

به نأخذوا بحبله  
بالحق من بيان



دانشکده شیمی

گروه شیمی تجزیه

پایان نامه کارشناسی ارشد

جداسازی و اندازه گیری تیکلوپیدین و لوزارتان با استفاده از روش میکرواستخراج فیبر

توخالی و جفت شده با کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

منیره شمس

استاد راهنما:

دکتر ناصر گودرزی

استاد مشاور:

دکتر قدمعلی باقریان دهقی

شهریور ماه ۱۳۹۴

ب

بارها! تو نزدیک ترین خوانده شده و سریع ترین اجابت کننده هستی. گرامی ترین بخشنده و وسعت بخش ترین بخشاننده و شنواترین شنونده. ای که در دنیا و آخرت رحمان و رحیمی. بماندی نذاری تا از او سوال شود و غیر از تو کسی نیست تا به او امید بسته شود.

خدایا! من در عین بی نیازی نیازمندم، چگونه در نیازمندی ام بی نیاز باشم؟!

ای! من در دانایم، نادان، هستم، پس چگونه در عین جهالم نادان باشم؟!

ماحصل آموخته هایم را اگر شایسته تقدیم باشد:

### تقدیم به پدر و مادر عزیزتر از جانم

و به تمام آزاد مردانی که نیک می اندیشند و عقل و منطق را پیشه خود نموده و جز رضای الهی و پیشرفت و سعادت جامعه، مدنی ندارند. دانشمندان، بزرگان، و جوانمردانی که جان و مال خود را در حفظ و اعتلای این مرز و بوم فدا نموده و مینمایند.

## تقدیر و تشکر

سپاس و ستایش مرخدای راجل و جلاله که آثار قدرت او بر چهره روز روشن، تابان است و انوار حکمت او در دل شب تار، درخشان. آفریدگاری که خویش را به ما شناساند و درهای علم را بر ما گشود و عمری و فرصتی عطا فرمود تا بدان، بنده ضعیف خویش را در طریق علم و معرفت یازماید.

اکنون در آستانه راهی نو به پاس نعمت بی حد پروردگار، بر خود لازم می دانم سپاس گزار تمام عزیزانی باشم که در این مسیر که راه گشای راهم بودند. از استاد فریخته و فرزانه جناب آقای دکتر ناصر کوردزی که راهم را به این راهی های ارزنده و صبر و حوصله فراوان ایشان، بهواره راه گشای من در تمام و اکمال پایان نامه بوده است، صمیمانه تشکر می نمایم. از استاد بزرگوارم جناب آقای دکتر قد معلی باقریان دهمی که زحمت مشاوره این پروژه را بر عهده داشتند و جناب آقای دکتر منصور عرب چم خنجی برای مساعدت این عزیزان در طول انجام این تحقیق و دوران تحصیل در دانشگاه شاهرود ساکن سازی می نمایم. از خانم دکتر مصدر الامور عزیز که زحمت داوری این پروژه را بر عهده گرفتند تشکر و قدر دانی می نمایم.

اکنون پس از گذشت هفت سال تحصیل در دانشگاه شاهرود و کسب فیض از محضر اساتید محترم گروه شیمی، به پاس تمام زحماتشان سر تعظیم فرود آورده و برایشان از درگاه خدای متعال، بهترین ها را آرزو مندم.

از تمامی دوستان، هم کلاسی های خوبم و دانشجویان دکتری به ویژه از زحمات دوست نازنین خانم سحر فارسی مدان به پاس تمام تلاش ها و مساعدتشان و برای خاطرات خوبی که در ذهنم به یادگار گذاشتند و تمامی کارکنان گروه شیمی ساکن زارم.

در پایان از پدر بزرگوارم که اسطوره ای فدakar است، مادر مهربام که تعبیر واژه صبر و آرامش است، برادر و خواهر عزیزم محمد و فاطمه که در تمامی مراحل، مشوق من بوده اند کمال تشکر و قدر دانی را دارم.

مسیری که بدون یاری های شایسته سرانجام نمی رسید.

## تعهد نامه

اینجانب منیره شمس دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته شیمی تجزیه دانشکده شیمی دانشگاه شاهرود نویسنده پایان نامه جداسازی و اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان با استفاده از روش میکرواستخراج فیبر توخالی و جفت شده با کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا تحت راهنمایی جناب آقای دکتر ناصر گودرزی متعهد می‌شوم.

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

تاریخ

امضای دانشجو

### مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج ، کتاب ، برنامه‌های رایانه‌ای ، نرم افزارها و تجهیزات ساخته شده است ) متعلق به دانشگاه شاهرود می‌باشد. این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود.
- استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی‌باشد.

## چکیده

در این مطالعه، یک روش پیش‌تغلیظ ساده و کارآمد با استفاده از سیستم دو فاز میکر و استخراج فاز مایع فیبر توخالی برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری هم‌زمان مقادیر کم تیکلوپیدین و لوزارتان با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا با آشکار ساز ماوراء بنفش ارائه شد. از حلال ۱- اکتانول با فراریت پایین برای جلوگیری از تبخیر شدن، گرانیوی کم برای اطمینان از انتقال جرم سریع، قطبیت پایین به منظور سازگاری با فیبر توخالی و جلوگیری از نشست به داخل نمونه، به عنوان حلال استخراج استفاده شد. بعضی از پارامترها مانند pH، زمان استخراج، سرعت به هم زدن، طول فیبر و اثر نمک که بر روی بازده استخراج مؤثرند با روش طراحی آزمایش بهینه شدند. تحت شرایط بهینه، منحنی کالیبراسیون در محدوده ۶/۰-۰/۰۰۴ میلی‌گرم بر لیتر برای تیکلوپیدین و در محدوده ۵/۵-۰/۰۰۳ میلی‌گرم بر لیتر برای لوزارتان خطی بوده، همچنین حد تشخیص ۱/۲ میکروگرم بر لیتر برای تیکلوپیدین و ۱/۱ میکروگرم بر لیتر برای لوزارتان، فاکتور پیش‌تغلیظ ۲۷۲ برای تیکلوپیدین و ۱۷۶ برای لوزارتان به دست آمد. همچنین انحراف استاندارد نسبی برای سه اندازه‌گیری تکراری در غلظت‌های ۰/۱ و ۱/۰ و ۴/۰ میلی‌گرم بر لیتر به ترتیب ۳/۵۶ و ۳/۹۵ و ۱/۷ برای تیکلوپیدین و ۳/۰۶ و ۳/۴۸ و ۱/۸۹ برای لوزارتان بدست آمد.

**کلمات کلیدی:** تیکلوپیدین، لوزارتان، میکرواستخراج فاز مایع بر اساس سیستم دو فاز میکر

توخالی، طراحی آزمایش

## فهرست مطالب

صفحه	عنوان
۱	۱- فصل اول .....
۲	۱-۱- داروهای ضد تشکیل لخته .....
۲	۱-۱-۱- تیکلوپیدین .....
۳	۲-۱- عوامل ضد فشار خون .....
۴	۱-۲-۱- لوزارتان .....
۵	۳-۱- اهمیت اندازه‌گیری داروهای تیکلوپیدین و لوزارتان .....
۶	۴-۱- روش‌های اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان .....
۷	۵-۱- مروری بر کارهای انجام شده .....
۱۱	۲- فصل دوم: .....
۱۲	۱-۲- مقدمه ای بر کروماتوگرافی .....
۱۳	۱-۱-۲- کروماتوگرافی مایع بر اساس انواع فاز ساکن: .....
۱۳	۲-۱-۲- کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا .....
۱۴	۳-۱-۲- کروماتوگرافی تقسیمی .....
۱۵	۴-۱-۲- اجزاء سازنده کروماتوگرافی مایع .....
۱۶	۲-۲- مقدمه ای بر روش‌های آماده سازی نمونه .....
۱۷	۱-۲-۲- اهداف آماده سازی نمونه .....

- ۱۷.....۲-۲-۲- روش‌های آماده سازی نمونه
- ۱۹.....۳-۲-۲- روش‌های میکرواستخراج
- ۲۱.....۳-۲-۳- میکرواستخراج فاز مایع با فیبر توخالی
- ۲۱.....۱-۳-۲- انواع روش‌های میکرواستخراج مایع با فیبر توخالی
- ۲۳.....۲-۳-۲- حالت استخراج ایستا و پویا
- ۲۴.....۳-۳-۲- سیستم میکرواستخراج با فیبر توخالی
- ۲۵.....۴-۳-۲- اصول تئوری در سیستم دو فازی HF-LPME
- ۲۸.....۵-۳-۲- فاکتورهای موثر بر روش دو فازی HF-LPME
- ۲۸.....۶-۳-۲- مزایای روش میکرواستخراج با فیبر توخالی
- ۲۹.....۷-۳-۲- کاربردها و سازگاری روش با فنون مختلف دستگامی
- ۲۹.....۴-۲- روش‌های بهینه‌سازی فاکتورها
- ۳۰.....۱-۴-۲- روش تک عاملی (تک متغیری)
- ۳۱.....۲-۴-۲- طرح آزمایش (طراحی آماری)
- ۳۱.....۳-۴-۲- رهیافت آزمایش تجربی و کاربرد طراحی آزمایش
- ۳۴.....۴-۴-۲- تنظیم شرایط طراحی آزمایش
- ۳۵.....۵-۴-۲- معرفی و مقدمات اولیه روش رویه پاسخ
- ۳۶.....۱-۵-۴-۲- فرایند طراحی در روش RSM
- ۳۶.....۶-۴-۲- طرح پلاکت- برمن

- ۳۷ ..... ۲-۴-۷- طراحی باکس بنکن
- ۳۹ ..... ۳- بخش تجربی
- ۴۰ ..... ۳-۱- مقدمه
- ۴۰ ..... ۳-۲- محلول‌های مورد استفاده و طرز تهیه آنها
- ۴۲ ..... ۳-۲-۱- دستگاه‌ها و نرم‌افزارها
- ۴۳ ..... ۳-۲-۲- طیف جذبی
- ۴۴ ..... ۳-۲-۳- شرایط کروماتوگرافی و تهیه فاز متحرک
- ۴۵ ..... ۳-۳- روش کار در بهینه‌سازی پارامترهای مؤثر بر اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان
- ۳-۳-۱- بررسی و بهینه‌سازی پارامترهای مؤثر بر استخراج تیکلوپیدین و لوزارتان به روش HF-LPME
- ۴۹ ..... ۳-۳-۲- نتایج حاصل از بهینه‌سازی یک متغیر در یک زمان
- ۴-۳- بررسی عوامل تأثیرگذار و بهینه‌سازی عوامل مؤثر بر اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان با استفاده از طراحی آزمایش (DOE)
- ۵۱ ..... ۳-۴-۱- تعیین سطح فاکتورها
- ۵۲ ..... ۳-۴-۱-۱- اجرای طرح پلاکت- برمن
- ۵۴ ..... ۳-۴-۱-۲- ارزیابی نتایج حاصل از طرح پلاکت برمن
- ۵۸ ..... ۳-۴-۱-۳- تحلیل واریانس
- ۲-۴-۳- بهینه‌سازی فاکتورهای مؤثر بر پیش‌تعلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان
- ۶۳ .....

- ۶۳ ..... ۱-۲-۴-۳-۳ اجرای طرح باکس- بنکن (BBD)
- ۶۹ ..... ۲-۲-۴-۳-۳ ارزیابی مدل
- ۷۰ ..... ۳-۲-۴-۳-۳ الف- تحلیل واریانس
- ۷۱ ..... ۴-۲-۴-۳-۳ ب- بررسی باقیمانده‌ها
- ۷۸ ..... ۵-۲-۴-۳-۳ نمودارهای روبه پاسخ
- ۸۲ ..... ۶-۲-۴-۳-۳ سطح بهینه فاکتورهای مؤثر
- ۸۳ ..... ۳-۴-۳-۳-۳ توجیه فاکتورهای مؤثر بر پیش تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان
- ۸۳ ..... ۱-۳-۴-۳-۳ بررسی اثر نوع حلال استخراج کننده
- ۸۴ ..... ۲-۳-۴-۳-۳ بررسی اثر pH فاز آبی بر میزان استخراج
- ۸۶ ..... ۳-۳-۴-۳-۳ بررسی اثر نوع بافر
- ۸۶ ..... ۴-۳-۴-۳-۳ بررسی اثر حجم بافر
- ۸۷ ..... ۵-۳-۴-۳-۳ بررسی اثر نمک
- ۸۸ ..... ۶-۳-۴-۳-۳ بررسی اثر سرعت چرخش همزن
- ۸۸ ..... ۷-۳-۴-۳-۳ بررسی اثر طول فیبر
- ۸۹ ..... ۸-۳-۴-۳-۳ بررسی اثر زمان استخراج
- ۹۱ ..... ۵-۳-۵-۳-۳ رسم منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ
- ۹۱ ..... ۱-۵-۳-۵-۳ رسم منحنی پیش تغلیظ تیکلوپیدین
- ۹۳ ..... ۲-۵-۳-۵-۳ رسم منحنی پیش تغلیظ لوزارتان

- ۹۵ ..... ۳-۶- بررسی اثر مزاحمت
- ۹۶ ..... ۳-۷- ارقام شایستگی اندازه گیری تیکلوپیدین و لوزارتان
- ۹۷ ..... ۳-۷-۱- دقت و صحت روش
- ۹۹ ..... ۳-۸- محاسبه فاکتور پیش تغلیظ و درصد بازیابی
- ۱۰۰ ..... ۳-۹- اندازه گیری تیکلوپیدین و لوزارتان در نمونه‌های حقیقی
- ۱۰۷ ..... ۴- فصل چهارم:
- ۱۰۸ ..... ۴-۱- ارقام شایستگی روش
- ۱۰۸ ..... ۴-۲- مقایسه روش پیشنهادی با برخی روش‌های موجود
- ۱۱۰ ..... ۴-۳- نتیجه‌گیری
- ۱۱۱ ..... ۴-۴- آینده‌نگری

## فهرست شکل‌ها

عنوان	صفحه
شکل ۱-۱: ساختار تیکلوپیدین .....	۳
شکل ۲-۱: ساختار داروی لوزارتان .....	۴
شکل ۱-۲: الف) سیستم دوفازی میکرواستخراج فاز مایع با فیبر توخالی ب) سیستم سه فازی میکرواستخراج فاز مایع با فیبر توخالی .....	۲۲
شکل ۲-۲: میکرواستخراج فیبر توخالی پویا .....	۲۴
شکل ۳-۲: سیستم مورد استفاده در شکل الف) سیستم لاشکل و ب) سیستم میله‌ای شکل .....	۲۵
شکل ۴-۲: مدل عمومی یک فرایند .....	۳۲
شکل ۵-۲: طرح آزمایشی در روش باکس بنکن .....	۳۸
شکل ۱-۳: طیف جذبی تیکلوپیدین و لوزارتان .....	۴۴
شکل ۲-۳: کروماتوگرام محلول استاندارد ۱۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر تیکلوپیدین و لوزارتان .....	۴۷
شکل ۳-۳: منحنی کالیبراسیون مستقیم تیکلوپیدین .....	۴۸
شکل ۴-۳: منحنی کالیبراسیون مستقیم لوزارتان .....	۴۹
شکل ۵-۳: نمودار پرتو اثر فاکتورها بر پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان .....	۵۷
شکل ۶-۳: نمودار احتمال نرمال برای پاسخ اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان در مرحله طراحی پلاکت برمن .....	۶۲
شکل ۷-۳: نمودار احتمال نرمال برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان با روش HF-LPME در طراحی باکس- بنکن مربوط به پاسخ تیکلوپیدین .....	۷۳
شکل ۸-۳: نمودار احتمال نرمال برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان با روش HF-LPME در طراحی باکس- بنکن مربوط به پاسخ لوزارتان .....	۷۳
شکل ۹-۳: نمودار باقیمانده در مقابل مقدار برآزش شده برای استخراج تیکلوپیدین و لوزارتان	

در طراحی باکس-بنکن مربوط به پاسخ تیکلوپیدین ..... ۷۵

شکل ۳-۱۰: نمودار باقیمانده در مقابل مقدار برازش شده برای استخراج تیکلوپیدین و لوزارتان

در طراحی باکس-بنکن مربوط به پاسخ لوزارتان ..... ۷۵

شکل ۳-۱۱: نمودار باقیمانده در برابر ترتیب زمانی برای پیش تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان با روش HF-LPME در طراحی باکس- بنکن مربوط به پاسخ تیکلوپیدین ..... ۷۷

شکل ۳-۱۲: نمودار باقیمانده در برابر ترتیب زمانی برای پیش تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان با روش HF-LPME در طراحی باکس- بنکن مربوط به پاسخ لوزارتان ..... ۷۷

شکل ۳-۱۳: منحنی رویه پاسخ پیش تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان در مقابل طول فیبر (B) و pH (A) برای پاسخ تیکلوپیدین ..... ۷۸

شکل ۳-۱۴: منحنی رویه پاسخ پیش تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان در مقابل طول فیبر (B) و pH (A) برای پاسخ لوزارتان ..... ۷۹

شکل ۳-۱۵: منحنی رویه پاسخ پیش تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان در مقابل pH محلول نمونه (A) و زمان استخراج (C) برای پاسخ تیکلوپیدین ..... ۸۰

شکل ۳-۱۶: منحنی رویه پاسخ پیش تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان در مقابل pH محلول نمونه (A) و زمان استخراج (C) برای پاسخ لوزارتان ..... ۸۰

شکل ۳-۱۷: منحنی رویه پاسخ پیش تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان در مقابل زمان استخراج و طول فیبر برای پاسخ تیکلوپیدین ..... ۸۱

شکل ۳-۱۸: منحنی رویه پاسخ پیش تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان در مقابل زمان استخراج و طول فیبر برای پاسخ لوزارتان ..... ۸۲

شکل ۳-۱۹: کروماتوگرام مربوط به استخراج در غلظت ۱/۰ میلی گرم بر لیتر تیکلو پیدین و لوزارتان در شرایط بهینه حاصل از طراحی آزمایش. طول موج اندازه‌گیری ۲۱۸ نانومتر ..... ۹۱

- شکل ۳-۲۰: منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ تیکلوپیدین ..... ۹۳
- شکل ۳-۲۱: منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ لوزارتان ..... ۹۴
- شکل ۳-۲۲: نمونه قرص تیکلوپیدین بدون افزایش آنالیت ..... ۱۰۵
- شکل ۳-۲۳: نمونه قرص تیکلوپیدین پس از افزایش ۲/۰ میلی گرم بر لیتر از هر دو دارو ..... ۱۰۵
- شکل ۳-۲۴: کروماتوگرام مربوط به نمونه سرم در غلظت ۱/۰ میلی گرم بر لیتر برای هر دو دارو ..... ۱۰۵
- شکل ۳-۲۵: کروماتوگرام نمونه ادرار فرد بیمار بدون افزایش آنالیت ..... ۱۰۶
- شکل ۳-۲۶: کروماتوگرام مربوط به نمونه ادرار فرد بیمار پس از افزایش ۲/۰ میلی گرم بر لیتر از دو دارو، ..... ۱۰۶

## فهرست جدول‌ها

عنوان	صفحه
جدول ۱-۳: مواد شیمیایی مورد استفاده .....	۴۱
جدول ۲-۳: سیگنال‌های مستقیم بدست آمده برای محلول‌های تیکلوپیدین با غلظت‌های متفاوت .....	۴۷
جدول ۳-۳: سیگنال‌های مستقیم بدست آمده برای محلول‌های لوزارتان با غلظت‌های متفاوت .....	۴۸
جدول ۴-۳: نتایج حاصل از بهینه‌سازی یک متغیر در یک زمان برای اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان .....	۵۱
جدول ۵-۳: فاکتورها و سطوح تعیین شده برای آن‌ها .....	۵۲
جدول ۶-۳: ماتریس طرح پلاکت برمن و پاسخ‌ها در استخراج تیکلوپیدین و لوزارتان با روش HF-LPME .....	۵۴
جدول ۷-۳: نتایج حاصل از آنالیز مدل خطی طرح پلاکت-برمن در استخراج تیکلوپیدین و لوزارتان .....	۵۵
جدول ۸-۳: جدول آنالیز واریانس طرح پلاکت برمن .....	۵۸
جدول ۹-۳: سطح فاکتورهای مؤثر بر طرح عاملی باکس - بنکن .....	۶۳
جدول ۱۰-۳: ماتریس طرح باکس - بنکن برای تیکلوپیدین و لوزارتان در استخراج با روش HF-LPME .....	۶۵
جدول ۱۱-۳: پارامترهای آماری برای طرح عامل باکس - بنکن برای تیکلوپیدین .....	۶۶
جدول ۱۲-۳: پارامترهای آماری برای طرح عامل باکس - بنکن برای لوزارتان .....	۶۷
جدول ۱۳-۳: آنالیز واریانس طرح عاملی پیشنهادی برای پاسخ تیکلوپیدین در استخراج	

- تیکلوپیدین و لوزارتان با روش HF-LPME ..... ۷۰
- جدول ۱۴-۳: آنالیز واریانس طرح عاملی پیشنهادی برای پاسخ لوزارتان در استخراج تیکلوپیدین
- و لوزارتان با روش HF-LPME ..... ۷۰
- جدول ۱۵-۳: مقادیر بهینه در طراحی فاکتوریل ..... ۸۳
- جدول ۱۶-۳: شرایط بهینه نهایی سیستم برای اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان ..... ۹۰
- جدول ۱۷-۳: سیگنال‌های تجزیه‌ای بدست آمده برای غلظت‌های متفاوت از تیکلوپیدین ..... ۹۲
- جدول ۱۸-۳: سیگنال‌های تجزیه‌ای بدست آمده برای غلظت‌های متفاوت از لوزارتان ..... ۹۴
- جدول ۱۹-۳: نتایج حاصل از بررسی اثر گونه‌های مزاحم در اندازه‌گیری تیکلوپیدین با غلظت ۱/۰ میلی‌گرم بر لیتر ..... ۹۶
- جدول ۲۰-۳: نتایج حاصل از بررسی اثر گونه‌های مزاحم در اندازه‌گیری لوزارتان با غلظت ۱/۰ میلی‌گرم بر لیتر ..... ۹۶
- جدول ۲۱-۳: نتایج حاصل از دقت و صحت روش برای تیکلوپیدین ..... ۹۸
- جدول ۲۲-۳: نتایج حاصل از دقت و صحت روش برای لوزارتان ..... ۹۸
- جدول ۲۳-۳: نتایج محاسبه درصد بازیابی تیکلوپیدین و لوزارتان ..... ۱۰۰
- جدول ۲۴-۳: نتایج نمونه‌های حقیقی برای تیکلوپیدین و لوزارتان در استخراج به روش HF-LPME ..... ۱۰۴
- جدول ۱-۴: مقایسه روش پیشنهادی با برخی روش‌های گزارش شده برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان ..... ۱۰۹

# فصل اول

## مقدمه

## ۱-۱- داروهای ضد تشکیل لخته

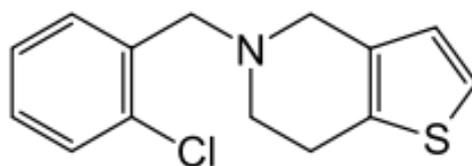
عوامل ضد تشکیل لخته موادی هستند که از تشکیل لخته‌ی خون جلوگیری می‌کنند. به طور کلی دو نوع مختلف از لخته وجود دارد که شامل لخته‌های سیاهرگی و لخته‌های سرخرگی می‌باشد. اولین مورد که لخته قرمز نام دارد، بسیار شبیه به آن چیزی است که در خارج از بدن تشکیل گردیده و دارای یک شبکه فیبرینی است که اجزای متشکله خون را به دام می‌اندازد. نوع دوم لخته سفید نام دارد که عمدتاً از پلاکت‌ها تشکیل شده است. همه اشکال بسته شدن رگ‌ها و ایجاد لخته وریدی از لخته‌های قرمز ناشی می‌شود. بسته شدن رگ‌ها در اثر ایجاد لخته احتمالاً شایع‌ترین مورد بیماری در افراد میان سال در اغلب کشورهای متمدن می‌باشد. بطور کلی داروهای ضد لخته را می‌توان به دو گروه مهارکننده‌های تجمع پلاکتی و داروهای ضد انعقاد تقسیم کرد که تیکلوپیدین<sup>۱</sup> از داروهای مهارکننده‌ی تجمع پلاکتی به شمار می‌رود [۱].

### ۱-۱-۱- تیکلوپیدین

داروی تیکلوپیدین هیدروکلراید اولین ترکیب از گروه داروهای آنتی‌پلاکت تینوپیریدین است [۲] که دارای نام آیوپاک ۴ - [ ( ۲ - کلرو فنیل ) متیل ] - ۴ و ۵ و ۶ و ۷ - تتراهیدرو تیئو - [ ۳ ] و ۲ - [ - پیریدین، می‌باشد [۳]. نام تجاری آن Ticlid و دارای فرمول بسته  $C_{14}H_{14}ClNS$  و وزن مولکولی ۲۵۰/۳۰۰ گرم بر مول می‌باشد [۴]. شکل (۱-۱)، ساختار تیکلوپیدین را که یک داروی ضد انعقاد قوی با اثر بخشی طولانی می‌باشد، نشان می‌دهد [۵].

---

۱- Ticlopidine



شکل ۱-۱: ساختار تیکلوپیدین [۵]

مطالعات فارماکولوژی نشان داده‌اند که داروی تیکلوپیدین مهارکننده قوی آدنوزین دی‌فسفات، کلاژن و آدرنالین می‌باشد که این ویژگی سبب کاهش فرایند انعقاد خون شده و در درمان ترومبوز (ایجاد شدن لخته در سیستم گردش خون) شریانی حاد و هم‌چنین در پیشگیری از حمله قلبی در بیماران با ریسک بالا استفاده می‌شود [۶]. هم‌چنین مشخص شده‌است که تیکلوپیدین نسبت به داروی آسپرین که دارای اثرات جانبی گوناگونی می‌باشد ارجعیت دارد [۷]. مقالات متعددی قرص تیکلوپیدین را به عنوان یک جایگزین ارزشمند در زمانی که بیمار نمی‌تواند از آسپرین استفاده کند، توصیه می‌کنند. داروی تیکلوپیدین به سرعت از طریق سیستم گوارش جذب شده و در کبد متابولیزه می‌شود. هم‌چنین گزارش شده است که قرص تیکلوپیدین به طور قابل توجهی باعث مهار چند داروی متابولیزه شده توسط سیستم آنزیم CYP (سیتوکروم P) کبدی می‌شود [۷].

## ۱-۲- عوامل ضد فشار خون

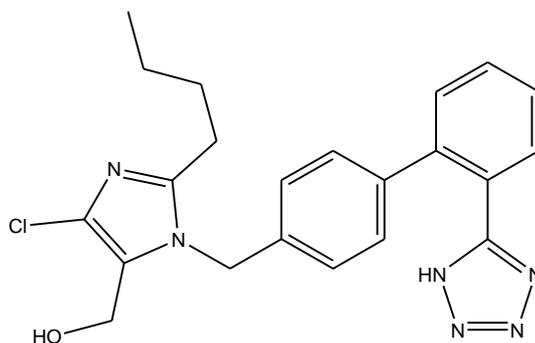
عوامل ضد فشار خون داروهایی هستند که در فشار بالای خون - حالتی که در آن فشار سیستولی متجاوز از ۱۶۰ میلی‌متر جیوه یا فشار دیاستولی بیش از ۹۵ میلی‌متر جیوه است، به کار می‌روند. دو نوع عمده‌ی فشار خون بالا وجود دارد که می‌توان به فشار خون بالای ذاتی یا اولیه و فشار خون بالای ثانویه اشاره نمود. فشار خون بالای ذاتی ۱۰ درصد از جمعیت جهان را تحت تاثیر قرار داده و تقریباً ۸۰ درصد از کل فشار خون‌های بالا را در بر می‌گیرد. در حدود ۶۰ درصد از بیمارانی که فشار خون بالا دارند، یک یا چند بیماری قلبی عروقی عمده نظیر نارسایی احتقانی قلب، سکته،

بیماری کرونری قلب و نارسایی پیشرونده‌ی کلیوی بروز می‌نماید. معمولاً زنان بیشتر از مردان در معرض فشار خون بالای ذاتی هستند. این بیماری با فشار بالای دیاستول مشخص شده و می‌تواند دارای دو مسیر خوش خیم (تدریجی) و بد خیم (سریع) باشد. این عارضه را می‌توان تا حدودی با نگهداری بدن در حد تعادل؛ محدود کردن نمک در رژیم غذایی، تعدیل در مصرف الکل، اصلاح مصرف چربی در غذا، پرهیز از تنباکو، ورزش و تغییرات رفتاری کنترل نمود [۱].

فشار خون بالای ثانویه از عوامل شناخته شده ای ناشی می‌شود. و آن را می‌توان به چهار شکل مختلف کلیوی، عصبی، ناشی از غدد درون ریز و قلبی عروقی تقسیم‌بندی نمود.

### ۱-۲-۱- لوزارتان<sup>۱</sup>

لوزارتان یک آنتاگونیست گیرنده آنژیوتانسین II (نوع AT<sub>1</sub>) و یک مولکول غیرپپتیدی با نام تجاری Cozaar با وزن مولکولی ۴۲۲/۹۱ و فرمول تجربی C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>ClN<sub>6</sub>O می‌باشد. این دارو دارای اثر تدریجی و دیرپا به عنوان یک داروی ضد پر فشاری خون می‌باشد [۸و۹]. و شکل (۱-۲) نیز ساختار لوزارتان را نمایش می‌دهد.



شکل ۱-۲: ساختار داروی لوزارتان

---

1- Losartan

آنژیوتانسین II نقش مهمی را در نقاط مختلف بدن، از جمله عضلات عروق، قشر آدرنال، کلیه و مغز ایفا می‌کند. از طریق همین اعمال، سیستم رنین - آنژیوتانسین در تنظیم آب و الکترولیت و فشار خون شریانی نقش کلیدی را انجام می‌نماید. فعالیت بیش از حد سیستم رنین - آنژیوتانسین می‌تواند موجب فشار خون بالا و اختلال در تعادل آب و الکترولیت شود. گیرنده‌های آنژیوتانسین II در بدن پراکنده بوده و دو نوع گیرنده مجزا به اسامی  $AT_1$  و  $AT_2$  برای آنژیوتانسین II شناخته شده‌است. تفکیک این دو نوع بر اساس تفاوت میزان تمایل هر یک از آنها برای آنتاگونیست‌ها و حساسیت آنها به مواد احیاکننده سولفیدریل صورت گرفته‌است. گیرنده‌های  $AT_1$  تمایل بسیار زیادی به اتصال با لوزارتان دارند [۱۰].

### ۱-۳- اهمیت اندازه‌گیری داروهای تیکلوپیدین و لوزارتان

داروهای مهارکننده گیرنده‌های آنژیوتانسین نوع II ( $AT_1$ )، مانند لوزارتان، والسارتان و تلمیسارتان در قیاس با مهارکننده‌های ACE<sup>۱</sup> تمایل بیشتری برای مهار گیرنده‌های آنژیوتانسین دارند. از این داروها برای درمان فشار خون بالا و کنترل نارسایی احتقانی قلب استفاده می‌شود [۱۱ و ۱۲]. مطالعات مختلف نشان داده‌اند که مهارکننده‌های گیرنده‌های آنژیوتانسین می‌توانند در پیشگیری از ضایعات بعد از سکته قلبی و مغزی سودمند باشند. همچنین لوزارتان می‌تواند اثرات ضد تجمع پلاکتی، ضد دیابتی، ضد پلاکت‌های دیواره عروقی، کاهش دهنده اسید اوریک خون و عمل ضد فیبریلاسیون دهلیزی را از خود نشان دهد [۱۱]. همچنین در بیماران مبتلا به بیماری‌های مزمن کلیه و فشار خون با تجویز لوزارتان از شدت آسیب کلیوی کاسته شده‌است و در بسیاری از موارد دو داروی لوزارتان و تیکلوپیدین بطور همزمان توسط بیمار مصرف می‌شود [۱۳]. با توجه به پژوهش‌های انجام گرفته با پایین آمدن فشار خون، خطر سکته مغزی به میزان ۳۰ تا ۴۰ درصد کاهش پیدا می‌کند. در اغلب مواقع درمان با داروهای ضد پرفشاری خون به تنهایی کاهش خطر سکته مغزی را به دنبال ندارد. بر طبق گزارش غذا و داروی ایالت متحده، عوامل ضد پلاکت خصوصاً تیکلوپیدین برای پیشگیری از گرفتگی عروق در بیماران دچار

---

۱- Angiotensin-converting enzyme

سکته مغزی با حمله ایسکمیک - گذرا<sup>۱</sup> بکار گرفته می‌شود. همچنین تیکلوپیدین برای پیشگیری از انفارکتوس قلبی یا مرگ با منشا عروق در بیماران دچار سکته مغزی مورد بررسی قرار گرفته و نشان می‌دهد این افراد به میزان پایین‌تری سکته مغزی یا مرگ و میر داشته‌اند. میزان خونریزی گوارشی در بیمارانی که تیکلوپیدین مصرف می‌کنند، مشابه یا کمتر از بیمارانی است که آسپرین مصرف می‌کنند. از نظر بالینی، لوزارتان و قرص تیکلوپیدین را می‌توان به طور همزمان برای پیشگیری و یا درمان بیماری‌های قلبی و عروقی تجویز نمود [۱۴].

مطالعات فارماکوکینتیک صورت گرفته [۷] در مورد اثر قرص تیکلوپیدین در فارماکوکینتیک لوزارتان و متابولیت فعال آن EXP - 3174 در موش‌ها نشان می‌دهد فارماکوکینتیک لوزارتان بین موش و انسان مشابه بوده و موش یک مدل حیوانی مناسب برای مطالعات فارماکوکینتیک لوزارتان است. تجویز خوراکی لوزارتان همراه با ۱۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن انسان از قرص تیکلوپیدین باعث افزایش قابل توجه  $AUC$ <sup>۲</sup> (تا ۶۵٪) می‌شود، و این نشان می‌دهد که قرص تیکلوپیدین می‌تواند به طور موثر متابولیسم لوزارتان در روده و یا کبد را مهار کند و به همین دلیل اندازه‌گیری همزمان این دو دارو حائز اهمیت هستند. اما از آنجایی که اندازه‌گیری مستقیم داروها در خون و ادرار به دلیل غلظت بسیار کم آن‌ها امکان‌پذیر نیست، ابتدا باید با یک روش مناسب پیش‌تغلیظ شده و بعد با روش‌های مناسب که در ادامه به توضیح آن پرداخته می‌شود، اندازه‌گیری می‌شوند. قابل ذکر است که تاکنون گزارشی مبنی بر جداسازی و اندازه‌گیری همزمان تیکلوپیدین و لوزارتان گزارش نشده‌است.

