و حساس با حد تشخیص بسیار پایین برای جداسازی، پیش تغلیظ و اندازه گیری همزمان مقادیر بسیار کم این ویتامین ها در نمونه های روغن گیاهی می باشد.

۳-۲ آینده نگری

به عنوان پیشنهاد برای مطالعات آینده، می توان به موارد زیر توجه نمود:

۱- استفاده و کاربرد روش پیشنهاد شده برای پیش تغلیظ و اندازه گیری سایر ترکیبات محلول در

چربی

۲- استفاده از دستگاه ورتکس به جای امواج فراصوت برای پراکنش سورفکتانت

۳- استفاده از سورفکتانت به عنوان عامل پخش کننده

۴- استفاده از روش استخراج فاز جامد کوپل شده با دیگر روش های میکرواستخراج فاز مایع

۵- استفاده از روش میکرواستخراج فاز جامد هالوفیبر سه فازی اصلاح شده به وسیله نانوذرات

پیوست

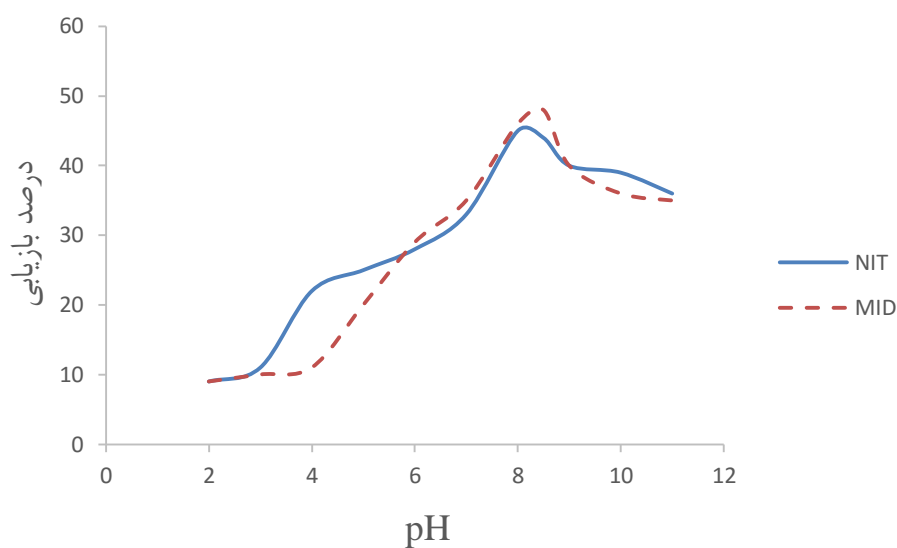
پیوست ۱

نتایج بررسی یک متغیر در زمان برای روش میکرواستخراج فاز مایع بر اساس قطره جامد با کمک سورفکتانت و امواج فراصوت برای پیش تغلیظ و اندازه‌گیری مقادیر کم نیترازپام و میدازولام در نمونه‌های حقیقی به‌وسیله کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

به‌منظور بررسی متغیرها به روش یک متغیر در زمان در یک لوله آزمایش، محلول نیترازپام و میدازولام استاندارد با غلظت 0.5 mg L^{-1} ، با درصد وزنی حجمی از محلول NaCl و حجمی از حلال استخراج و همچنین حجمی از محلول سورفکتانت عنوان امولسیفایر به محلول نمونه اضافه شد و به حجم نهایی دلخواه رسید. پس از آن، لوله آزمایش در حمام فراصوت با فرکانس 60 KHz در 25 درجه سانتیگراد قرار داده شد تا یک محلول ابری متشکل از قطرات بسیار ریز حلال استخراج پراکنده در محلول آبی تشکیل شد که در این مرحله آنالیت‌ها در قطرات ریز حلال آلی استخراج شدند. سپس محلول نمونه با سرعت 3500 دور در دقیقه سانتریفیوژ و قطرات حلال آلی (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 در حمام یخ قرار داده شد تا حلال آلی شناور به صورت قطره جامد درآید. سپس قطره آلی منجمد شده به یک ویال مخروطی توسط یک قاشق پزشکی کوچک منتقل گردید که در دمای اتاق ذوب شده و سپس $5/0 \mu\text{L}$ از آن به دستگاه HPLC تزریق شد و سیگنال به‌دست آمده که به‌صورت سطح زیر پیک منحنی بود، ثبت گردید.

جدول (۱-۱) پ: نتایج حاصل از بررسی pH

pH	نیترازپام (درصد بازیابی)	میدازولام (درصد بازیابی)	نیترازپام (سطح زیر پیک) (mV.S)	میدازولام (سطح زیر پیک) (mV.S)
۲/۰	۹	۹	۱۰۹	۱۳۶
۳/۰	۱۱	۱۰	۱۳۳	۱۵۰
۴/۰	۲۲	۱۱	۲۶۳	۱۶۴
۵/۰	۲۵	۲۰	۲۹۹	۲۸۷
۶/۰	۲۸	۲۹	۳۳۵	۴۱۰
۷/۰	۳۳	۳۵	۳۹۴	۴۹۲
۸/۰	۴۵	۴۶	۶۳۸	۵۳۷
۸/۵	۴۴	۴۸	۵۲۵	۶۷۰
۹/۰	۴۰	۴۰	۴۷۷	۵۶۱
۱۰/۰	۳۸	۳۶	۴۵۱	۵۰۳
۱۱/۰	۳۶	۳۵	۴۳۰	۴۹۲

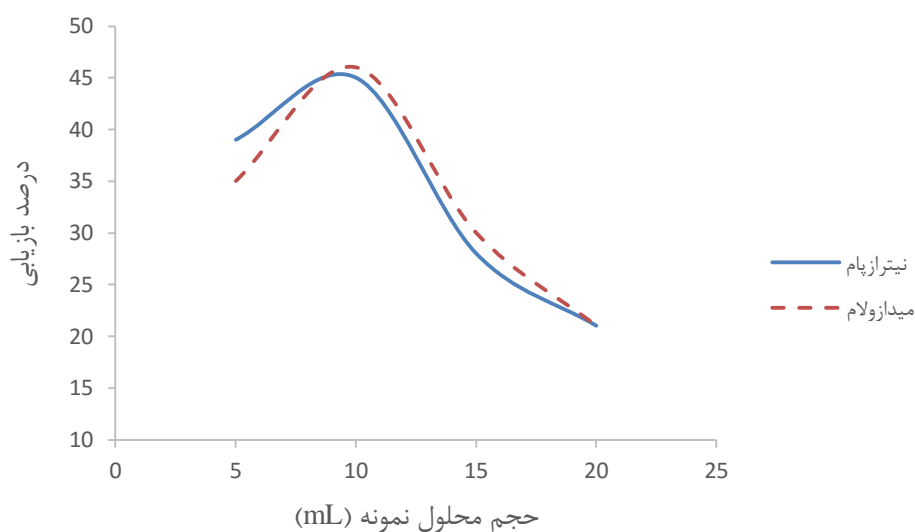


شکل (۱-۱) پ: نمودار اثر pH فاز آبی بر میزان استخراج همزمان نیترازپام و میدازولام

شرایط آزمایش: غلظت نیترازپام و میدازولام 0.5 mg L^{-1} ، حجم محلول نمونه 1.0 mL ، 3.0 mL بافر فسفات، زمان استخراج ۱۰ دقیقه، حجم حلال استخراج کننده (۱-آندکانول) $50.0 \mu\text{L}$ ، نوع سورفکتانت Tween80، غلظت سورفکتانت 50.0 mg mL^{-1} ، حجم Tween 80 1.0 میکرولیتر، $1/5$ درصد وزنی-حجمی نمک، زمان سانتریفیوژ کردن 10.0 دقیقه، دور سانتریفیوژ 3500 دور در دقیقه

جدول (۲-۱) پ: نتایج حاصل از بررسی اثر حجم محلول نمونه بر میزان استخراج

حجم نمونه (mL)	نیترازپام (درصد بازیابی)	میدازولام (درصد بازیابی)	نیترازپام (سطح زیر پیک) (mV.S)	میدازولام (سطح زیر پیک) (mV.S)
۵/۰	۳۹	۳۵	۲۳۴	۱۸۷
۱۰/۰	۴۵	۴۶	۵۳۷	۶۳۸
۱۵/۰	۲۸	۳۰	۵۱۲	۶۱۸
۲۰/۰	۲۱	۲۱	۴۹۹	۶۰۰

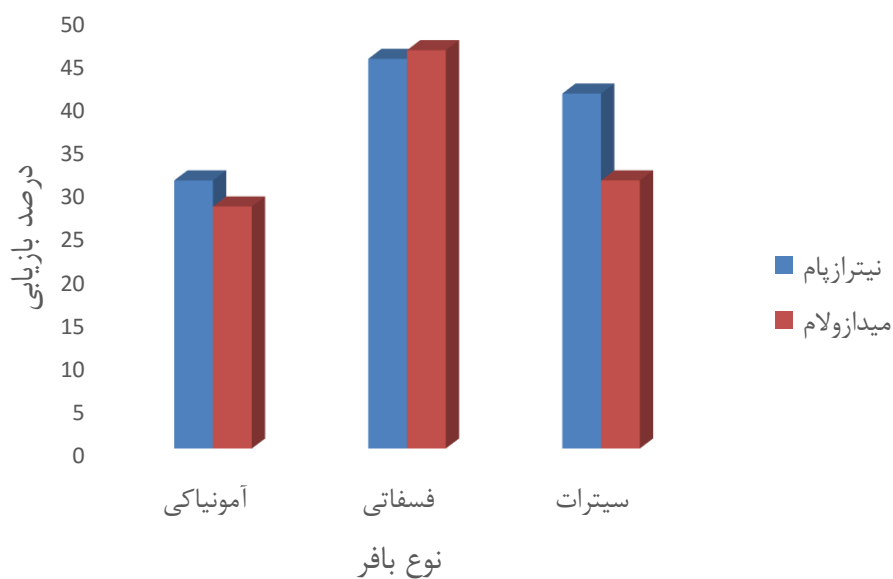


شکل (۲-۱) پ: نمودار تاثیر حجم محلول بر میزان استخراج

شرایط آزمایش: غلظت نیترازپام و میدازولام 0.5 mg L^{-1} ، $\text{pH} = 8.0$ ، 3.0 mL بافر فسفات، زمان استخراج ۱۰ دقیقه، حجم حلال استخراج کننده (۱-اندکانول) $50.0 \mu\text{L}$ ، نوع سورفکتانت Tween80، غلظت سورفکتانت 1.0 mL^{-1} Tween 80، حجم 1.0 میکرولیتر، $1/5$ درصد وزنی-حجمی نمک، زمان سانتریفیوژ کردن 10.0 دقیقه، دور سانتریفیوژ 3500 دور در دقیقه

جدول (۳-۱) پ: نتایج حاصل از بررسی نوع بافر بر میزان استخراج

نوع بافر	نیترازپام (درصد بازیابی)	میدازولام (درصد بازیابی)	نیترازپام (سطح زیر پیک) (mV.S)	میدازولام (سطح زیر پیک) (mV.S)
آمونیاکی	۳۱	۲۸	۳۷۰	۳۹۴
فسفاتی	۴۵	۴۶	۵۳۷	۶۳۸
بوراکسی	۴۱	۳۱	۴۸۹	۴۳۴

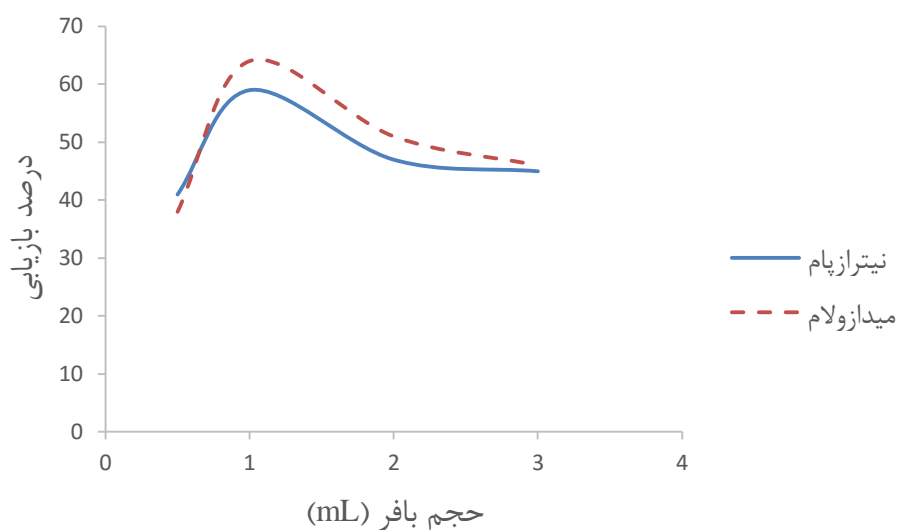


شکل (۳-۱) پ: نمودار تاثیر نوع بافر بر میزان استخراج

شرایط آزمایش: غلظت نیترازپام و میدازولام 0.5 mg L^{-1} ، $\text{pH} = 8.0$ ، حجم محلول نمونه 1.0 mL ، 3.0 mL بافر، زمان استخراج ۱۰ دقیقه، حجم حلال استخراج کننده (۱-آندکانول) $50.0 \text{ } \mu\text{L}$ میکرولیتر، نوع سورفکتانت Tween80، غلظت سورفکتانت 50.0 mg mL^{-1} ، حجم Tween 80 1.0 میکرولیتر، $1/5$ درصد وزنی-حجمی نمک، زمان سانتریفیوژ $10/0$ دقیقه، دور سانتریفیوژ 3500 دور در دقیقه.

جدول (۴-۱) پ: نتایج حاصل از بررسی اثر حجم بافر بر میزان استخراج

حجم بافر (mL)	نیترازپام (درصد بازیابی)	میدازولام (درصد بازیابی)	نیترازپام (سطح زیر پیک) (mV.S)	میدازولام (سطح زیر پیک) (mV.S)
0.5	41	38	489	530
1.0	59	64	703	883
2.0	47	51	560	706
3.0	45	46	537	638

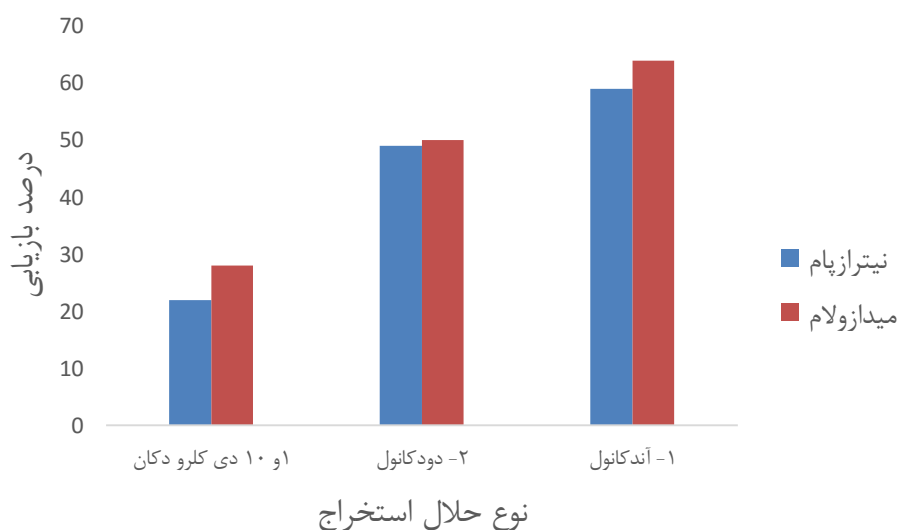


شکل (۴-۱) پ: نمودار تاثیر حجم بافر بر میزان استخراج

شرایط آزمایش: غلظت نیترازپام و میدازولام 0.5 mg L^{-1} ، $\text{pH} = 8.0$ ، حجم محلول نمونه 1.0 mL ، زمان استخراج 10 دقیقه، حجم حلال استخراج کننده (۱-آندکانول) $50.0 \mu\text{L}$ ، نوع سورفکتانت Tween80، غلظت سورفکتانت 1.0 mg mL^{-1} ، حجم Tween 80 1.0 میکرولیتر، $1/5$ درصد وزنی-حجمی نمک، زمان سانتیفریوژ کردن 10.0 دقیقه، دور سانتیفریوژ 3500 دور در دقیقه.