#### ۱-۴- روش‌های اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان

روش‌هایی که برای آنالیز لوزارتان در فرم خالص یا سیال‌های بیولوژیکی گزارش شده است

---

۱- transient ischemic attack

۲- area under the concentration-time curve (AUC)

شامل روش‌هایی از قبیل، HPLC<sup>۱</sup> [۱۵-۱۸]، کروماتوگرافی لایه نازک [۹]، الکتروفورز با لوله موئین<sup>۲</sup> [۱۹]، ولتامتری [۲۰]، که البته این روش‌ها برای انجام ساده نیستند. آنالیز اسپکترومتری یک روش ساده، رایج و در دسترس است ولی تاکنون در مورد کاربرد این ترکیب برای اندازه‌گیری لوزارتان گزارش‌های کمی ارائه شده است [۲۱].

چندین روش برای اندازه‌گیری تیکلوپیدین در سیال‌های بیولوژیکی گزارش شده است که از آن جمله می‌توان به کروماتوگرافی گازی همراه با آشکارساز (ITD)<sup>۳</sup> [۵]، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا کوپل شده با اسپکترومتری جرمی [۲۲]، HPLC همراه با اسپکترومتر جرمی دوتایی<sup>۴</sup> [۶]، هم‌چنین به کارگیری روش استخراج فاز جامد به همراه آنالیز با (GC/EI-MS)<sup>۵</sup> [۲۳] اشاره کرد.

## ۱-۵- مروری بر کارهای انجام شده

در سال ۲۰۱۴ رائو<sup>۶</sup> و همکارانش، با استفاده از روش RP-HPLC، بطور همزمان لوزارتان و هیدروکلروتیازید و آملودیپین در نمونه‌های قرص از این داروها را اندازه‌گیری نمودند. آن‌ها گستره خطی<sup>۷</sup> ۶۰/۰-۱۰/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و حد تشخیص<sup>۸</sup> ۳/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای لوزارتان، گستره خطی ۱۵/۰-۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و حد تشخیص ۰/۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای

---

۱- High performance liquid chromatography

۲- Capillary electrophoresis

۳- Ion trap detection

۴- Tandem mass spectrometry

۵- Gas chromatography electron impact ionisation-mass spectrometry

۶- J. R. Rao

۷- Linear range

۸- Limit of detection

هیدروکلروتیازید و ۶-۱ میکروگرم بر میلی لیتر دامنه خطی و حد تشخیص ۰/۴ میکروگرم بر میلی لیتر برای آملودیپین گزارش داده اند [۱۷].

در سال ۲۰۱۳ راجان<sup>۱</sup> و همکارانش، با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا موفق به اندازه گیری همزمان لوزارتان پتاسیم و اتنولول در نمونه قرص با دامنه خطی ۰/۰۶۵-۱۰/۰ میکروگرم بر میلی لیتر و حد تشخیص ۰/۰۳۴ میکروگرم بر میلی لیتر برای لوزارتان، و ۰/۰۸-۱۰/۰ میکروگرم بر میلی لیتر و حد تشخیص ۰/۰۹۲ میکروگرم بر میلی لیتر برای اتنولول، شدند [۱۶].

در سال ۲۰۱۲ جویبان<sup>۲</sup> و همکارانش، پیش تغلیظ، جداسازی و اندازه گیری هم زمان کارودیلول و لوزارتان با روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا را منتشر ساخت. آنالیتها با روش میکرواستخراج مایع مایع پخشی، پیش تغلیظ شدند. رنج خطی برای لوزارتان و کارودیلول به ترتیب ۱/۰-۰/۱ میکروگرم بر میلی-لیتر و ۰/۷۵-۰/۰۵ میکروگرم بر میلی لیتر، وحد تشخیصی برابر با ۰/۰۱۴ و ۰/۰۱۱ در پلاسما و ۰/۰۰۴ و ۰/۰۰۷ میکروگرم بر میلی لیتر در ادرار برای کارودیلول و لوزارتان به ترتیب بدست آمد. همچنین درصد بازیابی به ترتیب برای لوزارتان و کارودیلول ۱۰۰/۲ و ۹۸/۹٪ در پلاسما و ۱۰۰/۵ و ۱۰۰/۷٪ در ادرار گزارش شده است [۲۴].

در سال ۲۰۱۱ اوزا<sup>۳</sup> و همکاران، با روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا موفق به اندازه گیری همزمان لوزارتان پتاسیم و پریندوپریل اربومین در نمونه قرص شدند. در این مطالعه دامنه خطی ۱۵/۰-۲/۰ میکروگرم بر میلی لیتر برای هر دو دارو و LOD ۰/۱۰۹ میکروگرم بر میلی لیتر برای لوزارتان و ۰/۰۴۱ میکروگرم بر میلی لیتر برای پریندوپریل اربومین بدست آمد [۲۵].

---

۱- Rajan

۲- Abolghasem Jouyban

۳- Oza

در سال ۲۰۰۸ سردا<sup>۱</sup> و همکاران، از ترکیب تکنیک آنالیز کروماتوگرافی چند سرنگی (MSC)<sup>۲</sup> با استخراج دیسک‌های جاذب برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری هیدروکلروتیازید و لوزارتان پتاسیم در آب-های سطحی، زیرزمینی و پساب خروجی نمونه‌ها استفاده کرد. در این روش، حد تشخیص ۰/۰۷ نانو گرم بر لیتر برای هیدروکلروتیازید و ۰/۰۹ نانو گرم بر لیتر برای لوزارتان گزارش شده است [۲۶].

در سال ۲۰۱۱ چو<sup>۳</sup> و همکارانش، اندازه‌گیری کمی تیکلوپیدین را در پلاسمای انسان با استفاده از رسوب پروتئین و آنالیز با کروماتوگرافی همراه با اسپکترومتری جرمی (LC/MS) انجام دادند. در این گزارش ناحیه خطی ۲/۰ تا ۲۰۰۰/۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر برای دارو ذکر شده است [۶].

در سال ۲۰۱۱ جوشی<sup>۴</sup> و همکارانش، با استفاده از کروماتوگرافی مایع با فراکارایی<sup>۵</sup> (UPLC) با فاز معکوس و شویش ایزوکراتیک<sup>۶</sup>، تیکلوپیدین هیدروکلراید را در فرم جامد دارو اندازه‌گیری نمودند. دامنه خطی ۶۲/۵-۳۷۵/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و RSD ۱/۳۱٪ گزارش شده است [۲۷].

در سال ۲۰۰۳ پنا<sup>۷</sup> و همکارانش، اندازه‌گیری تیکلوپیدین را در پلاسمای انسان، با استفاده از کروماتوگرافی گازی با ستون مویینه<sup>۸</sup> و آشکارسازی با اسپکترومتری جرمی را گزارش دادند. در این فرایند دامنه خطی کالیبراسیون از غلظت ۰/۰۱ تا ۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و حد کمی<sup>۹</sup> ۰/۰۰۵

---

۱- Cerda

۲- Multi-syring chromatography

۳- Cho

۴- Joshi

۵- Ultra Performance Liquid Chromatography

۶- Isocratic

۷- Angelina Pena

۸- capillary gas chromatography

۹- Limit of quantitation

میکروگرم بر میلی‌لیتر برای تیکلوپیدین ارائه شده است [۵].

در سال ۱۹۹۷ رونا<sup>۱</sup> و همکارانش، با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، اندازه‌گیری تیکلوپیدین را در پلاسمای انسان با آشکارساز UV در طول موج ماکزیمم ۲۱۵ نانومتر به کار بردند. ناحیه خطی ۱۰/۰ تا ۱۰۰۰/۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر و حد تشخیص برابر با ۵/۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر گزارش شده است [۲۸].

با توجه به اهمیت دو داروی ذکر شده، در این مطالعه پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری همزمان آن‌ها با استفاده از تکنیک میکرواستخراج فاز مایع با فیبر توخالی و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا مورد بررسی قرار گرفت.

---

۱- K. Rona

فصل دوم:

تئوری

## ۲-۱- مقدمه‌ای بر کروماتوگرافی

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

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

تقسیم بندی روش های کروماتوگرافی از لحاظ نحوه تماس فاز ساکن و متحرک به صورت زیر می‌باشد [۲۹]:

---

۱- Mikhail Tsvet

۲- A. J. P. Martin

۳- R. L. M. Synge

- کروماتوگرافی ستونی<sup>۱</sup> : فاز ساکن در یک ستون نگه داشته شده و فاز متحرک از داخل آن در اثر نیروی جاذبه یا یک نیروی خارجی (پمپ) حرکت می کند.
  - کروماتوگرافی صفحه ای یا مسطح: مثل کروماتوگرافی کاغذی، فاز ساکن روی یک صفحه قرار گرفته و فاز متحرک از طریق نیروی موئینه از روی فاز ساکن عبور داده می شود.
- یک دسته بندی اساسی تر روش های کروماتوگرافی بر پایه ی انواع فازهای متحرک و ساکن و انواع تعادل- های درگیر در انتقال مواد حل شده بین فازها بنا شده است. این طبقه بندی شامل سه گروه عمومی کروماتوگرافی مایع، کروماتوگرافی گازی و کروماتوگرافی سیال فوق بحرانی می باشد. همچنین قابل ذکر است که فقط کروماتوگرافی مایع می تواند هم در ستون ها و هم در سطوح مسطح انجام شود؛ از طرف دیگر کروماتوگرافی گازی و کروماتوگرافی سیال فوق بحرانی به روش های ستونی محدود می شوند.

## ۲-۱-۱- کروماتوگرافی مایع بر اساس انواع فاز ساکن:

۱. کروماتوگرافی مایع - مایع یا کروماتوگرافی تقسیمی<sup>۲</sup>
۲. کروماتوگرافی مایع - جامد یا کروماتوگرافی جذب سطحی<sup>۳</sup>
۳. کروماتوگرافی تعویض یونی<sup>۴</sup>
۴. کروماتوگرافی ژل تراوا یا طرد اندازه ای<sup>۵</sup>

## ۲-۱-۲- کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

کروماتوگرافی مایع اولیه، از جمله کار اصلی تسوت، در ستون های شیشه ای با قطرهای ۱ تا ۵ سانتی متر و طول ۵۰ تا ۵۰۰ سانتی متر انجام می شد. برای اطمینان از جریان هایی با سرعت معقول،

---

۱- Column chromatography

۲- Partition chromatography

۳- Adsorption chromatography

۴- Ion exchange chromatography

۵- Gel permeation or Size exclusion chromatography

قطر ذرات فاز ساکن جامد معمولاً در گستره‌ی ۱۵۰ تا ۲۰۰ میکرومتر 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 کارایی کاهش می‌یافت.

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.

## ۲-۱-۳- کروماتوگرافی تقسیمی

کروماتوگرافی تقسیمی در بین چهار نوع روش کروماتوگرافی مایع، بیشتر از همه به کار برده شده است. در این نوع کروماتوگرافی، مولکول‌های نمونه، بین دو فاز مایع غیر قابل امتزاج توزیع می‌شوند. یک مایع فاز متحرک است و مایع دیگر فاز ساکن است که به صورت لایه نازکی بر روی ذرات نگهدارنده بی اثر قرار می‌گیرد. این نوع کروماتوگرافی بر اساس روش پوشاندن فاز ساکن بر روی نگهدارنده به دو گروه زیر تقسیم می‌شود: کروماتوگرافی مایع-مایع که در آن فاز ساکن به صورت مکانیکی روی نگهدارنده جذب سطحی شده است و کروماتوگرافی با فاز پیوند شده<sup>۱</sup> که در آن، فاز ساکن به طور شیمیایی به ذرات نگهدارنده پیوند گردیده است. کروماتوگرافی تقسیمی از

---

۱- Bonded phase chromatography

گزينش پذيری بی نظيری برخوردار است و علت این امر می تواند به گستره وسیع فاز ساکن مربوط شود. بر اساس خاصیت قطبیت نسبی فاز متحرک و فاز ساکن، کروماتوگرافی تقسیمی به دو دسته ی کروماتوگرافی با فاز نرمال<sup>۱</sup> (NPC) و کروماتوگرافی فاز معکوس (RPC)<sup>۲</sup> تقسیم می شود. در NPC، ذرات نگهدارنده با فاز ساکن قطبی پوشش داده شده و فاز متحرک غیرقطبی می باشد. NPC برای جداسازی نمونه هایی با قطبیت بالا و محلول در آب استفاده می شود. در RPC، فاز ساکن غیرقطبی و فاز متحرک قطبی است و این روش نیز برای جداسازی نمونه هایی با حلالیت کم در آب به کار می روند.

## ۲-۱-۴- اجزاء سازنده کروماتوگرافی مایع

۱. پمپ: وسیله ایست که فاز متحرک را به جریان می اندازد، پمپ باید بتواند فاز متحرک را به طور تکرارپذیر و یکنواخت با سرعت جریان ثابت در ستون هدایت کند.
۲. مخزن های حلال: از شیشه یا فولاد زنگ نزن بوده و مجهز به میکروفیلتر جهت ممانعت از ورود ذرات ریز احتمالی موجود در فاز متحرک است.
۳. سیستم تزریق کروماتوگرافی: برای به دست آوردن حداکثر کارایی در کروماتوگرافی، نمونه باید به صورت یک نوار بسیار باریک از سر ستون وارد شود. سیستم تزریق نمونه به همین منظور طراحی شده است. در این سیستم، یک حلقه<sup>۳</sup> تزریق نمونه، در نظر گرفته شده است که می توان حجم نمونه تزریقی به ستون را توسط آن کنترل کرد. حجم حلقه تزریق نمونه می تواند بین ۲ تا ۲۰ میکرولیتر، بسته به نوع کار تغییر کند.

---

۱- Normal phase chromatography

۲- Reverse phase chromatography

۳- Loop

۴. ستون: ستون به منزله قلب یک دستگاه کروماتوگرافی بوده و عمل جداسازی ترکیبات مختلف در آن انجام می‌شود. جنس ستون معمولاً از فولاد زنگ نزن به طول ۵ تا ۵۰ سانتی‌متر و قطر داخلی ۳ تا ۹ میلی‌متر می‌باشد. ستون از فاز ساکن که بروی نگهدارنده‌ای به قطر ۳ تا ۳۰ میکرومتر اتصال داده شده، پر شده است.
۵. آشکارساز: وظیفه آشکارساز تولید علامتی متناسب با غلظت نمونه‌های جداسازی شده در ستون می‌باشد. در HPLC از آشکارسازهای مختلفی نظیر آشکارسازهای ضریب شکست، جذب UV-Vis، فلئورسانس، الکتروشیمیایی و طیف‌سنجی جرمی استفاده می‌شود.
۶. سیستم برنامه‌ریزی دما و حلال: با تنظیم خودکار پمپ‌ها و اتافک مخصوص ستون، می‌توان به ترتیب طی یک آنالیز به طریقه شویش گرادینانی، ترکیب فاز متحرک و دمای ستون را کنترل کرد. در این پروژه شویش به شیوه ایزوکراتیک انجام شده است.
۷. علامت خروجی الکترونیکی از آشکارساز: علامت مربوط به نمونه شسته شده از ستون HPLC توسط پردازشگرها بررسی شده و شکل پیک و علامت متناسب با آن توسط پردازشگر رسم می‌شود.

## ۲-۲- مقدمه ای بر روش های آماده سازی نمونه

آنالیز ماده موثر دارویی برای درمان‌های بالینی، نظارت بر درمان و ایجاد یک پروتکل درمانی که مورد استفاده در پزشکی قانونی برای تعیین علت مرگ و اهداف سم شناسی و تعیین مقدار مواد مخدر و یا دوپینگ بسیار قابل توجه است. در سال‌های اخیر توجه به توسعه روش‌های جدید آماده‌سازی نمونه برای تعیین مقدار انواع آنالیت در بافت‌های مختلف با حساسیت و گزینش پذیری بالا، افزایش یافته است. آنالیز نمونه‌های پیچیده و شناسایی آنالیت یا سنجش کمی با حد تشخیص پایین دو مشکل اصلی شیمی تجزیه می‌باشد [۳۰].

یکی از مشکلاتی که در پیشرفت تکنولوژی در زمینه شیمی تجزیه وجود دارد، این است که

بیشتر دستگاه‌ها هنوز نمی‌توانند به طور مستقیم جهت بررسی آنالیتی که در یک ماتریس پیچیده قرار دارند به کار روند، بنابراین آماده‌سازی نمونه یک مرحله ضروری است. این فرایند شامل جداکردن آنالیت از مخلوط پیچیده ماتریس می‌باشد. به طور کلی ۷۵ درصد از زمان کاری در آزمایشگاه‌های تجزیه‌ای برای آماده‌سازی نمونه صرف می‌شود [۳۰]. از طرف دیگر غلظت بعضی از نمونه‌ها در حدی نیست که بتوان آن‌ها را به طور مستقیم اندازه‌گیری نمود و لذا یک مرحله آماده‌سازی نمونه جهت پیش‌تغلیظ ضروری است.

## ۲-۲-۱- اهداف آماده سازی نمونه

۱. افزایش غلظت آنالیت به منظور بالا بردن حساسیت اندازه‌گیری
۲. حذف مزاحمت‌های بالقوه در مراحل جداسازی و شناسایی آنالیت و در نتیجه افزایش گزینش پذیری روش
۳. در صورت لزوم تبدیل آنالیت‌ها به فرم مناسب‌تر برای تشخیص یا جداسازی بهتر
۴. فراهم کردن یک روش تکرارپذیر و قوی که مستقل از تغییرات ماتریکس نمونه باشد [۳۱].

## ۲-۲-۲- روش‌های آماده سازی نمونه

یکی از روش‌های آماده‌سازی نمونه روش‌های فیزیکی است که این روش‌ها شامل الک کردن و خرد کردن جامدات، پودر کردن، صاف کردن انحلال در حلال مناسب و عصاره‌گیری از نمونه‌های گیاهی می‌باشند. یک نوع دیگر از روش‌های آماده‌سازی نمونه، روش‌های شیمیایی است که از جمله این روش‌ها می‌توان، استخراج، پیش‌تغلیظ، خالص‌سازی، هضم و مشتق‌سازی را نام برد [۳۲].

اکثر روش‌های نمونه‌برداری و آماده‌سازی نمونه نظیر سوکسوله و غیره بر اساس فن‌آوری‌های قرن ۱۹ پایه‌گذاری شده‌اند. اغلب این روش‌ها وقت‌گیر بوده و به دلیل درگیر شدن در مراحل چندگانه خطر از دست رفتن بخشی از نمونه در آن‌ها زیاد است. هم‌چنین در این روش‌ها از حلال‌های آلی در

حجم‌های بالا استفاده می‌شود. این ویژگی‌های مذکور را با مشکل عدم امکان خودکار شدن و ارائه مستقیم به دستگاه‌های جدید تجزیه‌ای، آن‌ها را با مشکل مواجه ساخته‌است. از سوی دیگر مصرف بالای حلال‌های آلی علاوه بر این که از نظر اقتصادی مقرون به صرفه نمی‌باشند به دلیل خطراتی که سلامت آزمایشگر را تهدید می‌کند و همچنین اثرات سوء آن‌ها بر محیط‌زیست یکی دیگر از معضلات جدی روش‌های کلاسیک آماده‌سازی نمونه است [۳۳].

روش‌های آماده‌سازی رایج که شامل استخراج مایع-مایع<sup>۱</sup> و استخراج با فاز جامد<sup>۲</sup> می‌باشند هم زمان‌های بالا و هم حجم حلال زیادی را مصرف می‌کنند. به سبب این معایب، روش‌های میکرواستخراج به دلیل کاربرد آسان، سرعت، ارزانی و سازگاری با محیط‌زیست به سرعت توسعه یافته‌اند. امروزه نیز تحقیقات گسترده‌ای به منظور دستیابی به روش‌هایی با صحت و دقت بالا به همراه حد کمی قابل قبول صورت می‌گیرد. استخراج مایع-مایع، استخراج فاز جامد و استخراج نقطه ابری<sup>۳</sup> از اولین روش‌های استخراج هستند، که برای جداسازی یک گونه از محلول، مورد استفاده قرار گرفتند. استخراج مایع-مایع (LLE) و استخراج فاز جامد (SPE) با استفاده از چندین جاذب مختلف بر تکنیک‌های سنتی آماده‌سازی نمونه برای استخراج داروها از بافت‌های بیولوژیکی و زیست محیطی ترجیح داده می‌شوند [۳۰]. روش استخراج مایع-مایع معایبی از قبیل طولانی بودن زمان استخراج و مصرف زیاد حلال‌های سمی داشته و اجرای آن مستلزم انجام مراحل متعددی است که احتمال از دست دادن مقادیری از نمونه را زیاد می‌کند. امروزه توجه محققین بر روش‌هایی معطوف است که با محیط‌زیست سازگار بوده و با کاهش مصرف حلال آلی همراه باشند. استخراج فاز جامد (SPE) به عنوان مکمل یا حتی جانشین استخراج مایع-مایع گسترش یافته‌است و یکی از روش‌هایی است که

---

۱- Liquid- liquid extraction

۲- Solid phase extraction

۳- Cloud point extraction

در حوزه‌های مختلفی از شیمی از قبیل آنالیز نمونه‌های زیست محیطی، دارویی، غذایی، بالینی و شیمی صنعتی استفاده می‌شود. استخراج فاز جامد نسبت به استخراج مایع- مایع مزایای زیادی داشته که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به مصرف کم‌تر حلال‌های مضر، اتوماتیک شدن آسان و کاهش مراحل استخراج اشاره نمود. در استخراج فاز جامد مصرف حلال بسیار کم‌تر از استخراج مایع- مایع بوده و در حد میلی‌لیتر می‌باشد [۳۴].

### ۳-۲-۲- روش‌های میکرواستخراج

تمایل به توسعه روش‌های استخراج موجب شد که در سال ۱۹۹۰ آرتور<sup>۱</sup> و پالیزین<sup>۲</sup>، میکرواستخراج فاز جامد<sup>۳</sup> [۳۵] را معرفی نمایند. هرچند میکرواستخراج فاز جامد، روشی بدون حلال، ساده و سریع است، ولی به فراگیری استخراج فاز جامد نبوده و محدوده کاربرد آن به علت مشکلات در استخراج ترکیبات آب‌دوست و غیرفرار کمتر است [۳۴]. معایب دیگر این روش هزینه بالا، شکستگی بودن فیبر و عمر کوتاه آن می‌باشد. به موازات توسعه میکرواستخراج فاز جامد، در سال ۱۹۹۶ یک جایگزین مناسب و جدید برای SPE<sup>۴</sup>، به نام میکرواستخراج فاز مایع توسط جی‌نات و کانتول<sup>۵</sup> [۳۶] و همچنین لیو و داسگوپتا<sup>۶</sup> [۳۷] ارائه گردید. اولین ایده پس از اودانسن<sup>۷</sup> در سال

---

۱- Arthur

۲- Pawliszyn

۳- Solid- phase microextraction

۴ - Dispersive liquid – liquid microextraction

۵- Jeannot and Cantwell

۶- Liu and Dasgupta

۷- Audunsson

۱۹۸۶ با کارهای توردانسن<sup>۱</sup> و همکاران و نیز در سال ۱۹۹۹ پدرسن بجرگارد<sup>۲</sup> و راسموسن<sup>۳</sup> توسعه پیدا کرد. آن‌ها با یک کار کم هزینه با استفاده از فیبرهای توخالی متخلخل یک بار مصرف از جنس پلی پروپیلن، میکرواستخراج فاز مایع بر پایه فیبرتوخالی<sup>۴</sup> (HF-LPME) را ابداع کردند [۳۰]. این روش‌ها به عنوان راهکاری برای رفع برخی از مشکلات روش میکرواستخراج فاز جامد معرفی گردیدند. اما مواردی از قبیل ناپایداری قطره حلال، تشکیل حباب‌های هوا در فیبر توخالی میکرواستخراج فاز مایع و طولانی بودن زمان استخراج از معایب این روش‌ها محسوب می‌شوند.

روش‌های میکرواستخراج به دو دسته کلی میکرواستخراج فاز جامد (SPME)<sup>۵</sup> و میکرواستخراج فاز مایع تقسیم (LPME)<sup>۶</sup> می‌شوند. با توجه به اینکه روش به کار رفته در این پایان نامه، میکرواستخراج فاز مایع با فیبر توخالی می‌باشد، لذا به جزئیات بیشتری از این روش خواهیم پرداخت. روش‌های میکرواستخراج‌های فاز مایع به ۴ دسته‌ی زیر طبقه‌بندی می‌شوند:

- ۱- میکرواستخراج قطره تنها<sup>۷</sup>
- ۲- میکرواستخراج فاز مایع با فیبر توخالی
- ۳- میکرواستخراج مایع - مایع پخشی<sup>۸</sup>

---

۱- Thordarson

۲- Pedersen- Bjergaard

۳- Rasmussen

۴- Hollow fiber liquid phase microextraction

۵- Solid – phase microextraction

۶- Liquid – phase microextraction

۷- Single drop microextraction (SDME)

۸- Dispersive liquid liquid microextraction

۴- میکرواستخراج مایع - مایع - مایع<sup>۱</sup>

## ۲-۳- میکرواستخراج فاز مایع با فیبر توخالی

روش میکرواستخراج فاز مایع با فیبر توخالی توسط پدرسن- بجرگارد و راسموسن در سال ۱۹۹۹ معرفی شد و برای اولین بار برای استخراج ترکیبات معدنی به کار برده شد. این روش امکان استخراج و پیش تغلیظ آنالیت در بافت‌های پیچیده را با روش ساده و ارزان فراهم می‌سازد. در این روش، مقدار حلال استخراج مورد استفاده در حدود ۲۰-۱۰ میکرولیتر می‌باشد [۳۸].

## ۲-۳-۱- انواع روش‌های میکرواستخراج مایع با فیبر توخالی

روش‌های میکرواستخراج مایع با فیبر توخالی به دو دسته دوفازی و سه‌فازی طبقه‌بندی شده است [۳۹].

بر طبق خصوصیات ماتریکس و نوع آنالیت می‌توان از هر یک از روش‌های دوفازی و سه‌فازی استفاده نمود. در روش " میکرواستخراج فاز مایع با فیبر توخالی دوفازی " آنالیت از نمونه‌ی آبی به درون فاز استخراجی غیرقابل‌امتزاج (فاز آلی) و تثبیت شده بر روی حفره‌ها به درون فیبر توخالی استخراج می‌شود. این فیبرهای توخالی از جنس پلی‌پروپیلن هستند که توسط یک میکروسرنگ در درون فاز آبی نگهداشته می‌شوند. در این روش استخراج، فاز پذیرنده (یا حلال استخراج آلی) معمولاً سازگاری بیشتری با روش‌های کروماتوگرافی دارد.

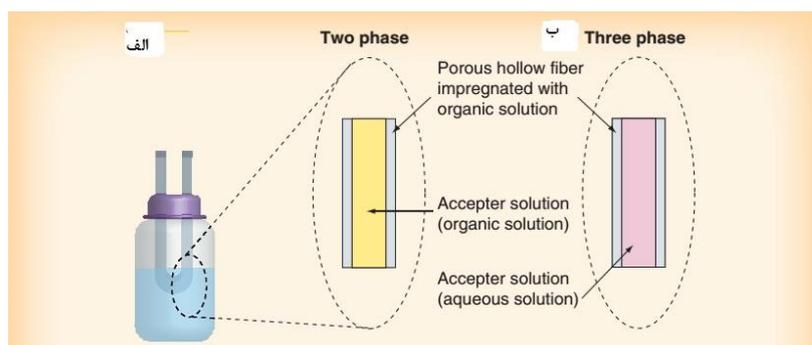
در روش میکرواستخراج مایع-مایع-مایع با فیبر توخالی سه‌فازی، آنالیت توسط گرادیان pH منتقل می‌شود. در این روش، آنالیت در نمونه‌ی آبی، در امتداد فاز استخراج کننده آلی و تثبیت شده

---

۱- Liquid - liquid - liquid microextraction

روی حفره‌های فیبر توخالی، پیش‌تغلیظ و سرانجام به درون فاز آبی در لومن<sup>۱</sup> فیبر توخالی استخراج می‌شود [۴۰].

تثبیت حلال بر روی فیبرها یک مرحله بسیار مهم می‌باشد زیرا فرایند استخراج بایستی روی یک سطح ثابت انجام شود. حلال آلی تثبیت شده روی حفره‌های غشای پلیمری آبگریز و متخلخل توسط نیروی موئینگی نگهداشته می‌شود. در این روش قطبیت حلال استخراج بایستی با قطبیت فیبر توخالی متناسب باشد که بتواند روی حفره‌ها تثبیت شود. از آن جایی که فیبرهای توخالی آبگریز اجازه‌ی استفاده از سرعت‌های هم‌زدن بالا و به دنبال آن افزایش سرعت استخراج را امکان‌پذیر می‌سازند و همچنین ناحیه‌ی تماس بین نمونه‌ی آبی و فاز آلی استخراج کننده نسبت به میکرواستخراج با قطره زیاد است، سبب افزایش سرعت انتقال ماده می‌شود. همچنین استفاده از فیبرهای توخالی، پوششی را برای فاز استخراج کننده فراهم می‌کند که برای استخراج نمونه‌های آلوده بکار می‌رود. به هر حال حفره‌های با اندازه کوچک فیبر توخالی اجازه‌ی فیلتراسیون نمونه را ممکن می‌سازند [۴۱]. در شکل (۱-۲) سیستم دو فازی و سه فازی برای میکرواستخراج با فیبر توخالی به نمایش گذاشته شده است.



شکل ۱-۲: الف) سیستم دو فازی میکرواستخراج فاز مایع با فیبر توخالی (ب) سیستم سه فازی میکرواستخراج فاز مایع

با فیبر توخالی [۴۲].

۱- Lumen

## ۲-۳-۲- حالت استخراج ایستا<sup>۱</sup> و پویا<sup>۲</sup>

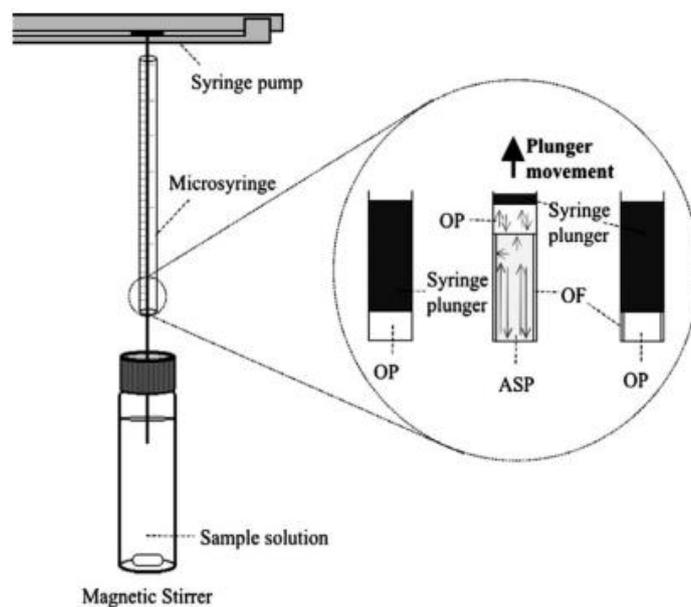
HF-LPME، می تواند در هر دو حالت استاتیک و حالت پویا انجام شود. در حالت استاتیک، حلال آلی استخراج کننده در طول استخراج، درون فیبر توخالی نگهداشته می شود و برای تسهیل انتقال جرم از عمل همزدن استفاده می شود [۴۱]. از ویژگی های این روش سادگی و تکرارپذیری خوب است و استفاده از حجم بیشتری از حلال های آلی همراه با همزدن برای افزایش حساسیت مفید هستند.

در حالت پویا فیبر توخالی ابتدا به مدت ۵ ثانیه درون حلال آلی قرار می گیرد تا منافذ آن از حلال آلی اشباع شود. سپس فیبر اشباع شده از حلال که در نوک سوزن یک سرنگ قرار گرفته، درون حجم مشخصی از محلول نمونه قرار می گیرد. مقداری از حلال که درون سرنگ وارد شده به طور کامل به فیبر موجود در نوک آن تزریق می شود. پیستون سرنگ به یک پمپ سرنگی متصل بوده که به طور همزمان با مکنت هم زده می شود. در نتیجه کشیدن پیستون به سمت خارج ضمن ورود بخشی از محلول نمونه به درون سرنگ، فیلم نازکی از حلال آلی موجود درون فیبر که وارد محفظه سرنگ شده است، تشکیل می شود. در نتیجه امکان تماس نمونه با سطح داخلی حلال (فیلم تشکیل شده) و هم سطح خارجی آن در قسمت فیبر منفذ دار ایجاد گردیده و بنابراین در اثر افزایش سطح تماس، سرعت انتقال جرم افزایش می یابد. در اثر تکرار این سیکل یعنی با حرکت مکرر پیستون سرنگ به سمت داخل و خارج، همواره فیلم ایجاد شده از حلال با بخش تازه ای از محلول نمونه که حاوی غلظت اولیه آنالیت است در تماس قرار می گیرد (شکل ۲-۲) [۴۳].

---

۱- Static

۲- Dynamic

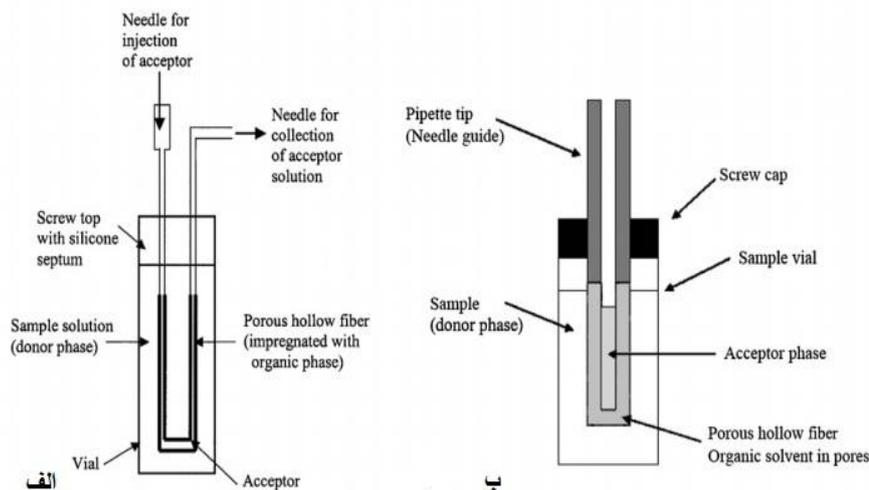


شکل ۲-۲: میکرواستخراج فیبر توخالی پویا [۴۳]

### ۲-۳-۳- سیستم میکرواستخراج با فیبر توخالی

توسعه روش های جدید میکرواستخراج با فیبر توخالی نیازمند انتخاب مناسب فیبر توخالی است تا به عنوان مکانی برای فاز پذیرنده و عاملی برای پوشش حلال آلی باشد. به نظر می رسد رایج ترین فیبر توخالی که در روش میکرواستخراج فاز مایع استفاده می شود، دارای ابعادی با قطر داخلی ۶۰۰ میکرومتر، ضخامت دیواره ۲۰۰ میکرومتر و اندازه منافذ ۰/۲ میکرومتر و درصد تخلخل ۷۵٪ می باشد. با این ابعاد بایستی میکروسرنگی با سوزن باریک برای تزریق و بیرون کشیدن فاز پذیرنده استفاده شود. به طور عمده فیبر ۸ سانتی متری که به انتهای دو سرنگ به صورت U شکل متصل شده است، به کار می رود، (شکل ۲-۳ الف) و مزیت اصلی این حالت، افزایش سطح تماس بین نمونه و فیبر می باشد. با این حال سیستم میله ای شکل برای میکرواستخراج فاز مایع به صورت اتوماتیک پیشنهاد می شود. شکل (۲-۳ ب) نشان دهنده HF-LPME میله ای شکل می باشد. هر دو سیستم با آماده سازی های مشابه به هم برای میکرواستخراج فاز مایع مناسب اند. نوع شکل استفاده شده وابسته به ابعاد فیزیکی فیبر و ویال نمونه و با توجه به نوع استخراج که به صورت اتوماتیکی یا دستی انجام

شود، انتخاب می‌گردد. در بهینه‌سازی روش LPME ویال‌های مختلف نمونه باید آزمایش شوند و در نهایت با توجه به راندمان و زمان تعادلی در LPME، انتخاب گردند [۴۴ و ۴۵].