جدول (۵-۱) پ: نتایج حاصل از بررسی اثر نوع حلال استخراج کننده بر میزان استخراج

نوع حلال استخراج کننده	نیترازپام (درصد بازیابی)	میدازولام (درصد بازیابی)	نیترازپام (سطح زیر پیک) (mV.S)	میدازولام (سطح زیر پیک) (mV.S)
۱ و ۱۰ دی کلرو دکان	۲۲	۲۸	۲۶۴	۳۹۵
۱-دو دکانول	۴۹	۵۰	۵۸۴	۶۹۳
۱-آندکانول	۵۹	۶۴	۷۰۳	۸۸۳

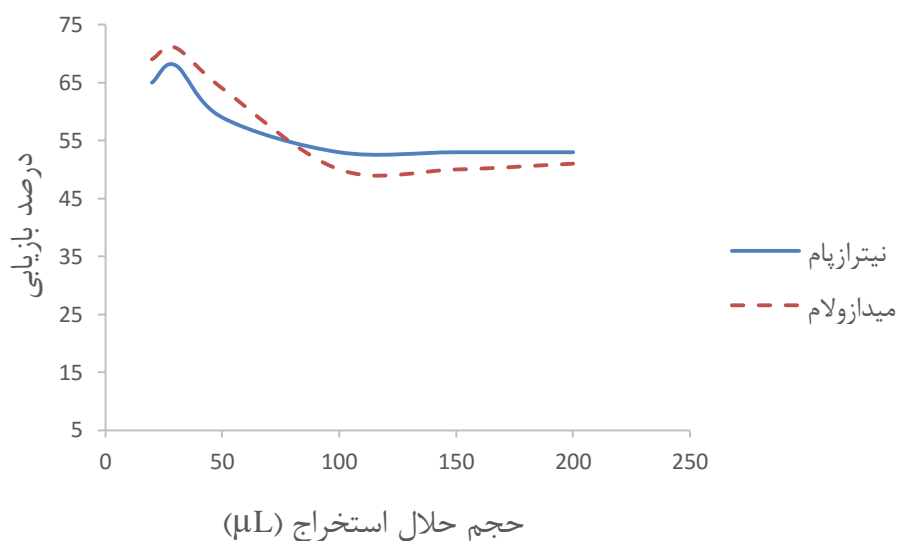


شکل (۵-۱) پ: نمودار تاثیر حجم بافر بر میزان استخراج

شرایط آزمایش: غلظت نیترازپام و میدازولام 0.5 mg L^{-1} ، $\text{pH} = 8.0$ ، حجم محلول نمونه 1.0 mL ، بافر، 1.0 mL ، زمان استخراج ۱۰ دقیقه، حجم حلال استخراج کننده $50.0 \mu\text{L}$ ، نوع سورفکتانت Tween80، غلظت سورفکتانت 1.0 mg mL^{-1} ، حجم Tween 80 1.0 mL میکرولیتر، $1/5$ درصد وزنی-حجمی نمک، زمان سانتریفیوژ کردن 10.0 دقیقه، دور سانتریفیوژ 3500 دور در دقیقه.

جدول (۶-۱) پ: نتایج حاصل از بررسی حجم حلال استخراج کننده بر میزان استخراج

حجم حلال استخراج- کننده (μL)	نیترازپام (درصد بازیابی)	میدازولام (درصد بازیابی)	نیترازپام (سطح زیر پیک) (mV.S)	میدازولام (سطح زیر پیک) (mV.S)
۲۰/۰	۶۵	۶۹	۱۳۲۹	۱۶۲۵
۳۰/۰	۶۸	۷۱	۱۳۸۸	۱۶۷۱
۵۰/۰	۵۹	۶۴	۷۰۳	۸۸۳
۱۰۰/۰	۵۲	۵۰	۳۱۱	۳۵۳
۱۵۰/۰	۵۳	۵۰	۲۱۲	۲۴۰
۲۰۰/۰	۵۴	۵۱	۱۶۲	۱۸۷

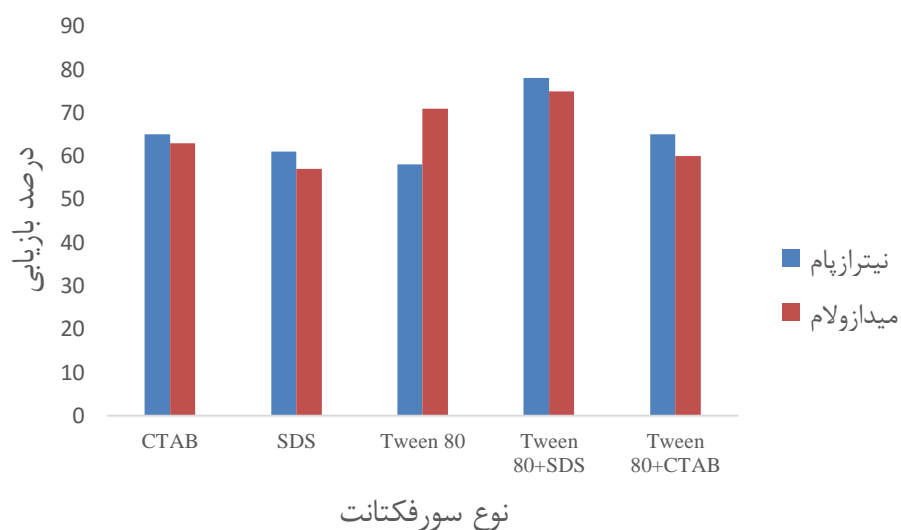


شکل (۱-۶) پ: نمودار اثر حجم حلال استخراج بر میزان استخراج

شرایط آزمایش: غلظت نیترازپام و میدازولام 0.5 mg L^{-1} ، 1.0 mL بافر $\text{pH} = 8.0$ ، حجم محلول نمونه $1.0/0 \text{ mL}$ ، زمان استخراج 10 دقیقه، نوع حلال استخراج کننده $1/5$ -آندکانول، نوع سورفکتانت Tween80، غلظت سورفکتانت mg mL^{-1} $5.0/0$ ، حجم Tween 80 1.0 میکرولیتر، $1/5$ درصد وزنی-حجمی نمک، زمان سانتریفیوژ کردن $10/0$ دقیقه، دور سانتریفیوژ 3500 دور در دقیقه.

جدول (۱-۷) پ: نتایج حاصل از بررسی اثر نوع سورفکتانت بر میزان استخراج

نوع سورفکتانت	نیترازپام (درصد بازیابی)	میدازولام (درصد بازیابی)	نیترازپام (سطح زیر پیک) (mV.S)	میدازولام (سطح زیر پیک) (mV.S)
CTAB	۶۵	۶۳	۱۳۰۱	۱۲۸۸
SDS	۶۱	۵۷	۱۲۳۵	۱۱۵۴
Tween 80	۶۸	۷۱	۱۳۷۷	۱۴۲۱
Tween 80+SDS	۷۸	۷۵	۱۵۷۹	۱۴۵۲
Tween 80+CTAB	۶۵	۶۰	۱۳۶۶	۱۳۱۱

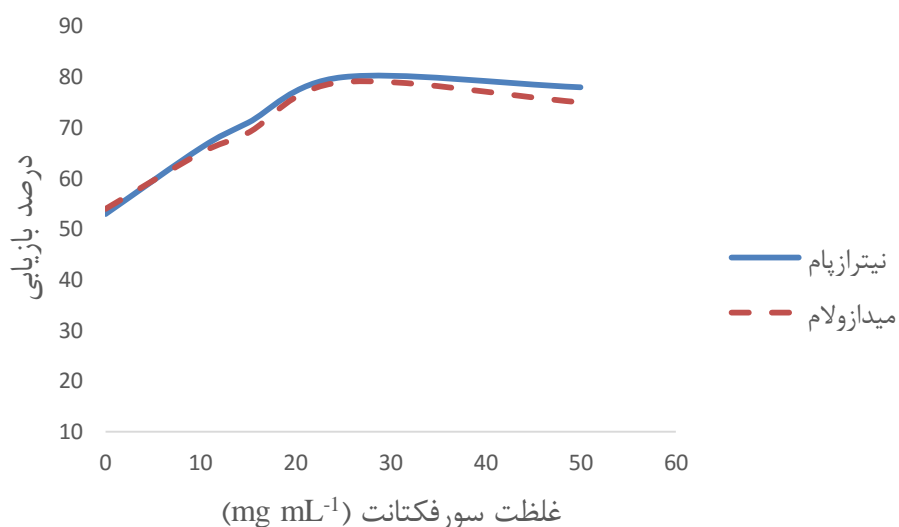


شکل (۷-۱) پ: نمودار اثر نوع سورفکتانت بر میزان استخراج

شرایط آزمایش: غلظت نیترازپام و میدازولام 0.5 mg L^{-1} ، 1.0 mL بافر $\text{pH} = 8.0$ ، حجم محلول نمونه 1.0 mL ، زمان استخراج 10 دقیقه، $30 \mu\text{L}$ - 1 آنکانول، غلظت سورفکتانت 5.0 mg mL^{-1} ، حجم Tween 80 1.0 میکرولیتر، حجم SDS 1.0 میکرولیتر، $1/5$ درصد وزنی-حجمی نمک، زمان سانتریفیوژ کردن $10/0$ دقیقه، دور سانتریفیوژ 3500 دور در دقیقه.

جدول (۸-۱) پ: نتایج حاصل از بررسی اثر غلظت SDS بر میزان استخراج

غلظت SDS (mg mL^{-1})	نیترازپام (درصد بازیابی)	میدازولام (درصد بازیابی)	نیترازپام (سطح زیر پیک) (mV.S)	میدازولام (سطح زیر پیک) (mV.S)
1.0	66	65	1336	1331
1.5	71	69	1437	1397
2.5	80	79	1603	1512
5.0	78	75	1579	1452

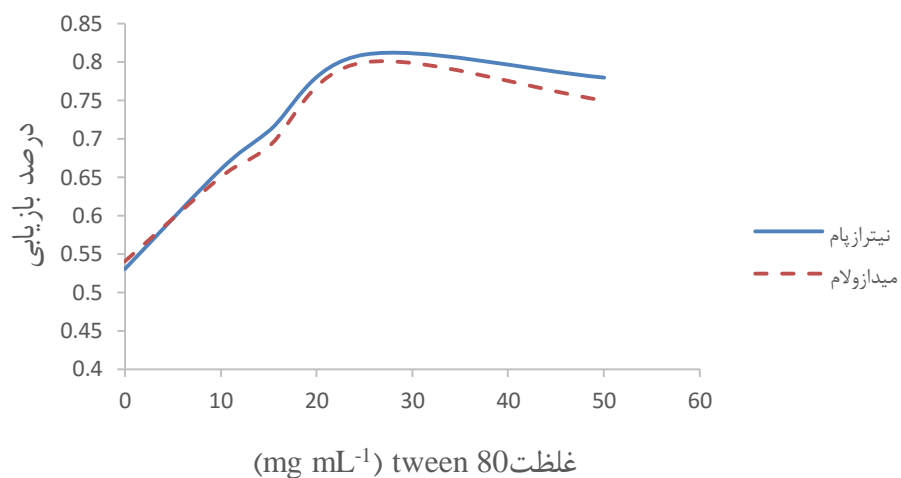


شکل (۸-۱) پ: نمودار اثر غلظت SDS بر میزان استخراج

شرایط آزمایش: غلظت نیترازپام و میدازولام 0.5 mg L^{-1} ، $\text{pH} = 8.0$ ، حجم محلول نمونه 1.0 mL ، 1.0 mL بافر، زمان استخراج ۱۰ دقیقه، $30 \mu\text{L}$ آنکانول، غلظت سورفکتانت 5.0 mg mL^{-1} ، حجم Tween 80 1.0 میکرولیتر، حجم SDS 1.0 میکرولیتر، $1/5$ درصد وزنی-حجمی نمک، زمان سانتریفیوژ کردن 10.0 دقیقه، دور سانتریفیوژ 3500 دور در دقیقه.

جدول (۹-۱) پ: نتایج حاصل از بررسی اثر غلظت Tween80 بر میزان استخراج

غلظت Tween 80 (mg mL^{-1})	نیترازپام (درصد بازیابی)	میدازولام (درصد بازیابی)	نیترازپام (سطح زیر پیک) (mV.S)	میدازولام (سطح زیر پیک) (mV.S)
۱۰/۰	۶۶	۶۵	۱۳۳۶	۱۳۳۱
۱۵/۰	۷۱	۶۹	۱۴۳۷	۱۳۹۷
۲۵/۰	۸۱	۸۰	۱۶۰۳	۱۵۱۲
۵۰/۰	۷۸	۷۵	۱۵۷۹	۱۴۵۲

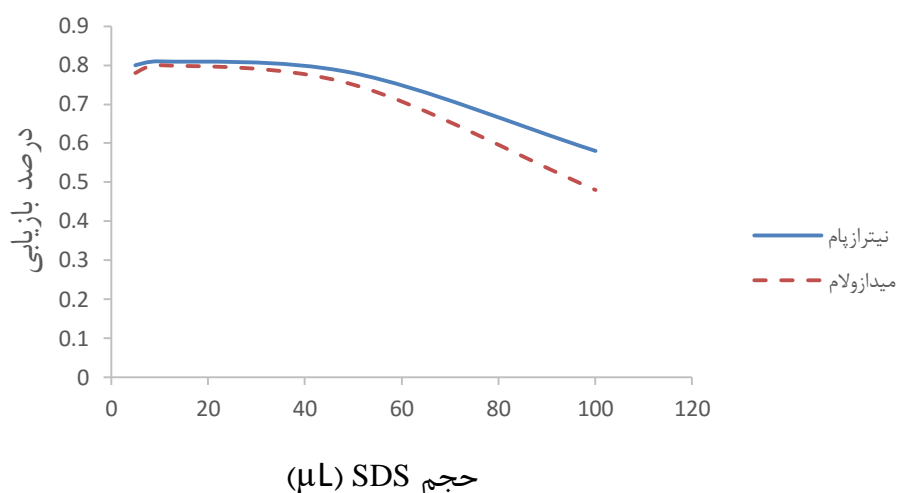


شکل (۹-۱) پ: نمودار اثر غلظت Tween 80 بر میزان استخراج

شرایط آزمایش: غلظت نیترازپام و میدازولام 0.5 mg L^{-1} ، $\text{pH} = 8.0$ ، حجم محلول نمونه 1.0 mL ، بافر، 1.0 mL Tween 80، زمان استخراج ۱۰ دقیقه، $30 \mu\text{L}$ -۱ آندکانول، غلظت SDS 25.0 میلی گرم بر میلی لیتر، حجم 1.0 mL میکرولیتر، حجم SDS 1.0 میکرولیتر، $1/5$ درصد وزنی-حجمی نمک، زمان سانتریفیوژ کردن 10.0 دقیقه، دور سانتریفیوژ 3500 دور در دقیقه

جدول (۱۰-۱) پ: نتایج حاصل از بررسی اثر حجم SDS بر میزان استخراج

حجم SDS (μL)	نیترازپام (درصد بازیابی)	میدازولام (درصد بازیابی)	نیترازپام (سطح زیر پیک) (mV.S)	میدازولام (سطح زیر پیک) (mV.S)
۵.۰	۷۸	۷۵	۱۵۷۹	۱۴۵۲
۱۰.۰	۸۱	۸۰	۱۶۰۰	۱۵۱۵
۵۰.۰	۷۸	۷۵	۱۵۷۹	۱۴۵۲
۱۰۰.۰	۵۸	۴۸	۱۱۵۹	۷۱۰

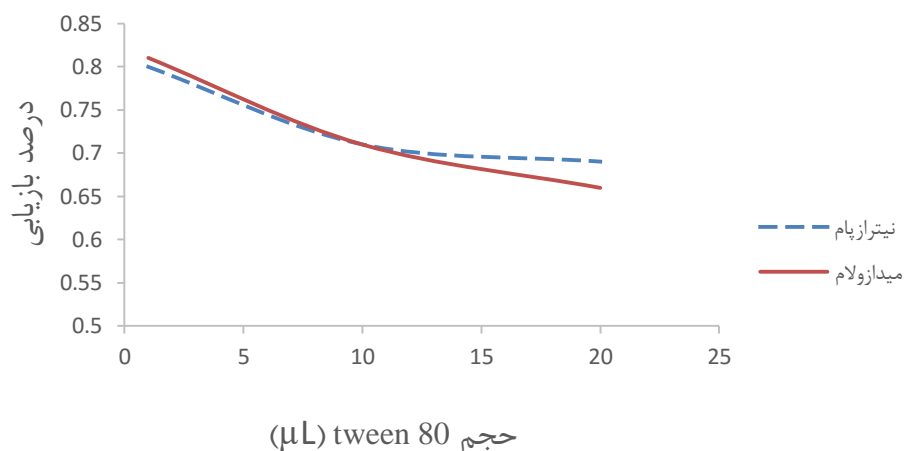


شکل (۱۰-۱) پ: نمودار اثر حجم SDS بر میزان استخراج

شرایط آزمایش: غلظت نیترازپام و میدازولام 0.5 mg L^{-1} ، $\text{pH} = 8.0$ ، حجم محلول نمونه 1.0 mL ، 1.0 mL بافر، زمان استخراج 10 دقیقه، $30 \mu\text{L}$ -آندکانول، غلظت SDS و Tween80 25.0 میلی گرم بر میلی لیتر، حجم Tween 80 1.0 میکرولیتر، $1/5$ درصد وزنی -حجمی نمک، زمان سانتریفیوژ کردن $10/0$ دقیقه، دور سانتریفیوژ 3500 دور در دقیقه

جدول (۱۱-۱) پ: نتایج حاصل از بررسی اثر حجم Tween80 بر میزان استخراج

حجم Tween 80 (μL)	نیترازپام (درصد بازیابی)	میدازولام (درصد بازیابی)	نیترازپام (سطح زیر پیک) (mV.S)	میدازولام (سطح زیر پیک) (mV.S)
1.0	0.81	0.81	1603	1520
10.0	0.71	0.69	1437	1397
20.0	0.81	0.80	1604	1514