شکل ۲-۳: سیستم مورد استفاده در شکل الف) سیستم u شکل و ب) سیستم میله-ای شکل [۴۵]

### ۲-۳-۴- اصول تئوری در سیستم دو فاز HF-LPME [۴۵]

در سیستم‌های دو فاز استخراج، آنالیت مورد نظر (A) از محلول آبی نمونه از طریق منافذ غشاء فیبر توخالی به داخل حلال آلی (فاز پذیرنده) استخراج می‌شود. این فرایند با تعادل زیر دنبال می‌شود:

$$A_{\text{sample}} \leftrightarrow A_{\text{acceptor}} \quad \text{معادله (۱-۲)}$$

$A_{\text{sample}}$ ، مقدار آنالیت در محلول نمونه و  $A_{\text{acceptor}}$  مقدار کل آنالیت در محلول پذیرنده است.

ضریب توزیع ( $D_{\text{acceptor/sample}}$ ) به شکل زیر تعریف می‌شود:

$$D_{\text{acceptor/sample}} = \frac{C_{\text{eq, sample}}}{C_{\text{eq, acceptor}}} = \alpha_D \cdot K_{\text{acceptor/sample}} \quad \text{معادله (۲-۲)}$$

که در این معادله،  $C_{\text{eq, acceptor}}$  مقدار غلظت نهایی از A در فاز پذیرنده (فاز آلی) در حالت تعادل و  $C_{\text{eq, sample}}$  غلظت نهایی A در نمونه (فاز آبی) در هنگام تعادل می‌باشد.  $K_{\text{acceptor/sample}}$  ضریب تقسیم تصحیح شده آنالیت و یا به عبارتی نسبت گونه‌های قابل استخراج از آنالیت A در دو فاز بوده و  $\alpha_D$  نیز کسر قابل استخراج از غلظت کلی آنالیت در نمونه است. اگر A آنالیت اصلی باشد، بخشی از آن قابل استخراج است که بدون بار باشد یا به عبارت دیگر بخشی از آن که پروتونه نشده است. آنالیت‌های باردار مثل آنیون‌های اسیدی یا پروتونه بازی، قابل استخراج نمی‌باشند. کسر قابل استخراج از طریق pH مربوطه و مقدار  $pK_a$  مطابق معادله (۳-۲) قابل محاسبه است.

$$\alpha = \frac{1}{1 + 10^{s(pH - pKa)}} \quad \text{معادله (۳-۲)}$$

مقدار s برای اسیدها +1 و برای بازها -1 می‌باشد. معادله (۳-۲) برای اسیدها و بازهای تک پروتونه صادق است. برای آنالیت‌های اسیدی معمولاً استخراج از محلول‌های اسیدی و برای آنالیت‌های بازی از محلول‌های قلیایی استخراج صورت می‌گیرد و  $\alpha_D$  نزدیک به یک خواهد بود. راندمان استخراج (E) به صورت کسری از آنالیت استخراج شده به فاز پذیرنده بیان می‌شود.

$$E = \frac{n_{\text{extr}}}{n_{\text{total}}} \quad \text{معادله (۴-۲)}$$

$n_{\text{extr}}$  تعداد مول‌های استخراج شده آنالیت در فاز پذیرنده و  $n_{\text{total}}$  تعداد مول‌های کل A می‌باشد. گاهی اوقات به جای راندمان استخراج (E)، از پارامتر بازیابی (R) استفاده می‌شود. که معمولاً به صورت درصد بیان می‌گردد. بر اساس معادله (۲-۲)، تعادل جرمی در سیستم دو فازي LPME، راندمان استخراج در تعادل به صورت زیر محاسبه می‌شود:

$$E = \frac{D_{acceptor/sample} \cdot V_{org}}{D_{acceptor/sample} \cdot V_{org} + V_{sample}} \quad \text{معادله (۵-۲)}$$

که  $V_{org}$  حجم نهایی از حلال استخراج استفاده شده و  $V_{sample}$  نیز حجم نمونه می باشد. حجم کل حلال استفاده شده از مجموع حلال آلی موجود در منافذ دیواره فیبر توخالی ( $V_{membrane}$ ) و حجم داخل استوانه (فیبر توخالی) ( $V_{acceptor}$ ) بدست می آید. در بیشتر موارد مربوط به آنالیز استخراج از مایع آلی داخل فیبر ( $V_{membrane}$ )، از قسمتی از نمونه استخراج شده در منافذ غشاء صرف نظر می شود. در صورتیکه حجم مایعی که در منافذ فیبر باقی مانده به بزرگی داخل فیبر باشد، اصلاح معادله (۵-۲) ضروری است:

$$E = \frac{D_{acceptor/sample} \cdot V_{acceptor}}{D_{acceptor/sample} \cdot V_{org} + V_{sample}} \quad \text{معادله (۶-۲)}$$

این رابطه نشان می دهد که راندمان استخراج (بازیابی) به ضریب توزیع و حجم حلال آلی و حجم نمونه وابسته است. ضریب توزیع بالا و حجم های کم از نمونه، بازیابی بالایی را در استخراج به دست می دهد. فاکتور پیش تغلیظ<sup>۱</sup> آنالیت (PF)، که به صورت نسبت بین غلظت آنالیت در محلول پذیرنده در پایان استخراج ( $C_{acceptor.end}$ ) و غلظت اولیه آنالیت در محلول نمونه ( $C_{initial}$ ) تعریف می شود، توسط معادله (۷-۲) در هر زمان در طول فرایند استخراج قابل محاسبه می باشد:

$$PF = \frac{C_{acceptor.end}}{C_{initial}} = \frac{V_{sample} \cdot E}{V_{org}} \quad \text{معادله (۷-۲)}$$

در حالت تعادل استخراج،  $C_{acceptor.end}$  مقداری برابر با  $C_{eq.acceptor}$  دارد. و وقتی PF در حجم نهایی مایع پذیرنده داخل فیبر توخالی محاسبه می شود (در معادله (۶-۲))، حجم  $V_{org}$  در معادله (۷-۲) بایستی به  $V_{acceptor}$  تغییر یابد.

---

۱- Preconcentration factor

## ۲-۳-۵- فاکتورهای مؤثر بر روش دو فازی HF-LPME

فاکتورهای مؤثر بر میکرواستخراج با روش HF-LPME عبارتند از:

- نوع حلال آلی
- زمان استخراج
- pH محلول نمونه (donor)
- سرعت هم‌زدن محلول
- طول فیبر توخالی
- قدرت یونی

## ۲-۳-۶- مزایای روش میکرواستخراج با فیبر توخالی

از مزایای این روش می‌توان به موارد زیر اشاره نمود:

- حجم بسیار اندک از حلال آلی مورد نیاز است.
  - عدم مشکلات مربوط به ناپایداری قطره که در روش SDME مشاهده می‌شود.
  - بهره‌وری استثنایی در پاکسازی یا تصفیه بعد از استخراج برای مولکول‌هایی با جرم مولکولی بالا که نتوانسته‌اند از دیواره غشاء عبور کنند.
  - از دیگر مزایای این روش، ضرایب غنی‌سازی<sup>۱</sup> بالای آن برای نمونه‌های آلی و معدنی و امکان جفت-شدن این روش با کروماتوگرافی و دیگر سیستم‌های دستگاهی است [۴۶].
- این روش با توجه به سادگی، کم هزینه بودن و راندمان بالا و حجم حلال ناچیز مورد استفاده آن به عنوان یک روش امیدبخش در آماده‌سازی نمونه معرفی گردید [۴۷].

---

۱- Enrichment coefficients

## ۲-۳-۷- کاربردها و سازگاری روش با فنون مختلف دستگاهی

در روش HF-LPME، فاز پذیرنده بعد از انجام عمل استخراج مستقیماً می‌تواند مورد آنالیز دستگاهی قرار گیرد و نیازی به انجام مراحل اضافی روی فاز پذیرنده نیست. این روش با دستگاه‌هایی هم‌چون اسپکتروفتومتری (ماوراء بنفش - مرئی)<sup>۱</sup> [۴۸]، کروماتوگرافی گازی [49]، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا [۴۱]، الکتروفورز موئینه (CE) [۳۰]، ولتامتری برهنه‌سازی آندی<sup>۲</sup> [۵۰] و کروماتوگرافی الکتروسینتیکی مایسلی<sup>۳</sup> (MEKC) [۵۱] سازگار است. میکرواستخراج فاز مایع با فیبر توخالی ترکیب شده با اسپکتروسکوپی جذب اتمی الکتروترمال [۵۲]، همچنین اتوماتیک شدن روش دوفازی HF-LPME با دستگاه GC نیز گزارش شده است [۵۳]. کوپل دو روش میکرواستخراج فاز مایع، ورتکس<sup>۴</sup> و فیبر توخالی و آنالیز آن با HPLC برای استخراج استروژن از نمونه شیر [۵۴]، فیبر توخالی تقویت شده با نانو لوله‌های کربنی و کوپل با HPLC [۵۵]، برای استخراج هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای، استرهای فتالات، داروها، آفت‌کش‌های آلی کلردار در نمونه‌های زیست محیطی، غذایی و نمونه‌های بیولوژیکی و برای استخراج و پیش‌تغلیظ انواع فلزات استفاده شده است [۵۳].

## ۲-۴- روش‌های بهینه‌سازی فاکتورها

هر فرایند تابع تعدادی از متغیرهای مؤثر و مقدار آن‌ها می‌باشد. این متغیرهای مؤثر بر فرایند مانند، دما، زمان و ...، فاکتور یا عامل و مقدار این فاکتورها سطح نامیده می‌شود. منظور از طراحی آزمایش‌ها این است که بدانیم بهترین روش جهت تغییر فاکتورها برای رسیدن به شرایط بهینه جهت سنتز یا استخراج آنالیت مورد نظر چیست ممکن است محقق از روش قدیمی آزمون و خطا استفاده

---

۱- UV - visible

۲- Anodic stripping voltammetry

۳- Micellar electrokinetic chromatography

۴- Vortex

نماید، یعنی آزمایش‌های بسیار زیادی را در شرایط مختلف انجام دهد و پس از رد آزمایش‌های نامطلوب به آزمایش مطلوب برسد. این روش برای بررسی اثر شرایط مؤثر بر پاسخ آزمایش منطقی نیست. هر قدر تعداد داده‌ها بیشتر باشد می‌توان اطمینان بیشتری به پاسخ‌های حاصل داشت. ولی مزیت یک طراحی تجربی خوب این است که اطلاعات مورد نظر با تعداد کمتر آزمایش‌ها حاصل گردد تا ضمن برتری به لحاظ اقتصادی و صرف وقت کمتر به جهت زیست محیطی آلودگی کمتری نیز داشته باشد. علاوه بر فاکتور و سطح که تعاریف آن قبلاً ذکر شده است، به اصطلاحات دیگر طراحی آزمایش‌ها مانند نحوه آزمایش و پاسخ آزمایش می‌توان اشاره کرد. منظور از نحوه آزمایش؛ طرز عمل و شرایط انجام یک آزمایش مانند دما، فشار، غلظت یا حجم حلال و ... می‌باشد. و پاسخ آزمایش؛ خاصیتی از نظام مورد بررسی است که اندازه‌گیری می‌شود [۵۶].

پس از تعیین متغیرهایی که بر پاسخ مؤثرند، نوبت بهینه‌سازی فرایند است. یعنی تعیین سطحی از متغیرهای مهم که منجر به بهترین پاسخ می‌شوند.

در این پروژه از روش‌های تک‌عاملی و طراحی آزمایش (روش فاکتوریال) برای بهینه‌سازی متغیرها استفاده شده است. در این بخش به بررسی بیشتر این دو روش پرداخته خواهد شد.

## ۲-۴-۱- روش تک عاملی (تک متغیری)

در این روش لازم است آزمایش‌های زیادی انجام شود. برای مثال در بررسی اثر چندین متغیر بر راندمان یک واکنش می‌بایست در هر مرتبه اثر آن را در مقادیر مختلف و در شرایطی که بقیه متغیرها ثابت هستند بررسی نمود. علاوه بر صرف وقت و هزینه، اشکال دیگر این روش آن است که تداخل‌ها نیز شناخته نمی‌شوند. منظور از تداخل اثر هم‌زمان دو یا چند فاکتور مؤثر بر پاسخ یک فرایند است.

## ۲-۴-۲- طرح آزمایش (طراحی آماری)

این روش توسط فیشر<sup>۱</sup> در سال ۱۹۲۰ در انگلستان مطرح شد. برای سال‌های متمادی وی مسئول تحلیل داده‌های آماری یک ایستگاه کشاورزی در لندن بود. فیشر تحلیل واریانس<sup>۲</sup> (ANOVA) را در تلاش برای بهبود محصول‌های کشاورزی ابداع کرد و اولین کسی بود که این روش را در طراحی آزمایش‌ها به کار گرفت. بسیاری از کاربردهای اولیه روش طراحی آزمایش‌ها در علوم کشاورزی و زیست‌شناسی بوده‌اند. اما به نظر می‌رسد که اولین کاربردهای صنعتی طراحی آزمایش در اوایل سال ۱۹۳۰ در صنعت پشم‌بافی انگلستان بوده‌است. در گسترش و توسعه طراحی آزمایش‌ها افرادی هم‌چون باکس و بیسگارد<sup>۳</sup> و باکس و همکاران طرح‌های مناسب آزمایشگاهی و صنعتی را گسترش دادند [۵۷ و ۵۸].

## ۲-۴-۳- رهیافت آزمایش تجربی<sup>۴</sup> و کاربرد طراحی آزمایش

در هر بررسی تجربی پاسخ‌ها و نتیجه‌گیری‌های حاصل به شدت به روش جمع‌آوری داده‌ها بستگی دارد و بنابراین آزمایش‌ها می‌بایست در شرایط یکسان انجام پذیرد. پس از جمع‌آوری داده‌ها، نتیجه‌گیری نهایی بسیار مهم است. آزمایش‌ها در یک پروژه تحقیقاتی جهت نمایش عملیاتی فرایند با سیستم صورت می‌گیرد. همان‌طور که در شکل (۲-۴) نشان داده شده‌است فرایند را می‌توان به صورت یک مدل عمومی که شامل ترکیبی از ماشین‌ها، روش‌ها، ... و سایر منابع به کار رفته جهت تبدیل ورودی‌ها (منظور مواد اولیه و انرژی است) به خروجی یا محصول است نمایش داد. در هر فرایند

---

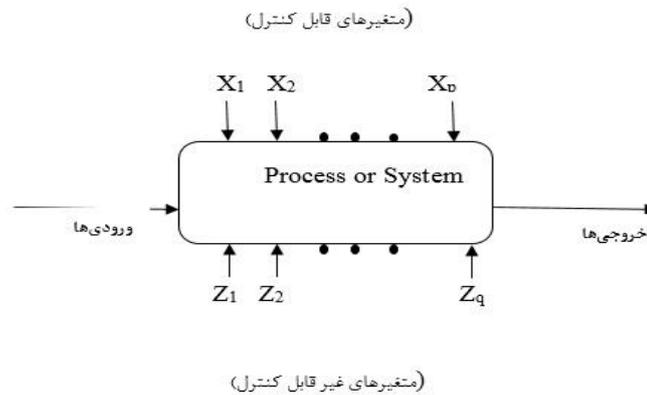
۱- Sir Ronald A. Fisher

۲- Analysis of variance

۳- Box & Bisgaard

۴- Strategy of experimentation

همواره بعضی از متغیرهای فرایند مانند  $X_1, X_2, \dots, X_n$  قابل کنترل بوده، در حالی که تعداد دیگری از متغیرها همچون  $Z_1, Z_2, \dots, Z_p$  غیر قابل کنترل می‌باشند.



شکل ۲-۴: مدل عمومی یک فرایند [۵۶]

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

- ۱- کدام متغیر بیش از سایر متغیرها بر پاسخ اثر می‌گذارد.
- ۲- تعیین مقادیر مؤثر بر عوامل ( $X$ ) برای آن که پاسخ ( $Y$ ) به پاسخ مطلوب نزدیک‌تر باشد.
- ۳- تعیین مقادیر متغیرهای مؤثر به منظور کوچک شدن تغییرات در پاسخ ( $Y$ )
- ۴- مقادیر مؤثر  $X$  چنان تنظیم گردد تا اثر متغیرهای غیرقابل کنترل کمینه گردد.

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

آزمایش بخشی از عملیات فرایند بوده و راهی است که توسط آن درمی‌یابیم فرایند یا سیستم

موردنظر کارایی دارد یا خیر و بعلاوه به وسیله انجام آزمایش، داده‌ها به دست می‌آید که در نتیجه‌گیری به آن‌ها استناد می‌شود. اطلاعات بدست آمده از داده‌ها ممکن است آزمایش‌های دیگری را پیشنهاد نماید. کاربرد طراحی آزمایش ممکن است به موارد زیر منجر شود:

۱- بهبود راندمان فرایند

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

۳- کاهش زمان فرایند

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

در ادامه با استفاده از روش‌های آماری طراحی آزمایش برای بهینه‌سازی شرایط آزمایش بهره می‌جوییم. وقتی پارامترهای متعددی در سطوح مختلف در آزمایش دخیل باشند، آنگاه طراحی یک آزمایش تجربی موثر و کارا برای رسیدن به نتایج بهینه حائز اهمیت است. استفاده از آمار در طراحی آزمایش به منظور بررسی عوامل مختلف تاثیرگذار بر روی نتایج منجر به کاهش تعداد آزمایش‌های لازم برای دستیابی به شرایط بهینه و در نتیجه کاهش زمان و هزینه می‌گردد. متداولترین روش بهینه‌سازی روش یک متغیر-در زمان است. این روش گاهی اوقات منجر به یافتن نقاط بهینه نادرست می‌شود و این امر به دلیل برهم‌کنش احتمالی بین متغیرها بوده و علاوه براین برهم‌کنش بین متغیرها را نیز نمی‌توان مشخص کرد. در عوض طرح‌های آماری قادر به تعیین همزمان تاثیر فاکتورهای مختلف بر روی پاسخ‌ها بوده و همچنین در این روش‌ها فاکتور داده شده در یک سطح چندین بار آزمایش شده و اطلاعات کمی زیادی در زمینه مهم بودن اثرات فاکتورهای مختلف و برهم‌کنش بین آن‌ها در اختیار ما قرار می‌دهد.

## ۲-۴-۴- تنظیم شرایط طراحی آزمایش

در ادامه بعد از انجام آزمایش‌های اولیه، برای تعیین ناحیه بهینه و در نهایت نقطه بهینه از طرح‌های مراحل غربالگری و بهینه‌سازی استفاده می‌کنیم. در اکثر روش‌های غربالگری برای تعیین عوامل مهم و اثر متقابل آنها از تمام عوامل بالقوه که بر پاسخ مورد نظر موثرند، استفاده می‌شود. این نوع طرح‌ها که عوامل کیفی، کمی و ترکیب آنها را به طور همزمان بررسی می‌کند شامل طرح‌های فاکتوریل کسری<sup>۱</sup> و پلاکت برمن<sup>۲</sup> و طراحی فاکتوریل کامل<sup>۳</sup> می‌باشند [۵۹].

بهینه‌سازی یکی از جنبه‌های دیگر طراحی آزمایش است که شرایط مطلوب و تنظیمات یک آزمایش را تعیین می‌کند. این مرحله شامل طرح‌های متقارن<sup>۴</sup> و نامتقارن<sup>۵</sup> بوده، که در این مطالعه از طراحی متقارن استفاده گردید. طرح‌های متقارن شامل طرح‌های سه سطحی است که به عنوان مثال می‌توان به طرح‌های مرکب مرکزی<sup>۶</sup>، باکس-بنکن<sup>۷</sup> و دوهرلت<sup>۸</sup> اشاره نمود. اغلب این طرح‌ها، دارای نقطه مرکزی با ۳ تا ۵ بار تکرار برای تخمین خطای آزمایشگاهی انجام می‌شوند.

برای بهینه‌سازی پارامترهایی که بر عملکرد روش HF-LPME تاثیر می‌گذارد، در اغلب موارد از روش یک متغیر-در-زمان<sup>۹</sup> (تک متغیری) استفاده شده است. در این روش، در یک مجموعه خاص

---

۱- Fractoinal factorial design

۲- Plackett-Burman design

۳- Full factorial design

۴- Symmetrical design

۵- Asymmetrical design

۶- Central composite design

۷- Box-Behnken design

۸- Doehlert design

۹- one - at - time

از شرایط هر پارامتر به صورت منفرد تغییر کرده، در حالی که تمام پارامترهای دیگر ثابت نگه داشته می‌شود. در روش تک متغیره نیاز به مقدار بیشتری از مواد شیمیایی به خاطر تعداد آزمایش‌های بیشتر و صرف زمان بالاتری است. علاوه بر این، از تداخل‌های احتمالی میان متغیرها صرف‌نظر شده، به طوری که شرایط مطلوب را نمی‌توان به دست آورد. روش‌های کمومتریکس مانند روش رویه پاسخ (RSM)<sup>۱</sup> بر اساس طرح تجربی این مشکلات را حل و فصل نموده است. در میان روش‌های طراحی تجربی، طراحی پلاکت - برمن به عنوان یک روش غربالگری برای زمانی که تعداد متغیرها حداقل ۵ باشد، قابل کاربرد است. این طراحی که اجازه می‌دهد تا بیشترین تعداد عوامل موثر با انجام حداقل تعداد آزمایش‌ها بررسی شود. همچنین طراحی باکس-بنکن (BBD)، به عنوان یک رویه پاسخ، در مدل سازی مفید و بهینه سازی پارامترهای موثر در روش HF-LPME قابل کاربرد است [۶۰]. با کمک این طرح آماری، تعداد آزمایش‌ها کاهش یافته و کلیه ضرایب مدل رگرسیون درجه دوم و اثر متقابل فاکتورها قابل برآورد هستند [۶۱].

## ۲-۴-۵- معرفی و مقدمات اولیه روش رویه پاسخ

در سال ۱۹۵۰، روش سطح یا رویه پاسخ توسط باکس و همکاران توسعه داده شد. این اصطلاح از منظر گرافیکی در پی شایستگی مدل ریاضی تولید شده و استفاده از آن به طور گسترده‌ای در متون در کمومتریکس به تصویب رسیده است. RSM متشکل از یک گروه از تکنیک‌های ریاضی و آماری می‌باشد که برپایه تطابق مدل‌های تجربی با داده‌های تجربی به دست آمده در ارتباط با طراحی آزمایش است. با این هدف، توابع مربع چند جمله‌ای و یا خطی برای توصیف سیستم مورد مطالعه به کار گرفته می‌شود و در نتیجه، (مدل سازی و جابجایی) شرایط تجربی تا بهینه سازی آن پویش می‌شود. هم چنین می‌توان گفت RSM مجموعه‌ای از تکنیک‌های آماری و ریاضی است که برای

---

۱- Response surface methodology

مدل‌سازی و تحلیل در برنامه‌های کاربردی که در آن پاسخ‌های مورد انتظار تحت تاثیر چندین متغیر هستند، استفاده می‌شود [۶۲].

## ۲-۴-۵-۱- فرایند طراحی در روش RSM [۶۳]

۱. طراحی یکسری آزمایش‌ها برای یک اندازه‌گیری قابل اطمینان و مناسب برای رسیدن به پاسخ موردنظر
۲. توسعه یک مدل ریاضی با بهترین تناسب در دومین دستور از رویه پاسخ
۳. یافتن یک مجموعه بهینه از پارامترهای آزمایشگاهی که مقدار حداکثر و حداقل از پاسخ را ایجاد کند.
۴. معرفی اثرات مستقیم و متقابل پارامترهای فرایند با استفاد از نمودارهای دو و سه بعدی

## ۲-۴-۶- طرح پلاکت- برمن

طراحی پلاکت- برمن که در سال ۱۹۶۴ توسط پلاکت و برمن ابداع شد، یک طراحی فاکتوریل ناقص دو سطحی است که از برهم کنش‌های بین فاکتورها صرف‌نظر می‌کند. در این طراحی که برای تعیین عوامل تاثیر گذار استفاده می‌گردد، اگر تعداد آزمایش‌ها برابر  $N$  باشد تعداد فاکتورها از رابطه  $K = N - 1$  بدست می‌آید. در این طراحی تعداد فاکتورها می‌بایستی از ۱۱ بیشتر باشد و برای حالاتی که تعداد آزمایش‌ها برابر یکی از اعداد ۱۲، ۲۰، ۲۴، ۳۶ باشد نیز به کار می‌رود [۵۹و۵۶]. زمانی که تعداد کمتری از فاکتورها را باید مطالعه کرد، فاکتورهای ساختگی افزوده می‌شوند [۶۴].

مهم‌ترین ویژگی این روش‌ها کاهش تعداد آزمایش‌ها برای ارزیابی متغیرهای چندتایی و برهم کنش بین آنها است. این تکنیک‌ها می‌توانند به طور موفقیت آمیزی با بررسی پارامترهای گوناگون برای فرایند استخراج به کار برده شوند.

## ۲-۴-۷- طراحی باکس بنکن

در این پروژه از باکس بنکن استفاده شد. این طرح یک ابزار طراحی ایده آل برای آزمایش‌های متوالی بوده و امکان بررسی خطای مدل را زمانی که مقادیر مناسبی از آزمایش در دسترس باشد را امکان پذیر می‌سازد.

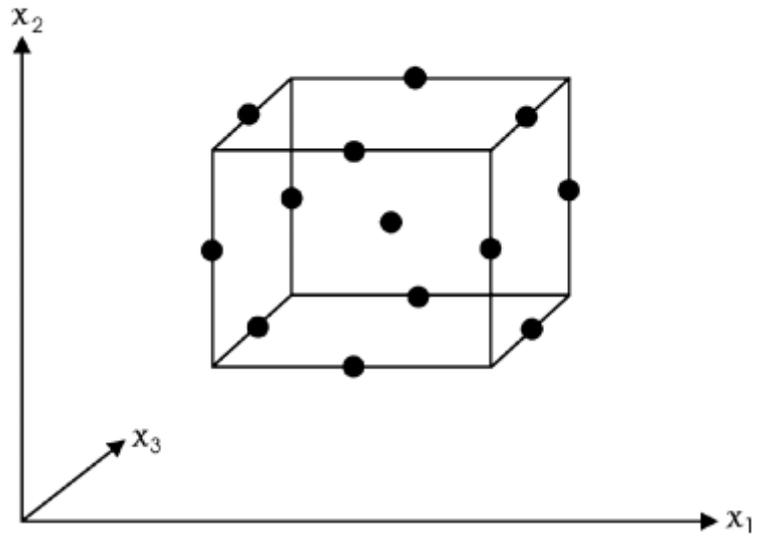
در این طراحی اثرات مهم، برهم کنش اثرات و اثرات درجه دوم بهینه و مورد ارزیابی قرار گرفت. این طرح یک مدل چرخشی یا نزدیک به طرح‌های مرتبه دوم سه سطحی طرح‌های فاکتوریل ناکامل می‌باشد [۶۵]. یکی از مهم‌ترین مزایای طرح BBD این است که شامل همه فاکتورها به طور همزمان در بالاترین و پایین‌ترین سطح خود نمی‌شود. بنابراین این طرح برای انجام آزمایش‌ها، تحت شرایط پیچیده، مفید می‌باشد. تعداد آزمایش‌ها  $N$ ، مورد نیاز برای انجام طرح BBD، از معادله زیر قابل محاسبه است:

$$N = 2k(k - 1) + C_0 \quad \text{معادله (۲-۸)}$$

که در این رابطه  $k$  تعداد فاکتورها و  $C_0$  نیز تعداد نقاط مرکزی می‌باشد. به طور مثال، ۱۵ آزمایش برای این طراحی برای ۳ فاکتور و ۳ نقطه مرکزی مورد نیاز است.

BBD یک طرح کروی و در حال چرخش است. مکعب نشان داده در شکل (۲-۵) شامل نقاط

مرکزی و میانه روی یال‌ها می‌باشد [۶۵].



شکل ۲-۵: طرح آزمایشی در روش باکس بنکن [۶۵]

فصل سوم:

بخش تجربی

### ۳-۱- مقدمه

مطابق آنچه در فصل اول درباره اهمیت اندازه‌گیری همزمان تیکلوپیدین و لوزارتان و نیز تأثیر متقابل آن‌ها در حضور هم در بدن، آورده شد، ارائه یک روش ساده و حساس برای استخراج و اندازه‌گیری این داروها در نمونه‌های بیولوژیکی ضروری به نظر می‌رسد. در این پروژه روش میکرواستخراج فاز مایع بر پایه فیبر توخالی و کوپل آن با دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، برای اندازه‌گیری مقادیر کم این داروها در نمونه‌های بیولوژیکی طراحی و به کار گرفته شد. در این فصل نتایج تجربی حاصل از روش به کار برده شده ارائه خواهد شد.

### ۳-۲- محلول‌های مورد استفاده و طرز تهیه آن‌ها

در تهیه تمام محلول‌ها از آب دو بار تقطیر و مواد شیمیایی با خلوص تجزیه ای ( و حلال‌های فاز متحرک نیز با درجه HPLC ) استفاده گردید. مشخصات مواد شیمیایی مورد استفاده در جدول (۳-۱) آمده است.

مقدار ۰/۰۱۰۰ گرم از ماده جامد تیکلوپیدین و لوزارتان ساخت شرکت داروسازی نوکام ساوه، به صورت جداگانه توزین و با متانول به حجم ۱۰/۰ میلی‌لیتر رسانده شد و به این ترتیب محلول ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (محلول مادر) از داروها تهیه شد. محلول مادر لوزارتان به مدت یک ماه و محلول مادر تیکلوپیدین ۴۵ روز در فریزر در دمای ۴- درجه سانتی‌گراد پایدار می‌باشند. محلول‌های ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر لوزارتان و تیکلوپیدین از محلول مادر آن‌ها در بالن‌های ۵/۰ میلی‌لیتری و در متانول تهیه گردید که این محلول‌ها سه روز در فریزر نگهداری و پایدار می‌باشند. محلول ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از هر دارو به صورت روزانه از محلول ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، در بالن‌های ۵/۰ میلی‌لیتری و در متانول و محلول‌های رقیق‌تر به صورت روزانه با استفاده از آب دوبار تقطیر تهیه و در یخچال نگهداری شدند. شایان ذکر است که تمامی این محلول‌ها با پیچیدن فویل آلومینیومی دور

بالنها، در مقابل نور محافظت شدند.

محلول‌های بافر فسفاتی با  $\text{pH} = 8/0 - 2/0$  از مخلوط کردن حجم‌های معینی از محلول سدیم دی‌هیدروژن فسفات  $0/067$  مولار و محلول سدیم هیدروژن فسفات  $0/067$  مولار تهیه شدند. محلول‌های بافر فسفاتی با  $\text{pH} = 3/0 - 2/0$  نیز از محلول سدیم دی‌هیدروژن فسفات  $0/067$  و فسفریک اسید  $1/00$  مولار استفاده شد.

جدول ۳-۱: مواد شیمیایی مورد استفاده

ردیف	نام ماده شیمیایی	فرمول شیمیایی	شرکت سازنده
۱	سدیم هیدروژن فسفات	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	مرک
۲	سدیم دی‌هیدروژن فسفات	$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	مرک
۳	استونیتریل	$\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$	مرک
۴	متانول	$\text{CH}_4\text{O}$	مرک
۵	اتانول	$\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$	مرک
۶	۱- اکتانول	$\text{C}_8\text{H}_{18}\text{O}$	مرک
۷	۱- هپتانول	$\text{C}_7\text{H}_{16}\text{O}$	مرک
۸	۱- آندکانول	$\text{C}_{11}\text{H}_{24}\text{O}$	مرک
۹	۱- دودکانول	$\text{C}_{12}\text{H}_{26}\text{O}$	مرک
۱۰	۱- دکانول	$\text{C}_{10}\text{H}_{22}\text{O}$	مرک
۱۱	استون	$\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$	مرک
۱۲	سدیم کلرید	$\text{NaCl}$	مرک
۱۳	هیدروکلریک اسید	$\text{HCl}$	مرک
۱۴	تیکلوپیدین	$\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{ClNS}$	داروسازی ساوه
۱۵	لوزارتان	$\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{ClN}_6\text{O}$	داروسازی ساوه
۱۶	فیبر متخلخل توخالی پلی- پروپیلنی		ممبرانا <sup>۱</sup>

### ۳-۲-۱- دستگاه‌ها و نرم‌افزارها

در این پروژه برای جداسازی و آنالیز نمونه‌ها از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (اجیلنت<sup>۱</sup> مدل ۱۱۰۰) مجهز به گاز زدایی (مدل G1374A)، حلقه ۵/۰۰ میکرولیتر، آشکارساز فرابنفش چند طول موجی (MWD)<sup>۳</sup> (مدل 1365B)، پمپ کوات<sup>۴</sup> با (مدل G1311A) استفاده شد. ستون مورد استفاده از نوع C<sub>18</sub> (۴/۵×۱۵۰ میلی‌متر با اندازه ذرات ۵ میکرومتر) بود. همچنین برای ثبت داده‌های طیفی، یک رایانه مجهز به برنامه نرم‌افزاری اجیلنت ChemStation به کار گرفته شد. برای برداشتن حجم‌های مشخصی از حلال و انتقال و تزریق آن به فیبر توخالی از یک میکروسرنگ ۲۵/۰ میکرولیتری ساخت کشور چین و برای تزریق فاز پذیرنده به دستگاه کروماتوگرافی از یک سرنگ اجیلنت ۵۰/۰ میکرولیتری استفاده شد. برای تنظیم pH محلول‌های بافری، از pH متر دیجیتالی ساخت شرکت مترام مدل ۷۸۰<sup>۵</sup> با دقت ۰/۰۱۰ مجهز به الکترود ترکیبی شیشه‌ای-کالومل (۳/۰ مولار پتاسیم کلرید) استفاده شد. برای سانتیفریوژ کردن محلول‌ها از دستگاه سانتیفریوژ ساخت شرکت بنیامین طب استفاده شد. برای همزدن محلول نمونه نیز از همزن مغناطیسی<sup>۶</sup> هایدولف<sup>۷</sup>، (مدل Mr-Hie Standard) و مگنت ۰/۷ سانتی‌متری استفاده شد. برای یکنواخت ساختن و گاز زدایی از مخلوط فاز متحرک، اولتراسونیک بندلین الکترونیک<sup>۸</sup> مدل DT 510 H مورد استفاده قرار گرفت.

---

۱- Agilent

۲- Degasser

۳- Multi wave length detector

۴- Quat pump

۵- Metrohm 780

۶- Magnetic stirrer

۷- Heidolph

۸- Bandelin electronic

برای وزن کردن حجم معینی از مواد شیمیایی از ترازوی تجزیه‌ای با دقت ۰/۱ میلی‌گرم سارتریوس<sup>۱</sup> A200S ساخت شرکت آلمان استفاده شد. همچنین برای برداشتن حجم معینی از حلال آلی از میکروپیپت‌های ۱۰۰۰/۰ و ۱۰۰/۰ میکرولیتری با حجم قابل تنظیم ساخت شرکت اپندورف<sup>۲</sup> (مدل Research 100) استفاده گردید.

برای طراحی آزمایش‌ها به منظور تعیین تاثیر گذارترین فاکتورها و یافتن نقطه بهینه واقعی برای استخراج تیکلوپیدین و لوزارتان از نرم‌افزار آماری Minitab 16 استفاده شد.

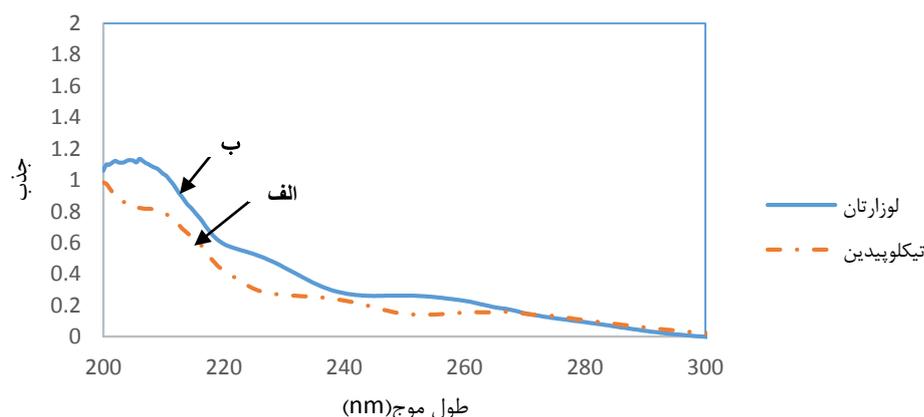
### ۳-۲-۲- طیف جذبی

برای تعیین طول موج‌های دارای جذب ماکزیمم داروهای تیکلوپیدین و لوزارتان، طیف جذبی محلول‌های این داروها ثبت گردید. به این ترتیب که به یک بالن حجمی ۱۰/۰ میلی‌لیتری به ترتیب ۱/۰ میلی‌لیتر محلول داروی مورد نظر با غلظت ۵/۰ میلی‌گرم بر لیتر با فاز متحرک تعیین شده (ترکیب آب: استونیتریل: بافر فسفات با pH برابر با ۲/۷۰، با نسبت ۷۰:۹۰:۴۰) به حجم رسانده شد. پس از یکنواخت کردن محلول، مقداری از آن به داخل سل اسپکتروفتومتر منتقل و طیف جذبی آن نسبت به فاز متحرک در ناحیه ۲۰۰-۴۰۰ نانومتر، ثبت شد. شکل (۳-۱) طیف جذبی محلول ۵/۰ میلی‌گرم بر لیتر تیکلوپیدین و لوزارتان را نشان می‌دهد. باتوجه به این که به طور معمول در اندازه‌گیری‌های کروماتوگرافی با دتکتور UV، از طول موج‌های پایین تر از ۲۱۵ نانومتر استفاده نمی‌گردد [۱۷-۱۵]، طول موج ۲۱۸ نانومتر برای اندازه‌گیری این دو دارو استفاده گردید.

---

۱- Sartorius

۲- Eppendorf



شکل ۳-۱: طیف جذبی تیکلوپیدین و لوزارتان نمودار الف) و خط چین طیف داروی تیکلوپیدین و نمودار ب) طیف داروی لوزارتان شرایط آزمایش: محلول ۵/۰ میلی گرم بر لیتر دو دارو در فاز متحرک

### ۳-۲-۳- شرایط کروماتوگرافی و تهیه فاز متحرک

جهت تهیه فاز متحرک (بر مبنای زمان بازداری، شکل پیک و تفکیک) برای جداسازی لوزارتان و تیکلوپیدین، ترکیب آب: استونیتریل: بافر فسفات با pH برابر با ۲/۷۰، با نسبت ۷۰:۹۰:۴۰ در ۲۰۰/۰ میلی لیتر، در نظر گرفته شد [۱۸]. فاز متحرک ابتدا به منظور همگن سازی و گاز زدایی آن در حمام اولتراسونیک قرار داده شد. پس از آن نیز با قرار دادن در مخازن فاز متحرک دستگاه کروماتوگرافی، در هر لحظه برای ورود به ستون، توسط میکروفیلتر صاف و هوازدایی شد و از گاز زدای دستگاه عبور و عاری از حباب و گاز شده است. پاسخ کروماتوگرافی با توجه به ماکزیمم شدت جذب برای دو دارو، در طول موج ۲۱۸ برای تیکلوپیدین و لوزارتان ثبت گردید. کلیه آزمایش ها در دمای اتاق و با سرعت جریان فاز متحرک ۱/۰ میلی لیتر بر دقیقه انجام گردید. قبل از تزریق نمونه به داخل ستون، اجازه داده شد تا فاز متحرک برای مدت زمان حدود یک ساعت با سرعت جریان ۱/۰ میلی لیتر بر دقیقه از داخل ستون عبور کرده تا ستون به حالت تعادل برسد.

### ۳-۳- روش کار در بهینه‌سازی پارامترهای مؤثر بر اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان

محلول ۱۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر از داروی تیکلوپیدین و محلول ۵/۰ میلی‌گرم بر لیتر لوزارتان از محلول‌های مادر (شرح داده شده در قسمت ساخت محلول‌های استاندارد) در بالن ۱۰/۰ میلی‌لیتری تهیه گردید. برای انجام هر استخراج به ترتیب مراحل زیر عمل شد:

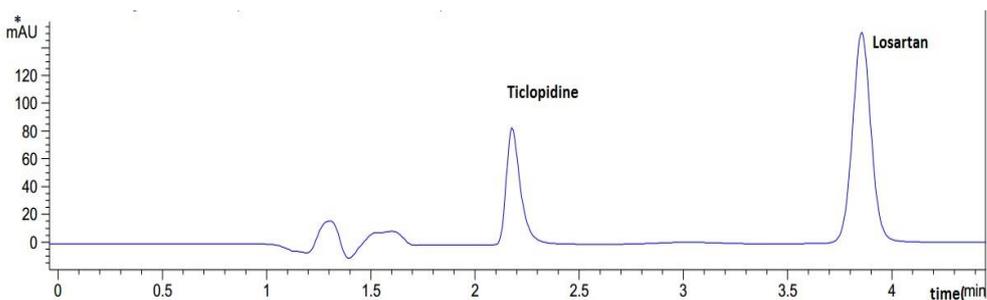
در یک ظرف نمونه، ۱/۰ میلی‌لیتر از محلول ۱۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر تیکلوپیدین و ۱/۰ میلی‌لیتر محلول لوزارتان ۵/۰ میلی‌گرم بر لیتر، ۱/۰ میلی‌لیتر بافر فسفاتی با  $\text{pH} = 3/0$  افزوده شد و سپس با آب دو بار تقطیر به حجم ۱۰/۰ میلی‌لیتر رسانده شد. به موازات تهیه نمونه، فیبرهای پلی‌پروپیلن در ابعاد ۶/۰ سانتی‌متر بریده شدند (حجم این فیبرها مطابق با حجم یک استوانه به شعاع ۳۰۰ میکرومتر و طول ۶/۰ سانتی‌متر، ۱۶/۹۰ میکرولیتر است). فیبرهای برش داده‌شده به منظور حذف هر گونه ماده همراه احتمالی به مدت ۱۰ دقیقه در یک لوله آزمایش حاوی استون مرک غوطه‌ور شدند و پس از آن ۵ دقیقه در حمام اولتراسونیک قرار گرفتند و سپس در دمای محیط خشک شدند [۳۰]. سپس فیبر داخل یک میکروتیوپ حاوی حلال آلی ۱- اکتانول به صورت عمودی قرار داده شد تا کاملاً به حلال آغشته و خلل و فرج فیبر متخلخل از حلال پر شود. پس از اطمینان از نفوذ کامل حلال، فیبر از حلال خارج و حلال اضافی که داخل لومن فیبر گیر افتاده، از انتهای آن با ضربه‌های متوالی روی یک دستمال خارج گردید. فیبر به مدت ۵ ثانیه داخل آب به شکل U گذاشته شد تا حلال اضافی از روی سطح آن حذف شود [۶۶]. در این حین، فاز گیرنده (حلال آلی ۱- اکتانول) به میزان ۱۶/۹ میکرولیتر) به داخل میکروسرنگ کشیده شد. سپس حلال به داخل فیبر تزریق و انتهای فیبر با فویل آلومینیومی کوچک بسته شد. فیبر داخل محلول آنالیت قرار داده و میکروسرنگ توسط یک گیره به پایه نگهداشته شد و سپس کل مجموعه، یعنی میکروسرنگ و ظرف آزمایش روی یک همزن مغناطیسی قرار داده شد. سرعت چرخش محلول روی سرعت ۹۰۰ دور در دقیقه (rpm) تنظیم گردید. در این مرحله باید دقت شود که مگنت در حال همزدن، فیبر را از نوک سرنگ جدا نکند. بعد

از اتمام ۶۰ دقیقه زمان استخراج، فیبر از داخل محلول آبی خارج و انتهای فیبر با قیچی بریده شد و فاز داخل فیبر (حلال آلی اکتانول حاوی آنالیت‌ها) به داخل سرنگ کشیده شد. حلال به یک میکروتیوپ ۱/۵ میلی‌لیتری (ویال) منتقل و پس از تهیه فاز متحرک و آماده‌سازی ستون، مقداری از آن با دقت به HPLC تزریق شد. برای محلول شاهد نیز به طور مشابه عمل شد با این تفاوت که محلول شاهد فاقد داروهای تیکلوپیدین و لوزارتان بود. اختلاف سیگنال محلول نمونه (مجموع سطوح زیر منحنی دو آنالیت) و شاهد به عنوان سیگنال تجزیه‌ای مورد استفاده قرار گرفت.

برای رسم منحنی کالیبراسیون مستقیم تیکلوپیدین و لوزارتان به شیوه زیر عمل شد: در این مرحله، محلول‌های ۲۰۰/۰ و ۱۰۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر از هر دارو از محلول مادر به صورت جداگانه در متانول تهیه شد. محلول‌هایی با غلظت‌های متفاوتی از لوزارتان و تیکلوپیدین با رقیق‌سازی از محلول‌های ساخته شده از هر دو دارو در ۱- اکتانول (حلال استخراج بهینه) تهیه شد. انتقال حجم‌های متفاوت از داروها و حلال با استفاده از میکروپیپت‌های ۱۰۰/۰ و ۱۰۰۰/۰ میکرولیتری انجام شد. محلول داخل این ویال‌ها به دقت به HPLC تزریق و سطح زیر پیک دو دارو در طول موج ۲۱۸ نانومتر برای آن‌ها ثبت گردید. منحنی کالیبراسیون نیز از رسم تغییرات سیگنال تیکلوپیدین و لوزارتان بر حسب غلظت آن‌ها بدست آمد، که نتایج مربوط به دو دارو در جدول (۳-۲) و شکل (۳-۳) برای تیکلوپیدین و جدول (۳-۳) و شکل (۳-۴) برای لوزارتان آورده شده است. محدوده غلظتی ۰/۵-۵۰۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر برای تیکلوپیدین و محدوده غلظتی ۰/۵-۶۰۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر برای لوزارتان خطی می‌باشد. کروماتوگرام حاصل از محلول استاندارد ۱۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر تیکلوپیدین و لوزارتان در شکل (۳-۲) نشان داده شده است. محور افقی زمان بازداری بر حسب دقیقه و محور عمودی واحد جذب (mAU)<sup>۱</sup> را نمایش می‌دهد.

---

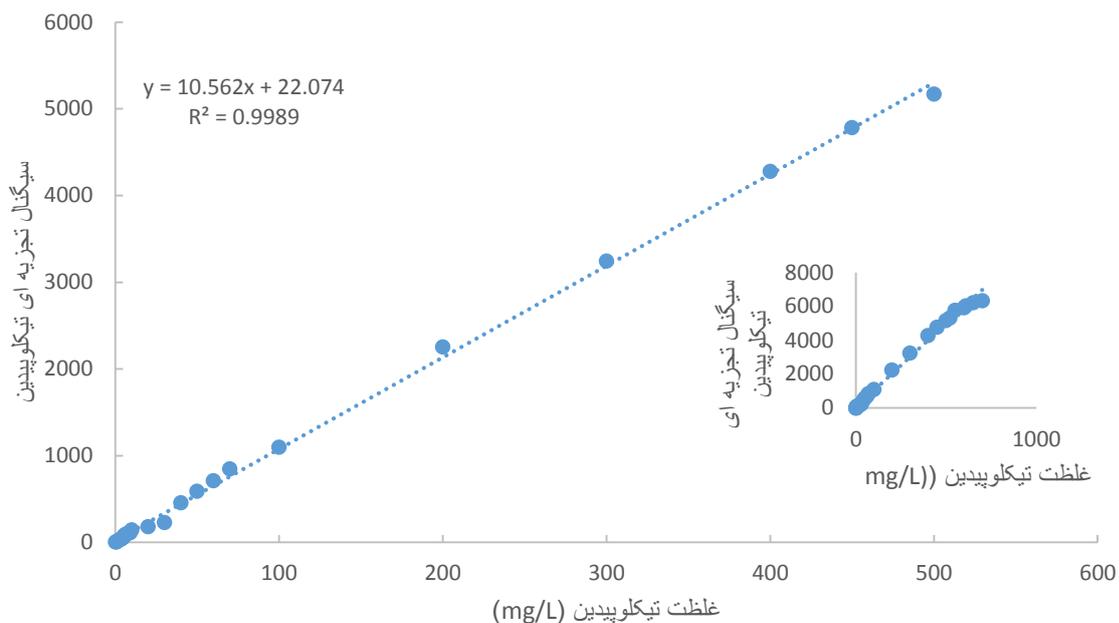
۱- MI absorbance unit



شکل ۲-۳: کروماتوگرام محلول استاندارد ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر تیکلوپیدین و لوزارتان برابر با ۲/۷۰، با نسبت ۷۰:۹۰:۴۰ به عنوان فاز متحرک، pH شرایط آزمایش: ترکیب آب: استونیتریل: بافر فسفات با سرعت جریان ۱/۰ میلی لیتر بر دقیقه، حجم لوب ۵/۰ میکرولیتر، طول موج اندازه گیری ۲۱۸ نانومتر

جدول ۲-۳: سیگنال های مستقیم بدست آمده برای محلول های تیکلوپیدین با غلظت های متفاوت

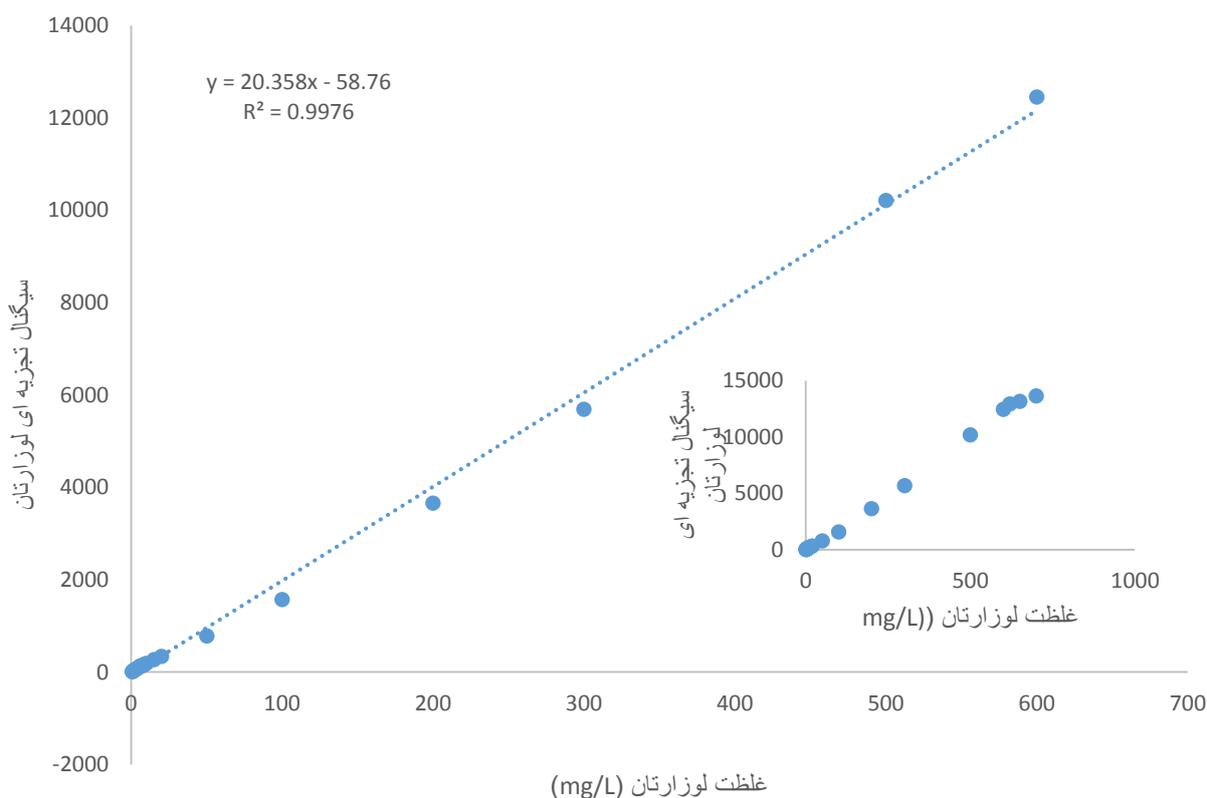
غلظت تیکلوپیدین (میلی گرم بر لیتر)	سیگنال تجزیه ای	غلظت تیکلوپیدین (میلی گرم بر لیتر)	سیگنال تجزیه ای
۰/۵	۸/۵	۵۰/۰	۵۹۰/۰
۱/۰	۱۰/۴	۶۰/۰	۷۱۰/۰
۲/۰	۲۲/۶	۷۰/۰	۸۴۷/۰
۳/۰	۳۳/۵	۱۰۰/۰	۱۱۰۰/۰
۳/۵	۳۸/۰	۲۰۰/۰	۲۲۵۴/۰
۴/۰	۴۶/۲	۳۰۰/۰	۳۲۴۵/۰
۵/۰	۵۸/۳	۴۰۰/۰	۴۲۸۰/۰
۵/۵	۷۸/۴	۴۵۰/۰	۴۷۸۳/۰
۶/۰	۹۰/۴	۵۰۰/۰	۵۱۷۰/۰
۷/۰	۱۰۲/۰	۵۲۰/۰	۵۳۲۱/۰
۸/۰	۱۰۶/۲	۵۵۰/۰	۵۷۶۸/۰
۹/۰	۱۱۰/۳	۶۰۰/۰	۵۹۲۳/۰
۱۰/۰	۱۴۵/۰	۶۱۰/۰	۶۰۳۲/۰
۲۰/۰	۱۸۰/۰	۶۵۰/۰	۶۲۳۴/۰
۳۰/۰	۲۳۰/۰	۷۰۰/۰	۶۳۴۷/۰
۴۰/۰	۴۵۷/۰		



شکل ۳-۳: منحنی کالیبراسیون مستقیم تیکلوپیدین  
 شرایط آزمایش: غلظت‌های مختلف از آنالیت در حجم ۰/۵ میلی‌لیتر در حلال ۱- اکتانول، ترکیب آب: استونیتریل؛  
 بافر فسفات (pH = ۲/۷) به عنوان فاز متحرک، سرعت جریان ۱/۰ میلی‌لیتر بر دقیقه، حجم لوپ ۵/۰ میکرولیتر، طول  
 موج اندازه‌گیری ۲۱۸ نانومتر

جدول ۳-۳: سیگنال‌های مستقیم بدست آمده برای محلول‌های لوزارتان با غلظت‌های متفاوت

غلظت لوزارتان (میلی‌گرم بر لیتر)	سیگنال تجزیه‌ای	غلظت لوزارتان (میلی‌گرم بر لیتر)	سیگنال تجزیه‌ای
۰/۵	۱۲/۴	۹/۰	۱۷۲/۰
۱/۰	۱۸/۳	۱۰/۰	۱۸۷/۰
۱/۵	۳۵/۲	۱۵/۰	۲۷۱/۰
۲/۰	۴۴/۶	۲۰/۰	۳۴۵/۰
۲/۵	۵۳/۸	۵۰/۰	۷۸۶/۰
۳/۰	۶۳/۲	۱۰۰/۰	۱۵۷۰/۰
۴/۰	۸۳/۰	۲۰۰/۰	۳۶۵۷/۰
۴/۵	۹۴/۰	۳۰۰/۰	۵۶۹۲/۰
۵/۰	۱۰۸/۷	۵۰۰/۰	۱۰۲۱۰/۰
۵/۵	۱۲۰/۲	۶۰۰/۰	۱۲۴۵۳/۰
۶/۰	۱۲۶/۳	۶۲۰/۰	۱۲۹۴۴/۰
۷/۰	۱۳۲/۱	۶۵۰/۰	۱۳۱۷۵/۰
۸/۰	۱۴۷/۰	۷۰۰/۰	۱۳۶۵۱/۰



شکل ۳-۴: منحنی کالیبراسیون مستقیم لوزارتان

غلظت‌های مختلف از آنالیت در حجم ۰/۵ میلی‌لیتر در حلال ۱-اکتانول، ترکیب آب: استونیتریل: بافر فسفات (۲/۷) = pH، با نسبت ۷۰:۹۰:۴۰ به عنوان فاز متحرک، سرعت جریان ۱/۰ میلی‌لیتر بر دقیقه، حجم لوب ۵/۰ میکرولیتر، طول موج اندازه‌گیری ۲۱۸ نانومتر

### ۳-۱- بررسی و بهینه‌سازی پارامترهای موثر بر استخراج تیکلوپیدین و لوزارتان به روش HF-LPME

#### LPME

به منظور فراهم نمودن بهترین حساسیت، و در نتیجه بهترین حد تشخیص، در این پروژه بهینه‌سازی پارامترها در ابتدا به صورت یک متغیر در زمان و پس از تعیین تقریبی حدود بهینه، از روش طراحی آزمایش برای شناسایی فاکتورهای مهم و میزان تاثیر آنها و تعیین نقطه بهینه استفاده گردید. به منظور دستیابی به حداکثر میزان بازیابی در استخراج، پارامترهای موثر بر بازیابی استخراج لوزارتان و تیکلوپیدین، در سیستم دو فازی روش میکرواستخراج فاز مایع با فیبر متخلخل توخالی

شامل موارد زیر مورد بررسی قرار گرفتند.

۱. نوع حلال استخراج
۲. pH محلول نمونه (فاز دهنده آبی)
۳. نوع بافر
۴. حجم بافر
۵. زمان استخراج
۶. سرعت همزدن محلول نمونه
۷. قدرت یونی
۸. طول فیبر یا حجم حلال استخراج کننده (فاز پذیرنده داخل لومن فیبر)

این پارامترها ابتدا توسط روش تک متغیری مورد بررسی قرار گرفتند و سپس با توجه به مقادیر بهینه، سطح مورد نظر هر فاکتور برای روش طراحی آزمایش تعیین گردید.

### ۳-۳-۲- نتایج حاصل از بهینه‌سازی یک متغیر در یک زمان

نتایج به دست آمده در بررسی و بهینه‌سازی پارامترهای مؤثر بر عملکرد سیستم میکرواستخراج فاز مایع با فیبر توخالی به روش بهینه‌سازی یک متغیر در یک زمان در جدول (۳-۴) نشان داده شده است. در تمام مراحل بهینه‌سازی پارامترها در روش تک متغیری، غلظت لوزارتان ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و غلظت تیکلوپیدین برابر با ۱/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در ظرف آزمایش ثابت و آزمایش‌ها در دمای محیط انجام شد. لازم به ذکر است که تمامی نتایج و نمودارهای مربوط به بهینه‌سازی پارامترها به روش تک متغیری، در پیوست پایان نامه آورده شده است.

جدول ۳-۴: نتایج حاصل از بهینه‌سازی یک متغیر در یک زمان برای اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان

فاکتور	محدوده تغییرات	نقطه بهینه
حلال استخراج	۱-اکتانول، ۱- دکانول، آندکانول، ۱- دودکانول، ۱- هپتانول	۱-اکتانول
pH	۲/۰-۸/۰	۴/۵
نوع بافر	استاتی-فسفاتی-فتالاتی	فسفاتی
حجم بافر (ml)	۰/۵-۳/۵	۲/۰
نمک افزوده شده (w/v) %	۰/۰-۸/۰	۵/۰
سرعت چرخش (rpm)	۱۰۰-۱۲۰۰	۱۰۰۰/۰
طول فیبر (cm)	۴/۰-۱۰/۰	۸/۰
زمان استخراج (دقیقه)	۱۰-۷۰	۶۰/۰

### ۳-۴- بررسی عوامل تأثیرگذار و بهینه‌سازی عوامل مؤثر بر اندازه‌گیری تیکلوپیدین و

#### لوزارتان با استفاده از طراحی آزمایش<sup>۱</sup> (DOE)

هدف از بکارگیری تکنیک‌های مختلف طراحی آزمایش‌ها، شناسایی عوامل مؤثر در فرآیند و تعیین مقادیر بهینه‌ی آن‌ها می‌باشد. با کمک تکنیک‌های DOE می‌توان اولاً متغیرهایی که بیشترین تأثیر را در خروجی دارند، تعیین کرد. ثانياً متغیرهای ورودی مؤثر را به گونه‌ای تعیین کرد که مقادیر پاسخ را به مقدار بهینه واقعی خود نزدیک نماید. همانطور که در بخش قبل دیده شد، پارامترهایی نظیر pH، نوع حلال استخراج کننده، طول فیبر، اثر نمک، نوع بافر، حجم بافر، زمان استخراج و سرعت همزدن محلول نمونه در میزان پاسخ آشکارساز و حساسیت روش مؤثر هستند. از طرف دیگر احتمال برهم‌کنش متغیرها وجود دارد و در نتیجه شرایط حاصل از بهینه‌سازی یک متغیر در یک زمان نمی‌تواند شرایط بهینه واقعی باشد و از طرفی نیاز به تعداد آزمایش‌های زیاد و وقت گیر آزمایشگاهی است، بنابراین لازم است اثر فاکتورهای مؤثر بر حساسیت با استفاده از روش‌های طراحی آزمایش مورد بررسی قرار گیرد. به این منظور برای تعیین فاکتورهای مؤثر بر راندمان استخراج و مشخص نمودن اثر

1- Design of experiment

هر یک از این فاکتورها، طرح پلاکت- برمن دو سطحی طراحی و اجرا شد. پس از مشخص شدن پارامترهای مؤثر، طرح آزمایشی باکس- بنکن نیز برای یافتن شرایط بهینه واقعی با استفاده از فاکتورهای مهم تعیین شده توسط طرح پلاکت- برمن به کار برده شد.

### ۳-۴-۱- تعیین سطح فاکتورها

هر یک از پنج فاکتور مورد مطالعه در دو سطح (بالا و پایین)، مورد آزمون قرار گرفته (جدول ۳-۵) و مجموع سطح زیر پیک دو دارو به عنوان پاسخ آزمایش‌ها در نظر گرفته شد. سطوح فاکتورها با استفاده از آزمایش‌های اولیه در بهینه‌سازی تک متغیری تعیین شدند. لازم به ذکر است بعضی از فاکتورهای مؤثر بر روش مانند نوع حلال استخراج، نوع بافر و حجم آن همان مقادیر بدست آمده از روش تک متغیری در نظر گرفته شد.

جدول ۳-۵: فاکتورها و سطوح تعیین شده برای آن‌ها

سطح		علامت	نام فاکتور
بالا (+)	پایین (-)		
۶/۲	۲/۸	A	pH
۶	۱	B	طول فیبر (cm)
۶۰	۲۰	C	زمان استخراج (دقیقه)
۱۰۰۰	۱۰۰	D	درصد نمک افزوده شده (w/v) %
۹/۰	۵/۰	E	سرعت همزدن محلول (rpm)

### ۳-۴-۱-۱- اجرای طرح پلاکت- برمن

برای طراحی آزمایش‌ها جهت غربال کردن فاکتورها و تعیین فاکتورهای مؤثر بر روی اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان از نرم افزار Minitab 16 برای انجام طرح پلاکت-برمن و پردازش داده‌ها استفاده

شد. طرح پلاکت- برمن برای فاکتورهای pH، طول فیبر، سرعت همزن، قدرت یونی و زمان در دوسطح و با دو تکرار انجام شد که تعداد کل آزمایش‌ها با توجه به بخش (۲-۴-۶)، ۲۴ آزمایش می‌باشد. در تمامی ۲۴ آزمایش، میکرواستخراج بر اساس روش کار زیر انجام گردید.

در یک ظرف نمونه، ۱/۰ میلی‌لیتر از محلول ۱۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر تیکلوپیدین و ۱/۰ میلی‌لیتر محلول لوزارتان ۵/۰ میلی‌گرم بر لیتر، ۲/۰ میلی‌لیتر بافر فسفاتی با pH مورد نظر و مقدار نمک مورد نظر افزوده شد و سپس با آب دو بار تقطیر به حجم ۱۰/۰ میلی‌لیتر رسانده شد. به موازات تهیه نمونه، فیبرهای پلی‌پروپیلن در ابعاد مورد نظر بریده و مطابق بخش ۳-۳ آماده‌سازی شدند. اکنون فیبر را داخل یک میکروتیوپ حاوی حلال آلی ۱- اکتانول به صورت عمودی قرار داده تا کاملاً به حلال آغشته و در این حین، فاز گیرنده (حلال آلی) (۱- اکتانول) به داخل میکروسرنگ کشیده شد. سپس حلال به داخل فیبر تزریق شد و انتهای فیبر با فویل آلومینیومی کوچک بسته می‌شود. فیبر داخل محلول آنالیت قرار داده و میکروسرنگ توسط یک گیره به پایه نگهداشته شد. و سپس کل مجموعه، یعنی میکروسرنگ و ظرف آزمایش روی یک همزن مغناطیسی قرار داده شد. سرعت چرخش محلول روی سرعت مورد نظر تنظیم گردید. بعد از اتمام زمان استخراج، فیبر از داخل محلول آبی خارج و انتهای فیبر با قیچی بریده شده و فاز داخل فیبر (حلال آلی اکتانول حاوی آنالیت‌ها) به داخل سرنگ کشیده شد. حلال به یک میکروتیوپ ۱/۵ میلی‌لیتری (ویال) منتقل و مقداری از آن با دقت به HPLC تزریق شد

جدول (۳-۶) ماتریس طرح فاکتوریال مورد استفاده برای پنج فاکتور آزمایشی و مقادیر مجموع سطح زیر پیک [۶۸-۶۶] کروماتوگرام برای دو آنالیت را که به عنوان سیگنال تجزیه‌ای در نظر گرفته شده، نشان می‌دهد. لازم به ذکر است در تمام آزمایش‌ها نمونه شاهد نیز اندازه‌گیری شد.

جدول ۳-۶: ماتریس طرح پلاکت برمن و پاسخ‌ها در استخراج تیکلوپیدین و لوزارتان با روش HF-LPME

شماره آزمایش	فاکتورها					پاسخ
	A	B	C	D	E	
۱	+۱	+۱	-۱	-۱	+۱	۲۲۳۸/۳۳
۲	+۱	-۱	-۱	-۱	+۱	۴۶۸۵/۶۱
۳	-۱	+۱	-۱	+۱	+۱	۳۲۰/۲۷
۴	+۱	+۱	+۱	+۱	-۱	۳۱۲۵/۰۰
۵	-۱	-۱	-۱	+۱	-۱	۲۰۶/۵۲
۶	+۱	+۱	-۱	+۱	-۱	۳۶۵۲/۰۰
۷	-۱	+۱	+۱	-۱	-۱	۳۰۶/۶۸
۸	+۱	-۱	+۱	+۱	+۱	۴۸۹۹/۷۳
۹	-۱	+۱	+۱	-۱	+۱	۴۹۵/۰۹
۱۰	-۱	-۱	-۱	-۱	-۱	۱۶۰/۵۹
۱۱	-۱	-۱	+۱	+۱	+۱	۴۲۰/۸۳
۱۲	+۱	-۱	+۱	-۱	-۱	۴۳۰۷/۶۱
۱۳	+۱	+۱	-۱	-۱	+۱	۳۲۱۲/۱۶
۱۴	+۱	-۱	+۱	-۱	-۱	۴۰۷۹/۴۵
۱۵	+۱	+۱	-۱	+۱	-۱	۱۹۷۹/۱۹
۱۶	-۱	-۱	-۱	+۱	-۱	۱۹۵/۵۷
۱۷	-۱	+۱	+۱	-۱	-۱	۵۰۰/۹۱
۱۸	+۱	-۱	-۱	-۱	+۱	۳۶۶۳/۰۱
۱۹	+۱	-۱	+۱	+۱	+۱	۴۷۷۰/۲۷
۲۰	-۱	+۱	+۱	-۱	+۱	۵۲۴/۱۶
۲۱	-۱	+۱	-۱	+۱	+۱	۲۵۷/۲۳
۲۲	+۱	+۱	+۱	+۱	-۱	۲۸۷۲/۴۰
۲۳	-۱	-۱	-۱	-۱	-۱	۱۵۵/۳۲
۲۴	-۱	-۱	+۱	+۱	+۱	۴۰۵/۳۵

### ۳-۴-۱-۲- ارزیابی نتایج حاصل از طرح پلاکت برمن

در این قسمت با استفاده از نرم افزار Minitab 16، عوامل موثر به ترتیب اهمیت تشخیص داده شدند.

برای تأیید معنی‌دار بودن اثر فاکتورهای انتخاب شده بر نتایج حاصله، آنالیز مدل خطی انجام و نتایج

حاصل در جدول (۷-۳) نشان داده شد.

جدول ۷-۳: نتایج حاصل از آنالیز مدل خطی طرح پلاکت-برمن در استخراج تیکلوپیدین و لوزارتان

عبارت	اثر <sup>۱</sup>	ضریب <sup>۲</sup>	ضریب خطای استاندارد <sup>۳</sup>	T	P
ثابت	-	۱۹۷۲/۰	۱۱۰/۱	۱۷/۸۹	۰/۰۰۰
A	۳۲۹۴/۴	۱۶۴۷/۷	۱۱۰/۱	۱۴/۹۸	۰/۰۰۰
B	-۷۰۵/۸	-۳۴۸/۴	۱۱۰/۱	-۳/۳۱	۰/۰۰۵
C	۵۰۷/۲	۲۵۳/۶	۱۱۰/۱	۲/۳۰	۰/۰۳۴
D	-۱۰۲/۵	-۵۱/۲	۱۱۰/۱	-۰/۴۶	۰/۶۴۸
E	۳۶۲/۶	۱۸۵/۷	۱۱۰/۱	۱/۶۵	۰/۱۱

در جدول (۷-۳) ضرایب رگرسیونی نشان داده شده است که در ادامه به تفسیر آنها پرداخته می‌شود.