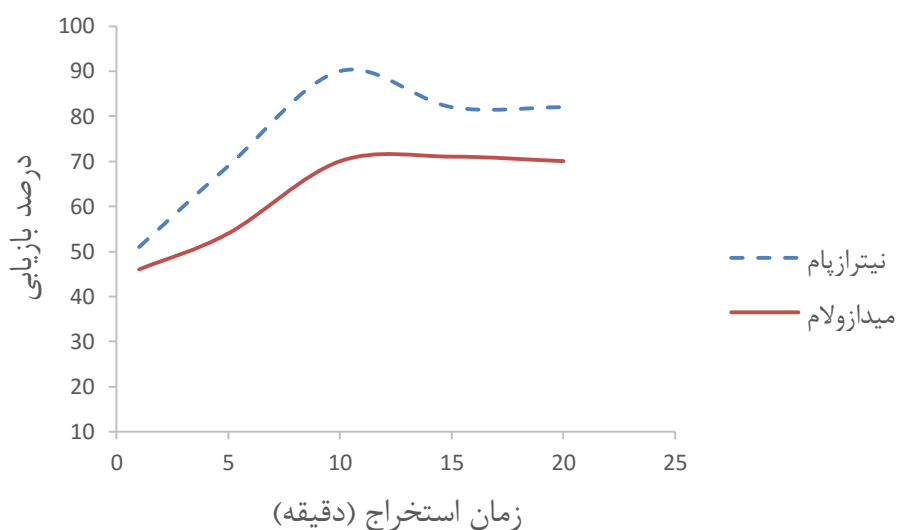


شکل (۱۱-۱) پ: نمودار اثر حجم Tween 80 بر میزان استخراج

شرایط آزمایش: غلظت نیترازپام و میدازولام 0.5 mg L^{-1} ، $\text{pH} = 8.0$ ، حجم محلول نمونه 1.0 mL ، 1.0 mL میلی - لیتر بافر، زمان استخراج ۱۰ دقیقه، $30 \mu\text{L}$ -۱ آندکانول، غلظت SDS و Tween80 $25/0$ میلی گرم بر میلی لیتر، حجم SDS $1.0/0$ میکرولیتر، $1/5$ درصد وزنی-حجمی نمک، زمان سانتریفیوژ کردن $10/0$ دقیقه، دور سانتریفیوژ 3500 دور در دقیقه

جدول (۱۲-۱) پ: نتایج حاصل از بررسی اثر زمان استخراج بر میزان استخراج

زمان استخراج (دقیقه)	نیترازپام (درصد بازیابی)	میدازولام (درصد بازیابی)	نیترازپام (سطح زیر پیک) (mV.S)	میدازولام (سطح زیر پیک) (mV.S)
۱	۵۱	۴۶	۱۰۱۲	۹۳۱
۵	۶۹	۵۴	۱۳۹۷	۱۴۱۰
۱۰	۸۰	۸۱	۱۶۰۳	۱۵۱۲
۱۵	۸۲	۸۳	۱۶۴۰	۱۶۴۵
۲۰	۸۲	۸۰	۱۶۳۸	۱۶۵۱

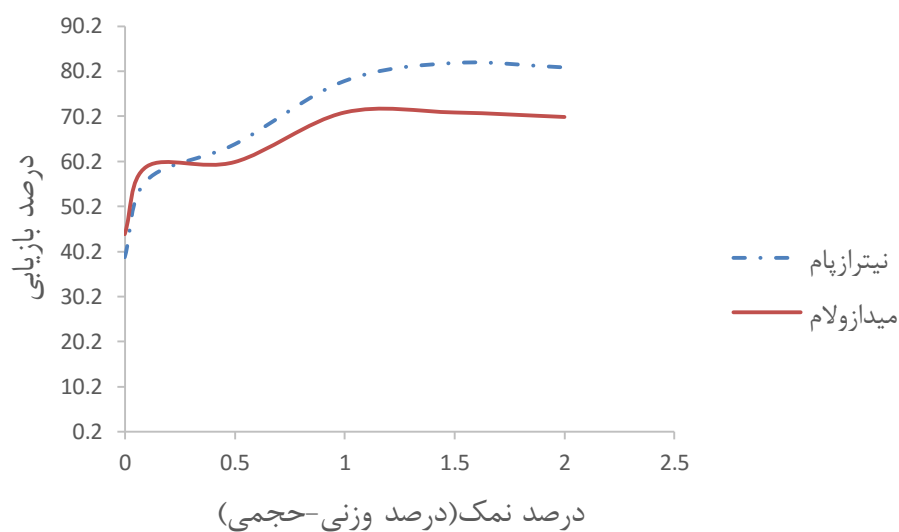


شکل (۱۲-۱) پ: نمودار اثر زمان استخراج بر میزان استخراج

شرایط آزمایش: غلظت نیترازپام و میدازولام 0.5 mg L^{-1} ، $\text{pH} = 8.0$ ، حجم محلول نمونه 1.0 mL ، 1.0 mL بافر، زمان استخراج ۱۰ دقیقه، $130 \mu\text{L}$ آندکانول، نوع سورفکتانت Tween 80+SDS، غلظت سورفکتانت 25.0 mg mL^{-1} ، حجم Tween 80 1.0 میکرولیتر، حجم SDS 1.0 میکرولیتر، $1/5$ درصد وزنی-حجمی نمک، زمان سانتریفیوژ کردن $10/0$ دقیقه، دور سانتریفیوژ 3500 دور در دقیقه

جدول (۱۳-۱) پ: نتایج حاصل از بررسی اثر قدرت یونی (اثر نمک) بر میزان استخراج

اثر نمک (قدرت یونی) (درصد وزنی-حجمی)	نیترازپام (درصد بازیابی)	میدازولام (درصد بازیابی)	نیترازپام (سطح زیر پیک) (mV.S)	میدازولام (سطح زیر پیک) (mV.S)
۰	۳۹	۴۴	۷۸۸	۱۰۴۱
۰/۱	۵۶	۵۹	۱۱۳۳	۱۴۱۶
۰/۵	۶۴	۶۰	۱۲۹۱	۱۴۱۷
۱/۰	۷۸	۷۴	۱۵۷۸	۱۶۴۵
۱/۵	۸۲	۸۳	۱۶۴۰	۱۶۴۵
۲/۰	۸۱	۸۲	۱۶۳۸	۱۶۴۴

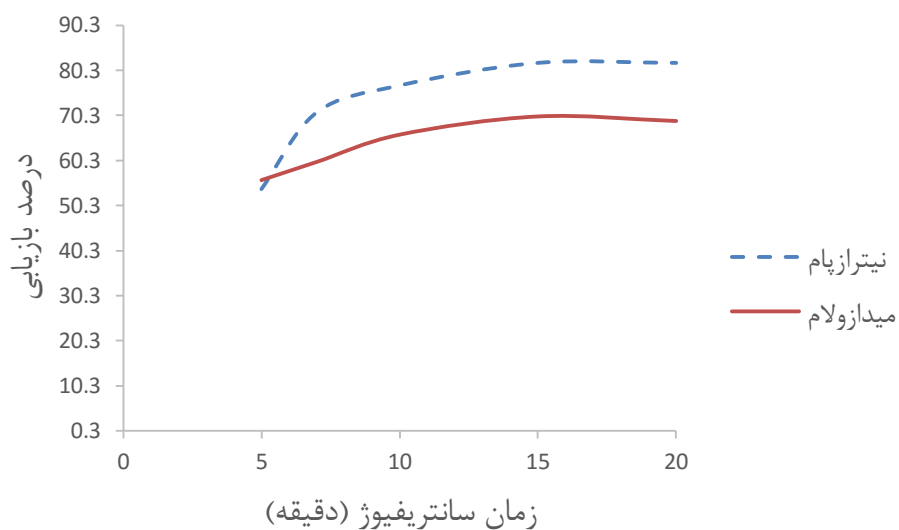


شکل (۱۳-۱) پ: نمودار اثر درصد نمک بر میزان استخراج

شرایط آزمایش: غلظت نیترازپام و میدازولام 0.5 mg L^{-1} ، $\text{pH} = 8.0$ ، حجم محلول نمونه 1.0 mL ، 1.0 mL بافر، زمان استخراج ۱۵ دقیقه، $30 \mu\text{L}$ -آندکانول، نوع سورفکتانت Tween 80+SDS، غلظت سورفکتانت 1 mg mL^{-1} ، 25.0 میلی گرم بر میلی لیتر، حجم Tween 80 1.0 میکرولیتر، حجم SDS 1.0 میکرولیتر، 1.5 ٪ وزنی-حجمی نمک، زمان سانتریفیوژ کردن 10.0 دقیقه، دور سانتریفیوژ 3500 دور در دقیقه

جدول (۱۴-۱) پ: نتایج حاصل از بررسی اثر زمان سانتریفیوژ بر میزان استخراج

زمان سانتریفیوژ (دقیقه)	نیترازپام (درصد بازیابی)	میدازولام (درصد بازیابی)	نیترازپام (سطح زیر پیک) (mV.S)	میدازولام (سطح زیر پیک) (mV.S)
۵	۵۴	۵۶	۱۱۳۰	۱۱۴۱
۷	۷۱	۶۰	۱۲۳۵	۱۲۲۵
۱۰	۷۷	۷۵	۱۵۷۵	۱۵۴۹
۱۵	۸۲	۸۳	۱۶۴۰	۱۶۴۵
۲۰	۸۲	۸۱	۱۶۳۹	۱۶۲۴



شکل (۱-۱۴) پ: نمودار اثر زمان سانتریفیوژ بر میزان استخراج

شرایط آزمایش: غلظت نیترازپام و میدازولام 0.5 mg L^{-1} ، $\text{pH} = 8.0$ ، حجم محلول نمونه 1.0 mL ، 1.0 mL افر، زمان استخراج ۱۵ دقیقه، $30 \mu\text{L}$ ۱-آندکانول، نوع سورفکتانت Tween 80+SDS، غلظت سورفکتانت 1 mg mL^{-1} ، 25.0 ، حجم Tween 80 1.0 میکرولیتر، حجم SDS 10.0 میکرولیتر، $1/5$ درصد وزنی/حجمی NaCl، دور سانتریفیوژ 3500 دور در دقیقه

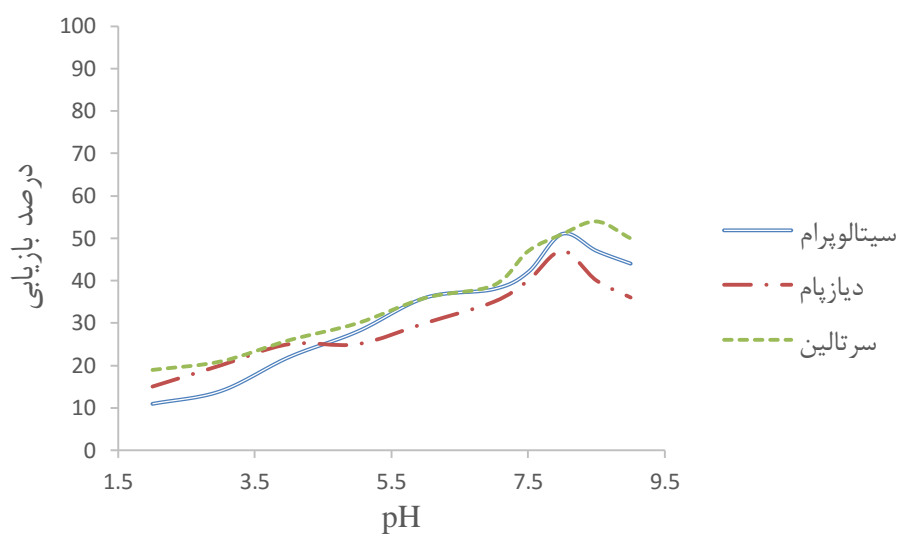
پیوست ۲

نتایج بررسی یک متغیر در زمان روش میکرواستخراج پخشی مایع مایع به همراه روش میکرواستخراج مبتنی بر انجماد قطره آلی شناور و به همراه امواج فراصوت برای پیش تغلیظ مقادیر سرتالین، سینالوپرام و دیازپام در نمونه‌های حقیقی و به همراه روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

به منظور بررسی متغیرها به روش یک متغیر در زمان، در یک لوله آزمایش غلظت mg L^{-1} ۰/۵ از هر یک از داروهای مورد بررسی، با pH دلخواه و توسط آب مقطر به حجم دلخواه رسانده شد. سپس مخلوط همگنی شامل حلال استخراج و حلال پخش کننده، توسط سرنگ به سرعت به نمونه آبی تزریق گردید. در نتیجه، محلول کدر یا ابری (حاوی محلول آبی، حلال آلی استخراج کننده و حلال آلی پخش کننده) تشکیل می‌شود که این کدورت به علت پخش ذرات ریز حلال استخراج کننده به درون محلول آبی می‌باشد. در مرحله بعد لوله آزمایش در حمام فراصوت با قدرت ۶۰ kHz قرار گرفته شد. سپس به منظور جداسازی بهتر دو فاز، لوله آزمایش در دستگاه سانتریفیوژ با سرعت ۳۰۰۰ دور بر دقیقه قرار داده شد. پس از اتمام عمل استخراج، لوله آزمایش به حمام یخ منتقل گردید و بعد از گذشت ۲۰ دقیقه، قطره آلی منجمد، در سطح محلول تشکیل گردید. سپس قطره آلی منجمد شده توسط اسپاتول به یک ویال منتقل و به دستگاه HPLC تزریق شد و سیگنال به دست آمده که به صورت سطح زیر پیک منحنی بود، ثبت گردید.

جدول (۱-۲ پ): نتایج حاصل از بررسی اثر pH فاز آبی بر میزان استخراج

pH	سیتالوپرام (درصد بازیابی)	دیازپام (درصد بازیابی)	سرتالین (درصد بازیابی)	سیتالوپرام (سطح زیر پیک) (mV.S)	دیازپام (سطح زیر پیک) (mV.S)	سرتالین (سطح زیر پیک) (mV.S)
۲/۰	۱۱	۱۵	۱۹	۵۴۳	۵۵۲	۹۶۴
۳/۰	۱۴	۲۰	۲۱	۶۹۰	۷۳۰	۱۰۶۲
۴/۰	۲۲	۲۵	۲۶	۱۰۸۲	۹۰۷	۱۳۰۶
۵/۰	۲۸	۲۵	۳۰	۱۳۷۷	۹۰۸	۱۵۰۲
۶/۰	۳۶	۳۰	۳۶	۱۷۶۹	۱۰۸۵	۱۷۹۴
۷/۰	۳۸	۳۵	۳۹	۱۸۶۷	۱۲۶۳	۱۹۴۲
۷/۵	۴۲	۴۰	۴۷	۲۰۶۴	۱۴۴۰	۲۳۳۳
۸/۰	۵۱	۴۷	۵۱	۲۵۰۵	۱۶۸۹	۲۵۲۹
۸/۵	۴۷	۴۰	۵۴	۲۳۰۹	۱۴۴۱	۲۶۷۵
۹/۰	۴۲	۳۶	۵۰	۲۰۶۵	۱۲۹۸	۲۴۸۰



شکل (۱-۲) بررسی اثر pH بر میزان استخراج

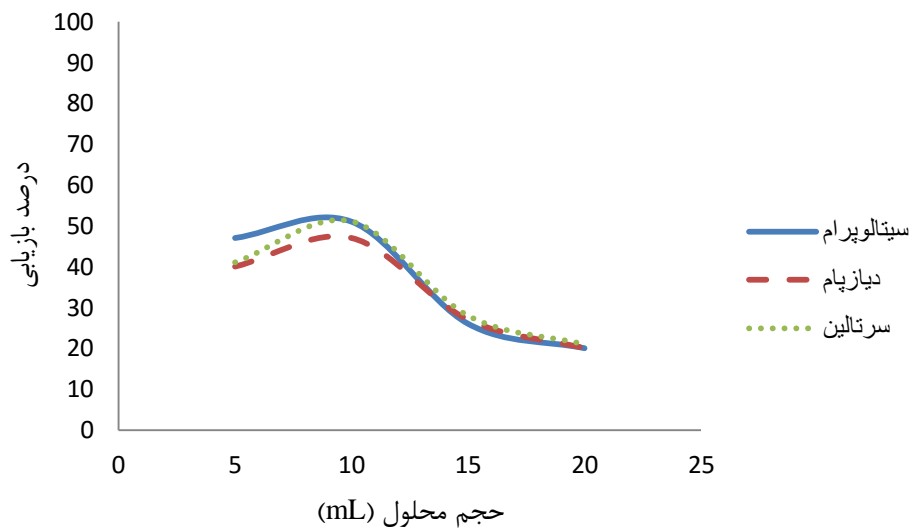
شرایط آزمایش: غلظت سیتالوپرام، دیازپام و سرتالین 0.5 mg L^{-1} ، حجم محلول نمونه 1.0 mL ، 3.0 mL بافر

فسفات، زمان استخراج ۱۰ دقیقه، $50 \mu\text{L}$ - 1 mL آندکانول، $1000 \mu\text{L}$ حلال پخش کننده اتانول، زمان استخراج 15.0