اثر: مقدار اثر هر متغیر از رابطه زیر به دست می‌آید:

$$effect = \frac{\sum Y_+}{n_+} + \frac{\sum Y_-}{n_-} \quad (۱-۳)$$

n نشان دهنده تعداد داده‌ها در هر سطح محاسبه شده می‌باشد.  $Y^+$  نشان دهنده جمع یا پیوستگی پاسخ‌هایی که در آن متغیر مورد بررسی در سطح بالا و  $Y^-$  پاسخ‌هایی که در آن متغیر مورد بررسی در سطح پایین خود است، می‌باشند. مقدار مثبت هر اثر نشان دهنده آن است که با افزایش سطح یک متغیر از پایین به بالا مقدار پاسخ افزایش می‌یابد و همچنین مقدار منفی یک اثر نشان دهنده آن است که با افزایش سطح یک متغیر از پایین به بالا مقدار پاسخ کاهش می‌یابد. بنابراین با توجه به اثرهای نشان داده شده در جدول (۷-۳)، pH بالاترین اثر را در میان فاکتورها دارد، در نتیجه تاثیر آن

۱- Effect

۲- Coefficient

۳- Standard error coefficient

۴- P- value

بر روی پاسخ بیشتر است.

ضریب: مقدار ضریب هر متغیر از تقسیم اثر هر متغیر بر دو بدست می‌آید. با توجه به ضرایب نشان داده شده در جدول (۷-۳) هر چه مقدار ضریب بیشتر باشد تاثیر آن اثر بر روی پاسخ بیشتر است.

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

**ضریب خطای استاندارد:** همچنین برای هر ضریب یک انحراف استاندارد تخمین ضرایب رگرسیون گزارش شده است که نشان‌دهنده اندازه خطای تجربی (تصادفی) می‌باشد که روی ضریب تاثیر می‌گذارد. مقدار آن مثبت است و مقدار کوچک آن نشان‌دهنده برآورد دقیق‌تر است.

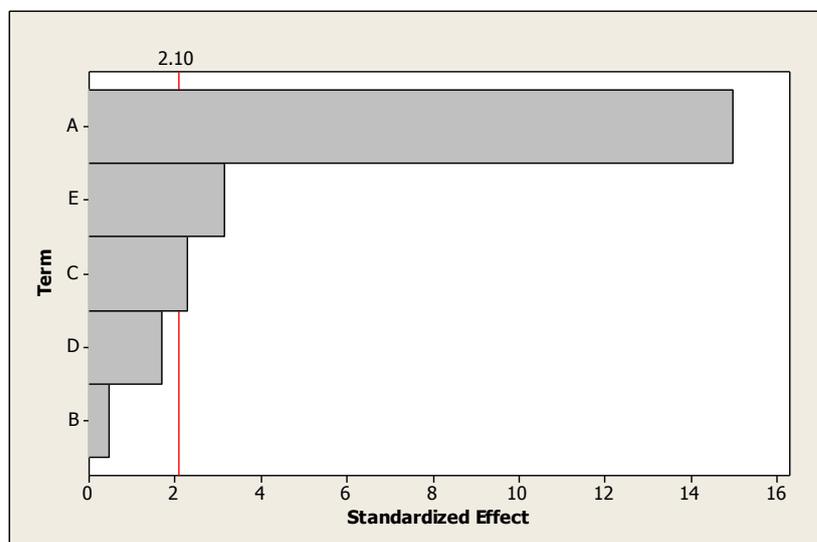
**آماره T:** مقدار T گزارش شده در جدول نشان می‌دهد که ضریب در برابر خطای استاندارد چقدر بزرگ است و مفهوم آن چیزی شبیه نسبت سیگنال به نویز می‌باشد. مقدار T از تقسیم کردن هر ضریب بر خطای استاندارد مطابق رابطه (۳-۳) به دست می‌آید. با توجه به نتایج در جدول (۷-۳) مقدار t مربوط به pH بیشتر، در نتیجه تاثیر آن بر روی پاسخ نیز بیشتر است.

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

**ارزش P:** برای تعیین اهمیت فاکتورها، میزان احتمال (ارزش P) کمتر از ۰/۰۵ ( $P < 0/05$ ) به عنوان نقطه حد در نظر گرفته شد. بنابراین عامل‌ها با ارزش P کمتر از ۰/۰۵ به عنوان فاکتور موثر مهم در پاسخ و فاکتورهای با ارزش P بیشتر از ۰/۰۵ به عنوان فاکتور غیر مهم بر پاسخ می‌باشند. مقدار p کمتر از ۰/۰۵ نشان‌دهنده اهمیت آماری یک اثر در سطح اطمینان ۰/۹۵ می‌باشد. با توجه به مقدار p در داده‌های جدول (۷-۳)، فاکتورهای طول فیبر، pH محلول نمونه و زمان استخراج، اثرات معنی‌داری بر پاسخ دارند.

همچنین از نمودارهایی که می‌تواند در تعیین عامل‌های اصلی کمک کنند، نمودار پارتو<sup>۱</sup>، می‌باشد، که در ادامه به نتایج حاصل از آن خواهیم پرداخت.

**نمودار پارتو:** از نمودار پارتو برای بررسی و ارزیابی اثر فاکتورهای به کار برده شده در این طرح استفاده شد. در این نمودار طول هر ستون متناسب با اهمیت هر یک از فاکتورها می‌باشد [۳۴ و ۶۴]. خط عمودی در نمودار پارتو، سطح اطمینان ۹۵٪ را به عنوان حد معنی‌داری اثرات، نشان می‌دهد. شکل (۳-۵) نمودار پارتوی اثرات استاندارد شده مورد مطالعه برای پنج فاکتور مورد بررسی طرح پلاکت- برمن را نشان می‌دهد. همان‌طور که در این شکل دیده می‌شود، اثرات استاندارد شده ی سه فاکتور pH محلول نمونه، طول فیبر و زمان استخراج، از حد مشخص شده (۲/۱۰) در سطح احتمال ۹۵٪ تجاوز کرده و این سه فاکتور دارای بیشترین اثر بر میزان پاسخ هستند. در حالی که فاکتورهای دیگر، کوچک‌تر از این حد بوده و در نتیجه اثر معنی‌دار بر پاسخ ندارند.



شکل ۳-۵: نمودار پارتو اثر فاکتورها بر پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان

۱- Pareto

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

### ۳-۴-۱-۳- تحلیل واریانس

با در نظر گرفتن فاکتورهای اصلی، برای استخراج تیکلوپیدین و لوزارتان آنالیز واریانس در جدول (۳-۸)، نشان می‌دهد که طرح انتخاب شده توانایی محاسبه و پیش‌بینی مقادیر پاسخ را دارا می‌باشد. در ادامه به تعریف دو آماره P و F و نیز لزوم استفاده از تحلیل واریانس اشاره و همچنین دلیل استفاده از ضریب تعیین بیان خواهد شد [۳۴].

جدول ۳-۸: جدول آنالیز واریانس طرح پلاکت برمن

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F	P
Main Effects	۵	۷۰۸۲۳۱۱۲	۱۴۱۶۴۶۲۲	۴۸/۵۶	۰/۰۰۰
A	۱	۶۵۴۷۶۱۴۰	۶۵۴۷۶۱۴۰	۲۲۴/۴۶	۰/۰۰۰
B	۱	۲۹۱۳۰۷۳	۲۹۱۳۰۷۳	۹/۹۹	۰/۰۰۵
C	۱	۱۵۴۳۶۵۱	۱۵۴۳۶۵۱	۵/۲۹	۰/۰۳۴
D	۱	۶۲۹۹۲	۶۲۹۹۲	۰/۲۲	۰/۶۴۸
E	۱	۸۲۷۲۵۵	۸۲۷۲۵۵	۲/۸۴	۰/۱۰۹
Residual Error	۱۸	۵۲۵۰۷۳۳	۲۹۱۷۰۷		
Lack of Fit	۶	۲۷۶۳۱۴۹	۴۶۰۵۲۵	۲/۲۲	۰/۱۱۳
Pure Error	۱۲	۲۴۸۷۵۸۳	۲۰۷۲۹۹		
Total	۲۳				

هدف از انجام آنالیز واریانس، بررسی مؤثر بودن یک فاکتور در روند یک آزمایش است و لازم به ذکر است که انجام این کار برای حالتی است که بیش از دو فاکتور وجود داشته باشد. (به عبارت دیگر، برای اینکه بخواهیم از میزان تاثیر یک فاکتور مطمئن شده و یا اثرهای مهم را بیابیم.) در صورتی که

تعداد فاکتورها ۲ سری یا کمتر باشد از روش t-test استفاده می‌شود. در یک آنالیز واریانس، واریانس کلی پاسخ به عنوان SS؛ مجموع مربعات واریانس کلی یک پاسخ برگزیده شده که یک مقدار میانگین تصحیح شده است. SS کل شامل دو بخش است؛ یک بخش در نتیجه مدل رگرسیون ( $SS_{\text{regr}}$ ) و دیگری مربوط به باقی‌مانده‌ها ( $SS_{\text{resid}}$ ) می‌باشد. مجموع مربعات واریانس کل، تصحیح شده برای میانگین (SS)، با استفاده از معادله (۳-۴) محاسبه می‌شود [۶۲]:

$$SS = SS_{\text{regr}} + SS_{\text{resid}} \quad (۳-۴)$$

اگر در میان آزمایش‌ها، تکرار نیز وجود داشته باشد، مؤلفه باقی‌مانده، به دو بخش تقسیم خواهد شد (مطابق معادله (۳-۵)) که شامل مجموع مربعات عدم تناسب<sup>۱</sup> ( $SS_{\text{lof}}$ ) و مجموع مربعات خطای آزمایشگاهی خالص<sup>۲</sup> ( $SS_{\text{pe}}$ ) می‌باشد:

$$SS_{\text{resid}} = SS_{\text{lof}} + SS_{\text{pe}} \quad (۳-۵)$$

در نرم‌افزار طراحی آزمایش، دو منحنی از آنالیز واریانس بدست می‌آید که یکی شامل منحنی مربوط به آنالیز واریانس و دیگری مربوط به منحنی عدم تناسب است که در تعیین متناسب بودن مدل بسیار مفید است، می‌باشد. اگر انحراف استاندارد<sup>۳</sup> پاسخ‌های مورد نظر در مدل (SD رگرسیون) بزرگتر از انحراف استاندارد باقی‌مانده‌ها ضرب در جذر F بحرانی<sup>۴</sup> ( $RSD \cdot \sqrt{F_{\text{crit}}}$ ) باشد، بنابراین مدل در سطح احتمال مورد نظر، معنی‌دار خواهد بود (معمولاً  $P=0.05\%$ ). در اینجا لازم است توضیح مختصری نیز در مورد مفهوم P داده شود. به طور کلی در روند یک آزمایش دو دسته از خطاها وجود

---

۱- Lack of fit

۲- Pure error

۳- Relative standard deviation (RSD)

۴- critical F

دارند؛ خطاهای سیستماتیک<sup>۱</sup>؛ که این قسم از خطاها قابل حذفند و بر صحت روش تاثیرگذارند. اما دسته‌ای دیگر از خطاها، خطای تصادفی<sup>۲</sup> نامیده می‌شوند. این خطاها قابل حذف نیستند و تنها با تکرار می‌توان مقدار آن را کمتر نمود. این نوع خطا هم بر دقت و هم بر صحت تاثیرگذار می‌باشد.

سطح اطمینان<sup>۳</sup>؛ نشان می‌دهد که چه میزان می‌توان خطای تصادفی را پذیرفت، به عبارتی اگر داده‌ای خارج از این سطح باشد خطایی که روی این داده مؤثر است، خطای سیستماتیک است و بنابراین داده اعتباری ندارد. مقدار P در واقع این مفهوم را می‌رساند که چند درصد احتمال خطای تصادفی وجود دارد.

در تست نسبت واریانس‌ها یا F تست، نسبت واریانس بین عدم تناسب و خطای آزمایشی خالص با مقادیر F توزیع قابل مقایسه می‌باشد. اگر مقدار  $F_{1of/pe}$  از F بحرانی تجاوز کند، در سطح اطمینانی که مدنظر است، یک عدم تناسب مشهود وجود دارد و در نتیجه مدل ارائه شده، مدل مناسبی نمی‌باشد. مفهوم Lack of fit (عدم تناسب) نیز بیانگر احتمالی از عدم متناسب بودن مدل پیشنهادی است که این احتمال در صورتی ناچیز است که مقدار عددی این پارامتر بیشتر از ۰/۰۵ باشد. با توجه به نتایج بدست آمده مقدار P عدم تناسب (۰/۱۱) در جدول (۳-۸)، نشان می‌دهد که بین نتایج حاصل از مدل و داده‌های تجربی تطابق خوبی وجود دارد.

آماره F، معیار دیگری برای ارزیابی مدل‌ها می‌باشد. مقدار این آماره از تقسیم واریانس رگرسیون به واریانس باقیمانده بدست می‌آید. اگر مقدار F مدل بدست آمده از مقدار F بحرانی ثبت شده در جدول آماری بزرگتر باشد وجود رابطه خطی بین متغیر وابسته و متغیرهای مستقل تأیید می‌شود. به

---

۱- Systematic

۲- Random

۳- Confidence level

عبارت دیگر 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 (MSR) به میانگین مربعات باقیمانده‌ها (MSE) است. بیان ریاضی آن به صورت زیر می‌باشد:

$$F = \frac{MSR}{MSE} = \frac{SSR/df_m}{SSE/df_{res}} \quad (6-3)$$

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

$df_m$  درجه آزادی مدل،  $p$  تعداد متغیرهای مستقل مدل برابر با ۵،  $n$  تعداد کل ترکیبات مربوط به مدل (تعداد کل آزمایش‌ها) برابر با ۲۴ و  $df_{res}$  نیز درجه آزادی باقیمانده‌ها است. برای بدست آوردن SSE و SSR نیز می‌توان از روابط (۷-۳) و (۸-۳) استفاده نمود. هر چه مقدار میانگین مربع فاکتور به باقی مانده بیشتر باشد به معنی مقدار F بیشتر بوده که با توجه به مقادیر به دست آمده در جدول (۳-۳) مقدار F مربوط به فاکتور pH بیشتر و در نتیجه تاثیر آن فاکتور بر پاسخ نیز بیشتر است.

SSR طبق رابطه (۷-۳) بیانگر مجموع مربعات انحراف مقادیر پیش بینی شده متغیر وابسته از میانگین مقادیر آن است.

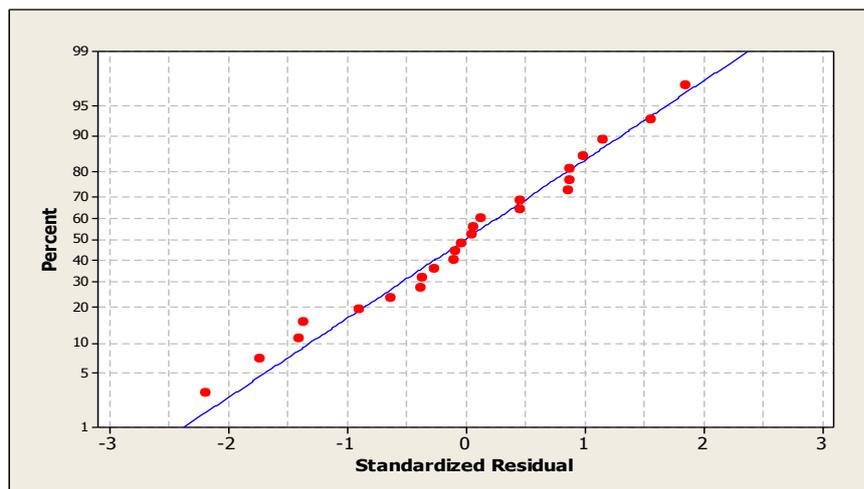
$$SSR = \sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2 \quad (7-3)$$

SSE نیز مبین مجموع مربعات انحراف مقادیر واقعی متغیر وابسته از مقادیر پیش بینی شده برای آن و  $y_i$  انحراف مقادیر واقعی،  $\bar{y}$  میانگین مقادیر و  $\hat{y}_i$  انحراف مقادیر پیش بینی شده متغیر وابسته است.

$$SSE = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad (۸-۳)$$

مقدار Adj MS، از تقسیم Adj SS بر درجه آزادی به دست می آید که در محاسبه آماره F بکار می رود. خطای خالص: برای یک سری داده‌های تکراری به کار می رود، که مقدار کوچکتر آن نشان دهنده برآورد دقیق تر است.

**نمودار باقیمانده:** معمولاً مقادیر به دست آمده از مدل با مقادیر واقعی یکسان نبوده و مقدار باقیمانده را ایجاد می کند. به عبارتی، مقادیر باقی مانده از اختلاف مقدار واقعی و مقدار پیش بینی شده پاسخ به دست می آید 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 می شود. اگر باقی مانده‌ها به طور نرمال توزیع شوند، همه آنها به طور اختصاصی در این صفحه روی خط می افتند. در این نمونه در شکل (۶-۳) انحرافات از نمودار خطی خیلی کم بوده که این نرمال بودن فرضیه‌ها را اثبات می کند. برای الگوهای غیرخطی فرم s شکل مشاهده می شود [۶۹].



شکل ۶-۳: نمودار احتمال نرمال برای پاسخ اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان در مرحله طراحی پلاکت برمن

### ۳-۴-۲- بهینه‌سازی فاکتورهای مؤثر بر پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان

برای تعیین نقطه بهینه فاکتورهای انتخاب شده در طراحی پلاکت-برمن، طرح BBD طراحی و اجرا شد. بر اساس نتایج طرح پلاکت-برمن، فاکتورهای pH محلول نمونه، طول فیبر و زمان استخراج به عنوان فاکتورهای مؤثر بر پاسخ در استخراج HF-LPME می‌باشند. برای یافتن نقطه بهینه فاکتورهای مؤثر در طرح BBD، لازم است که اثر هر فاکتور در سه سطح مورد بررسی قرار گیرد. مقدار هر فاکتور با توجه به سطوح آن فاکتور با توجه به طرح پلاکت-برمن، در جدول (۳-۹) برای طرح عاملی باکس-بنکن آورده شده است.

جدول ۳-۹: سطح فاکتورهای مؤثر بر طرح عاملی باکس-بنکن

فاکتور	سطح بالا (+۱)	سطح میانی (۰)	سطح پایین (-۱)
A	۶/۲	۴/۵	۲/۸
B	۹/۰	۷/۰	۵/۰
C	۶۰	۴۰	۲۰

شایان ذکر است که در تمام آزمایش‌هایی که بر اساس طرح باکس-بنکن انجام می‌شود فاکتورهای غیر مهم با توجه به اثر این فاکتورها در نمودار پارتو، در سطح مناسب خود قرار می‌گیرند. فاکتورهای غیر مهم در این روش، شامل سرعت همزن مغناطیسی و درصد نمک افزوده شده بوده است که با توجه به اثر این فاکتورها در نمودار پارتو، اثر نمک در سطح پایین آن (۱/۰٪) و فاکتور سرعت همزن مغناطیسی در سطح بالای خود (۱۰۰۰ دور در دقیقه) قرار گرفت.

### ۳-۴-۲-۱- اجرای طرح باکس-بنکن (BBD)

طراحی BBD در نرم‌افزار Minitab 16، با سه فاکتور در دو بلوک و دو تکرار و دو نقطه مرکزی شامل ۲۸ آزمایش، اجرا گردید. جدول (۳-۱۰) ماتریس و سیگنال‌های مربوط به طرح عاملی BBD را

برای تیکلوپیدین و لوزارتان در استخراج با روش HF-LPME نمایش می‌دهد. تمامی ۲۸ آزمایش، میکرواستخراج بر اساس روش کار زیر انجام گردید.

در یک ظرف نمونه، ۱/۰ میلی‌لیتر از محلول ۱۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر تیکلوپیدین و ۱/۰ میلی‌لیتر محلول لوزارتان ۵/۰ میلی‌گرم بر لیتر، ۲/۰ میلی‌لیتر بافر فسفاتی با pH مورد نظر، مقدار ۰/۱ گرم نمک سدیم کلرید افزوده شد و سپس با آب دو بار تقطیر به حجم ۱۰/۰ میلی‌لیتر رسانده شد. به موازات تهیه نمونه، فیبرهای پلی‌پروپیلن در ابعاد مورد نظر بریده و مطابق بخش ۳-۳ آماده‌سازی شدند. سپس فیبر داخل یک میکروتیوپ حاوی حلال آلی ۱- اکتانول به صورت عمودی قرار داده شد تا کاملاً به حلال آغشته شود و در این حین، فاز گیرنده (حلال آلی ۱- اکتانول) به داخل میکروسرنگ کشیده شد. سپس حلال به داخل فیبر تزریق شد و انتهای فیبر با فویل آلومینیومی کوچک بسته شد. فیبر داخل محلول آنالیت قرار داده و میکروسرنگ توسط یک گیره به پایه نگهداشته شد. سپس کل مجموعه، یعنی میکروسرنگ و ظرف آزمایش روی یک همزن مغناطیسی قرار داده شد. سرعت چرخش محلول روی سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه تنظیم گردید. بعد از اتمام زمان استخراج، فیبر از داخل محلول آبی خارج و انتهای فیبر با قیچی بریده شده و فاز داخل فیبر (حلال آلی اکتانول حاوی آنالیت‌ها) به داخل سرنگ کشیده شد. حلال به یک میکروتیوپ ۱/۵ میلی‌لیتری (ویال) منتقل و مقداری از آن با دقت به HPLC تزریق شد.

جدول ۳-۱۰: ماتریس طرح باکس - بنکن برای تیکلوپیدین و لوزارتان در استخراج با روش HF-LPME

شماره آزمایش	A	B	C	پاسخ تیکلوپیدین	پاسخ لوزارتان
۱	۰	۰	۰	۸۲۵/۵۲	۴۵۳۷/۰۷
۲	۰	۰	۰	۱۱۱۷/۶۶	۴۶۶۷/۵
۳	+۱	۰	-۱	۲۸۰۰/۰۵	۶۴۲/۶۹
۴	۰	-۱	-۱	۵۱۰/۳۹	۱۹۰۰/۰۵
۵	+۱	۰	+۱	۴۱۰۰/۳۰	۱۴۴۰/۰۲
۶	+۱	-۱	۰	۲۶۰۰/۷۲	۸۳۵/۴۸
۷	۰	+۱	-۱	۶۹۸/۰۰	۱۹۴۶/۵۳
۸	-۱	-۱	۰	۱۳۵/۰۴	۳۱۸۱/۹۴
۹	-۱	۰	-۱	۱۷۲/۴۷	۲۱۲۷/۷۷
۱۰	-۱	۰	+۱	۲۶۰/۰۵	۳۹۶۴/۴۲
۱۱	۰	+۱	+۱	۱۲۰۰/۲۶	۳۸۱۸/۴۸
۱۲	+۱	+۱	۰	۲۷۹۳/۶۲	۱۲۰۰/۵۰
۱۳	-۱	+۱	۰	۳۱۳/۶۱	۳۳۱۳/۰۶
۱۴	۰	-۱	+۱	۸۰۰/۰۰	۱۵۶۲/۲۰
۱۵	-۱	۰	+۱	۱۰۳/۲۴	۲۷۲۶/۳۱
۱۶	+۱	۰	-۱	۲۶۰۶/۶۴	۶۱۱/۶۲
۱۷	۰	-۱	+۱	۱۱۱۰/۷۲	۱۸۵۶/۸۲
۱۸	+۱	+۱	۰	۲۶۴۹/۷۴	۱۱۲۶/۰۰
۱۹	۰	+۱	-۱	۸۴۰/۲۰	۱۹۱۵/۷
۲۰	-۱	۰	-۱	۱۵۸/۷۶	۲۲۵۵/۱۰
۲۱	۰	۰	۰	۱۰۶۲/۹۵	۴۳۳۱/۰۵
۲۲	۰	-۱	-۱	۴۰۹/۹۳	۱۴۵۰/۹۷
۲۳	-۱	-۱	۰	۱۲۶/۹۷	۳۲۰۰/۶۲
۲۴	+۱	۰	+۱	۴۰۰۰/۶۲	۱۳۴۰/۹۵
۲۵	-۱	+۱	۰	۲۳۴/۱۹	۳۲۱۶/۵۷
۲۶	۰	+۱	+۱	۱۵۰۰/۷۵	۳۴۰۳/۱۳
۲۷	+۱	-۱	۰	۲۴۴۰/۲۹	۶۱۳/۶۶
۲۸	۰	۰	۰	۷۴۵/۵۷	۳۸۵۰/۹۳

در این بررسی اهمیت اثرات و برهم‌کنش‌ها با استفاده از آنالیز پارامترهای آماری ارزیابی شدند. نتایج

این آنالیز در جدول (۳-۱۱) و (۳-۱۲) نشان می‌دهند که اثرات pH، طول فیبر، زمان استخراج، تمام

برهم‌کنش‌های توان دوم فاکتورها برای هر دو پاسخ تیکلوپیدین و لوزارتان دارای مقدار p کمتر از ۰/۰۵ بوده و به طور آماری معنی‌دار هستند. همچنین برهم‌کنش دوتایی زمان و pH برای پاسخ تیکلوپیدین و برهم‌کنش دوتایی زمان و طول فیبر برای پاسخ لوزارتان دارای مقدار p کمتر از ۰/۰۵ بوده و به طور آماری معنی‌دار هستند. سایر برهم‌کنش‌های دوتایی برای هر پاسخ دارای p بیشتر از ۰/۰۵ می‌باشد.

جدول ۳-۱۱: پارامترهای آماری برای طرح عامل باکس- بنکن برای تیکلوپیدین

عبارت	ضریب	خطای استاندارد	T	P
Constant	۱۳۳۰/۸۰	۱۲۴۳/۶۰	۱/۰۷۰	۰/۳۰۰
Block	۱۸/۲۴	۳۰/۳۳	۰/۶۰۱	۰/۵۵۶
A	-۱۹۴۶/۱۵	۲۴۰/۱۹	-۸/۱۰۳	۰/۰۰۰
B	۷۰۱/۶۳	۲۴۱/۹۹	۲/۸۹۹	۰/۰۱۰
C	-۴۱/۳۰	۱۷/۸۹	-۲/۳۰۹	۰/۰۳۴
AA	۲۴۵/۸۳	۲۱/۹۵	۱۱/۱۹۹	۰/۰۰۰
BB	-۵۴/۹۷	۱۵/۸۶	-۳/۴۶۶	۰/۰۰۳
CC	۰/۲۷	۰/۱۶	۱/۷۱۷	۰/۱۰۴
AB	۳۱/۱۵	۱۶/۶۹	۱/۸۶۶	۰/۰۷۹
AC	۸/۴۵	۱/۶۷	۵/۰۶۴	۰/۰۰۰
BC	-۰/۱۲	۱/۴۲	-۰/۰۸۵	۰/۹۳۳

با حذف عوامل غیر مهم و با استفاده از ضرایبی که در جدول (۳-۱۱) داده شده است، ساده-ترین مدل برای اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان به روش HF-LPME مربوط به پاسخ تیکلوپیدین به صورت زیر پیشنهاد می‌شود که در این معادله درصد R، همان متغیر پاسخ است.

ضرایب تعیین مدل و معادله آن برای پاسخ تیکلوپیدین:

$$R^2 = 98.8\%$$

$$R_{adj}^2 = 98.2\%$$

$$\text{Response} = 1330/80 - 1946/15 A + 701/63 B - 41/30 C - 245/83 A^2 + 31/15 AB + 8/45 AC - 54/97 B^2 - 0/12 BC + 0/27 C^2 \quad (9-3)$$

جدول ۳-۱۲: پارامترهای آماری برای طرح عامل باکس- بنکن برای لوزارتان

عبارت	ضریب	خطای استاندارد	T	P
Constant	-۱۷۳۳۲/۸	۲۶۷۰/۹۱	-۶/۴۸۹	۰/۰۰۰
Block	۱۱۴/۸	۶۵/۱۴	۱/۷۶۳	۰/۰۹۶
A	۳۳۸۹/۵	۵۱۵/۸۶	۶/۵۷۱	۰/۰۰۰
B	۲۹۸۷/۱	۵۱۹/۷۴	۵/۷۴۷	۰/۰۰۰
C	۱۹۴/۹	۳۸/۴۲	۵/۰۷۳	۰/۰۰۰
AA	-۴۵۰/۲	۴۷/۱۴	-۹/۵۵۰	۰/۰۰۰
BB	-۲۳۹/۳	۳۴/۰۶	-۷/۰۲۶	۰/۰۰۰
CC	-۲/۹	۰/۳۴	-۸/۴۹۱	۰/۰۰۰
AB	۲۶/۲	۳۵/۸۴	۰/۷۳۱	۰/۴۷۵
AC	-۲/۹	۳/۵۸	-۰/۸۰۱	۰/۴۳۴
BC	۱۰/۳	۳/۰۵	۳/۳۸۱	۰/۰۰۴

همچنین ساده-ترین مدل برای اندازه گیری تیکلوپیدین و لوزارتان به روش HF-LPME مربوط به پاسخ لوزارتان به صورت زیر پیشنهاد می‌شود.

ضرایب تعیین مدل و معادله آن برای پاسخ لوزارتان:

$$R^2 = 95/36\% \quad R_{adj}^2 = 92/63\%$$

$$\text{Response} = -17332/8 + 3389/5 A + 2987/1 B + 194/9 C - 450/2 A^2 + 26/2 AB - 2/9 AC - 239/3 B^2 + 10/3 BC - 2/9 C^2 \quad (10-3)$$

ضریب تعیین:

یکی از پارامترهایی که بیان کننده مناسب بودن یک مدل می‌باشد،  $R^2$  یا ضریب تعیین می‌باشد. به بیان علمی، تغییرات شرح داده شده کسری از تغییرات کلی پاسخی است که در مدل توضیح داده شده است و به طریق معادله (۱۱-۳) قابل محاسبه است.

$$R^2 = \frac{SS_{\text{regr}}}{SS} \quad (11-3)$$

با توجه به رابطه  $(SS=SS_{\text{reg}}+SS_{\text{resi}})$ ، می‌توان رابطه  $R^2$  را به صورت معادله  $(12-3)$  بازآرایی کرد:

$$R^2 = (SS - SS_{\text{resid}})/SS \quad (12-3)$$

بنابراین همانطور که ملاحظه می‌شود، هرچه مقدار این مؤلفه به یک نزدیک‌تر باشد، بهتر است. زیرا این حالت در صورتی امکان‌پذیر است که مجموع مربعات باقیمانده‌ها  $(SS_{\text{resid}})$  صفر باشد و مدل تعریف شده، مدل مناسبی است. مقدار ضریب تعیین  $(R^2)$  برای پاسخ تیکلوپیدین در اندازه‌گیری همزمان تیکلوپیدین و لوزارتان  $98/8$  درصد می‌باشد که نشان می‌دهد  $98/8$  درصد تغییرات در متغیر وابسته می‌تواند توسط متغیر مستقل توضیح داده شود. همچنین مقدار ضریب تعیین  $(R^2)$  برای پاسخ لوزارتان در اندازه‌گیری همزمان تیکلوپیدین و لوزارتان  $95/36$  درصد می‌باشد.

حال اگر در رابطه مربوط به  $R^2$ ، درجات آزادی را دخیل کنیم، اعتبار این پارامتر افزایش می‌یابد و مفهوم جدیدی به نام  $R^2_{\text{adj}}$  به صورت معادله  $(13-3)$  معرفی می‌شود. ضریب تعیین تعدیل شده<sup>۱</sup>: یکی از پارامترهایی است که در ارزیابی و مقایسه مدل‌های مختلف با تعداد متفاوت متغیر پیش‌بینی شده استفاده می‌شود. اما از آنجایی که  $R^2$  (ضریب تعیین) تعداد پارامترهای موجود در مدل را به حساب نمی‌آورد، مقدار  $R^2$  تعدیل شده محاسبه می‌شود که سعی دارد مربع  $R$  را تصحیح نماید تا بیشترین میزان انطباق مدل را در جمعیت انعکاس دهد. لذا بدین منظور از ضریب تعیین تعدیل شده طبق رابطه  $(13-3)$  برای انتخاب مدل برتر استفاده می‌شود.

$$R^2_{\text{adj}} = \frac{\frac{SS_{\text{regr}}}{P-1}}{\frac{SS}{N-1}} \quad (13-3)$$

---

۱- Adjusted R squared

که در این رابطه  $N-1$  و  $P-1$  بیانگر درجه آزادیست. پس از بازآرایی رابطه (۳-۱۲)، به رابطه (۳-۱۴) دست می‌یابیم [۷۰]؛

$$R_{adj}^2 = 1 - R^2 \left( \frac{N-1}{N-p} \right) \quad (۳-۱۴)$$

همان‌طور که در این رابطه ملاحظه می‌شود مقدار عددی مفهوم  $R_{adj}^2$  از مقدار  $R^2$  کمتر است و عموماً در یک مدل معتبر و مناسب این دو مفهوم باید از نظر عددی به هم نزدیک باشند. برخلاف  $R^2$ ، مقدار  $R_{adj}^2$  تعدیل شده (که مقدار آن برای پاسخ تیکلوپیدین برابر با ۹۸/۲٪ و برای پاسخ لوزارتان برابر با ۹۲/۶۳٪ می‌باشد) ممکن است با اضافه شدن تعداد فاکتورها کوچکتر شود.

### ۳-۴-۲-۲- ارزیابی مدل

برای اطمینان از اینکه مدل به‌دست آمده، مدل مناسبی است که توانایی پیش‌بینی نمونه‌های مختلفی از یک جمعیت را داراست، باید مدل را ارزیابی کرد. در ارزیابی مدل فرضیه‌های زیر باید محقق شود [۷۱].

۱- پاسخ حاصل به خوبی با مدل توضیح داده شود.

۲- داده پرت وجود نداشته باشد.

۳- توزیع باقی‌مانده‌ها نرمال باشد.

۴- واریانس همگون باشد.

۵- تغییرات خطاها مستقل باشد.

برای ارزیابی مدل به‌دست آمده از روش تحلیل واریانس و بررسی باقی‌مانده‌ها استفاده گردید که این ارزیابی‌ها از طریق شاخص‌های کمی بوده و به وسیله آنها صحت نتایج ارائه شده توسط مدل مورد سنجش قرار می‌گیرند.

### ۳-۴-۲-۳- الف- تحلیل واریانس

با در نظر گرفتن فاکتورهای اصلی، یک مدل ریاضی برای استخراج تیکلوپیدین و لوزارتان به دست آمد. آماره‌های F و P این مدل در جدول (۳-۱۳) و (۳-۱۴) که به ترتیب مربوط به پاسخ تیکلوپیدین و لوزارتان هستند، نشان می‌دهد که مدل انتخاب شده توانایی محاسبه و پیش‌بینی مقادیر پاسخ را دارا می‌باشد. در روش آنالیز واریانس اثرات خطی، درجه دوم و برهمکنش‌ها در نظر گرفته شده‌اند.