دقیقه، زمان سانتریفیوژ کردن 15.0 دقیقه، دور سانتریفیوژ 3500 دور در دقیقه

جدول (۲-۲ پ): نتایج حاصل از بررسی اثر حجم محلول نمونه بر میزان استخراج

حجم نمونه (mL)	سیتالوپرام (درصد بازیابی)	دیازپام (درصد بازیابی)	سرتالین (درصد بازیابی)	سیتالوپرام (سطح زیر پیک) (mV.S)	دیازپام (سطح زیر پیک) (mV.S)	سرتالین (سطح زیر پیک) (mV.S)
۵/۰	۴۷	۴۰	۴۱	۱۱۵۶	۷۲۹	۱۰۳۷
۱۰/۰	۵۱	۴۷	۵۱	۲۵۰۵	۱۶۸۹	۲۵۲۹
۱۵/۰	۲۶	۲۷	۲۸	۱۹۲۲	۱۴۳۸	۲۱۰۹
۲۰/۰	۲۰	۲۰	۲۱	۱۹۶۳	۱۴۲۰	۲۰۶۹

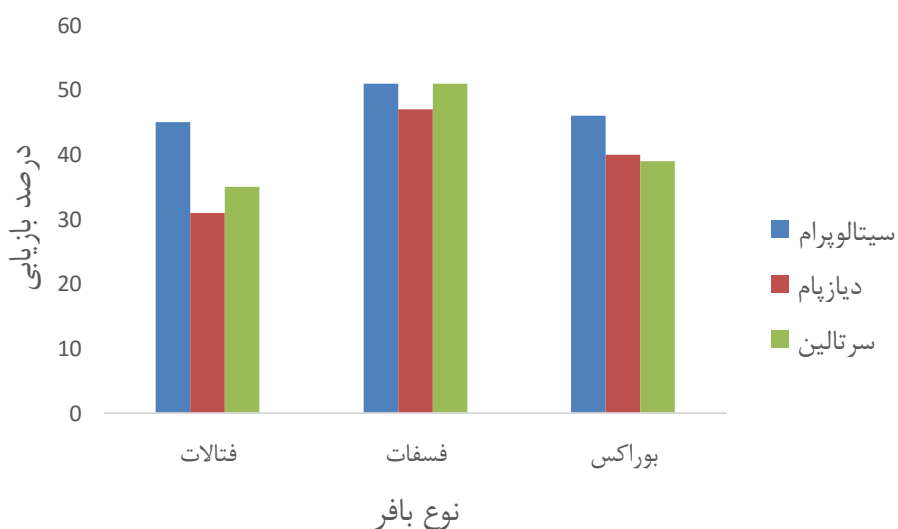


شکل (۲-۲ پ) بررسی اثر حجم محلول نمونه بر میزان استخراج

شرایط آزمایش: غلظت سیتالوپرام، دیازپام و سرتالین 0.5 mg L^{-1} ، $\text{pH} = 8.0$ ، 3.0 mL بافر فسفات، زمان استخراج ۱۰ دقیقه، $50 \mu\text{L}$ – $1000 \mu\text{L}$ حلال پخش کننده اتانول، زمان استخراج ۱۵/۰ دقیقه، زمان سانتریفیوژ کردن ۱۵/۰ دقیقه، دور سانتریفیوژ ۳۵۰۰ دور در دقیقه

جدول (۲-۳): نتایج حاصل از بررسی نوع بافر بر میزان استخراج

نوع بافر	سیتالوپرام (درصد بازیابی)	دiazپام (درصد بازیابی)	سرتالین (درصد بازیابی)	سیتالوپرام (سطح زیر پیک) (mV.S)	دiazپام (سطح زیر پیک) (mV.S)	سرتالین (سطح زیر پیک) (mV.S)
فتالاتی	۴۵	۳۱	۳۵	۲۲۱۱	۱۱۲۰	۱۷۴۶
فسفاتی	۵۱	۴۷	۵۱	۲۵۰۵	۱۶۸۹	۲۵۲۹
بوراکس	۳۶	۴۰	۳۹	۱۷۶۹	۱۴۴۰	۱۹۴۲

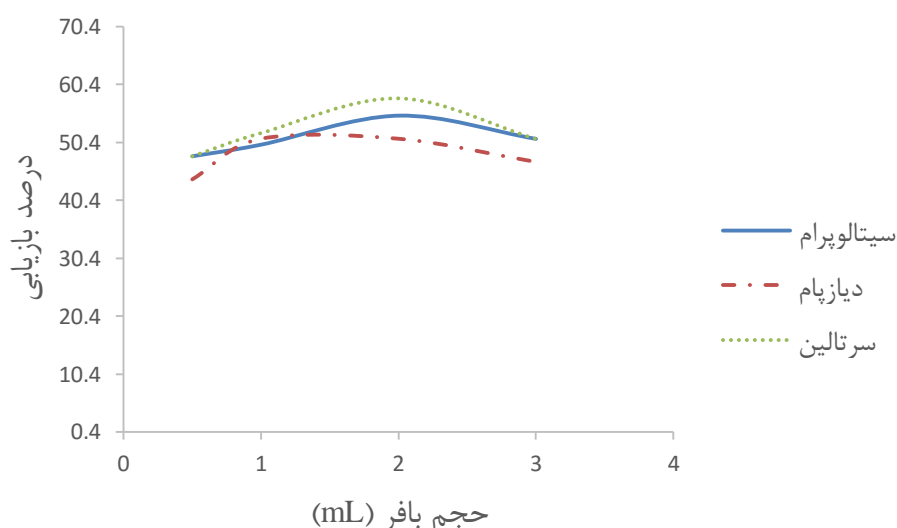


شکل (۲-۳) بررسی اثر نوع بافر بر میزان استخراج

شرایط آزمایش: غلظت سیتالوپرام، دیازپام و سرتالین $1/5 \text{ mg L}^{-1}$ ، $\text{pH} = 8/0$ ، حجم محلول نمونه $10/0 \text{ mL}$ ، $3/0$ میلی‌لیتر بافر، زمان استخراج ۱۰ دقیقه، $50 \mu\text{L}$ - 1 آنکانول، $1000/0 \mu\text{L}$ حلال پخش کننده اتانول، زمان استخراج $15/0$ دقیقه، زمان سانتریفیوژ کردن $15/0$ دقیقه، دور سانتریفیوژ 3500 دور در دقیقه

جدول (۲-۴ پ): نتایج حاصل از بررسی اثر حجم بافر بر میزان استخراج

حجم بافر (mL)	سیتالوپرام (درصد بازیابی)	دیازپام (درصد بازیابی)	سرتالین (درصد بازیابی)	سیتالوپرام (سطح زیر پیک) (mV.S)	دیازپام (سطح زیر پیک) (mV.S)	سرتالین (سطح زیر پیک) (mV.S)
۰/۵	۴۸	۴۴	۴۸	۲۳۵۸	۱۵۸۳	۲۳۸۲
۱/۰	۵۰	۵۱	۵۲	۲۴۵۶	۱۸۳۱	۲۵۷۷
۲/۰	۵۵	۵۱	۵۸	۲۷۰۱	۱۸۳۰	۲۸۷۱
۳/۰	۵۱	۴۷	۵۱	۲۵۰۵	۱۶۸۹	۲۵۳۵



شکل (۲-۴ پ) بررسی اثر حجم بافر بر میزان استخراج

شرایط آزمایش: غلظت سیتالوپرام، دیازپام و سرتالین 0.5 mg L^{-1} ، $\text{pH} = 8.0$ ، حجم محلول نمونه 10.0 mL ، نوع بافر فسفات، زمان استخراج 10 دقیقه، $50 \mu\text{L}$ - 1 آنکانول، $1000.0 \mu\text{L}$ حلال پخش کننده اتانول، زمان استخراج $15/0$ دقیقه، زمان سانتریفیوژ کردن $15/0$ دقیقه، دور سانتریفیوژ 3500 دور در دقیقه

جدول (۲-۵ پ): نتایج حاصل از بررسی اثر نوع حلال استخراج کننده بر میزان استخراج

نوع حلال استخراج کننده	سیتالوپیرام (درصد بازیابی)	دیازپام (درصد بازیابی)	سرتالین (درصد بازیابی)	سیتالوپیرام (سطح زیر پیک) (mV.S)	دیازپام (سطح زیر پیک) (mV.S)	سرتالین (سطح زیر پیک) (mV.S)
۱۰ و ۱ دی کلرو دکان	۳۱	۲۹	۲۵	۱۵۲۴	۱۰۵۰	۱۲۵۷
۱-دو دکانول	۵۰	۴۸	۵۲	۲۴۵۶	۱۷۲۵	۲۵۷۷
۱-آندکانول	۵۵	۵۱	۵۸	۲۷۰۱	۱۸۳۱	۲۸۷۱



شکل (۲-۵ پ) بررسی اثر نوع حلال استخراج بر میزان استخراج

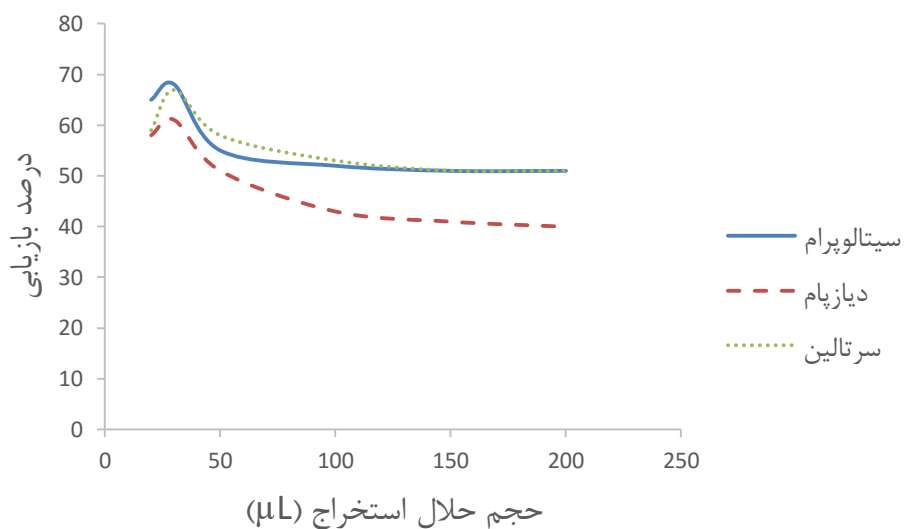
شرایط آزمایش: غلظت سیتالوپیرام، دیازپام و سرتالین 5 mg L^{-1} ، $\text{pH} = 8/0$ ، حجم محلول نمونه $10/0 \text{ mL}$ ،

$2/0$ بافر فسفات، زمان استخراج 10 دقیقه، $50 \mu\text{L}$ حلال استخراج، $1000/0 \mu\text{L}$ حلال پخش کننده اتانول، زمان

استخراج $15/0$ دقیقه، زمان سانتریفیوژ کردن $15/0$ دقیقه، دور سانتریفیوژ 3500 دور در دقیقه

جدول (۲-۶ پ): نتایج حاصل از بررسی حجم حلال استخراج کننده بر میزان استخراج

حجم حلال استخراج کننده (μL)	سیتالوپرام (درصد بازیابی)	دیازپام (درصد بازیابی)	سرتالین (درصد بازیابی)	سیتالوپرام (سطح زیر پیک) (mV.S)	دیازپام (سطح زیر پیک) (mV.S)	سرتالین (سطح زیر پیک) (mV.S)
۲۰/۰	۴۳	۵۸	۵۹	۵۳۱۱	۳۴۵۰	۴۸۳۳
۳۰/۰	۶۸	۶۱	۶۷	۵۵۵۴	۳۶۲۷	۵۴۸۴
۵۰/۰	۵۵	۵۱	۵۸	۲۷۰۱	۱۸۳۱	۲۸۷۱
۱۰۰/۰	۵۲	۴۳	۵۳	۱۲۷۸	۷۸۲	۱۳۳۱
۱۵۰/۰	۵۱	۴۱	۵۱	۸۳۷	۵۰۳	۸۶۷
۲۰۰/۰	۵۱	۴۰	۵۱	۶۲۹	۳۷۳	۶۵۹



شکل (۲-۶ پ) نمودار اثر حجم حلال استخراج کننده بر میزان استخراج

شرایط آزمایش: غلظت سیتالوپرام، دیازپام و سرتالین 5 mg L^{-1} ، $\text{pH} = 8.0$ ، حجم محلول نمونه 1.0 mL ،

2.0 بافر فسفات، زمان استخراج 10 دقیقه، 1 -آندکانول، 1000.0 μL حلال پخش کننده اتانول، زمان استخراج 15.0

دقیقه، زمان سانتریفیوژ کردن 15.0 دقیقه، دور سانتریفیوژ 3500 دور در دقیقه

جدول (۲-۷ پ): نتایج حاصل از بررسی اثر نوع حلال پخش کننده بر میزان استخراج

نوع حلال پخش کننده	سیتالوپرام (درصد بازیابی)	دیازپام (درصد بازیابی)	سرتالین (درصد بازیابی)	سیتالوپرام (سطح زیر پیک (mV.S)	دیازپام (سطح زیر پیک (mV.S)	سرتالین (سطح زیر پیک (mV.S)
اتانول	۶۸	۶۱	۶۷	۵۵۶۴	۳۶۲۷	۵۴۸۴
استون	۵۱	۵۵	۴۹	۴۱۷۳	۳۲۷۲	۴۰۲۰
متانول	۶۱	۵۲	۴۴	۴۹۸۸	۳۰۹۵	۳۶۱۳

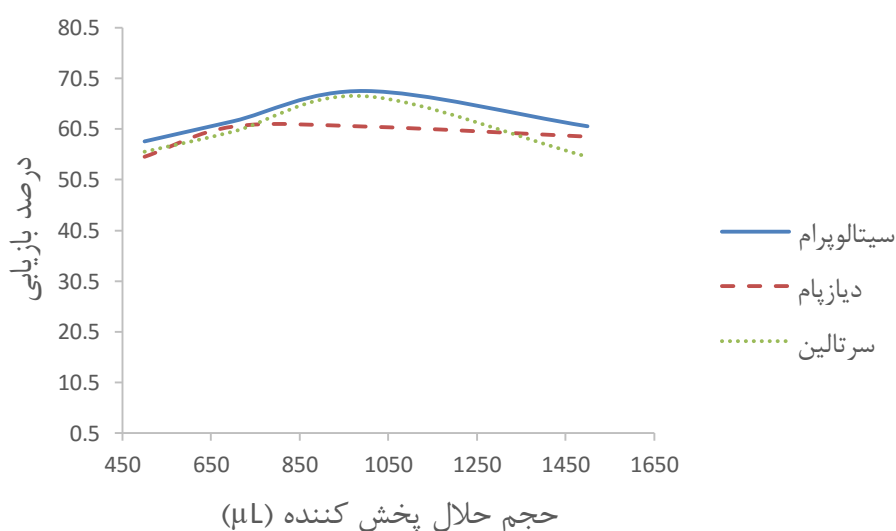


شکل (۲-۷ پ) بررسی اثر نوع حلال پخش کننده بر میزان استخراج

شرایط آزمایش: غلظت سیتالوپرام، دیازپام و سرتالین 5 mg L^{-1} ، $\text{pH} = 8/0$ ، حجم محلول نمونه $10/0 \text{ mL}$ ، $2/0$ بافر فسفات، زمان استخراج 10 دقیقه، $30 \text{ } \mu\text{L}$ حلال استخراج کننده 1 -آندکانول، $1000 \text{ } \mu\text{L}$ حلال پخش کننده، زمان استخراج $15/0$ دقیقه، زمان سانتریفیوژ کردن $15/0$ دقیقه، دور سانتریفیوژ 3500 دور در دقیقه

جدول (۲-۸ پ): نتایج حاصل از بررسی اثر حجم حلال پخش کننده بر میزان استخراج

حجم حلال پخش کننده (μL)	سیتالوپرام (درصد بازیابی)	دیازپام (درصد بازیابی)	سرتالین (درصد بازیابی)	سیتالوپرام (سطح زیر پیک) (mV.S)	دیازپام (سطح زیر پیک) (mV.S)	سرتالین (سطح زیر پیک) (mV.S)
۵۰۰/۰	۵۸	۵۵	۵۶	۴۷۴۶	۳۲۷۲	۴۵۹۸
۷۰۰/۰	۶۲	۶۰	۶۰	۵۰۷۳	۳۶۲۷	۴۹۱۶
۱۰۰۰/۰	۶۸	۶۱	۶۷	۵۵۶۴	۳۶۲۶	۵۴۸۴
۱۵۰۰/۰	۶۱	۵۹	۵۵	۴۹۹۱	۳۵۰۸	۴۵۱۷

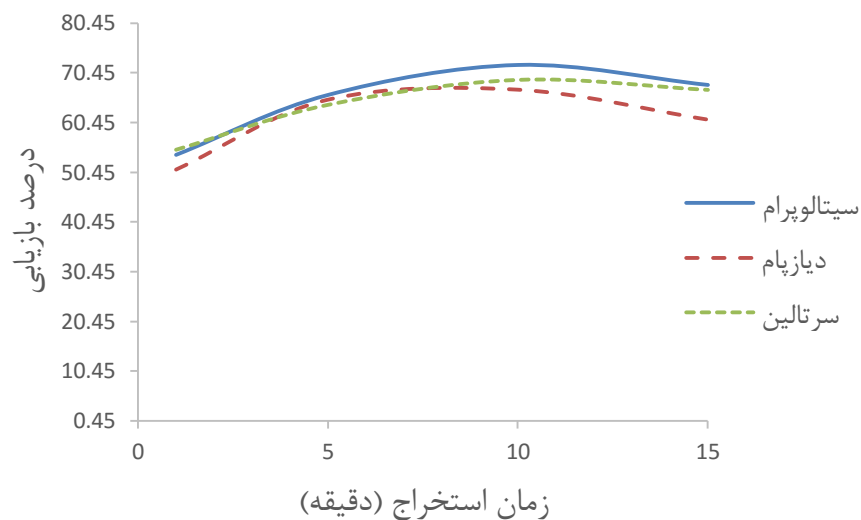


شکل (۲-۸ پ) نمودار اثر حجم حلال پخش کننده بر استخراج

شرایط آزمایش: غلظت سیتالوپرام، دیازپام و سرتالین 1 mg L^{-1} ، $\text{pH} = 8.0/5$ ، حجم محلول نمونه $10/0 \text{ mL}$ ، $2/0$ بافر فسفات، زمان استخراج ۱۰ دقیقه، $30 \mu\text{L}$ حلال استخراج کننده ۱-آندکانول، حلال پخش کننده اتانول، زمان استخراج $15/0$ دقیقه، زمان سانتریفیوژ کردن $15/0$ دقیقه، دور سانتریفیوژ 3500 دور در دقیقه

جدول (۲-۹ پ): نتایج حاصل از بررسی اثر زمان استخراج بر میزان استخراج

زمان استخراج (دقیقه)	سیتالوپرام (درصد بازیابی)	دiazepam (درصد بازیابی)	سرتالین (درصد بازیابی)	سیتالوپرام (سطح زیر پیک) (mV.S)	دiazepam (سطح زیر پیک) (mV.S)	سرتالین (سطح زیر پیک) (mV.S)
۱	۵۴	۵۱	۵۵	۴۴۱۹	۳۰۳۶	۴۵۰۸
۵	۶۶	۶۵	۶۴	۵۴۰۰	۳۸۶۴	۵۲۴۰
۱۰	۷۲	۶۷	۶۹	۵۸۹۱	۳۹۸۲	۵۶۴۷
۱۵	۶۸	۶۱	۶۷	۵۵۶۴	۳۶۲۷	۵۴۸۴

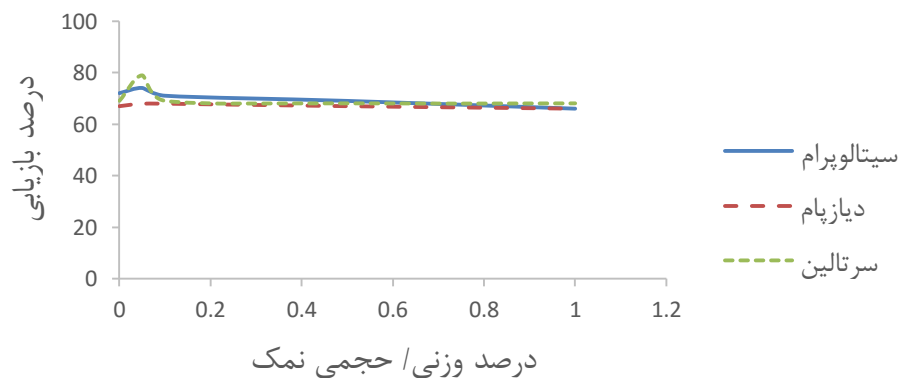


شکل (۲-۹ پ) نمودار اثر زمان استخراج بر استخراج

شرایط آزمایش: غلظت سیتالوپرام، diazepam و سرتالین 5 mg L^{-1} ، $\text{pH} = 8.0$ ، حجم محلول نمونه 10 mL ، 20 بافر فسفات، زمان استخراج 10 دقیقه، $30 \text{ }\mu\text{L}$ حلال استخراج کننده 1 -آندکانول، $1000 \text{ }\mu\text{L}$ حلال پخش کننده اتانول، زمان استخراج $15/0$ دقیقه، دور سانتریفیوژ 3500 دور در دقیقه

جدول (۲-۱۰ پ): نتایج حاصل از بررسی اثر قدرت یونی (اثر نمک) بر میزان استخراج

اثر نمک (قدرت یونی) (درصد وزنی-حجمی)	سیتالوپرام (درصد بازیابی)	دیازپام (درصد بازیابی)	سرتالین (درصد بازیابی)	سیتالوپرام (سطح زیر پیک) (mV.S)	دیازپام (سطح زیر پیک) (mV.S)	سرتالین (سطح زیر پیک) (mV.S)
۰	۷۲	۶۷	۶۹	۵۸۸۳	۳۹۸۲	۳۲۰۷
۰/۰۵	۷۴	۶۸	۷۰	۶۰۶۴	۴۰۴۲	۵۷۲۸
۰/۱	۷۱	۶۸	۶۹	۵۸۰۱	۴۰۴۱	۳۲۰۶
۰/۵	۶۹	۶۷	۶۸	۵۶۳۸	۳۸۱	۵۵۶۵
۱/۰	۶۶	۶۶	۶۸	۵۳۹۳	۳۹۲۳	۵۵۶۴



شکل (۲-۱۰ پ) بررسی اثر نمک بر استخراج

شرایط آزمایش: غلظت سیتالوپرام، دیازپام و سرتالین 1 mg L^{-1} ، $\text{pH} = 7.5$ ، حجم محلول نمونه 100 mL ،

200 mL بافر فسفات، زمان استخراج 10 دقیقه، 30 mL حلال استخراج کننده 1 -آندکانول، 1000 mL حلال پخش

کننده اتانول، زمان استخراج 150 دقیقه، دور سانتریفیوژ 3500 دور در دقیقه، 10 دقیقه زمان استخراج

پیوست ۳

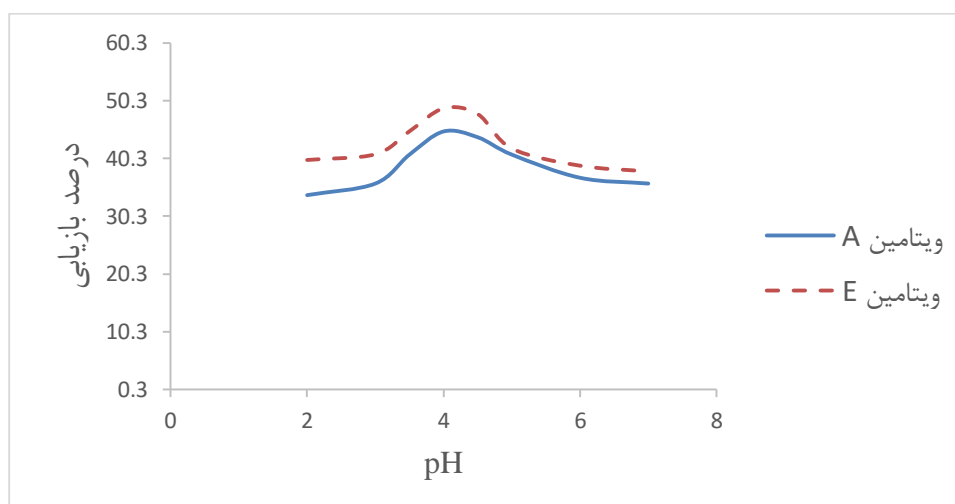
نتایج بررسی یک متغیر در زمان برای روش میکرواستخراج مایع مایع پخشی معکوس برای پیش تغلیظ و

اندازه‌گیری ویتامین A و E در روغن های گیاهی

به منظور بررسی متغیرها به روش یک متغیر در زمان، حجمی از روغن حاوی ویتامین های A و E با ۱/۰ mL سیکلوهگزان به عنوان رقیق کننده در یک لوله آزمایش یکنواخت گردید. مخلوطی از اتانول-آب با نسبت حجمی مشخص و pH تنظیم شده آب با بافر مناسب، به عنوان حلال استخراج کننده و حجمی از حلال پخش کننده به سرعت به درون لوله آزمایش تزریق گردید. محلول ابری تشکیل شده در حمام فراصوت قرار گرفت تا محلول استخراج کننده به درون محلول روغن پخش شود. پس از سانتریفیوژ نمونه با سرعت ۳۵۰۰ دور بر دقیقه، ۵/۰ μL از حلال ته نشین شده به دستگاه HPLC تزریق و مورد آنالیز قرار گرفت و سیگنال به دست آمده که به صورت سطح زیر پیک منحنی بود، ثبت گردید.

جدول (۳-۱ پ): نتایج حاصل از بررسی اثر pH حلال استخراج بر میزان استخراج

pH	ویتامین A (درصد بازیابی)	ویتامین E (درصد بازیابی)	ویتامین A (سطح زیر پیک) (mV.S)	ویتامین E (سطح زیر پیک) (mV.S)
۲/۰	۳۴	۴۰	۳۳۳	۲۸۱
۳/۰	۳۶	۴۱	۳۳۸	۲۹۸
۳/۵	۴۱	۴۵	۳۸۰	۳۲۳
۴/۰	۴۵	۴۹	۴۱۴	۳۴۹
۴/۵	۴۴	۴۸	۴۰۵	۳۲۳
۵/۰	۴۱	۴۲	۳۸۰	۳۰۴
۶/۰	۳۷	۳۹	۳۴۷	۲۸۵
۷/۰	۳۶	۳۸	۳۳۸	۲۷۸

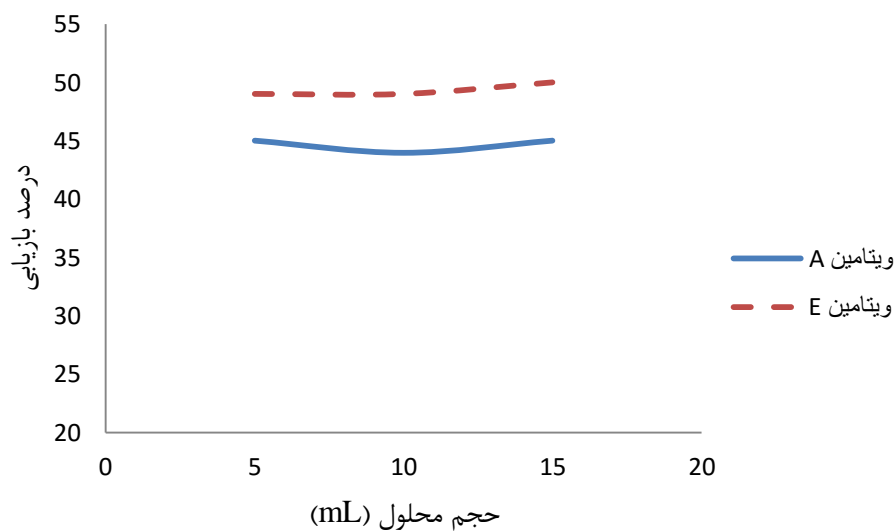


شکل (۳-۱ پ) نمودار تاثیر pH بر میزان استخراج

شرایط آزمایش: غلظت ویتامین A و ویتامین E هر کدام 0.5 mg L^{-1} ، حجم محلول نمونه $15/0 \text{ mL}$ ، نوع بافر فسفات، ترکیب درصد استخراج (اتانول-آب) (۵۰-۵۰)، حجم حلال استخراج $100/0 \text{ }\mu\text{L}$ ، $200 \text{ }\mu\text{L}$ و $4 \text{ }\mu\text{L}$ دی اکسان به عنوان حلال پخش کننده، زمان استخراج $15/0$ دقیقه، دور سانتریفیوژ 3500 دور در دقیقه، 10 دقیقه زمان سانتریفیوژ

جدول (۲-۳) پ: نتایج حاصل از بررسی اثر حجم محلول بر میزان استخراج

حجم محلول نمونه (mL)	ویتامین A (درصد بازیابی)	ویتامین E (درصد بازیابی)	ویتامین A (سطح زیر پیک) (mV.S)	ویتامین E (سطح زیر پیک) (mV.S)
۵/۰	۴۵	۴۹	۱۶۳	۱۷۴
۱۰/۰	۴۴	۴۹	۳۰۵	۳۱۶
۱۵/۰	۴۷	۵۰	۴۱۴	۳۵۰

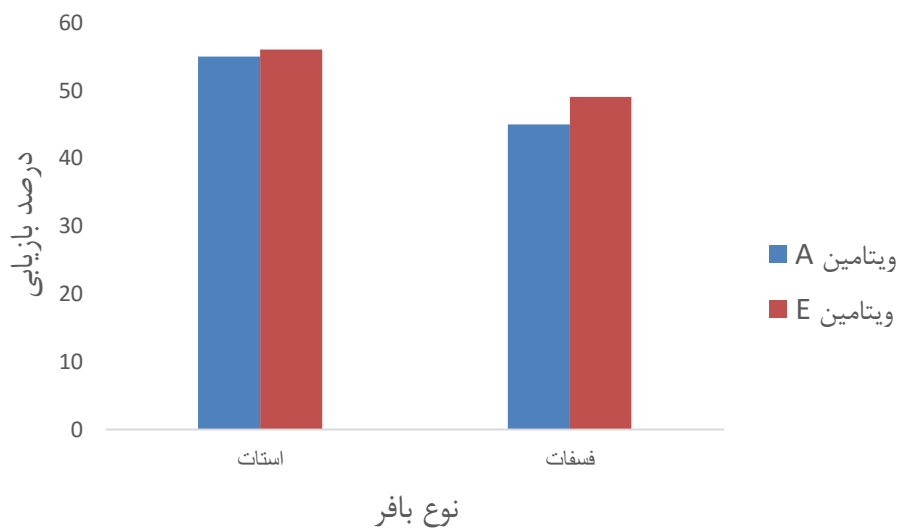


شکل (۲-۳) پ: نمودار تاثیر حجم محلول بر میزان استخراج

شرایط آزمایش: غلظت ویتامین A و ویتامین E ۰/۵ میلی گرم بر لیتر، حجم محلول نمونه ۵/۰ mL ، pH=۴/۰ ، بافر فسفات، ترکیب درصد استخراج (اتانول-آب) (۵۰-۵۰)، حجم حلال استخراج ۱۰۰/۰ μL ، ۲۰۰ μL و ۴ دی اکسان به عنوان حلال پخش کننده ، زمان استخراج ۱۵/۰ دقیقه، دور سانتریفیوژ ۳۵۰۰ دور در دقیقه، ۱۰ دقیقه زمان سانتریفیوژ

جدول (۳-۳) پ): نتایج حاصل از بررسی نوع بافر بر میزان استخراج

نوع بافر	ویتامین A (درصد بازیابی)	ویتامین E (درصد بازیابی)	ویتامین A (سطح زیر پیک) (mV.S)	ویتامین E (سطح زیر پیک) (mV.S)
استاتی	۵۵	۵۶	۴۹۷	۳۹۳
فسفاتی	۴۵	۵۰	۴۱۴	۳۵۰

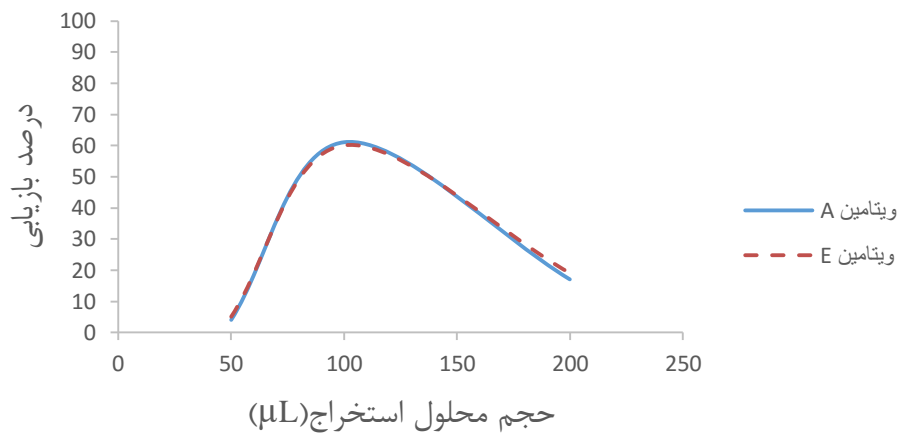


شکل (۳-۳) پ) نمودار تاثیر نوع بافر بر میزان استخراج

شرایط آزمایش: غلظت ویتامین A و ویتامین E ۰/۵ میلی گرم بر لیتر، حجم محلول نمونه ۵/۰ mL ، pH=۴/۰ ، ترکیب درصد استخراج (اتانول-آب) (۵۰-۵۰)، حجم حلال استخراج ۱۰۰/۰ μL ، ۲۰۰ μL و ۴ دی اکسان بعنوان حلال پخش کننده ، زمان استخراج ۱۵/۰ دقیقه، دور سانتریفیوژ ۳۵۰۰ دور در دقیقه، ۱۵ دقیقه زمان سانتریفیوژ