جدول ۳-۱۳: آنالیز واریانس طرح عاملی پیشنهادی برای پاسخ تیکلوپیدین در استخراج تیکلوپیدین و لوزارتان با روش

HF-LPME

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F	P
block	۱	۹۳۱۲	۹۳۱۲	۰/۰۳۶	۰/۵۵۶
Regression	۹	۳۸۴۱۷۶۰۶	۴۲۶۸۶۲۳	۱۶۵/۷۳	۰/۰۰۰
Linear	۳	۲۵۶۷۶۷۲	۸۵۵۸۹۱	۳۳/۲۳	۰/۰۰۰
Square	۳	۴۱۰۸۷۹۰	۱۳۶۹۵۹۷	۵۳/۱۸	۰/۰۰۰
Interaction	۳	۷۵۰۳۹۹	۲۵۰۱۳۳	۹/۷۱	۰/۰۰۱
Residual Error	۱۷	۴۳۷۸۵۸	۲۵۷۵۶		
Lack-of-Fit	۱۵	۴۳۱۲۴۰	۲۸۷۴۹	۸/۶۹	۰/۱۰۸
Pure Error	۲	۶۶۱۷	۶۶۱۷		
Total	۲۷				

جدول ۳-۱۴: آنالیز واریانس طرح عاملی پیشنهادی برای پاسخ لوزارتان در استخراج تیکلوپیدین و لوزارتان با روش

HF-LPME

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F	P
block	۱	۳۶۹۲۸۲	۳۶۹۲۸۲	۳/۱۱	۰/۰۹۶
Regression	۹	۴۱۱۳۸۳۷۲	۴۵۷۰۹۳۰	۳۸/۴۷	۰/۰۰۰
Linear	۳	۷۹۷۵۴۳۲	۲۶۵۸۴۷۷	۲۲/۳۸	۰/۰۰۰
Square	۳	۱۸۲۵۱۵۲۴	۶۰۸۳۸۴۱	۵۱/۲۱	۰/۰۰۰
Interaction	۳	۱۴۹۸۱۷۵	۴۹۹۳۹۲	۴/۲۰	۰/۰۲۱
Residual Error	۱۷	۲۰۱۹۷۲۵	۱۱۸۸۰۷		
Lack-of-Fit	۱۵	۱۸۹۵۹۸۵	۱۲۶۳۹۹	۲/۰۴	۰/۳۷۸
Pure Error	۲	۱۲۳۷۴۰	۶۱۸۷۰		
Total	۲۷				

داده‌های جدول (۳-۱۳) و (۳-۱۴) به خوبی نشان می‌دهد که با توجه به مقدار آماره F برای اثرات درجه دوم یا اثرات مربع (Square) بیشترین بوده و تاثیر بیشتری روی فاکتورها برای هر دو پاسخ دارد. همچنین مقدار P مربوط به عدم تناسب مانند طرح پلاکت برمن بیشتر از ۰/۰۵ بوده (۰/۳۷۸) برای پاسخ لوزارتان و ۰/۱۰۸ برای پاسخ تیکلوپیدین) و نشان‌دهنده انطباق خوب مدل و داده‌های تجربی می‌باشد.

### ۳-۴-۲-۴-ب- بررسی باقی‌مانده‌ها

آنچه که در ابتدا برای انجام هر رگرسیون بایستی در نظر گرفته شود، فرض‌های زیربنایی است که تحلیل‌ها براساس آن‌ها انجام می‌پذیرد. این نکته‌ای بسیار مهم است که متاسفانه اکثراً در تحلیل‌ها مورد غفلت قرار گرفته و نتایج آن را خدشه دار می‌سازد. فرض‌های زیربنایی برای یک الگوی رگرسیون به صورت زیر است که در آن  $\varepsilon$  نشان‌دهنده خطای مدل است [۷۰]:

۱- جمله خطای  $\varepsilon$  دارای میانگین صفر است.

۲- جمله خطای  $\varepsilon$  دارای واریانس ثابت است.

۳) جمله خطای  $\varepsilon$  ناهمبسته<sup>۱</sup> اند.

۴) جمله خطای  $\varepsilon$  دارای توزیع نرمال است.

اگر الگوی برازش داده شده مناسب باشد باید باقی‌مانده‌ها، فرض‌های بیان شده فوق را تایید کنند. باقی‌مانده ( $R_i$ ) در واقع همان خطای تصادفی در پیش‌بینی است که برابر با اختلاف بین مقدار مشاهده شده و مقدار پیش‌بینی شده با مدل ( $R_i = y_i - \hat{y}_i$ ) است.

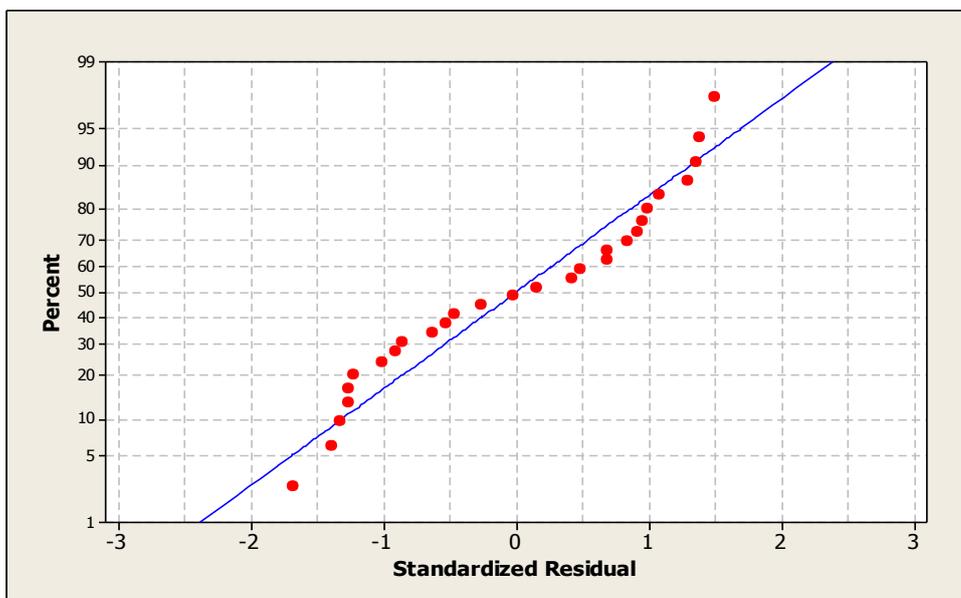
---

۱- Uncorrelated

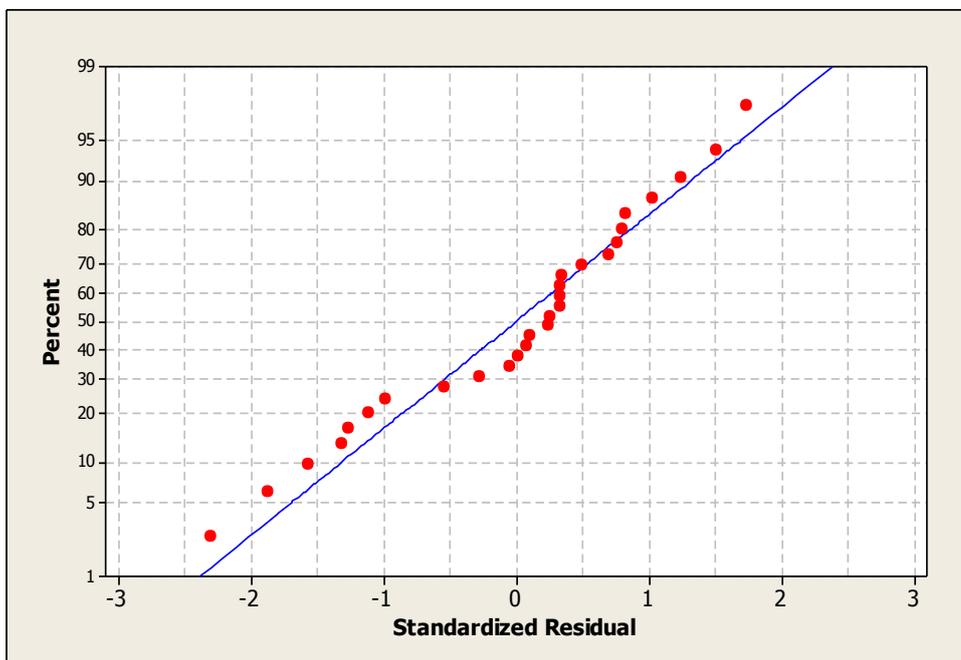
باقی مانده‌ها را می‌توان نماینده خطاهای الگو در نظر گرفت و از این روی هر انحراف از فرض‌های چهارگانه رگرسیون در مورد خطاها باید در باقی مانده‌ها دیده شود. برای یک مدل آماری صحیح این مقدار باید کوچک و توزیع آن نرمال باشد. یک راه مناسب برای این که ببینیم الگوی رگرسیون تا چه اندازه برای برازش داده‌ها خوب است، رسم نمودار باقی مانده‌ها می‌باشد.

#### • نمودار احتمال نرمال

رسم نمودار احتمال نرمال برای باقیمانده‌ها، روش مفیدی برای بررسی فرض نرمال بودن مشاهدات محسوب می‌شود. در تحلیل واریانس، انجام بررسی نرمال بودن، از طریق باقیمانده‌ها معمولاً می‌تواند اثربخش‌تر و راحت‌تر باشد. اگر توزیع باقیمانده‌ها نرمال باشد، آنگاه نمودار حاصل به صورت یک خط راست ظاهر می‌شود. در زمان ارزیابی این نمودار بایستی به جای نقاط دور افتاده، بر مقادیر مرکزی تاکید داشت. شکل‌های (۳-۷) و (۳-۸) نشان می‌دهند که توزیع خطاها برای هر دو پاسخ تیکلوپیدین و لوزارتان تقریباً نرمال است. یک مسأله بسیار متداول در نمودارهای احتمال نرمال، یک باقیمانده بزرگ در بین باقیمانده‌هاست و، چنین باقیمانده‌ای را غالباً یک نقطه دور افتاده می‌نامند. وجود یک یا چند نقطه دور افتاده می‌تواند به طور جدی تحلیل واریانس را با مشکل مواجه کند. در برخی مواقع، دلیل وجود مشاهدات دور افتاده می‌تواند اشتباه در محاسبات، کد کردن داده‌ها یا ثبت داده‌ها باشد [۶۹ و ۷۰].



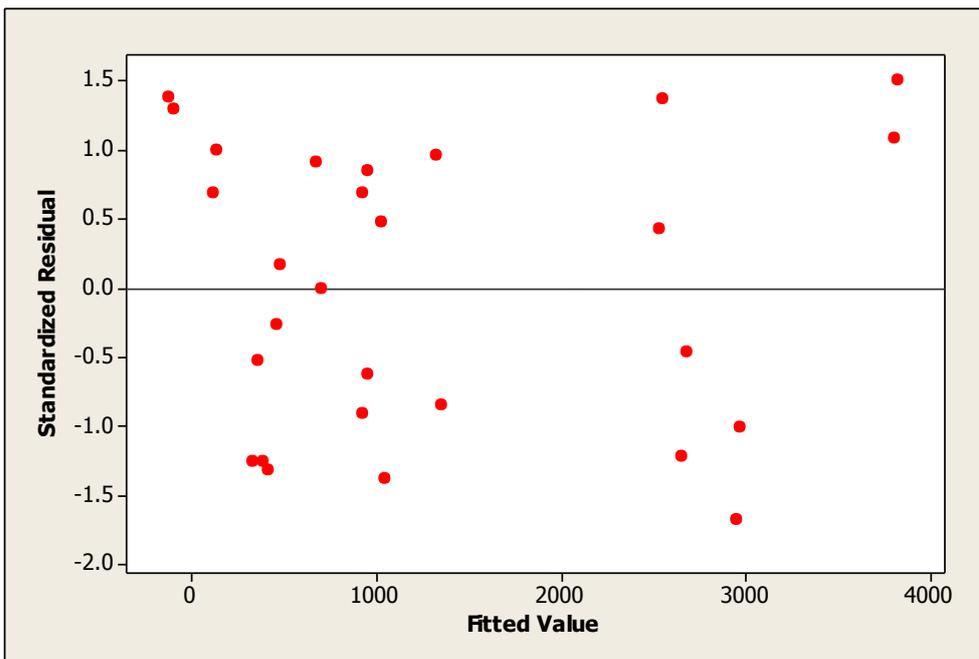
شکل ۳-۷: نمودار احتمال نرمال برای پیش تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان با روش HF-LPME در طراحی باکس- بنکن مربوط به پاسخ تیکلوپیدین.



شکل ۳-۸: نمودار احتمال نرمال برای پیش تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان با روش HF-LPME در طراحی باکس- بنکن مربوط به پاسخ لوزارتان.

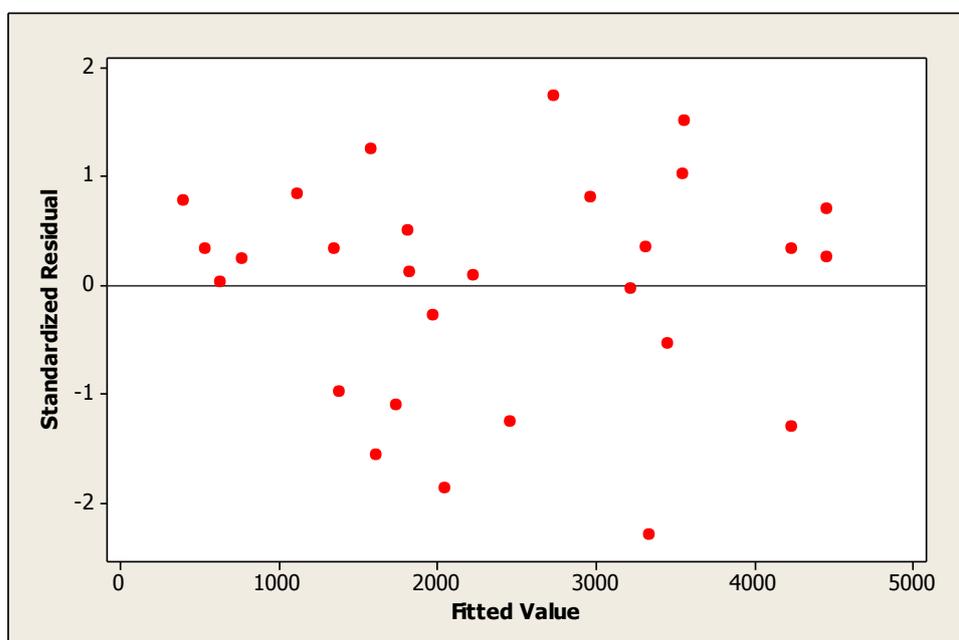
• نمودار باقیمانده در مقابل مقدار برازش شده

یک راه مناسب برای این که مدل رگرسیون پیشنهاد شده تا چه میزان در برازش داده‌ها قدرتمند است، رسم نمودار باقیمانده در مقابل مقدار برازش شده می‌باشد. نمودار شکل (۳-۹) و (۳-۱۰)، نمودار باقیمانده در مقابل مقدار برازش شده را برای استخراج تیکلوپیدین و لوزارتان با روش HF-LPME مربوط به دو پاسخ تیکلوپیدین و لوزارتان نشان می‌دهد. رسم نمودار باقیمانده‌ها  $R_i$  ( $i=1,2,\dots,n$ ) در مقابل مقادیر برازش شده متناظر یعنی  $\hat{y}_i$  ها در پی بردن به انواع متداول مناسب نبودن الگو مفید است. اگر مدل برازش شده مناسب باشد این نمودار بایستی نسبت به نقطه  $R_i=0$  متقارن بوده و نقاط حول این نقطه به طور یکنواخت پراکنده شده باشند. این وضعیت ثابت بودن واریانس خطاها را نشان می‌دهد. با توجه به اینکه یکی از فرضیه‌های رگرسیون ثابت بودن خطاهاست و در نمودار باقیمانده در برابر مقادیر برازش شده، وقتی باقیمانده‌ها دارای واریانس ثابت هستند که به طور تصادفی در اطراف خط صفر پراکنده شده باشند. بنابراین نمودار قابل قبول در این قسمت دارای نقطه دورافتاده و یا الگوی باقیمانده‌های افزایشی (به شکل یک قیف) را نشان نمی‌دهد. شکل‌های (۳-۹) و (۳-۱۰) نشان می‌دهند که نمودار باقی مانده‌ها از الگوی خاصی برخوردار نیست و بی‌ساختار می‌باشد و همچنین پراکندگی دو طرف خط صفر تقریباً ثابت است [۶۹ و ۷۰].



شکل ۳-۹: نمودار باقیمانده در مقابل مقدار برازش شده برای استخراج تیکلوپیدین و لوزارتان در طراحی باکس-بنکن

مربوط به پاسخ تیکلوپیدین

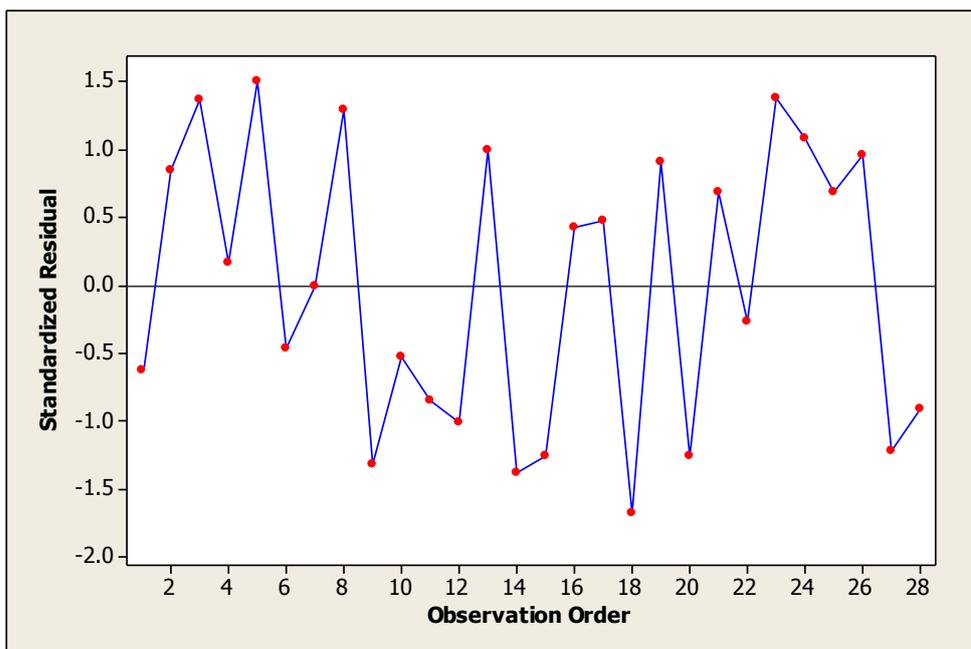


شکل ۳-۱۰: نمودار باقیمانده در مقابل مقدار برازش شده برای استخراج تیکلوپیدین و لوزارتان در طراحی باکس-بنکن

مربوط به پاسخ لوزارتان

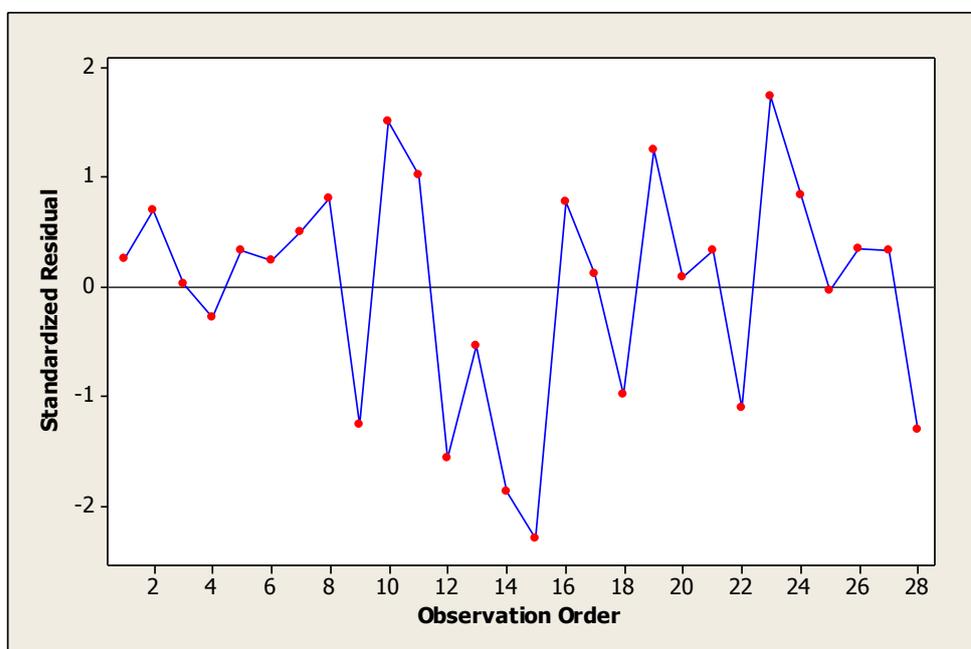
• نمودار باقیمانده در برابر ترتیب زمانی

رسم داده‌ها بر اساس ترتیب زمانی آن‌ها می‌تواند در شناسایی همبستگی بین باقیمانده‌ها مفید واقع شود. وجود تسلسل‌های مثبت و منفی بیانگر همبستگی مثبت بین باقیمانده‌ها و به معنای نقض فرض استقلال خطاها است. این مسأله یک مشکل جدی بالقوه محسوب می‌شود و بر طرف کردن آن معمولاً کار ساده‌ای نیست. بنابراین باید سعی شود تا در زمان جمع‌آوری داده از بروز چنین مشکلی پیش‌گیری کرد. تصادفی سازی مناسب آزمایش می‌تواند گام مهمی جهت دستیابی به استقلال مشاهدات باشد. شکل‌های (۱۱-۳) و (۱۲-۳) نمودار باقیمانده‌ها بر حسب زمان را نمایش می‌دهد. در برخی مواقع، مهارت آزمایشگر ممکن است با پیشرفت آزمایش تغییر کند و یا فرآیند مورد مطالعه ممکن است قادر به حفظ شرایط خاصی نباشد و یا به عبارت دیگر، غیر قابل پیش‌بینی باشد. وجود چنین شرایطی باعث می‌شود تا واریانس خطا با گذشت زمان تغییر کند. در چنین شرایطی نمودار باقیمانده‌ها بر حسب زمان، تغییرات زیادی را در یک طرف نمودار در مقایسه با طرف دیگر از خود نشان می‌دهد. با توجه به شکل‌های (۱۱-۳) و (۱۲-۳) همبستگی کمی بین داده‌ها مشاهده می‌شود که نشان‌دهنده استقلال خطاهاست [۶۹].



شکل ۳-۱۱: نمودار باقیمانده در برابر ترتیب زمانی برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان با روش HF-

LPME در طراحی باکس- بنکن مربوط به پاسخ تیکلوپیدین

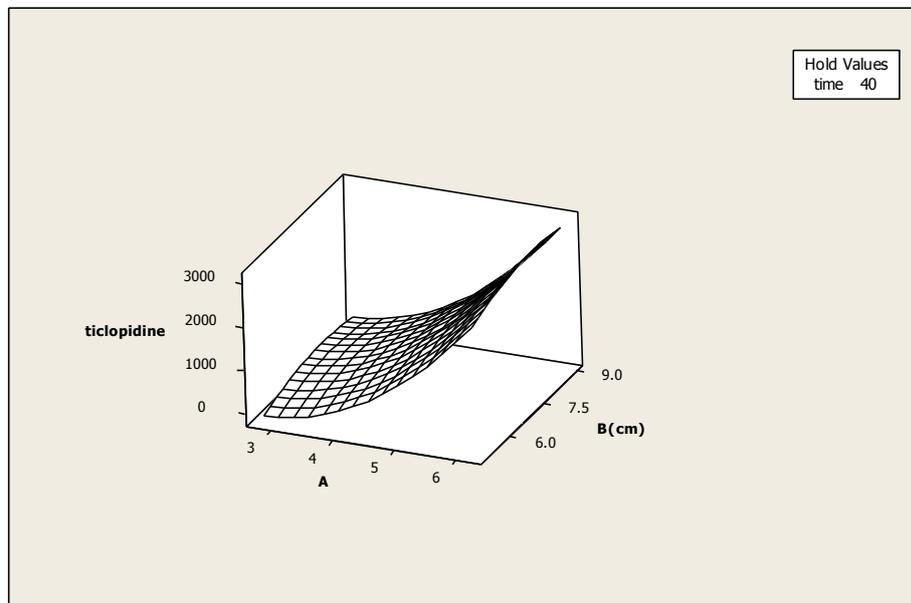


شکل ۳-۱۲: نمودار باقیمانده در برابر ترتیب زمانی برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان با روش HF-

LPME در طراحی باکس- بنکن مربوط به پاسخ لوزارتان

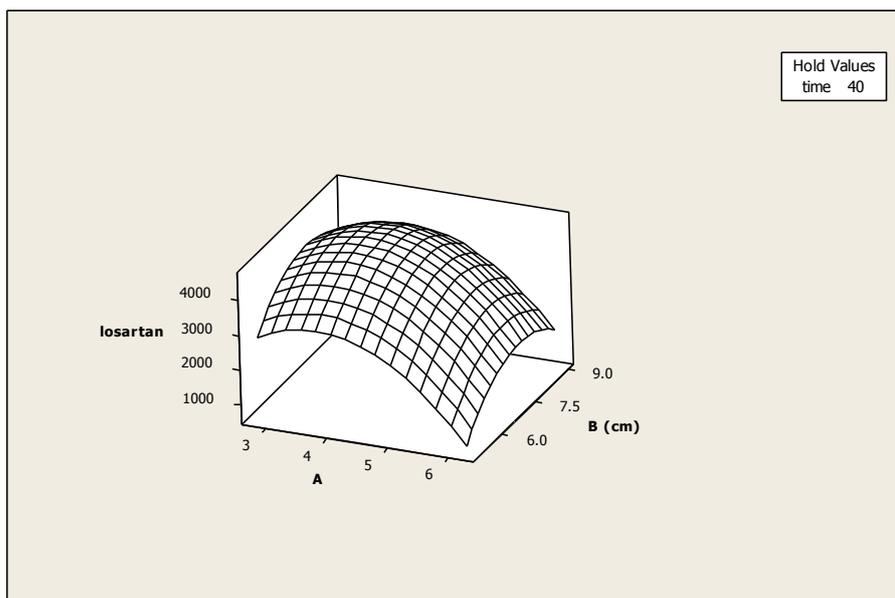
### ۳-۴-۲-۵- نمودارهای رویه پاسخ

از منحنی‌های رویه پاسخ سه بعدی برای نشان دادن رابطه و برهم کنش‌های بین خود متغیرها و نیز اثر این متغیرها به صورت تک تک روی پاسخ استفاده می‌شود. بر اساس نمودارهای رویه پاسخ مدل مربوطه، در شکل‌های (۳-۱۳) و (۳-۱۴)، نمودار پاسخ لوزارتان (۳-۱۴) در زمان ثابت ۴۰ دقیقه با افزایش طول فیبر تا ۷/۴ سانتی‌متر، پاسخ افزایش یافته و بعد از آن کمی کاهش می‌یابد. نمودار پاسخ تیکلوپیدین برای اثر مقابل pH و طول فیبر، پاسخ با افزایش طول فیبر افزایش و در نهایت طول ۷/۴ سانتی‌متر به عنوان طول فیبر بهینه انتخاب شد. با توجه به شکل (۳-۱۴)، افزایش pH تا ۴/۵ به علت پروتونه نشدن لوزارتان برای رفتن از فاز آبی به فاز آلی، سبب افزایش در میزان پاسخ شده و پس از این pH به دلیل یونیزه شدن لوزارتان با توجه به ثابت اسیدی پایین [۲۴] آن نسبت به تیکلوپیدین، شاهد کاهش سطح پاسخ لوزارتان هستیم. اما پاسخ تیکلوپیدین با افزایش pH همچنان افزایش یافته و در نهایت pH برابر با ۴/۹ به عنوان pH بهینه انتخاب گردید.



شکل ۳-۱۳: منحنی رویه پاسخ پیش تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان در مقابل طول فیبر (B) و pH (A) برای

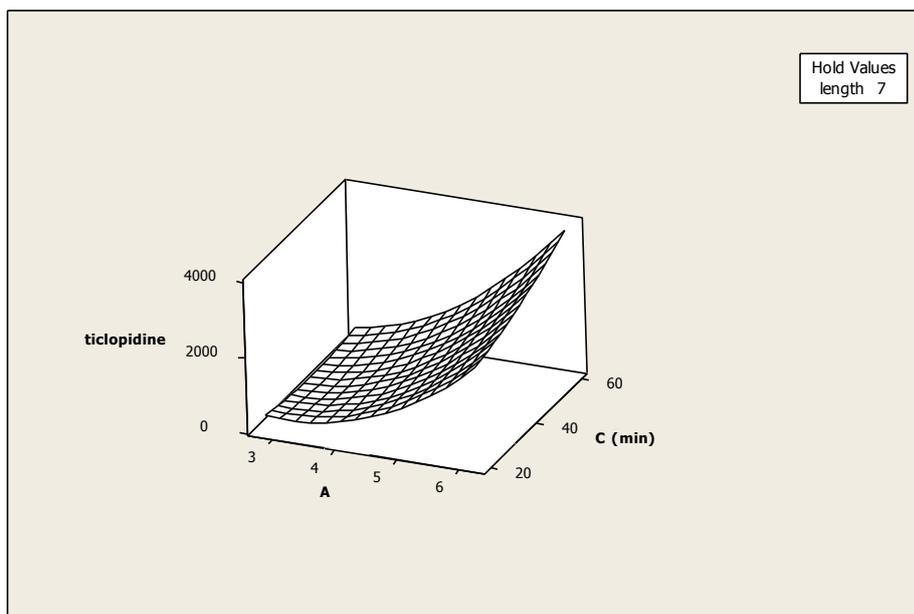
پاسخ تیکلوپیدین



شکل ۳-۱۴: منحنی رویه پاسخ پیش تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان در مقابل طول فیبر (B) و pH (A)

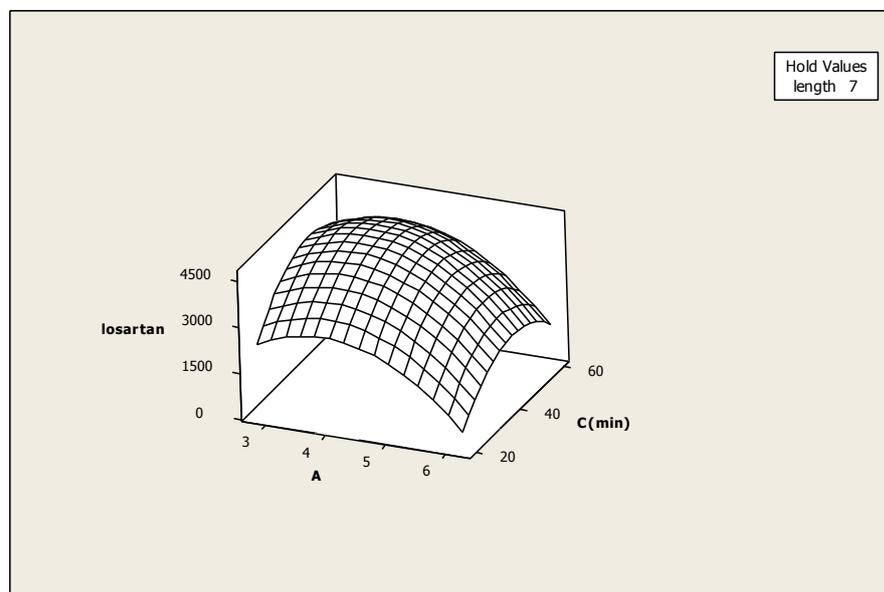
برای پاسخ لوزارتان

شکل‌های (۳-۱۵) و (۳-۱۶) منحنی رویه پاسخ برای تیکلوپیدین و لوزارتان در مقابل pH محلول نمونه و زمان استخراج را نشان می‌دهد. در نمودار (۳-۱۵) که رویه پاسخ برای تیکلوپیدین را نمایش می‌دهد با افزایش زمان استخراج پاسخ آشکارساز با شیب تندی افزایش یافته و همزمان پاسخ با افزایش pH افزایش می‌یابد. در نمودار (۳-۱۶) پاسخ لوزارتان با افزایش زمان استخراج تا ۴۸ دقیقه افزایش و پس از آن با شیب ملایم کاهش می‌یابد. pH محلول تا حدود ۴/۵ همراه با افزایش زمان با شیب بسیار ملایمی موجب افزایش پاسخ می‌شود و پس از آن با شیب بیشتری کاهش می‌یابد که می‌تواند به دلیل یونیزه شدن لوزارتان باشد. برهم‌کنش زمان و pH برای پاسخ تیکلوپیدین یک فاکتور مؤثر مهم (با توجه به مقدار احتمال P در جدول ۳-۱۱) و برای پاسخ لوزارتان یک فاکتور غیر مهم در روند استخراج می‌باشد.