جدول (۳-۴) پ: نتایج حاصل از بررسی اثر حجم محلول استخراج بر میزان استخراج

حجم محلول استخراج (μL)	ویتامین A (درصد بازیابی)	ویتامین E (درصد بازیابی)	ویتامین A (سطح زیر پیک) (mV.S)	ویتامین E (سطح زیر پیک) (mV.S)
۵۰	۴	۵	۱۰۱	۹۰
۱۰۰	۵۵	۵۶	۴۹۷	۳۹۴
۲۰۰	۱۷	۱۹	۱۱۱	۹۵

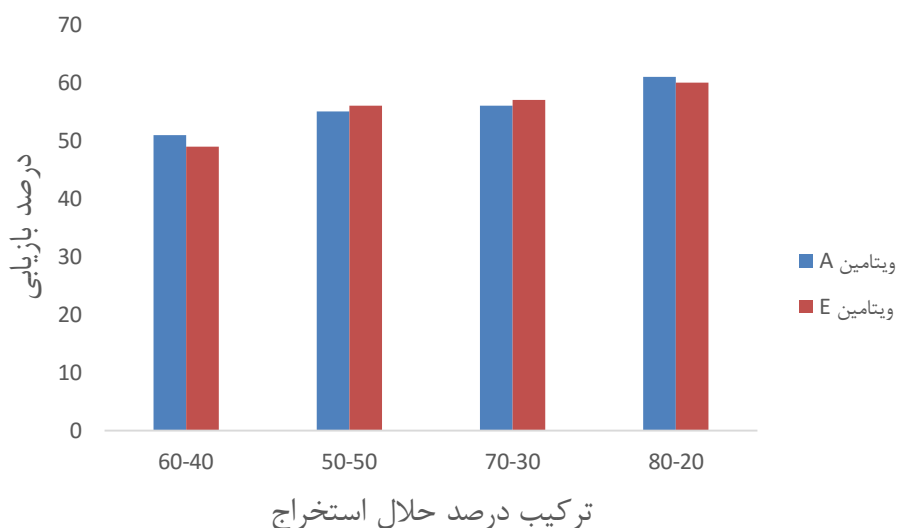


شکل (۳-۴) پ: نمودار تاثیر حجم محلول استخراج بر میزان استخراج

شرایط آزمایش: غلظت ویتامین A و ویتامین E ۰/۵ میلی گرم بر لیتر، حجم محلول نمونه ۵/۰ mL ، pH=۴/۰ ، ترکیب درصد استخراج (اتانول-آب) (۵۰-۵۰) ، ۲۰۰ و ۴ دی اکسان به عنوان حلال پخش کننده ، زمان استخراج ۱۵/۰ دقیقه، دور سانتریفیوژ ۳۵۰۰ دور در دقیقه، ۱۵ دقیقه زمان سانتریفیوژ

جدول (۳-۵ پ): نتایج حاصل از بررسی اثر ترکیب درصد حلال استخراج بر میزان استخراج

ترکیب درصد حلال استخراج	ویتامین A (درصد بازیابی)	ویتامین E (درصد بازیابی)	ویتامین A (سطح زیر پیک) (mV.S)	ویتامین E (سطح زیر پیک) (mV.S)
۴۰-۶۰	۵۱	۴۹	۴۶۴	۳۴۹
۵۰-۵۰	۵۵	۵۶	۴۹۷	۳۹۴
۳۰-۷۰	۵۶	۵۷	۵۰۶	۳۹۹
۲۰-۸۰	۶۱	۶۰	۵۴۸	۴۱۸



شکل (۳-۵ پ) نمودار تاثیر ترکیب درصد حلال استخراج بر میزان استخراج

شرایط آزمایش: غلظت ویتامین A و ویتامین E ۰/۵ میلی گرم بر لیتر، حجم محلول نمونه ۵/۰ mL ، pH=۴/۰ ، نوع بافر استات، نوع حلال استخراج کننده (اتانول-آب)، حجم حلال استخراج ۱۰۰/۰ μL ، نوع حلال پخش کننده ۴ و ۱ دی اکسان، ۲۰۰ μL و ۴ دی اکسان به عنوان حلال پخش کننده، زمان استخراج ۱۵/۰ دقیقه، دور سانتریفیوژ ۳۵۰۰ دور در دقیقه، ۱۵ دقیقه زمان سانتریفیوژ

جدول (۳-۶ پ): نتایج حاصل از بررسی اثر نوع حلال پخش کننده بر میزان استخراج

نوع حلال پخش کننده	ویتامین A (درصد بازیابی)	ویتامین E (درصد بازیابی)	ویتامین A (سطح زیر پیک) (mV.S)	ویتامین E (سطح زیر پیک) (mV.S)
۱ و ۴-دی اکسان	۵۹	۶۱	۵۴۸	۴۱۸
استون	۵۰	۵۲	۴۵۶	۳۶۷
THF	۴۷	۵۰	۴۳۰	۳۵۴

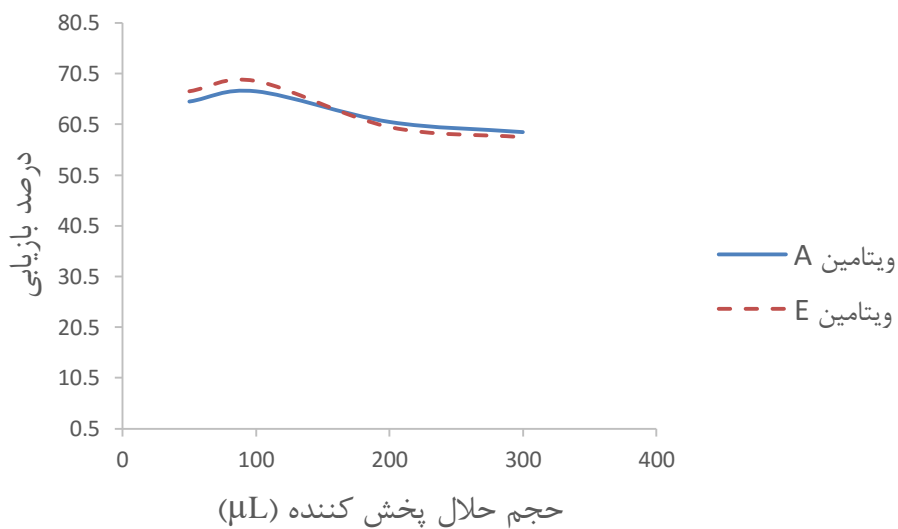


شکل (۳-۶ پ) نمودار تاثیر نوع حلال پخش کننده بر میزان استخراج

شرایط آزمایش: غلظت ویتامین A و ویتامین E ۰/۵ میلی گرم بر لیتر، حجم محلول نمونه ۵/۰ mL، pH=۴/۰، نوع بافر استات، (۲۰-۸۰) حلال استخراج کننده (اتانول-آب)، حجم حلال استخراج ۱۰۰/۰ μ L، حجم حلال پخش کننده ۲۰۰ μ L، زمان استخراج ۱۵/۰ دقیقه، دور سانتریفیوژ ۳۵۰۰ دور در دقیقه، ۱۵ دقیقه زمان سانتریفیوژ

جدول (۳-۷ پ): نتایج حاصل از بررسی حجم حلال پخش کننده بر میزان استخراج

حجم حلال پخش کننده (μL)	ویتامین A (درصد بازایی)	ویتامین E (درصد بازایی)	ویتامین A (سطح زیر پیک) (mV.S)	ویتامین E (سطح زیر پیک) (mV.S)
۵۰/۰	۶۵	۶۷	۵۸۱	۴۶۳
۱۰۰/۰	۶۷	۶۹	۵۹۸	۴۷۵
۲۰۰/۰	۶۱	۶۰	۵۴۷	۴۱۸
۳۰۰/۰	۵۹	۵۸	۵۳۰	۴۰۵

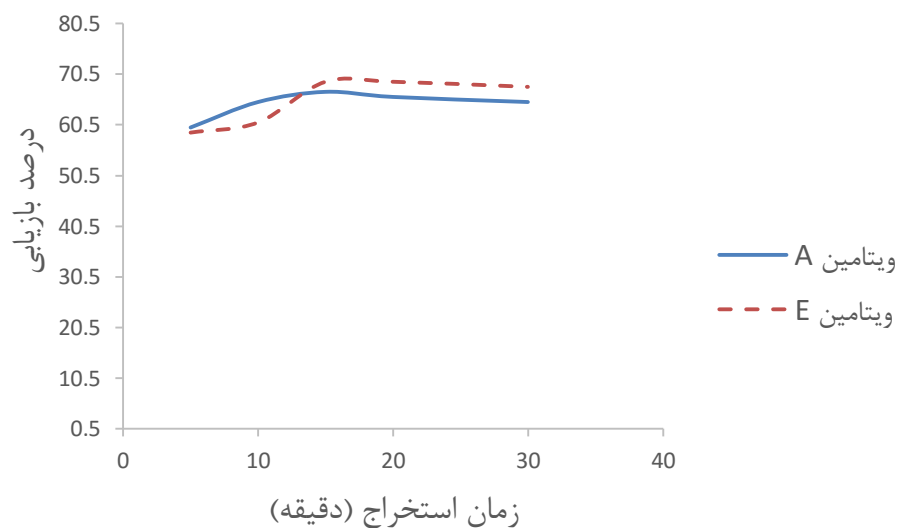


شکل (۳-۷ پ) نمودار تاثیر حجم حلال پخش کننده بر میزان استخراج

شرایط آزمایش: غلظت ویتامین A و ویتامین E ۰/۵ میلی گرم بر لیتر، حجم محلول نمونه ۵/۰ mL، pH=۴/۰، نوع بافر استات، (۲۰-۸۰) حلال استخراج کننده (اتانول-آب)، حجم حلال استخراج ۱۰۰/۰ μL ، نوع حلال پخش کننده ۱ و ۴ دی اکسان، زمان استخراج ۱۵/۰ دقیقه، دور سانتریفیوژ ۳۵۰۰ دور در دقیقه، ۱۵ دقیقه زمان سانتریفیوژ

جدول (۳-۸ پ): نتایج حاصل از بررسی اثر زمان استخراج بر میزان استخراج

زمان استخراج (دقیقه)	ویتامین A (درصد بازیابی)	ویتامین E (درصد بازیابی)	ویتامین A (سطح زیر پیک) (mV.S)	ویتامین E (سطح زیر پیک) (mV.S)
۵	۶۰	۵۹	۴۱۸	۴۱۲
۱۰	۶۵	۶۱	۵۸۱	۴۲۴
۱۵	۶۷	۶۹	۵۹۷	۴۷۵
۲۰	۶۶	۶۹	۵۸۹	۴۷۵
۳۰	۶۵	۶۸	۵۸۱	۴۶۹



شکل (۳-۸ پ) بررسی تاثیر زمان استخراج بر میزان استخراج

شرایط آزمایش: غلظت ویتامین A و ویتامین E ۰/۵ میلی گرم بر لیتر، حجم محلول نمونه ۵/۰ mL ، pH=۴/۰ ، نوع بافر استات، (۲۰-۸۰)، حجم حلال استخراج ۱۰۰/۰ μL ، حلال استخراج کننده (اتانول-آب)، نوع حلال پخش کننده

۱ و ۴ دی اکسان، حجم حلال پخش کننده ۱۰۰ μL ، دور سانتریفیوژ ۳۵۰۰ دور در دقیقه، ۱۵ دقیقه زمان

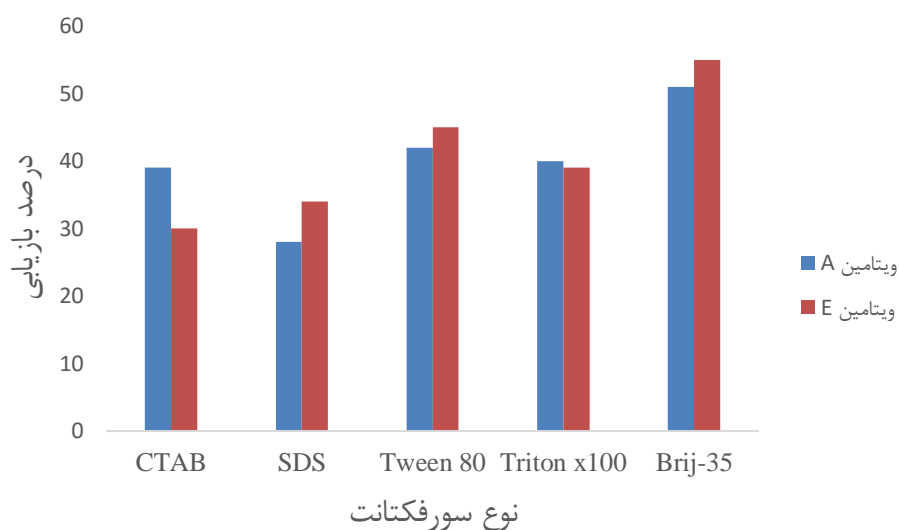
سانتریفیوژ

پیوست ۴

نتایج بررسی یک متغیر در زمان برای روش میکرواستخراج مایع مایع پخشی معکوس با کمک فاز غنی شده از سورفکتانت و به کمک امواج فراصوت برای پیش تغلیظ و اندازه گیری مقادیر کم ویتامین A و E به منظور بررسی متغیرها به روش یک متغیر در زمان، حجمی از روغن خوراکی حاوی ویتامین های A و E با ۱/۰ mL سیکلوهگزان به عنوان رقیق کننده در یک لوله آزمایش یکنواخت گردید. حجمی از محلول سورفکتانت با غلظت مشخص به عنوان حلال استخراج به سرعت به درون لوله آزمایش تزریق گردید. محلول ابری تشکیل شده در حمام فراصوت در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد قرار گرفت تا محلول استخراج کننده به درون محلول روغن پخش شود. پس از سانتریفیوژ نمونه با سرعت ۳۵۰۰ دور بر دقیقه، ۵/۰ μL از حلال ته نشین شده به دستگاه HPLC تزریق و مورد آنالیز قرار گرفت و سیگنال به دست آمده که به صورت سطح زیر پیک منحنی بود، ثبت گردید.

جدول (۴-۱ پ): نتایج حاصل از بررسی اثر نوع سورفکتانت بر میزان استخراج

نوع سورفکتانت	ویتامین A (درصد بازیابی)	ویتامین E (درصد بازیابی)	ویتامین A (سطح زیر پیک) (mV.S)	ویتامین E (سطح زیر پیک) (mV.S)
CTAB	۳۹	۳۰	۲۵۳	۱۶۶
SDS	۲۸	۳۴	۱۹۰	۱۸۳
Tween 80	۴۲	۴۵	۲۷۰	۲۲۹
Triton x100	۴۰	۳۹	۲۵۹	۲۰۴
Brij-35	۵۱	۵۵	۳۲۲	۲۷۰

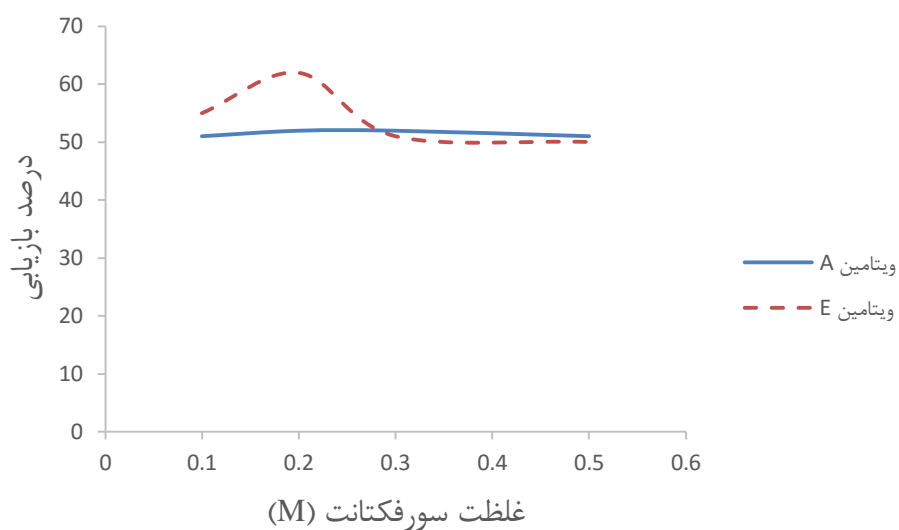


شکل (۴-۱) نمودار تاثیر نوع سورفکتانت بر میزان استخراج

شرایط آزمایش: غلظت ویتامین A و ویتامین E هر یک 0.5 mg L^{-1} ، غلظت سورفکتانت 0.1 M ، حجم محلول نمونه $5/0 \text{ mL}$ ، حجم سورفکتانت $50 \mu\text{L}$ ، درصد اسید افزوده شده به محلول نمونه 5 درصد حجمی-حجمی، زمان استخراج 10 دقیقه، دور سانتریفیوژ 3500 دور در دقیقه، 10 دقیقه زمان سانتریفیوژ