شکل ۳-۱۵: منحنی رویه پاسخ پیش تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان در مقابل pH محلول نمونه (A) و زمان

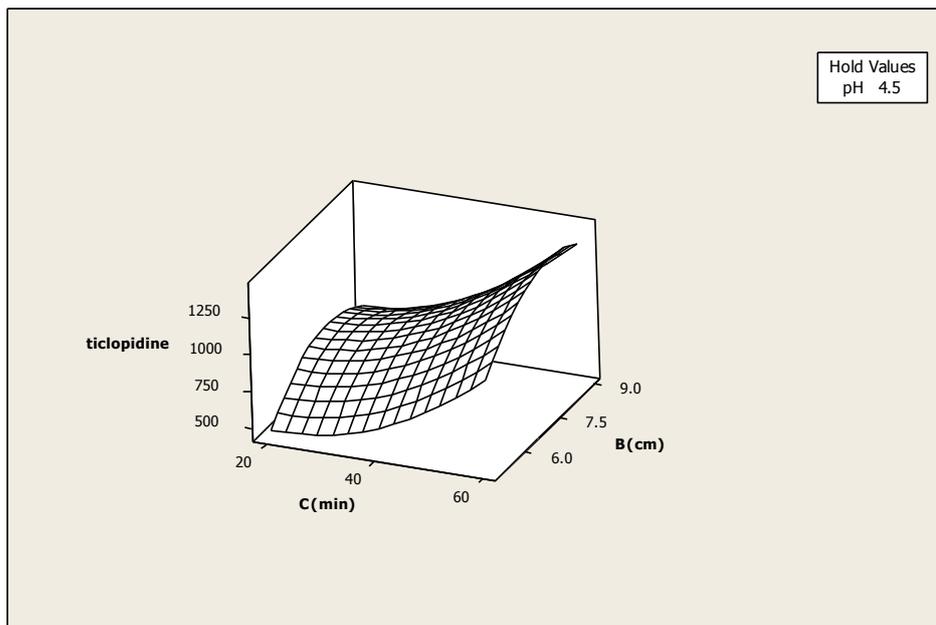
استخراج (C) برای پاسخ تیکلوپیدین



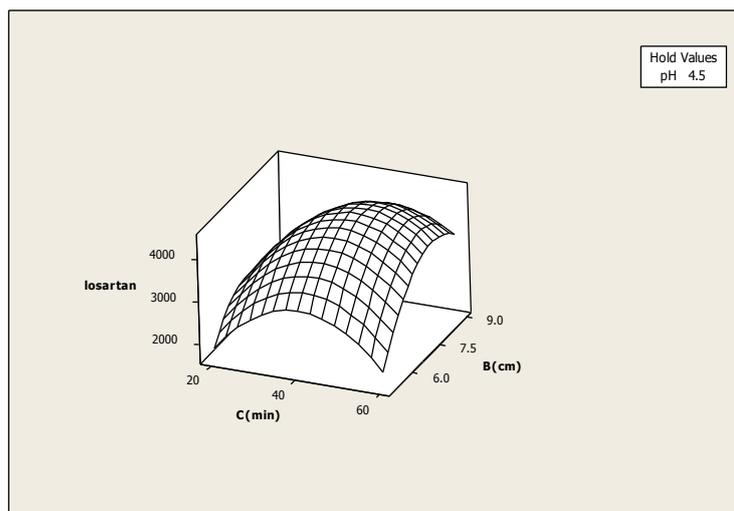
شکل ۳-۱۶: منحنی رویه پاسخ پیش تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان در مقابل pH محلول نمونه (A) و

زمان استخراج (C) برای پاسخ لوزارتان

منحنی رویه پاسخ برای اثر طول فیبر در برابر زمان انجام استخراج در شکل‌های (۳-۱۷) و (۳-۱۸)، نشان می‌دهد که سیگنال در گذر زمان همراه با افزایش طول فیبر افزایش می‌یابد. به عبارتی سطح فیبر با افزایش طول آن، زیادتر شده و برای اینک آنالیت‌های جذب شده در اثر اختلاف غلظتی با حلال درون لومن فیبر، منتقل شوند، به زمان نیاز دارند. این افزایش در سیگنال را تا طول تقریبی ۷/۴ سانتی‌متر با گذشت زمان استخراج شاهد هستیم اما از این طول به بعد با افزایش زمان استخراج، پاسخ طول فیبر در برابر سیگنال حاصل به شدت افت می‌کند. این کاهش شدید برای پاسخ لوزارتان (۳-۱۸) را شاهد هستیم علت آن نیز می‌تواند به دلیل کنده شدن حلال از سطح فیبر با افزایش زمان و در اثر ایجاد حباب هوای بزرگ در اثر چرخش مگنت درون محلول باشد [۷۲].



شکل ۳-۱۷: منحنی رویه پاسخ پیش تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان در مقابل زمان استخراج (C) و طول فیبر (B) برای پاسخ تیکلوپیدین



شکل ۳-۱۸: منحنی رویه پاسخ پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان در مقابل زمان استخراج و طول فیبر

برای پاسخ لوزارتان

### ۳-۴-۲-۶- سطح بهینه فاکتورهای مؤثر

بر مبنای این مدل ریاضی، مختصات شرایط بهینه فاکتورهای مؤثر در استخراج تیکلوپیدین و لوزارتان با روش HF-LPME، با استفاده از نرم‌افزار Minitab 16 محاسبه گردید. نتایج در جدول (۳-۱۳) گزارش شده‌است. در شرایط بهینه می‌توان به حساسیت بهتری برای اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان دست پیدا کرد. مقایسه این نتایج، با نتایج حاصل از تغییر یک فاکتور در زمان به خوبی نشان می‌دهد که شرایط بهینه به دست آمده از طرح آزمایش با استفاده از مدل باکس-بنکن، تا حدودی متفاوت از شرایط بهینه‌سازی تک متغیری بوده که نشان دهنده این است که بین فاکتورهای مؤثر بر پاسخ اندازه‌گیری شده برهم کنش وجود داشته است و در نتیجه شرایط بهینه بدست آمده از روش طرح آزمایش به مقدار بهینه واقعی نزدیک تر است.

جدول ۳-۱۵: مقادیر بهینه در طراحی فاکتوریل

فاکتور	مقادیر بهینه تک متغیری	مقادیر بهینه طرح فاکتوریل
pH	۴/۵۰	۴/۹۶
سرعت همزن (rpm)	۱۰۰۰	۱۰۰۰
درصد نمک افزوده شده (% w/v)	۵/۰	۱/۰
طول فیبر (cm)	۸/۰	۷/۴
زمان استخراج (min)	۶۰	۴۸

قابل ذکر است که سیگنال تجزیه‌ای به‌دست آمده از مقادیر بهینه در روش تک متغیری برای تیکلوپیدین ۱۰۲۵ و برای لوزارتان ۲۱۶۰ می‌باشد. در روش طراحی آزمایش، سیگنال تجزیه‌ای با افزایش نسبت به مقدار تک متغیری به مقدار ۲۴۷۱ برای داروی تیکلوپیدین و ۳۱۳۷ برای داروی لوزارتان به‌دست آمد. این افزایش سیگنال با توجه به در نظر گرفتن برهم‌کنش‌ها در طراحی آزمایش قابل توجیه است.

### ۳-۴-۳- توجیه فاکتورهای موثر بر پیش تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان

#### ۳-۴-۳-۱- بررسی اثر نوع حلال استخراج کننده

برای بررسی نوع حلال استخراج کننده، حلال‌های ۱- اکتانول، ۱- دکانول، ۱- دودکانول، ۱- آندکانول و ۱- هپتانول مورد آزمون قرار گرفتند. حلال‌های هگزان، اتیل استات و تولوئن به دلیل نقطه جوش پایین در سطح فیبر تثبیت نشده و پاسخی برای آنالیت‌ها بعد از انجام استخراج با این حلال‌ها ثبت نشد. برای انجام عمل استخراج جهت بهینه‌سازی، دو مرحله تهیه محلول نمونه (فاز دهنده) و آماده‌سازی فیبر توخالی، به موازات یکدیگر انجام شد. برای تهیه محلول نمونه در ظرف آزمایش، محلول‌های ۱۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر هر دو دارو از محلول‌های مادر ساخته شد و ظرف ۱۰/۰ میلی‌لیتری حاوی محلول آزمایش نسبت به تیکلوپیدین ۱/۰ میلی‌گرم بر لیتر و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر نسبت به لوزارتان بود. ۱/۰ میلی‌لیتر بافر فسفات با pH= ۳/۰ به محلول افزوده و با آب مقطر به حجم ۱۰/۰

میلی لیتر رسید. فیبرها را در اندازه‌ی ۶/۰ سانتی متری پس از آماده‌سازی ذکر شده در قسمت (۳-۳)، به مقدار ۱۶/۰ میکرولیتر (مطابق با حجم استوانه‌ای به شعاع ۳۰۰ میکرومتر) از حلال پر گردید. انتهای فیبر با یک فویل آلومینیومی کوچک بسته شد و فیبر همراه با میکروسرنگ به داخل محلول نمونه در روی همزن مغناطیسی قرار گرفت. سرنگ به گیره پایه متصل شد و به ظرف آزمایش که محتوی یک مگنت ۰/۷ سانتی متری بود، انتقال یافت. دور همزن روی ۹۰۰ دور در دقیقه تنظیم و پس از گذشت ۶۰ دقیقه (زمان استخراج)، فاز پذیرنده به داخل سرنگ کشیده شد و به یک میکروتیوپ منتقل گردید. سپس به مقدار مورد نیاز به دستگاه HPLC تزریق شد. این شرایط برای نمونه شاهد نیز عیناً تکرار شد. اختلاف سیگنال آنالیت و شاهد به عنوان سیگنال تجزیه‌ای ثبت گردید. که در جدول (۱-پیوست) و شکل (۱-پیوست) آورده شده است در این مرحله مشاهده شد که حلال ۱-هیپتانول به دلیل داشتن نقطه جوش پایین نسبت به سایر حلال‌ها به خوبی در سطح فیبر پایدار نبوده و درصد بازیابی پایین تری دارد. همچنین حلال ۱-دودکانول به دلیل داشتن نقطه انجماد پایین و یخ زدن داخل سرنگ، سیگنال و درصد بازیابی کمتری نسبت به ۱-اکتانول و ۱-دکانول است و در نهایت حلال ۱-اکتانول با اختلاف درصد بازیابی کمی نسبت به حلال ۱-دکانول، به عنوان حلال استخراج کننده انتخاب شد.

نوع حلال آلی که در داخل منافذ فیبر ثابت می‌شود، یک فاکتور بحرانی در HF-LPME می‌باشد. از این رو قطبیت فاز آلی بایستی شبیه فیبر پلی پروپیلنی باشد تا به آسانی درون خلل و فرج غشاء فیبر نفوذ نموده و آن را آغشته کند. همچنین حلال باید دارای فراریت کم و غیرقابل امتزاج با آب (محلول آبی نمونه) باشد و نیز به راحتی از سطح فیبر جدا نشود.

### ۳-۴-۲- بررسی اثر pH فاز آبی بر میزان استخراج

در بررسی pH محلول نمونه، از بافر فسفات‌ی در ناحیه pH ۸/۰-۲/۰ استفاده شد. ۱/۰ میلی

لیترمحلول ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر تیکلوپیدین و ۱/۰ میلی لیترمحلول ۵/۰ میلی گرم بر لیتر لوزارتان، ۱/۰ میلی لیتر محلول بافر فسفاتی pH بین ۲/۰ تا ۸/۰ به ظرف آزمایش منتقل و به حجم نهایی ۱۰/۰ میلی لیتر رسید. پس از تهیه محلول نمونه و آماده سازی فیبرها با طول ۶/۰ سانتی متر، استخراج با دور همزن ۹۰۰rpm و زمان استخراج ۶۰ دقیقه مطابق آنچه که در قسمت (۳-۴-۳-۱) ذکر شده است، انجام شد. پس از انتقال فاز پذیرنده به ویال، ۵/۰  $\mu$ l از حلال استخراج به دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا تزریق گردید. سپس سیگنال محلول شاهد نیز به همین روش اندازه گیری و اختلاف سیگنال محلول نمونه و شاهد به عنوان سیگنال تجزیه ای در نظر گرفته شد نتایج در جدول (۲-۲-پیوست) و شکل (۲-پیوست) آورده شده است. به طور کلی در تمامی استخراج های فاز مایع با فیبر توخالی همواره برای استخراج بیشتر آنالیت از فاز آبی به فاز آلی بایستی آنالیت مورد نظر در محلول نمونه خنثی (بدون بار) باشد [۶۶]. این روش برای ترکیبات اسیدی و بازی محدودیت دارد. برای مثال در ترکیبات بازی بایستی pH نمونه در ناحیه بازی تا خنثی تنظیم شود (آنالیت های بدون بار یکی از ضروریات یا شرایط کارآمد برای غشاء مایع پشتیبانی شده (SLM) یا همان فیبرها می باشد). در سیستم دو فازی گرادیان غلظتی بین حلال آلی روی سطح غشاء با فاز پذیرنده، باعث انتقال آنالیت ها می شود.

دو داروی مذکور رفتاری متفاوت و مخالف یکدیگر در رنج pH انجام کار از خود نشان دادند. بهترین سیگنال در محیط اسیدی برای لوزارتان با توجه به ثابت اسیدی پایین تر آن نسبت به تیکلوپیدین بوده و در این موقع تیکلوپیدین در کمترین مقدار خود قرار گرفت. در نهایت دو دارو در pH برابر با ۴/۵ سیگنالی مطلوب داشته و این pH به عنوان نقطه بهینه در روش یک متغیر در یک زمان در نظر گرفته شد. ناحیه pH برای بهینه سازی چند متغیری بین ۶/۲-۲/۸ انتخاب و پس از بررسی در مرحله غربالگری، به عنوان فاکتوری با اثر مهم و بالا انتخاب و در طرح فاکتوریل باکس-بنکن با در نظر گرفتن برهم کنش ها،  $pH = 4/96$  به عنوان نقطه بهینه بدست آمد.

### ۳-۴-۳-۳- بررسی اثر نوع بافر

پس از بررسی اثر pH، با توجه به pH بهینه، برای دستیابی به حساسیت بیشتر، نوع بافر شامل بافرهای فسفاتی، استاتی و فتالاتی در pH مورد نظر، مورد بررسی قرار گرفت. در این مرحله روش کار به شیوه زیر بود:

۱/۰ میلی لیتر محلول ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر از تیکلوپیدین و ۵/۰ میلی لیتر محلول ۵/۰ میلی گرم بر لیتر از لوزارتان به ظرف استخراج انتقال داده و هر بار ۱/۰ میلی لیتر محلول بافر از نوع فسفاتی، استاتی و فتالاتی با pH برابر با ۴/۵ به آن اضافه شد. محلول با آب دوبار تقطیر به حجم ۱۰/۰ میلی لیتر رسانده شد. عمل استخراج روی محلول نمونه انجام و فاز پذیرنده به مقدار ۵/۰ میکرولیتر به دستگاه HPLC تزریق شد، که نتایج حاصله در جدول (۳-پیوست) و شکل (۳-پیوست) آورده شده است. با توجه به نتایج بدست آمده، بافر فسفاتی دارای بیشترین سیگنال و همچنین پیک‌های کروماتوگرام نیز تیزتر بودند. بنابراین بافر فسفاتی به عنوان بافر بهینه در سایر مراحل انجام بهینه‌سازی مورد استفاده قرار گرفت.

### ۳-۴-۳-۴- بررسی اثر حجم بافر

در این قسمت بعد از بررسی نوع بافر، اثر حجم بافر فسفاتی با pH برابر با ۴/۵ در محدوده ۰/۵ تا ۳/۰ میلی لیتر از بافر مورد بررسی قرار گرفت. روش کار در این بررسی به صورت زیر بود:

۱/۰ میلی لیتر محلول ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر از تیکلوپیدین و ۵/۰ میلی لیتر محلول ۵/۰ میلی گرم بر لیتر از لوزارتان و حجم‌های مختلفی از بافر فسفات در محدوده ۰/۵-۳/۰ میلی لیتر، به ظرف استخراج اضافه و با آب دوبار تقطیر به حجم ۱۰/۰ میلی لیتر رسانده شده و عمل استخراج مطابق آنچه در مرحله تعیین pH نمونه گزارش شده، انجام شد و محلول پذیرنده به میزان ۵/۰ میکرولیتر برای محلول نمونه و شاهد به HPLC تزریق و اختلاف بین آن دو به عنوان سیگنال تجزیه‌ای مورد استفاده قرار

گرفت. نتایج بدست آمده در جدول (۴-پیوست) و شکل (۴-پیوست) آورده شده است. نتایج حاصله در محدوده ۱/۰-۲/۰ بیشترین مقدار را داشته و پس از آن ثابت می‌باشد. بنابراین حجم ۲/۰ میلی‌لیتر از بافر فسفاتی با pH برابر با ۴/۵ به عنوان حجم بهینه بافر برای بررسی‌های بعدی انتخاب شد. به نظر می‌رسد، ۲/۰ میلی‌لیتر از بافر برای ایجاد ظرفیت بافری مناسب، کافی باشد.

### ۳-۴-۳-۵- بررسی اثر نمک

برای این منظور مقدار نمک افزوده شده به ظرف مورد استخراج بین ناحیه ۰/۰ تا ۰/۸۰ گرم نمک سدیم کلرید به محلول نمونه افزوده شد پس از تهیه محلول ۱۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر از تیکلوپیدین و محلول ۵/۰ میلی‌گرم بر لیتر لوزارتان، به ظرف آزمایش از هر دارو ۱/۰ میلی‌لیتر، ۲/۰ میلی‌لیتر بافر فسفات با pH برابر ۴/۵ منتقل و به حجم ۱۰/۰ میلی‌لیتر رسانیده شد. مقدارهای متفاوت از نمک به ظرف آزمایش (محلول نمونه یا فاز دهنده) افزوده شد. پس از آماده‌سازی فیبر، فیبر از حلال ۱- اکتانول پر گردید و درون محلول آزمایش قرار داده شد. همچنین سرعت چرخش همزن روی ۹۰۰ دور در دقیقه تنظیم شد و پس از گذشت ۶۰ دقیقه، عمل استخراج به پایان رسید. فیبر را از محلول نمونه خارج و انتهای آن را با یک قیچی برش داده و حلال آلی حاوی آنالیت را توسط میکروسرنگ به ویال منتقل گردید. سپس ۵/۰  $\mu$ l از آن به دستگاه HPLC تزریق شد. نتایج و نمودار آن در جدول (۵-پیوست) و شکل (۵-پیوست) آورده شده است. تاثیر قدرت یونی بر راندمان استخراج را می‌توان تحت تاثیر دو نیروی مختلف بررسی کرد. در نیروی اول با افزایش نمک پدیده -Salting out اتفاق می‌افتد. به این ترتیب که با کاهش حلالیت آنالیت در فاز آبی سبب افزایش توزیع به فاز آلی می‌شود. و در نیروی دوم با افزایش قدرت یونی محلول آبی چگال تر و منجر به کاهش کارایی فرایند انتقال جرم و در نهایت کاهش راندمان استخراج می‌شود. سیگنال‌های پس از استخراج نشان دهنده افزایش یکنواخت با شیب کم پاسخ کروماتوگرافی برای آنالیت‌ها بود. در نهایت مقدار ۰/۵۰ گرم نمک به عنوان مقدار بهینه در روش تک متغیری نظر گرفته شد. در بهینه سازی چند متغیری مقدار نمک

در سطح ۰/۱۰ تا ۰/۶۰ تعیین سطح شد و در آزمون پلاکت برمن به عنوان یک فاکتور غیر مؤثر در سطح پایین یعنی ۰/۱۰ گرم نمک سدیم کلرید در ادامه آزمایش‌ها در نظر گرفته شد.

### ۳-۴-۳-۶- بررسی اثر سرعت چرخش همزن

تاثیر سرعت چرخش همزن بر روی پیش‌تغلیظ تیکلوپیدین و لوزارتان در محدوده ۱۰۰-۱۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) مورد بررسی قرار گرفت. روش کار به این صورت گزارش می‌شود:

۱/۰ میلی‌لیتر محلول ۱۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر از تیکلوپیدین و ۵/۰ میلی‌لیتر محلول ۵/۰ میلی‌گرم بر لیتر از لوزارتان و حجم ۲/۰ میلی‌لیتر از بافر فسفات، ۰/۵ گرم نمک سدیم کلرید به ظرف استخراج اضافه و با آب دوبار تقطیر به حجم ۱۰/۰ میلی‌لیتر رسانده شده و عمل استخراج مطابق آنچه در مرحله تعیین pH نمونه گزارش شده، انجام شد. نتایج بدست آمده نشان می‌دهد که در ۱۰۰۰ دور چرخش در دقیقه، بالاترین سیگنال به دست آمد و لذا به عنوان نقطه بهینه سرعت چرخش در آزمون تک متغیری انتخاب شد که نتایج حاصل از آن در جدول (۶-پیوست) و شکل (۶-پیوست) آورده شده است. در مرحله بعد، (آزمایش‌های چند متغیری) سرعت چرخش در سطوح rpm ۱۰۰-۱۰۰۰ مورد بررسی قرار گرفت که با غیر مهم شناختن این فاکتور توسط طرح پلاکت-برمن و با توجه به علامت ضرایب حاصل از این طرح، سرعت چرخش در سطح بالای rpm ۱۰۰۰ خود ثابت و برای اندازه‌گیری‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفت. سرعت چرخش یا همزدن محلول به انتقال جرم از فاز آبی به فاز آلی کمک می‌کند. در سرعت‌های بالا به دلیل ایجاد حباب‌های بزرگ هوا در محلول که باعث کنده شدن حلال از سطح فیبر می‌شود، انتقال جرم کاهش می‌یابد [۷۲].

### ۳-۴-۳-۷- بررسی اثر طول فیبر

تاثیر طول فیبر یا اثر حجم فاز گیرنده (حلال آلی استخراج کننده) بر میزان استخراج در محدوده ۱۰/۰-۴/۰ سانتی‌متری معادل حجم ۱۱/۰ و ۲۸/۰ میکرولیتر از فاز پذیرنده، مورد بررسی قرار

گرفت. روش کار در این بررسی به صورت زیر می‌باشد:

۱/۰ میلی لیتر محلول ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر از تیکلوپیدین و میلی لیتر محلول ۵/۰ میلی گرم بر لیتر از لوزارتان و حجم ۲/۰ میلی لیتر از بافر فسفات، ۰/۵۰ گرم نمک سدیم کلرید به ظرف استخراج اضافه و با آب دوبار تقطیر به حجم ۱۰/۰ میلی لیتر رسانده شد. برای آماده سازی فیبرها، آن‌ها را در اندازه‌های ذکر شده برش داده و همانند موارد و نکات گفته شده در قسمت روش کار، از گونه‌های همراه احتمالی پاکسازی و برای نشان دادن حلال آلی روی آن و نیز تزریق حلال در داخل لومن فیبر آماده شدند. عمل استخراج روی محلول‌های نمونه با فیبرهای آماده شده انجام گرفت و نتایج حاصل نشان داد که افزایش طول فیبرها موجب افزایش میزان فاز پذیرنده و نیز افزایش مساحت تماس با محلول نمونه می‌شود که پاسخ آشکارساز در یک حجم ثابت از فاز دهنده (آبی) نیز افزایش می‌یابد. بیشترین سیگنال بین ناحیه ۷/۰ تا ۹/۰ سانتی‌متر حاصل شد، که در بهینه‌سازی تک متغیری ۸/۰ سانتی‌متر به عنوان طول بهینه گزارش شد. نتایج به دست آمده در جدول (۷-پیوست) و شکل (۷-پیوست) آورده شده است. راندمان استخراج با افزایش طول فیبر از ۸/۰ سانتی‌متر تقریباً ثابت ماند و با توجه به اینکه فرایند انتقال جرم ثابت مانده است، افزایش در طول فیبر سبب رقیق شدن فاز پذیرنده و کاهش راندمان خواهد شد. در مرحله طراحی آزمایش سطح این فاکتور در محدوده ۵/۰-۹/۰ سانتی‌متر انتخاب شد. در مرحله غربالگری این فاکتور مهم شناخته شد و در مرحله بهینه‌سازی مورد آنالیز قرار گرفته که در نهایت نقطه بهینه برای طول فیبر ۷/۴ سانتی‌متر (حجم ۲۰/۰ میکرولیتر از فاز پذیرنده) بدست آمد.

### ۳-۴-۳-۸- بررسی اثر زمان استخراج

اثر زمان استخراج بر پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری دو داروی مذکور در محدوده ۷۰-۱۰ دقیقه مورد

بررسی قرار گرفت که روش کار آن به صورت زیر انجام شد:

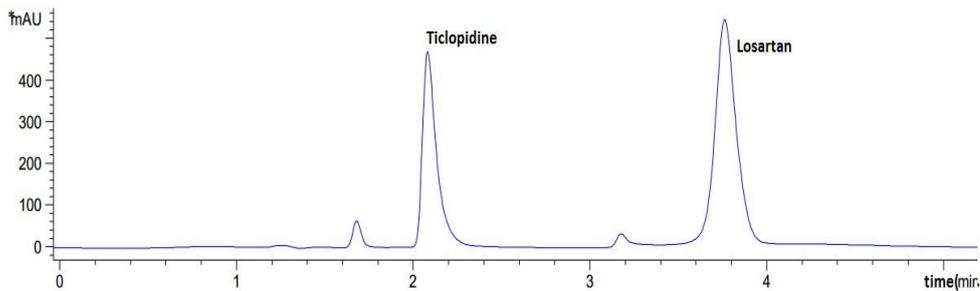
۱/۰ میلی لیتر محلول ۱۰/۰ میلی گرم بر لیتر از تیکلوپیدین و ۱/۰ میلی لیتر محلول ۵/۰ میلی گرم بر لیتر از لوزارتان و حجم ۲/۰ میلی لیتر از بافر فسفات، ۰/۵۰ گرم نمک سدیم کلرید به ظرف استخراج اضافه و با آب دوبار تقطیر به حجم ۱۰/۰ میلی لیتر رسانده شده و عمل استخراج در زمان‌های مختلف با قرار دادن یک فیبر به طول ۸/۰ سانتی متر داخل محلول به هم زدن در ۱۰۰۰ rpm، انجام شد. نتیجه حاصل از سیگنال‌های بدست آمده نشان می‌دهد که با افزایش زمان استخراج تا ۶۰ دقیقه پاسخ آشکارساز نیز افزایش و بعد از آن، احتمالاً به میزان جدا شدن حلال روی فیبر با گذشت زمان افزایش یافته و لذا سیگنال ثابت می‌ماند. زمان بهینه در روش یک متغیر در زمان، ۶۰ دقیقه در نظر گرفته شد. که نتایج در جدول (۸-پیوست) و شکل (۸-پیوست) آورده شده است. در بهینه سازی چند متغیری سطح فاکتور زمان استخراج در محدوده ۶۰-۲۰ دقیقه انتخاب و در مرحله غربالگری به عنوان فاکتور مهم انتخاب شد. در مرحله بهینه‌سازی طراحی آزمایش با مدل باکس-بنکن، زمان ۴۸ دقیقه به عنوان زمان بهینه استخراج انتخاب گردید.

با توجه به مدل ریاضی پیشنهادی، شرایط بهینه نهایی اندازه‌گیری داروهای تیکلوپیدین و لوزارتان به شرح جدول (۳-۱۶) می‌باشد.

جدول ۳-۱۶: شرایط بهینه نهایی سیستم برای اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان

مقدار بهینه	فاکتور
۱-اکتانول	نوع حلال
۴/۹۶	pH
فسفاتی	نوع بافر
۲/۰	حجم بافر (ml)
۱/۰	قدرت یونی (% w/w)
۱۰۰۰	سرعت همزن (rpm)
۷/۴	طول فیبر (cm)
۴۸	زمان استخراج (min)

کروماتوگرام مربوط به استخراج آنالیت‌ها در شرایط بهینه و در غلظت ۱/۰ میلی‌گرم بر لیتر از هر دو وارو در شکل (۳-۱۹) آورده شده است.



شکل ۳-۱۹: کروماتوگرام مربوط به استخراج در غلظت ۱/۰ میلی‌گرم بر لیتر تیکلوپیدین و لوزارتان در شرایط بهینه حاصل از طراحی آزمایش. طول موج اندازه‌گیری ۲۱۸ نانومتر

### ۳-۵- رسم منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ

پس از دستیابی به شرایط بهینه برای اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان، منحنی کالیبراسیون رسم گردید. ارزش و کارایی یک روش آنالیز با توجه به گستره دامنه خطی آن و حساسیت و تکرارپذیری نتایج در آن قابل ارزیابی می‌باشد. این پارامترها با توجه به منحنی کالیبراسیون برای یک روش قابل استخراج می‌باشد.

### ۳-۵-۱- رسم منحنی پیش تغلیظ تیکلوپیدین

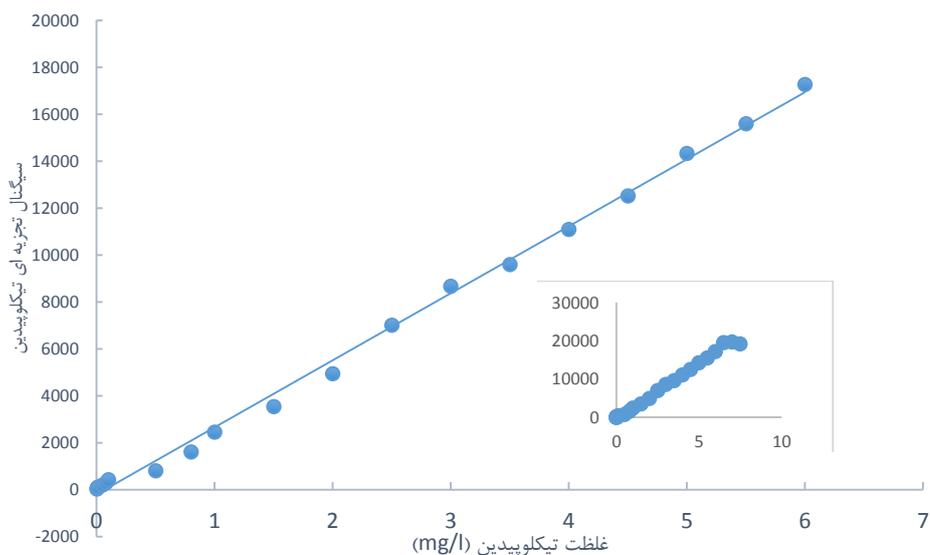
به‌منظور رسم منحنی کالیبراسیون پیش‌تغلیظ، محلول‌های نمونه با غلظت‌های متفاوت از تیکلوپیدین تهیه شد. بدین ترتیب که در ظرف آزمایش حجم‌های معینی از محلول ۱۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر تیکلوپیدین و لوزارتان برای ایجاد گستره غلظتی ۰/۰۰۱ تا ۷/۵ میلی‌گرم بر لیتر، سدیم کلرید ۰/۱ گرم و ۲/۰ میلی لیتر محلول بافر فسفاتی با  $\text{pH} = ۴/۹$  اضافه شد و به حجم ۱۰/۰ میلی لیتر رسانده شد

و سپس عمل استخراج تحت شرایط بهینه بر روی این محلول‌ها انجام شد. پس از جداسازی، فاز پذیرنده درون فیبر با دستگاه HPLC اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل از این بررسی در جدول (۳-۱۷) و شکل (۳-۲۰) نشان داده شده است. همچنین معادله خط برای تیکلوپیدین در محدوده خطی ۰/۰۰۴-۶/۰ میلی‌گرم بر لیتر به صورت زیر بدست آمد:

$$y = 2858/9C_{\text{ticlopidine}} - 154/26 \quad R^2 = 0/997$$

جدول ۳-۱۷: سیگنال‌های تجزیه‌ای بدست آمده برای غلظت‌های متفاوت از تیکلوپیدین

سیگنال تجزیه‌ای	غلظت تیکلوپیدین (mg/l)	سیگنال تجزیه‌ای	غلظت تیکلوپیدین (mg/l)
۷۰۰۹/۸۲	۰/۰۰۴	۴۰/۶۳	۲/۵
۸۶۶۹/۲۱	۰/۰۰۸	۸۷/۱۵	۳/۰
۹۵۹۷/۹۳	۰/۰۱	۱۰۷/۷۶	۳/۵
۱۱۰۹۶/۶۶	۰/۰۵	۱۸۹/۶۷	۴/۰
۱۲۵۱۹/۰۶	۰/۰۸	۲۸۹/۸۳	۴/۵
۱۴۳۳۲/۵۶	۰/۱	۴۲۶/۲۶	۵/۰
۱۵۹۴۲/۷۶	۰/۵	۸۰۲/۹۶	۵/۵
۱۷۲۵۶/۱	۰/۸	۱۶۰۸/۳۳	۶/۰
۱۹۵۶۴/۵۶	۱/۰	۲۴۵۳/۱۲	۶/۵
۱۹۷۳۶/۵	۱/۵	۳۵۳۸/۹۹	۷/۰
۱۹۲۰۷/۸۶	۲/۰	۵۹۴۷/۲۱	۷/۵



شکل ۳-۲۰: منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ لوزارتان تیکلوپیدین

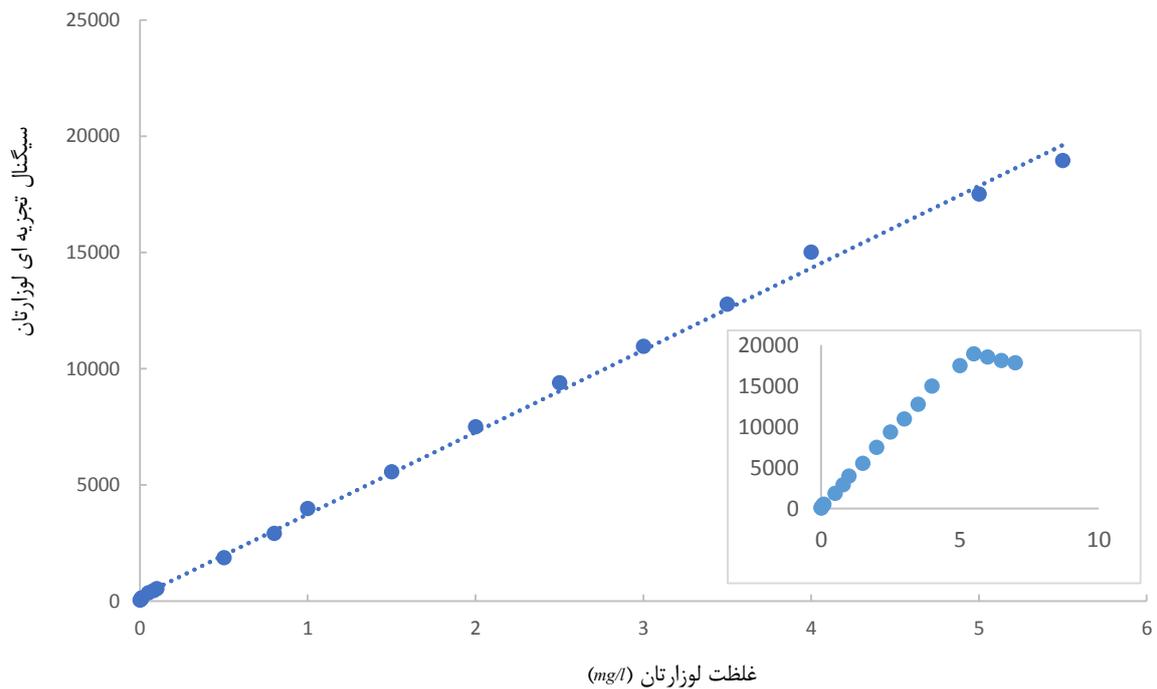
### ۳-۵-۲- رسم منحنی پیش تغلیظ لوزارتان

برای رسم نمودار کالیبراسیون پیش تغلیظ لوزارتان، عمل استخراج برای محلول‌های شاهد و آنالیت، مطابق آنچه در قسمت کالیبراسیون پیش تغلیظ تیکلوپیدین گفته شد، انجام شد. نمودار کالیبراسیون پیش تغلیظ لوزارتان در شکل (۳-۲۱) و نتایج سیگنال‌های حاصل در جدول (۳-۱۸) آمده است. معادله خط برای لوزارتان در محدوده خطی ۵/۵-۰/۰۳ میلی‌گرم بر لیتر به صورت زیر بدست آمد:

$$y = 3574/8 C_{\text{losartan}} + 107/76 \quad R^2 = 0/998$$

جدول ۳-۱۸: سیگنال‌های تجزیه‌ای بدست آمده برای غلظت‌های متفاوت از لوزارتان

سیگنال تجزیه‌ای	غلظت لوزارتان (mg/l)	سیگنال تجزیه‌ای	غلظت لوزارتان (mg/l)
۷۴۷۳/۴۷	۲/۰	۳۸/۳۳	۰/۰۰۳
۹۳۵۸/۶۷	۲/۵	۵۳/۶۶	۰/۰۰۵
۱۰۹۲۹/۵۵	۳/۰	۹۴/۸۲	۰/۰۰۸
۱۲۷۴۰/۰۵	۳/۵	۱۰۶/۲۵	۰/۰۱
۱۴۹۷۸/۵۵	۴/۰	۲۵۰/۳۶	۰/۰۵
۱۸۴۸۴/۵۵	۵/۰	۴۲۷/۶۵	۰/۰۸
۱۸۹۲۵/۸۷	۵/۵	۵۰۶/۳۵	۰/۱
۱۹۴۴۵/۵۷	۶/۰	۱۷۶۰/۷۸	۰/۵
۱۷۱۶۹/۵۵	۶/۵	۲۸۷۶/۸۹	۰/۸
۱۶۶۹۱/۲۵	۷/۰	۳۹۵۱/۵۶	۱/۰
		۵۵۳۳/۵۴	۱/۵



شکل ۳-۲۱: منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ لوزارتان

### ۳-۶- بررسی اثر مزاحمت

پس از بهینه‌سازی شرایط و رسم منحنی کالیبراسیون، به منظور تعیین میزان گزینش‌پذیری و بررسی قابلیت کاربرد روش میکرواستخراج مایع با فیبر توخالی در اندازه‌گیری لوزارتان و تیکلوپیدین در نمونه‌های حقیقی، اثر مزاحمت‌های احتمالی ترکیبات مختلف موجود در خون و همچنین داروهای هم‌خانواده در پیش‌تغلیظ دو داروی مذکور تحت شرایط بهینه مورد بررسی قرار گرفت. روش کار در بررسی اثر مزاحمت‌ها به صورت زیر بود:

ابتدا سیگنال محلول نمونه در غیاب گونه مزاحم اندازه‌گیری شد. عمل استخراج بر روی این محلول تحت شرایط بهینه انجام گردید. سیگنال تجزیه‌ای به دست آمده ۳ بار اندازه‌گیری شد و میانگین سیگنال‌ها و انحراف استاندارد محاسبه شد. محدوده قابل قبول برای نوسان سیگنال، با توجه به رابطه  $\bar{A} \pm 3S$  (که در این رابطه  $\bar{A}$  میانگین و  $S$  انحراف استاندارد سیگنال‌های اندازه‌گیری شده است) به دست آمد. سپس برای بررسی اثر مزاحمت احتمالی هر گونه، ترکیب مورد نظر با نسبت ۱۰۰۰/۰ برابر وزنی- وزنی، نسبت به لوزارتان و تیکلوپیدین به محلول اولیه اضافه شد. در مرحله بعد بر روی این محلول عمل استخراج صورت گرفت و سیگنال تجزیه‌ای مربوط به آن به دست آمد. اگر سیگنال تجزیه‌ای به دست آمده در حضور گونه مزاحم در دامنه  $\bar{A} \pm 3S$  قرار می‌گرفت به این معنا بود که یون مورد نظر با نسبت موجود، مزاحم نیست. در غیر این صورت نسبت وزنی گونه مزاحم آنقدر کاهش داده می‌شد تا سیگنال تجزیه‌ای در دامنه  $\bar{A} \pm 3S$  قرار گیرد. نتایج حاصل در جدول (۳-۱۹) و (۳-۲۰) به ترتیب برای تیکلوپیدین و لوزارتان نشان داده شده است.