جدول (۴-۲): نتایج حاصل از بررسی اثر غلظت سورفکتانت بر میزان استخراج

غلظت سورفکتانت (M)	ویتامین A (درصد بازیابی)	ویتامین E (درصد بازیابی)	ویتامین A (سطح زیر پیک) (mV.S)	ویتامین E (سطح زیر پیک) (mV.S)
0.1	51	55	322	270
0.2	52	62	327	300
0.3	52	51	327	254
0.5	51	50	320	249

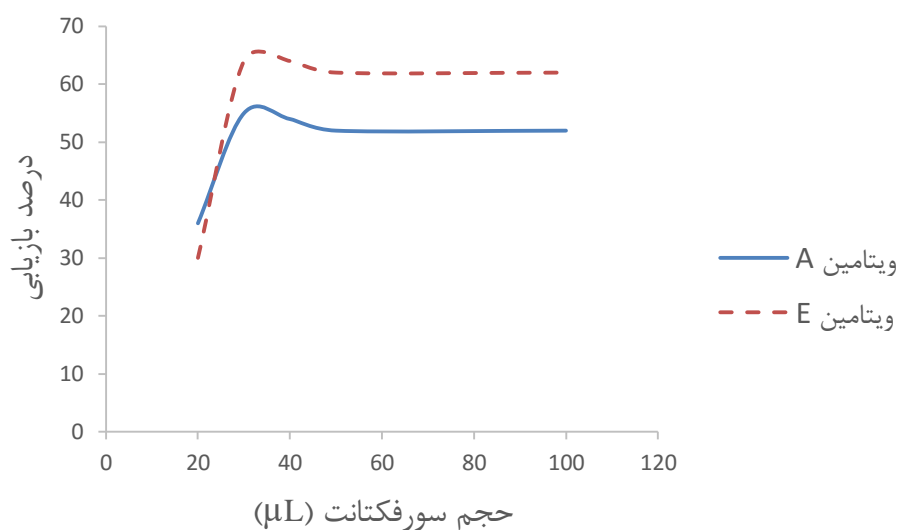


شکل (۴-۲) نمودار تاثیر غلظت سورفکتانت بر میزان استخراج

شرایط آزمایش: غلظت ویتامین A و ویتامین E هر یک 0.5 mg L^{-1} ، نوع سورفکتانت Brij-35، حجم سورفکتانت $50 \mu\text{L}$ ، درصد اسید افزوده شده به محلول نمونه ۵ درصد حجمی-حجمی، زمان استخراج ۱۰ دقیقه، دور سانتریفیوژ ۳۵۰۰ دور در دقیقه، ۱۰ دقیقه زمان سانتریفیوژ

جدول (۴-۳): نتایج حاصل از بررسی حجم سورفکتانت بر میزان استخراج

حجم سورفکتانت (μL)	ویتامین A (درصد بازیابی)	ویتامین E (درصد بازیابی)	ویتامین A (سطح زیر پیک) (mV.S)	ویتامین E (سطح زیر پیک) (mV.S)
۲۰/۰	۳۶	۳۰	۵۵۳	۴۵۱
۳۰/۰	۵۵	۶۴	۵۵۳	۴۸۶
۴۰/۰	۵۴	۶۴	۴۱۵	۳۷۴
۵۰/۰	۵۲	۶۲	۳۲۷	۳۰۰
۱۰۰/۰	۵۲	۶۲	۱۷۸	۱۷۰

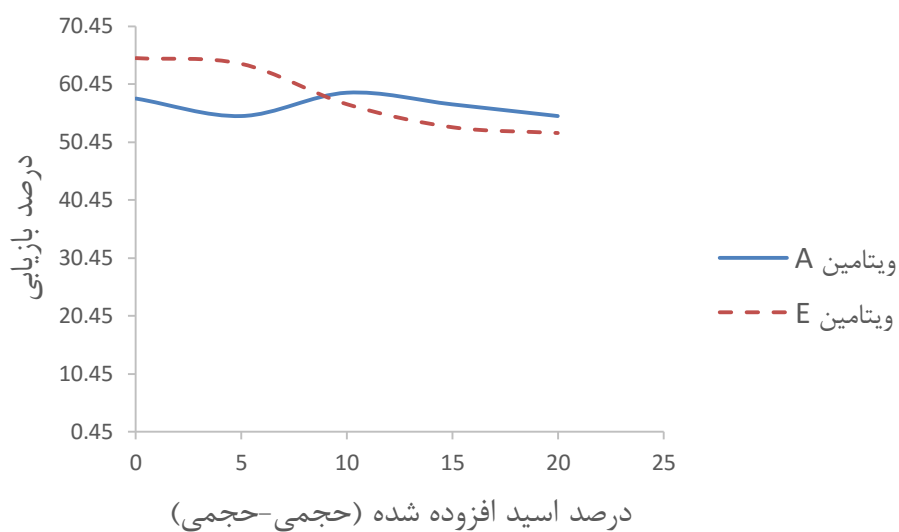


شکل (۳-۴) نمودار تاثیر حجم سورفکتانت بر میزان استخراج

شرایط آزمایش: غلظت ویتامین A و ویتامین E هر یک 0.5 mg L^{-1} ، غلظت سورفکتانت 0.2 M ، درصد اسید افزوده شده به محلول نمونه ۵ درصد حجمی-حجمی، زمان استخراج ۱۰ دقیقه، دور سانتریفیوژ ۳۵۰۰ دور در دقیقه، ۱۰ دقیقه زمان سانتریفیوژ

جدول (۴-۴): نتایج حاصل از بررسی اثر درصد اسید بر میزان استخراج

درصد اسید اضافه شده به محلول نمونه (حجمی-حجمی)	ویتامین A (درصد بازیابی)	ویتامین E (درصد بازیابی)	ویتامین A (سطح زیر پیک) (mV.S)	ویتامین E (سطح زیر پیک) (mV.S)
۰	۵۸	۶۵	۵۸۹	۴۹۳
۵/۰	۵۵	۶۴	۵۵۳	۴۸۶
۱۰/۰	۵۹	۵۷	۵۹۱	۴۳۷
۱۵/۰	۵۷	۵۳	۵۷۲	۴۱۰
۲۰/۰	۵۵	۵۲	۵۵۳	۴۰۳

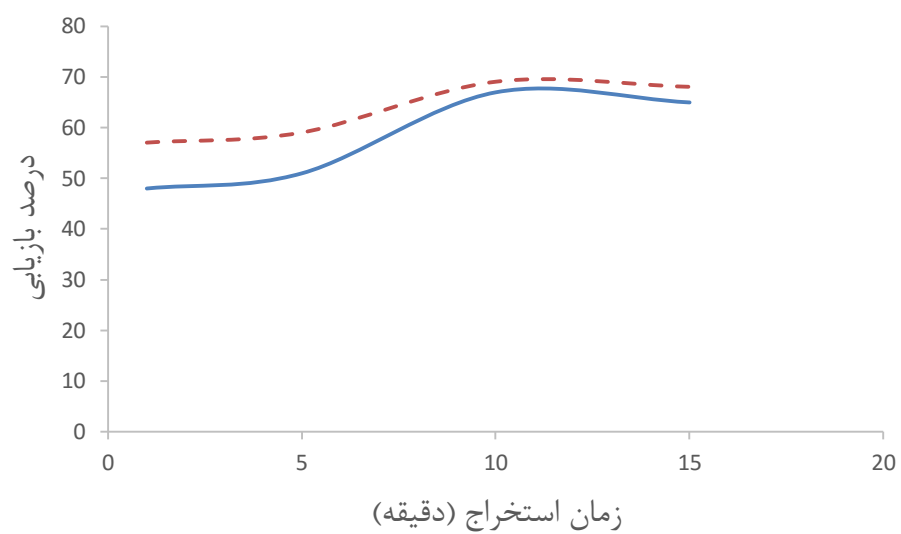


شکل (۴-۴) نمودار تاثیر درصد اسید افزوده شده بر میزان استخراج

شرایط آزمایش: غلظت ویتامین A و ویتامین E هر یک 5 mg L^{-1} ، غلظت سورفکتانت 0.2 M ، حجم سورفکتانت $40 \mu\text{L}$ ، زمان استخراج ۱۰ دقیقه، دور سانتریفیوژ ۳۵۰۰ دور در دقیقه، ۱۰ دقیقه زمان سانتریفیوژ

جدول (۴-۵) پ): نتایج حاصل از بررسی اثر زمان استخراج بر میزان استخراج

زمان استخراج (دقیقه)	ویتامین A (درصد باقی‌مانده)	ویتامین E (درصد باقی‌مانده)	ویتامین A (سطح زیر پیک) (mV.S)	ویتامین E (سطح زیر پیک) (mV.S)
۱	۴۸	۵۷	۴۸۷	۴۳۷
۵	۵۱	۵۹	۵۱۵	۴۵۱
۱۰	۶۷	۶۹	۶۶۶	۵۲۱
۱۵	۶۵	۶۸	۶۴۷	۵۱۴



شکل (۴-۵) نمودار تاثیر زمان استخراج بر میزان استخراج

شرایط آزمایش: غلظت ویتامین A و ویتامین E هر یک 0.5 mg L^{-1} ، غلظت سورفکتانت 0.2 M ، حجم سورفکتانت

$40 \mu\text{L}$ ، دور سانتریفیوژ 3500 دور در دقیقه، 10 دقیقه زمان سانتریفیوژ

- [1] Yamini Y, Moradi M, Tahmasebi E. (2012) High-throughput quantification of palladium in water samples by ion pair based-surfactant assisted microextraction. *Anal Chim Acta*;728:26-30.
- [2] 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.
- [3] Anderson RA, Ariffin MM, Cormack PA, Miller EI. (2008) Comparison of molecularly imprinted solid-phase extraction (MISPE) with classical solid-phase extraction (SPE) for the detection of benzodiazepines in post-mortem hair samples. *Forensic Sci Int*;174:40-46.
- [4] Dikeos D, Theleritis CG, Soldatos CR. *Sleep Disorders: Diagnosis and Therapeutics*. Informa Healthcare, London; 2008:
- [5] Salomone A, Gerace E, Brizio P, Gennaro MC, Vincenti M. (2011) A fast liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for determining benzodiazepines and analogues in urine. Validation and application to real cases of forensic interest. *J Pharm Biomed Anal*;56:582-591.
- [6] Riss J, Cloyd J, Gates J, Collins S. (2008) Benzodiazepines in epilepsy: pharmacology and pharmacokinetics. *Acta Neurol. Scand*;118:69-86.
- [7] Brigo F, Nardone R, Tezzon F, Trinkka E. (2015) Nonintravenous midazolam versus intravenous or rectal diazepam for the treatment of early status epilepticus: A systematic review with meta-analysis. *Epilepsy Behav*;49:325-336.
- [8] Haynes AB, Weiser TG, Berry WR, Lipsitz SR, Breizat A-HS, Dellinger EP, et al. (2009) A surgical safety checklist to reduce morbidity and mortality in a global population. *N Engl J Med* ;360:491-499.
- [9] Busto U, Sellers EM, Naranjo CA, Cappell H, Sanchez-Craig M, Sykora K. (1986) Withdrawal reaction after long-term therapeutic use of benzodiazepines. *N Engl J Med* ;315:854-859.

- [10] Calcaterra NE, Barrow JC. (2014) Classics in chemical neuroscience: diazepam (valium). *ACS Chem. Neurosci.*;5:253-260.
- [11] Svanström C, Hansson GP, Svensson LD, Sennbro CJ. (2012) Development and validation of a method using supported liquid extraction for the simultaneous determination of midazolam and 1'-hydroxy-midazolam in human plasma by liquid chromatography with tandem mass spectrometry detection. *J Pharm Biomed Anal*;58:71-77.
- [12] Trobec KC, Trontelj J, Springer J, Lainscak M, Kos MK. (2014) Liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for simultaneous quantification of bisoprolol, ramiprilat, propranolol and midazolam in rat dried blood spots. *J Chromatogr B*;958:29-35.
- [13] al-Hawasli H, al-Khayat MA, al-Mardini MA. (2012) Development of a validated HPLC method for the separation and analysis of a Bromazepam, Medazepam and Midazolam mixture. *J Pharm Anal*;2:484-491.
- [14] Barlow DH, Durand VM. *Abnormal psychology: An integrative approach*: Nelson Education; Cengage learning press, 2011.
- [15] Preskorn SH, Stanga CY, Feighner JP, Ross R. *Antidepressants: past, present and future*: Springer Science & Business Media; 2012.
- [16] ADM AM. (2010) Antidepressant Drug Effects and Depression Severity. *JAMA*;303:47-53.
- [17] Nemeroff CB. *Management of treatment-resistant major psychiatric disorders*, Oxford University Press; 2012.
- [18] Depression N. *The treatment and management of depression in adults (CG90)*. National Institute for Health and Clinical Excellence. 2009
- [19] Obach RS, Cox LM, Tremaine LM. (2005) Sertraline is metabolized by multiple cytochrome P450 enzymes, monoamine oxidases, and glucuronyl transferases in human: an in vitro study. *Drug Metab. Dispos*;33:262-270.
- [20] De Vane CL, Liston HL, Markowitz JS. (2002) Clinical pharmacokinetics of sertraline. *Clin Pharmacokinet*;41:1247-1266.

- [21] Macek J, Ptáček P, Klíma J. (2001) Rapid determination of citalopram in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J. chr. B* ;755:279-285.
- [22] Meng QH, Gauthier D. (2005) Simultaneous analysis of citalopram and desmethylcitalopram by liquid chromatography with fluorescence detection after solid-phase extraction. *Clin Biochem*;38:282-285.
- [23] Unceta N, Gómez-Caballero A, Sánchez A, Millán S, Sampedro MC, Goicolea MA, et al. (2008) Simultaneous determination of citalopram, fluoxetine and their main metabolites in human urine samples by solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal*;46:763-770.
- [24] Uřinová R, Brožmanová H, Šišťák P, Šilhán P, Kacířová I, Lemr K, et al. (2012) Liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for determination of five antidepressants and four atypical antipsychotics and their main metabolites in human serum. *J Chromatogr B*;907:101-107.
- [25] Ferrarini A, Huidobro AL, Pellati F, Barbas C. (2010) Development and validation of a HPLC method for the determination of sertraline and three non-chiral related impurities. *J Pharm Biomed Anal*;53:122-129.
- [26] Dwyer JT, Allison DB, Coates PM. (2005) Dietary supplements in weight reduction. *J Am Diet Assoc*;105:80-86.
- [27] Fennema OR, Damodaran S, Parkin KL. *Fennema's food chemistry*: CRC; 2008.
- [28] Fukuwatari T, Shibata K. (2008) Urinary water-soluble vitamins and their metabolite contents as nutritional markers for evaluating vitamin intakes in young Japanese women. *J. Nutr. Sci* ;54:223-229.
- [29] Tanumihardjo SA. (2011) Vitamin A: biomarkers of nutrition for development. *Am J Clin Nutr* ;94:658S-665S.
- [30] Wolf G. (2001) The discovery of the visual function of vitamin A. *J. Nutr*;131:1647-1650.
- [31] Alizadeh F, Bolhassani A, Khavari A, Bathaie SZ, Najji T, Bidgoli SA. (2014) Retinoids and their biological effects against cancer. *Int Immunopharmacol* ;18:43-49.

- [32] Underhill TM, Sampaio AV, Weston AD. Retinoid signalling and skeletal development. *The Molecular Basis of Skeletogenesis: Novartis Foundation Symposium* 232: Wiley Online Library; 2000. p. 171-188.
- [33] Xia Q, Yin JJ, Cherng S-H, Wamer WG, Boudreau M, Howard PC, et al. (2006) UVA photoirradiation of retinyl palmitate—formation of singlet oxygen and superoxide, and their role in induction of lipid peroxidation. *Toxicol Lett*;163:30-43.
- [34] Gundersen TE, Blomhoff R. (2001) Qualitative and quantitative liquid chromatographic determination of natural retinoids in biological samples. *J Chromatogr A*;935:13-43.
- [35] Brigelius-Flohe R, Traber MG. (1999) Vitamin E: function and metabolism. *The FASEB Journal*;13:1145-1155.
- [36] Beltrán G, Jiménez A, del Rio C, Sánchez S, Martínez L, Uceda M, et al. (2010) Variability of vitamin E in virgin olive oil by agronomical and genetic factors. *J. Food Comp. Anal* ;23:633-639.
- [37] Momenbeik F, Momeni Z, Khorasani J. (2005) Separation and determination of Vitamins E and A in multivitamin syrup using micellar liquid chromatography and simplex optimization. *J Pharm Biomed Anal*;37:383-387.
- [38] Khan A, Khan MI, Iqbal Z, Shah Y, Ahmad L, Watson DG. (2010) An optimized and validated RP-HPLC/UV detection method for simultaneous determination of all-trans-Retinol (Vitamin A) and α -Tocopherol (Vitamin E) in human serum: Comparison of different particulate reversed-phase HPLC columns. *J Chromatogr B*;878:2339-2347.
- [39] Chen L, Liu Z, Kang X, Gu Z. (2011) Determination of fat-soluble vitamins in food and pharmaceutical supplements using packed-fiber solid phase extraction (PFSPE) for sample preconcentration/clean-up. *Procedia Environmental Sciences*;8:588-595.
- [40] Santos J, Mendiola J, Oliveira M, Ibáñez E, Herrero M. (2012) Sequential determination of fat-and water-soluble vitamins in green leafy vegetables during storage. *J Chromatogr A*;1261:179-188.
- [41] Vinas P, Pastor-Belda M, Campillo N, Bravo-Bravo M, Hernández-Córdoba M. (2014) Capillary liquid chromatography combined with pressurized liquid extraction and

dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of vitamin E in cosmetic products. *J Pharm Biomed Anal*;94:173-179.

[42] Wong YF, Makahleh A, Saad B, Ibrahim MNM, Rahim AA, Brosse N. (2014) UPLC method for the determination of vitamin E homologues and derivatives in vegetable oils, margarines and supplement capsules using pentafluorophenyl column. *Talanta*;130:299-306.

[43] Skoog DA, West DM. *Principles of instrumental analysis*: Saunders College Philadelphia; 1980.

[44] Skoog W, West D. (1997) Holler. *Fundamentals of analytical Chemistry*.

[45] Willard HH, Merritt Jr LL, Dean JA, Settle Jr FA. (1988) *Instrumental methods of analysis*.

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

[47] Jeleń HH, Majcher M, Dziadas M. (2012) Microextraction techniques in the analysis of food flavor compounds: A review. *Anal Chim Acta*;738:13-26.

[48] Dadfarnia S, Shabani AMH. (2010) Recent development in liquid phase microextraction for determination of trace level concentration of metals—A review. *Anal Chim Acta*;658:107-119.

[49] Pena-Pereira F, Lavilla I, Bendicho C. (2010) Liquid-phase microextraction approaches combined with atomic detection: a critical review. *Anal Chim Acta*;669:1-16.

[50] Psillakis E, Kalogerakis N. (2003) Developments in liquid-phase microextraction. *TrAC, Trends Anal Chem*;22:565-574.

[51] Kocúrová L, Balogh IS, Šandrejová J, Andruch V. (2012) Recent advances in dispersive liquid–liquid microextraction using organic solvents lighter than water. A review. *Microchem J*;102:11-17.

[52] Ojeda CB, Rojas FS. (2009) Separation and preconcentration by dispersive liquid–liquid microextraction procedure: a review. *Chromatographia*;69:1149-1159.

[53] Dean JA. (1969) Chemical separation methods. Publisher, Van Nostrand Reinhold Co.

[54] Garcia-Lopez M, Rodriguez I, Cela R. (2007) Development of a dispersive liquid–liquid microextraction method for organophosphorus flame retardants and plasticizers determination in water samples. *J Chromatogr A*;1166:9-15.

[55] Farahani H, Norouzi P, Dinarvand R, Ganjali MR. (2007) Development of dispersive liquid–liquid microextraction combined with gas chromatography–mass spectrometry as a simple, rapid and highly sensitive method for the determination of phthalate esters in water samples. *J Chromatogr A*;1172:105-112.

[56] Andruch V, Burdel M, Kocúrová L, Šandrejová J, Balogh IS. (2013) Application of ultrasonic irradiation and vortex agitation in solvent microextraction. *TrAC, Trends Anal Chem*;49:1-19.

[57] Picó Y. (2013) Ultrasound-assisted extraction for food and environmental samples. *TrAC, Trends Anal Chem*;43:84-99.

[58] De Castro ML, Priego-Capote F. (2007) Ultrasound-assisted preparation of liquid samples. *Talanta*;72:321-334.

[59] Zanjani MRK, Yamini Y, Shariati S, Jönsson JÅ. (2007) A new liquid-phase microextraction method based on solidification of floating organic drop. *Anal Chim Acta*;585:286-293.

[60] Leong M-I, Huang S-D. (2008) Dispersive liquid–liquid microextraction method based on solidification of floating organic drop combined with gas chromatography with electron-capture or mass spectrometry detection. *J Chromatogr A*;1211:8-12.

[61] Xu H, Ding Z, Lv L, Song D, Feng Y-Q. (2009) A novel dispersive liquid–liquid microextraction based on solidification of floating organic droplet method for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous samples. *Anal Chim Acta*;636:28-33.

[62] Ma J, Zhang J, Du X, Lei X, Li J. (2010) Solidified floating organic drop microextraction for determination of trace amounts of zinc in water samples by flame atomic absorption spectrometry. *Microchimica Acta*;168:153-159.

- [63] Bidabadi MS, Dadfarnia S, Shabani AMH. (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.
- [64] Moradi M, Yamini Y, Esrafil A, Seidi S. (2010) Application of surfactant assisted dispersive liquid–liquid microextraction for sample preparation of chlorophenols in water samples. *Talanta*;82:1864-1869.
- [65] Wu Q, Chang Q, Wu C, Rao H, Zeng X, Wang C, et al. (2010) Ultrasound-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction for the determination of carbamate pesticides in water samples by high performance liquid chromatography. *J Chromatogr A*;1217:1773-1778.
- [66] Li Y, Wei G, Hu J, Liu X, Zhao X, Wang X. (2008) Dispersive liquid–liquid microextraction followed by reversed phase-high performance liquid chromatography for the determination of polybrominated diphenyl ethers at trace levels in landfill leachate and environmental water samples. *Anal Chim Acta*;615:96-103.
- [67] Hashemi P, Raeisi F, Ghiasvand AR, Rahimi A. (2010) Reversed-phase dispersive liquid–liquid microextraction with central composite design optimization for preconcentration and HPLC determination of oleuropein. *Talanta*;80:1926-1931.
- [68] Miller JN, Miller JC. *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*: Pearson Education; 2005.
- [69] Winer BJ, Brown DR, Michels KM. *Statistical principles in experimental design*: McGraw-Hill New York; 1971.
- [70] Box GE, Hunter JS, Hunter WG. *Statistics for experimenters: design, innovation, and discovery*: Wiley-Interscience New York; 2005.
- [71] Robbins H. Some aspects of the sequential design of experiments. *Herbert Robbins Selected Papers*: Springer; 1985. p. 169-177.
- [72] Kempthorne O. (1952) *The design and analysis of experiments*.
- [73] Sharif K, Rahman M, Azmir J, Mohamed A, Jahurul M, Sahena F, et al. (2014) Experimental design of supercritical fluid extraction—A review. *J Food Eng*;124:105-116.

- [74] Morgan E. Chemometrics: experimental design: John Wiley & Son Ltd; 1995.
- [75] Ferreira SLC, Bruns RE, da Silva EGP, dos Santos WNL, Quintella CM, David JM, et al. (2007) Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. *J Chromatogr A*;1158:2-14.
- [76] Lundstedt T, Seifert E, Abramo L, Thelin B, Nyström Å, Pettersen J, et al. (1998) Experimental design and optimization. *Chemometrics and intelligent laboratory systems*;42:3-40.
- [77] Araujo PW, Brereton RG. (1996) Experimental design I. Screening. *TrAC, Trends Anal Chem*;15:26-31.
- [78] Dejaegher B, Vander Heyden Y. (2011) Experimental designs and their recent advances in set-up, data interpretation, and analytical applications. *J Pharm Biomed Anal*;56:141-158.
- [79] Ahuja S, Ferreira G, Moreira A. (2004) Application of Plackett-Burman design and response surface methodology to achieve exponential growth for aggregated shipworm bacterium. *Biotechnol Bioeng*;85:666-675.
- [80] Myers RH, Montgomery DC, Anderson-Cook CM. *Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments*: John Wiley & Sons; 2016.
- [81] Ferreira SC, Bruns R, Ferreira H, Matos G, David J, Brandao G, et al. (2007) Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods. *Anal Chim Acta*;597:179-186.
- [82] Bezerra MA, Santelli RE, Oliveira EP, Villar LS, Escalreira LA. (2008) Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*;76:965-977.
- [83] Ryan TP, Morgan J. (2007) Modern experimental design. *Journal of Statistical Theory and Practice*;1:501-506.
- [84] Patel RB, Patel AB, Patel MR, Shankar MB, Bhatt KK. (2009) Estimation of alprazolam and sertraline in pure powder and tablet formulations by high-performance liquid chromatography and high-performance thin-layer chromatography. *Anal Lett*;42:1588-1602.

- [85] Ranjbari E, Hadjmohammadi MR. (2015) Optimization of magnetic stirring assisted dispersive liquid–liquid microextraction of rhodamine B and rhodamine 6G by response surface methodology: Application in water samples, soft drink, and cosmetic products. *Talanta*;139:216-225.
- [86] Draper NR, Smith H. *Applied regression analysis*: John Wiley & Sons; 2014.
- [87] 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.
- [88] Anderson RL. (1987) *Practical statistics for analytical chemists*.
- [89] Frost J. (2013) Multiple regression analysis: Use adjusted R-squared and predicted R-squared to include the correct number of variables. *Minitab Blog*.
- [90] Lewis PA. (1961) Distribution of the Anderson-Darling statistic. *The Annals of Mathematical Statistics*:1118-1124.
- [91] 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. *Int. J. Electrochem. Sci.* 8: 297-311.
- [92] Dolejšová J, Solich P, Polydorou CK, Koupparis M, Efstathiou C. (1999) Flow-injection fluorimetric determination of 1, 4-benzodiazepines in pharmaceutical formulations after acid hydrolysis. *J Pharm Biomed Anal*;20:357-362.
- [93] Lee HH, Lee JF, Lin SY, Lin YY, Wu CF, Wu MT, et al. (2013) Simultaneous quantification of urine flunitrazepam, nimetazepam and nitrazepam by using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Clin Chim Acta*;420:134-139.
- [94] Su H-L, Kao W-C, Lin K-W, Lee C-y, Hsieh Y-Z. (2010) 1-Butyl-3-methylimidazolium-based ionic liquids and an anionic surfactant: Excellent background electrolyte modifiers for the analysis of benzodiazepines through capillary electrophoresis. *J Chromatogr A*;1217:2973-2979.

- [95] Morini L, Vignali C, Polla M, Sponta A, Groppi A. (2012) Comparison of extraction procedures for benzodiazepines determination in hair by LC–MS/MS. *Forensic science international*;218:53-56.
- [96] Sauve E, Langødegård M, Ekeberg D, Øiestad ÅM. (2012) Determination of benzodiazepines in ante-mortem and post-mortem whole blood by solid-supported liquid–liquid extraction and UPLC–MS/MS. *J Chromatogr B*;883:177-188.
- [97] Juřica J, Dostálek M, Konečný J, Glatz Z, Hadařová E, Tomandl J. (2007) HPLC determination of midazolam and its three hydroxy metabolites in perfusion medium and plasma from rats. *J Chromatogr B*;852:571-577.
- [98] Gaujac A, Emídio ES, Navickiene S, Ferreira SLC, Dórea HS. (2008) Multivariate optimization of a solid phase microextraction-headspace procedure for the determination of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes in effluent samples from a waste treatment plant. *J Chromatogr A*;1203:99-104.
- [99] Khajeh M, Zadeh FM. (2012) Response surface modeling of ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction for determination of benzene, toluene and xylenes in water samples: Box–Behnken design. *Bull Environ Contam toxic* ;89:38-43.
- [100] Mercolini L, Mandrioli R, Iannello C, Matrisciano F, Nicoletti F, Raggi MA. (2009) Simultaneous analysis of diazepam and its metabolites in rat plasma and brain tissue by HPLC-UV and SPE. *Talanta*;80:279-285.
- [101] Fernández P, González C, Pena MT, Carro AM, Lorenzo RA. (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.
- [102] Halvorsen TG, Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE. (2001) Liquid-phase microextraction and capillary electrophoresis of citalopram, an antidepressant drug. *J Chromatogr A*;909:87-93.
- [103] Huang S-W, Hsieh M-M, Chang SY. (2012) Sensitive determination of sertraline by capillary electrophoresis with dispersive liquid–liquid microextraction and field-amplified sample stacking. *Talanta*;101:460-464.

[104] Andrés V, Villanueva MJ, Tenorio MD. (2014) Simultaneous determination of tocopherols, retinol, ester derivatives and β -carotene in milk-and soy-juice based beverages by HPLC with diode-array detection. *LWT-Food Science and Technology*;58:557-562.

[105] Mata-Granados J, De Castro ML, Quesada J. (2004) Fully automated method for the determination of 24, 25 (OH) 2 and 25 (OH) D 3 hydroxyvitamins, and Vitamins A and E in human serum by HPLC. *J Pharm Biomed Anal*;35:575-582.

Abstract

In the first section of this thesis, a simple, sensitive and rapid microextraction method namely ultrasound-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction based on the solidification of floating organic droplet method coupled with high performance liquid chromatography was developed for the simultaneous preconcentration and determination of nitrazepam and midazolam in real samples. The significant parameters affecting the extraction efficiency were considered using a Plackett-Burman design as a screening method. In order to obtain the optimum conditions with consideration of the selected significant variables, a Box-Behnken design was used. So, the microextraction procedure was performed using 29.1 μL of 1-undecanol, 1.36% (w/v) of NaCl, 10.0 μL of SDS ($25.0 \mu\text{g mL}^{-1}$) and 1.0 μL of Tween80 ($25.0 \mu\text{g mL}^{-1}$) as an emulsifier in extraction time of 20.0 min at pH 7.88. In order to investigate the validation of the developed method, some validation parameters including the linear dynamic range, repeatability, limit of detection and recovery were studied under the optimum conditions. The detection limits of the method were 0.017 and 0.086 ng mL^{-1} for nitrazepam and midazolam, respectively. The extraction recovery for the drugs studied were in the range of 98.0-108.1% with RSD range of 1.0-3.8%. The proposed methodology was successfully applied for the determination of these drugs in a number of human serum, tablet in injectable samples.

In the second section of this thesis, a novel coupling of ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic droplets (UADLLME-SFODs) with high performance liquid chromatography (HPLC) was developed for the simultaneous pre-concentration and determination of citalopram (CIT), diazepam (DIZ), and sertraline (SER) in the human serum, urine and tablet samples. In this proposed procedure, 1-undecanol and ethanol were used as the extraction and disperser solvents, respectively. Several parameters affecting the extraction efficiency were investigated by a Plackett-Burman factorial design as a screening design. The variables showing significant effects on the analytical response were pH and volume of the extraction solvent; they were optimized using central composite face centered design (CCFD). For validation of the technique, its accuracy, precision, limit of detection, linearity, and sensitivity were evaluated. limits of quantification (LOQ) of the method were 1.3, 2.7, and 1.2 ng mL^{-1} for CIT, DIZ, and SER, respectively. Extraction recovery

percentages for all the above-mentioned drugs were above 85.0 with acceptable relative standard deviations. The proposed methodology was successfully applied to the determination of these drugs in the human serum, urine and tablet samples.

In the third section, a new approach based on ultrasound assisted-reverse phase-dispersive liquid liquid microextraction technique is developed for the extraction and determination of vitamin A and vitamin E from oil matrices before a high performance liquid chromatography analysis. A methodology based on the full factorial design is carried out for choosing the significant parameters. Then the significant factors affecting the extraction efficiency including pH, volume of extraction solvent, and volume of disperser solvent are optimized using the Box-Behnken design. After analyzing the results obtained, the optimum conditions were: pH 4.5, 80-20 μL of the ethanol-water solvent mixture as extraction solvent, 110 μL of 1, 4- dioxane as the disperser solvent, and a sonication time of 10 min. For validation of the developed method, the linear dynamic range, repeatability, limit of detection, and recoveries were obtained under the optimum conditions. The detection limits of the method were 1.6 and 2.3 ng mL^{-1} for vitamin A and vitamin E, respectively. The extraction recovery percentages for the studied drugs were above 91%, with acceptable RSD. The proposed methodology was successfully applied for the determination of the vitamins in different oil samples.

Finally, application of a new free organic solvent-reverse phase-dispersive liquid-liquid microextraction (FOS-RP-DLLME) procedure is developed for the pre-concentration and quantification of vitamin A and vitamin E in various vegetable oil samples. This microextraction method is based upon transferring the analytes from the oil matrix into the surfactant-rich phase, and therefore, organic solvents are not used in this procedure. The variables of interest in the FOS-RP-DLLME method are optimized using the chemometrics approaches. Firstly, in the screening experiments, the full factorial design (FFD) is used for selection of the variables that significantly affect the variables significantly affecting the extraction procedure. Then the selected significant variables are optimized using the response surface methodology (RSM) based on the central composite design (CCD). Under the optimum conditions, the linear ranges were 3.1-3.0 $\times 10^3$ and 2.3-2.0 $\times 10^3$ ng mL^{-1} for vitamin A and vitamin E, respectively. The relative standard deviations (RSDs) were in the range of 0.77-4.71% and 0.61-4.37% for vitamin

A and vitamin E, respectively. The relative recoveries of these vitamins from different oil samples were above 98.3%.

Keywords: dispersive liquid liquid microextraction, liquid microextraction based on solidified organic droplets, surfactant, ultrasound irradiations, experimental design



Shahrood University of Technology

Faculty of chemistry

PhD Dissertation in analytical chemistry

**Application of modified dispersive liquid liquid
microextraction and optimization techniques for
determination of some drug compounds using high
performance liquid chromatography**

By: Sahar Farsi Madan

Supervisors:

Dr. Nasser Goudarzi

Dr. Mansour Arab Chamjangali

Advisore:

Dr. Ghadamali Bagherian