با توجه به نتایج جدول (۳-۱۹) و (۳-۲۰) مشخص گردید که بسیاری از گونه‌های مورد بررسی حتی هنگامی که به میزان هزار برابر تیکلوپیدین و لوزارتان حضور داشتند، مزاحم نبودند.

جدول ۳-۱۹: نتایج حاصل از بررسی اثر گونه‌های مزاحم در اندازه‌گیری تیکلوپیدین با غلظت ۱/۰ میلی‌گرم بر لیتر

حد مجاز گونه مزاحم (W/W)	گونه شیمیایی مورد بررسی (تیکلوپیدین)
۱۰۰۰	آلانین، اوره، تیواوره، متیونین، گلوکز، ویتامین B1 نیکوتین آمید، اتورواستاتین، جم فیبروزیل
۶۰۰	ویتامین B6، نیکوتینیک اسید
۲۰۰	کاپتوپریل

جدول ۳-۲۰: نتایج حاصل از بررسی اثر گونه‌های مزاحم در اندازه‌گیری لوزارتان با غلظت ۱/۰ میلی‌گرم بر لیتر

حد مجاز گونه مزاحم (W/W)	گونه شیمیایی مورد بررسی (لوزارتان)
۱۰۰۰	آلانین، اوره، تیواوره، متیونین، گلوکز، ویتامین B1 نیکوتین آمید، جم فیبروزیل
۶۰۰	ویتامین B6، نیکوتینیک اسید
۴۰۰	آتورواستاتین

### ۳-۷- ارقام شایستگی اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان

ارقام شایستگی روش، نظیر حد تشخیص (LOD)، گستره خطی (LR) و دقت و صحت روش در استخراج تیکلوپیدین و لوزارتان، توسط روش HF-LPME و اندازه‌گیری آن‌ها با HPLC-UV در این قسمت بررسی خواهد شد.

حد تشخیص یک روش، حداقل غلظت یا وزنی از آنالیت است که می‌تواند با سطح اطمینان مشخص آشکارسازی شود. برای محاسبه حد تشخیص از رابطه (۳-۱۵) استفاده شد:

$$LOD = \frac{KS_{bl}}{m} \quad (۳-۱۵)$$

$S_{bl}$  = انحراف استاندارد شاهد

m = شیب منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ

K = ضریب اطمینان

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

با ۶ بار اندازه گیری تکراری روی محلول شاهد (فاقد لوزارتان و تیکلوپیدین) طبق شرایط بهینه، انحراف استاندارد شاهد برای داروی تیکلوپیدین برابر با  $1/18$  اندازه گیری گردید. و با قرار دادن مقادیر انحراف استاندارد شاهد و شیب منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ در رابطه  $3-14$  حد آشکارسازی  $1/2$  میکروگرم بر لیتر برای تیکلوپیدین بدست آمد. به طور مشابه برای داروی لوزارتان با  $S_{bl}$  برابر با  $1/27$  و شیب منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ، حد آشکارسازی به دست آمده برابر با  $1/1$  میکروگرم بر لیتر می باشد.

### ۳-۷-۱- دقت و صحت روش

برای بررسی دقت و صحت روش، محلول‌هایی حاوی غلظت‌های متفاوتی از لوزارتان و تیکلوپیدین در محدوده 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 تجزیه‌ای به دست آمده برای هر نمونه و معادله منحنی کالیبراسیون پیش‌تغلیظ، غلظت معادل با هر سیگنال تجزیه‌ای محاسبه شد، و سپس انحراف استاندارد نسبی (RSD) برای هر غلظت طبق معادله (۳-۱۶) محاسبه گردید.

$$\%RSD = \frac{S_c}{c} \times 100 \quad (3-16)$$

در این رابطه  $S_c$ ، انحراف استاندارد غلظت و  $\bar{c}$ ، میانگین غلظت می باشد.

نتایج حاصل در جدول‌های (۳-۲۱) و (۳-۲۲) به ترتیب برای تیکلوپیدین و لوزارتان نشان داده شده است. با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان گفت که روش مذکور دارای دقت و صحت قابل قبولی می‌باشد. مقدار t بحرانی در سطح اطمینان ۹۵٪ برای ۳ اندازه‌گیری و ۲ درجه آزادی، ۴/۳۰ می‌باشد. مقدار t از رابطه (۳-۱۷) به دست می‌آید:

$$t = \frac{X - \mu}{S} \sqrt{n} \quad (۳-۱۷)$$

در این رابطه X مقدار غلظت اندازه‌گیری شده،  $\mu$  مقدار واقعی یا اولیه برای هر غلظت، S انحراف استاندارد مربوط به سه اندازه‌گیری تکراری و n تعداد تکرارها می‌باشد.

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

درصد بازیابی	مقدار t	RSD% (n=3)	مقدار اندازه‌گیری شده (mg/L)	تیکلوپیدین موجود در محلول آبی (mg/L)
۱۰۱/۰	۰/۴۸	۳/۵۶	۰/۱۰۱(±۰/۰۰۳۶) <sup>a</sup>	۰/۱۰۰
۹۷/۷	۱/۱۳	۳/۵۹	۰/۹۷۷(±۰/۰۳۵۱)	۱/۰۰
۹۶/۷۵	۳/۴۰	۱/۷۰	۳/۸۷(±۰/۰۶۶)	۴/۰۰

a = انحراف استاندارد سه اندازه‌گیری تکراری

جدول ۳-۲۲: نتایج حاصل از دقت و صحت روش برای لوزارتان

درصد بازیابی	مقدار t	RSD% (n=3)	مقدار لوزارتان اندازه‌گیری شده (mg/L)	لوزارتان موجود در محلول آبی (mg/L)
۹۸	۱/۱۵	۳/۰۶	۰/۰۹۸(±۰/۰۰۳)	۰/۱۰
۱۰۳/۴	۱/۶۳	۳/۴۸	۱/۰۳۴(±۰/۰۳۶۷)	۱/۰۰
۱۰۱/۵	۱/۴۱	۱/۸۹	۴/۰۶۳(±۰/۰۷۷)	۴/۰۰

### ۳-۸- محاسبه فاکتور پیش تغلیظ و درصد بازیابی

فاکتور پیش تغلیظ از نسبت شیب منحنی کالیبراسیون بعد از پیش تغلیظ (شکل ۳-۲۰) برای تیکلوپیدین و شکل (۳-۲۱) برای لوزارتان نسبت به شیب منحنی کالیبراسیون قبل از پیش تغلیظ (شکل ۳-۳) برای تیکلوپیدین و شکل (۳-۴) برای لوزارتان بدست می‌آید. با در نظر گرفتن شرایط آزمایش در حالت بهینه فاکتور غنی‌سازی با استفاده از نسبت شیب دو منحنی با معادله (۳-۱۸) قابل محاسبه می‌باشد.

$$EF = \frac{m_1}{m_2} \quad (3-18)$$

$m_1$ : شیب منحنی کالیبراسیون پیش تغلیظ

$m_2$ : شیب منحنی کالیبراسیون قبل از پیش تغلیظ

مقادیر فاکتور پیش تغلیظ برای لوزارتان ۱۷۶ و برای تیکلوپیدین ۲۷۲ بدست آمد.

برای به دست آوردن درصد بازیابی روش به این صورت عمل شد که در ابتدا با قرار دادن میزان سیگنال تجزیه‌ای بعد از پیش تغلیظ در منحنی کالیبراسیون مستقیم، مقدار غلظت تیکلوپیدین و لوزارتان به دست آمد. سپس مقدار میلی گرم تیکلوپیدین و لوزارتان بعد از عمل پیش تغلیظ و در محلول نمونه اولیه محاسبه گردید و از تقسیم نمونه بازیافت شده به مقدار اولیه، درصد بازیابی داروها محاسبه شد. نتایج حاصل در جدول (۳-۲۳) نشان داده شده است.

جدول ۳-۲۳ : نتایج محاسبه درصد بازیابی تیکلوپیدین و لوزارتان

درصد بازیابی	میکروگرم بازیافت شده	میکروگرم اولیه	غلظت (میلی گرم بر لیتر)	
۸۸	۰/۸۸	۱/۰	۰/۱	تیکلوپیدین
۵۶	۵/۲	۱۰/۰	۱/۰	
۶۸	۲۷/۲	۴۰/۰	۴/۰	
۵۰	۰/۵	۱/۰	۰/۱	لوزارتان
۴۲	۴/۲	۱۰/۰	۱/۰	
۳۸	۱۵/۲	۴۰/۰	۴/۰	

### ۳-۹- اندازه گیری تیکلوپیدین و لوزارتان در نمونه‌های حقیقی

به منظور بررسی توانایی روش پیشنهادی برای استفاده در نمونه‌های حقیقی با بافت‌های مختلف، این روش برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان در قرص، دو نمونه ادرار و سرم و به کار برده شد. برای اندازه‌گیری آنالیت‌ها در نمونه قرص تیکلوپیدین، چهار عدد قرص تیکلوپیدین (هر قرص حاوی ۲۵۰/۰ میلی‌گرم ماده مؤثر است) توزین شد و پس از آنکه در هاون عقیق پودر و همگن گردید، یک چهارم آن معادل ۲۵۰/۰ میلی‌گرم ماده مؤثر تیکلوپیدین در بالن حجمی ۲۵۰ میلی‌لیتری با متانول حل و به حجم رسانیده شد. سپس ۱/۰ میلی‌لیتر از آن به بالن ۱۰/۰ میلی‌لیتری منتقل و با متانول به حجم رسانده شد. از این محلول، ۱/۰ میلی‌لیتر به بالن ۱۰/۰ میلی‌لیتری منتقل و با آب به حجم رسانده شد. یک میلی‌لیتر از این محلول نمونه قرص به روش افزایش استاندارد مورد آنالیز قرار گرفت. بنابراین در این مرحله محلول نمونه حاوی ۱/۰ میلی‌گرم بر لیتر از قرص تیکلوپیدین خواهد بود. عمل استخراج تحت شرایط بهینه انجام شد و نتیجه آن ثبت گردید. در مراحل بعدی حجم‌های ۱/۰، ۲/۰ و ۳/۰ میلی‌لیتر از محلول استاندارد ۱۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر دو دارو به ظرف نمونه حاوی ۱/۰ میلی‌گرم بر لیتر نمونه قرص تیکلوپیدین افزوده و استخراج و آنالیز تحت شرایط بهینه انجام پذیرفت. هر اندازه‌گیری سه بار تکرار گردید. نتایج با استفاده از روش افزایش استاندارد به دست آمده است. نتایج نمونه قرص در جدول (۳-۲۴) نشان می‌دهد که درصد بازیابی برای

پیش تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین در نمونه قرص تیکلوپیدین در گستره ۱۰/۵-۹۶/۵٪ با انحراف استاندارد نسبی قابل قبول در گستره ۰/۷۸-۳/۵۶ می‌باشد. همچنین با توجه به نتایج اندازه‌گیری تیکلوپیدین در حضور لوزارتان تغییری در سیگنال تیکلوپیدین ایجاد نشد، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که اندازه‌گیری هم‌زمان این داروها در نمونه حقیقی مزاحمتی ندارد. کروماتوگرام مربوط به نمونه قرص تیکلوپیدین بدون افزودن داروی استاندارد در شکل (۳-۲۳) و کروماتوگرام این نمونه پس از افزایش ۲/۰ میلی‌لیتر از هر دو دارو در شکل (۳-۲۴) قابل مشاهده می‌باشد.

همچنین اندازه‌گیری بر روی قرص لوزارتان به این صورت بود که، چهار عدد قرص لوزارتان (هر قرص حاوی ۲۵/۰ میلی‌گرم ماده مؤثر است) توزین شد و پس از آنکه در هاون عقیق پودر و همگن گردید، یک چهارم آن معادل ۲۵/۰ میلی‌گرم ماده مؤثر تیکلوپیدین در بالن حجمی ۲۵ میلی‌لیتری با متانول حل و به حجم رسانیده شد. از این محلول، ۱/۰ میلی‌لیتر به بالن ۱۰/۰ میلی‌لیتری منتقل و با آب به حجم رسانده شد. یک میلی‌لیتر از این محلول نمونه قرص به روش افزایش استاندارد مورد آنالیز قرار گرفت. درصد بازیابی برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری لوزارتان در نمونه قرص در گستره ۹۶/۷-۱۰۵٪ و انحراف استاندارد نسبی قابل قبول در گستره ۱/۰۷-۳/۴ برای لوزارتان بدست آمد. نتایج مربوط در جدول (۳-۲۴) آورده شده‌است. قابل ذکر است که هر اندازه‌گیری، سه بار تکرار شد.

نحوه آماده‌سازی سرم به این صورت بود که ابتدا ۵/۰ میلی‌لیتر سرم و ۳/۰ میلی‌لیتر استونیتریل در لوله آزمایش افزوده و به مدت ۱۰ دقیقه در سانتریفیوژ با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه قرار گرفت تا پروتئین‌های آن جدا گردد [۷۳]. سپس محلول رویی آن به بالن ۲۵/۰ میلی‌لیتری منتقل و محلول ۵/۰ میلی‌گرم بر لیتر دارو تهیه شد. سپس ۱/۰ میلی‌لیتر از این محلول با استفاده از روش افزایش استاندارد در ظرف نمونه ۱۰/۰ میلی‌لیتری در شرایط بهینه به روش پیشنهادی در سه غلظت متفاوت از استاندارد داروهای تیکلوپیدین و لوزارتان مورد بررسی قرار گرفت. هر اندازه‌گیری سه بار

تکرار شد که نتایج آن در جدول (۳-۲۴) آورده شده است. نتایج نشان می‌دهد که درصد بازیابی برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین در نمونه سرم در گستره ۱۰۱-۹۰٪ با انحراف استاندارد نسبی قابل قبول در گستره ۴/۷-۲/۲۶ می‌باشد، و درصد بازیابی برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری لوزارتان در نمونه سرم در گستره ۹۹-۹۶٪ با انحراف استاندارد نسبی قابل قبول ۴/۱-۱/۹۵ می‌باشد، همچنین با توجه به اینکه اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان در حضور هم تغییری در سیگنال یکدیگر ایجاد نمی‌کنند، می‌توان نتیجه گرفت که اندازه‌گیری هم‌زمان این داروها در نمونه حقیقی سرم مزاحمتی بر روی یکدیگر ندارند. شکل (۳-۲۵) کروماتوگرام مربوط به نمونه سرم پس از افزودن ۱/۰ میلی‌گرم بر لیتر از هر دو دارو می‌باشد.

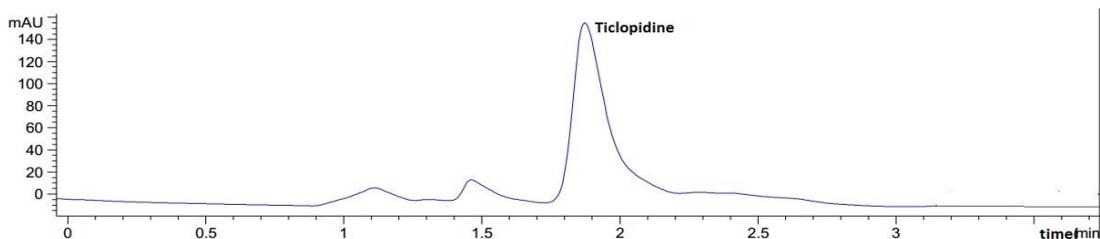
نحوه آماده‌سازی ادرار به این صورت بود که ابتدا به ۲/۰ میلی‌لیتر ادرار، ۱/۰ میلی‌لیتر استونیتریل در لوله آزمایش افزوده و با آب مقطر به حجم ۱۰/۰ میلی‌لیتر رسانده شد و به مدت ۱۰ دقیقه در سانتیفریوژ با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه قرار گرفت تا ناخالصی‌های آن جدا گردد. سپس ۱/۰ میلی‌لیتر از محلول رویی آن برداشته شد و به روش افزایش استاندارد در ظرف نمونه ۱۰/۰ میلی‌لیتری در شرایط بهینه به روش پیشنهادی مورد بررسی قرار گرفت. نمونه اول ادرار حاوی آنالیت‌ها بوده و از یک داوطلب زن ۴۹ ساله و دارای یک سال سابقه مصرف دارو (۲ مرتبه در هر روز) و ۳ ساعت پس از مصرف گرفته شد که پس از آماده‌سازی ذکر شده، در محلول نمونه در اندازه‌گیری اول تنها ۲/۰ میلی‌لیتر ادرار افزوده شد (بدون افزایش آنالیت‌ها)، و عمل استخراج انجام شد و نتایج مربوطه ثبت گردید. در مراحل بعدی غلظت‌های ۱/۰ و ۲/۰ میلی‌لیتر از محلول استاندارد به ظرف نمونه حاوی ۲/۰ میلی‌لیتر ادرار افزوده و عمل استخراج روی آن‌ها صورت گرفت. هر اندازه‌گیری نیز سه بار تکرار گردید. نتایج به دست آمده در جدول (۳-۲۴) نشان می‌دهد که غلظت تیکلوپیدین در نمونه ادرار بدون افزودن آنالیت کمتر از حد تشخیص بوده و درصد بازیابی پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین در دو غلظت دیگر به صورت ۱۰۲-۹۷/۳٪ با انحراف استاندارد نسبی قابل قبول در گستره

۴/۲۵-۴/۱۱ می‌باشد. همچنین غلظت داروی لوزارتان در نمونه ادرار بدون افزودن آنالیت ۰/۱۵۲ میلی گرم بر لیتر بدست آمده و درصد بازیابی پیش تغلیظ و اندازه‌گیری لوزارتان در دو غلظت دیگر در گستره ۹۸-۱۰۱٪ با انحراف استاندارد نسبی قابل قبول در گستره ۴/۵۷-۲/۴۷ می‌باشد. برای آماده‌سازی نمونه دوم ادرار مربوط به داوطلب زن سالم ۲۰ ساله بوده نحوه آماده سازی ادرار به این صورت بود که ابتدا به ۵/۰ میلی لیتر ادرار، ۲/۵ میلی لیتر استونیتریل در لوله آزمایش افزوده و به مدت ۱۰ دقیقه در سانتیفریوژ با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه قرار گرفت تا ناخالصی‌های آن جدا گردد. سپس محلول رویی آن به بالن ۲۵/۰ میلی لیتری منتقل و محلول ۵/۰ میلی گرم بر لیتر دارو تهیه شد. سپس ۱/۰ میلی لیتر از این محلول با استفاده از روش افزایش استاندارد در ظرف نمونه ۱۰/۰ میلی لیتری در شرایط بهینه به روش پیشنهادی در سه غلظت متفاوت از استاندارد داروهای تیکلوپیدین و لوزارتان مورد بررسی قرار گرفت. هر اندازه‌گیری سه بار تکرار شد که نتایج آن در جدول (۳-۲۴) آورده شده است. نتایج نشان می‌دهد که درصد بازیابی پیش تغلیظ و اندازه‌گیری تیکلوپیدین در نمونه ادرار در گستره ۹۸-۱۰۱/۴٪ با انحراف استاندارد نسبی قابل قبول در گستره ۴/۰۸-۱/۱۸ می‌باشد. همچنین درصد بازیابی برای پیش تغلیظ و اندازه‌گیری لوزارتان در نمونه ادرار در گستره ۹۹/۷-۱۰۴/۱۶٪ با انحراف استاندارد نسبی قابل قبول در گستره ۴/۷۴-۲/۰۸ می‌باشد، با توجه به نتایج بدست آمده، اندازه‌گیری تیکلوپیدین در حضور لوزارتان تغییری در سیگنال تیکلوپیدین ایجاد نکرده است، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که اندازه‌گیری هم‌زمان این داروها در نمونه حقیقی ادرار با موفقیت قابل انجام است. هر اندازه‌گیری نیز سه بار تکرار شد، که نتایج آن در جدول (۳-۲۴) آورده شده است. شکل (۳-۲۶) کروماتوگرام مربوط به نمونه ادرار بدون افزودن آنالیت و شکل (۳-۲۷) کروماتوگرام مربوط به نمونه ادرار با افزودن ۲/۰ میلی گرم بر لیتر از هر دارو می‌باشد.

جدول ۳-۲۴: نتایج نمونه های حقیقی برای تیکلوپیدین و لوزارتان در استخراج به روش HF-LPME

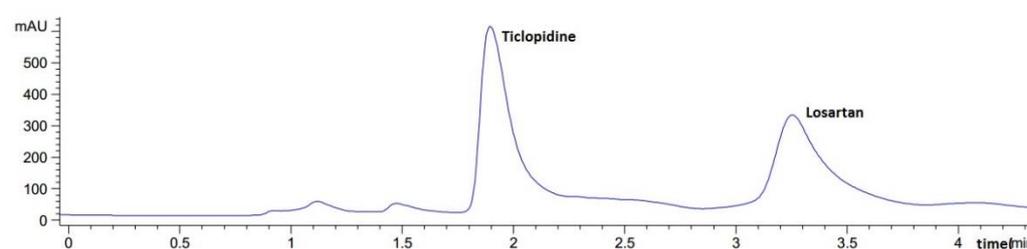
میلی گرم دارو در یک قرص	درصد بازیابی	مقدار t تجربی	RSD% (n=3)	آنالیت اضافه شده (mg/l)	آنالیت اندازه گیری شده (mg/l)	نمونه	
-	-	-	-	<LOD	۰/۰	تیکلوپیدین	ادراک
۹۷/۳۰	۱/۲۹	۴/۱۱	۰/۹۷±(۰/۰۴) <sup>a</sup>	۱/۰			
۱۰۲/۰۴	۰/۸۳	۴/۲۵	۲/۹۴±(۰/۰۴)	۳/۰			
-	-	-	۲/۶۳	۰/۱۵۲±(۰/۰۰۴)	۰/۰	لوزارتان	
۹۸/۳۰	۰/۶۵	۴/۵۷	۰/۹۸±(۰/۰۴۵)	۱/۰			
۱۰۱/۰۰	۰/۶۹	۲/۴۷	۲/۰۲±(۰/۰۵)	۲/۰			
-	-	-	-	<LOD	۰/۰	تیکلوپیدین	
۱۰۱/۴۰	۲/۰۱	۱/۱۸	۰/۵۰۷±(۰/۰۰۶)	۰/۵			
۹۹/۰۰	۰/۸۶	۴/۰۸	۱/۴۹±(۰/۰۴)	۱/۰			
۱۰۰/۰۰	۰/۴۲	۲/۰۶	۲/۵±(۰/۰۴)	۲/۰			
-	-	-	-	<LOD	۰/۰	لوزارتان	
۱۰۴/۱۶	۳/۴۶	۲/۰۸	۰/۴۸±(۰/۰۱)	۰/۵			
۹۷/۰۰	۰/۱۱	۴/۷۴	۱/۴۷±(۰/۰۴۷)	۱/۰			
۱۰۰/۰۰	۰/۷۸	۲/۲۲	۲/۵۰±(۰/۰۴)	۲/۰			
-	-	-	-	<LOD	۰/۰	تیکلوپیدین	سرم
۹۷/۲۰	۲/۲	۲/۲۶	۰/۴۸±(۰/۰۱)	۰/۵			
۱۰۱/۰۰	۰/۴۹	۳/۴	۱/۴۹±(۰/۰۳۵)	۱/۰			
۹۰/۰۰	۴/۰۸	۴/۷	۳/۲۰±(۰/۱۳)	۳/۰			
-	-	-	-	<LOD	۰/۰	لوزارتان	
۹۶/۰۰	۱/۷۳	۴/۱	۰/۴۸±(۰/۰۲)	۰/۵			
۹۷/۰	۰/۸۶	۲/۰۲	۱/۴۷±(۰/۰۲)	۱/۰			
۹۶/۵۰	۲/۸	۱/۵۳	۲/۴۳±(۰/۰۳)	۲/۰			
۲۲۵/۰	-	-	-	۰/۹۰۷	۰/۰	تیکلوپیدین	قرص
۱۰۰/۱۶	۰/۱	۱/۵۸	۱/۹۱±(۰/۰۲)	۱/۰			
۹۶/۵۲	۳/۳۶	۰/۷۸	۲/۸۴±(۰/۰۴)	۲/۰			
۱۰۱/۵۲	۱/۹	۳/۵۶	۳/۹۵±(۰/۰۴)	۳/۰			
۱۶/۲۵	-	-	-	۰/۶۵۳	۰/۰	لوزارتان	
۹۶/۷۶	۰/۲۱	۳/۴۱	۱/۶۲۱±(۰/۲۵)	۱/۰			
۱۰۵/۰۰	۲/۱	۱/۹۵	۲/۷۰±(۰/۰۴)	۲/۰			
۹۹/۸۳	۰/۵۴	۱/۰۷	۳/۶۵±(۰/۰۳۲)	۳/۰			

a = انحراف استاندارد سه اندازه گیری تکراری



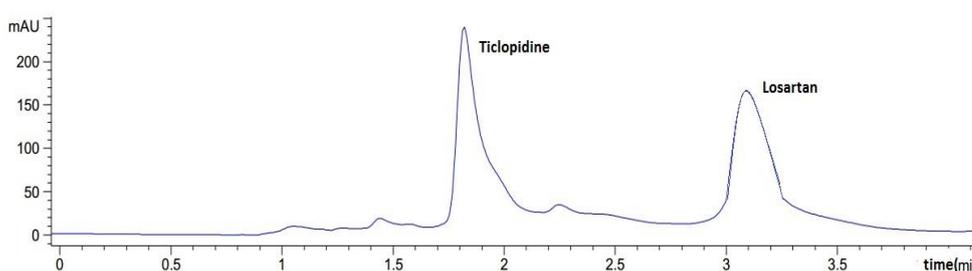
شکل ۳-۲۲: نمونه قرص تیکلوپیدین بدون افزایش آنالیت، طول موج اندازه‌گیری ۲۱۸ نانومتر

شرایط آزمایش: غلظت تیکلوپیدین و لوزارتان ۰/۰ میلی گرم بر لیتر، حجم محلول نمونه ۱۰/۰ میلی لیتر، حلال استخراج کننده (۱-اکتانول)، طول فیبر ۷/۴ سانتی‌متر، زمان استخراج ۴۸/۰ دقیقه، سرعت همزن ۱۰۰۰ دور در دقیقه، قدرت یونی ۱/۰٪.



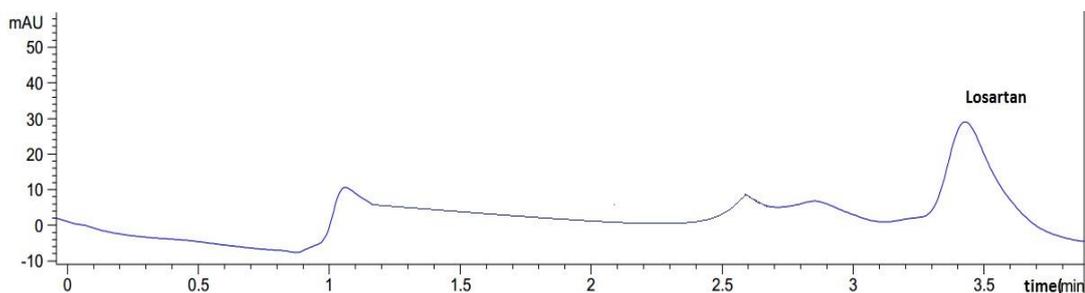
شکل ۳-۲۳: نمونه قرص تیکلوپیدین پس از افزایش ۲/۰ میلی گرم بر لیتر از هر دو دارو، طول موج اندازه‌گیری ۲۱۸

نانومتر، شرایط آزمایش: غلظت تیکلوپیدین و لوزارتان ۲/۰ میلی گرم بر لیتر، حجم محلول نمونه ۱۰/۰ میلی لیتر، حلال استخراج کننده (۱-اکتانول)، طول فیبر ۷/۴ سانتی‌متر، زمان استخراج ۴۸/۰ دقیقه، سرعت همزن ۱۰۰۰ rpm، قدرت یونی ۱/۰٪.

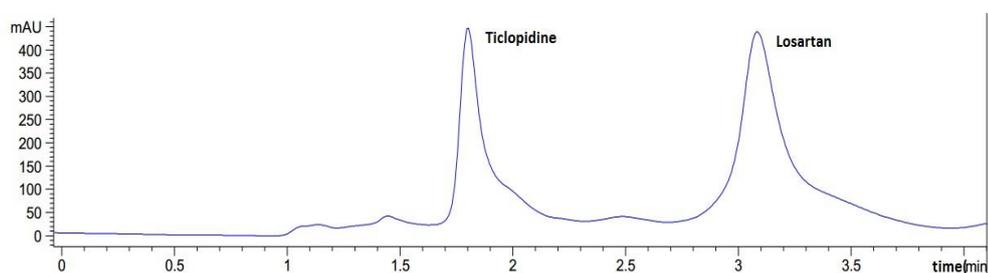


شکل ۳-۲۴: کروماتوگرام مربوط به نمونه سرم در غلظت ۱/۰ میلی گرم بر لیتر برای هر دو دارو، طول موج اندازه‌گیری

۲۱۸ نانومتر، شرایط آزمایش: غلظت تیکلوپیدین و لوزارتان ۱/۰ میلی گرم بر لیتر، حجم محلول نمونه ۱۰/۰ میلی لیتر، حلال استخراج کننده (۱-اکتانول)، طول فیبر ۷/۴ سانتی‌متر، زمان استخراج ۴۸/۰ دقیقه، سرعت همزن ۱۰۰۰ دور در دقیقه، قدرت یونی ۱/۰٪.



شکل ۳-۲۵: کروماتوگرام نمونه ادرار فرد بیمار بدون افزایش آنالیت، طول موج اندازه‌گیری ۲۱۸ نانومتر  
 شرایط آزمایش: غلظت تیکلوپیدین و لوزارتان ۲/۰ میلی گرم بر لیتر، حجم محلول نمونه ۱۰/۰ میلی لیتر، حلال  
 استخراج کننده (۱-اکتانول)، طول فیبر ۷/۴ سانتی متر، زمان استخراج ۴۸/۰ دقیقه، سرعت همزن ۱۰۰۰ دور در  
 دقیقه، قدرت یونی ۱/۰٪



شکل ۳-۲۶: کروماتوگرام مربوط به نمونه ادرار فرد بیمار پس از افزایش ۲/۰ میلی گرم بر لیتر از دو دارو، طول موج  
 اندازه‌گیری ۲۱۸ نانومتر  
 شرایط آزمایش: غلظت تیکلوپیدین و لوزارتان ۲/۰ میلی گرم بر لیتر، حجم محلول نمونه ۱۰/۰ میلی لیتر، حلال  
 استخراج کننده (۱-اکتانول)، طول فیبر ۷/۴ سانتی متر، زمان استخراج ۴۸/۰ دقیقه، سرعت همزن ۱۰۰۰ دور در  
 دقیقه، قدرت یونی ۱/۰٪

فصل چهارم:  
بحث و نتیجه گیری

#### ۴-۱- ارقام شایستگی روش

بررسی‌ها نشان می‌دهد که در ناحیه غلظتی ۰/۰۰۴-۶/۰ میلی‌گرم بر لیتر برای تیکلوپیدین و ۰/۰۰۳-۵/۵ میلی‌گرم بر لیتر برای لوزارتان، بین غلظت این داروها و سیگنال تجزیه‌ای رابطه خطی وجود دارد. معادلات مربوطه و مقادیر ضریب همبستگی در بخش (۳-۴-۴) آمده است.

مطابق جدول (۳-۲۱) و (۳-۲۲)، مقادیر انحراف استاندارد نسبی برای ۳ اندازه‌گیری تکراری در غلظت‌های ۰/۱۰، ۱/۰۰ و ۴/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به ترتیب برای تیکلوپیدین برابر با ۳/۵۶، ۳/۹۵ و ۱/۷۰ درصد، و برای لوزارتان برابر با ۳/۰۶، ۳/۴۸ و ۱/۸۹ می‌باشد که نشان دهنده دقت خوب روش است. همچنین مقادیر درصد بازیابی برای غلظت‌های ذکر شده در این جداول نشان دهنده صحت خوب روش است.

مقدار حدتشخیص روش برای داروی تیکلوپیدین ۱/۲ میکروگرم بر لیتر و برای داروی لوزارتان ۱/۱ میکروگرم بر لیتر بدست آمد. همچنین نتایج حاصل در جدول (۳-۱۹) برای تیکلوپیدین و جدول (۳-۲۰) برای لوزارتان نشان می‌دهد که بیشتر گونه‌ها در اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان مزاحم نیستند و روش از گزینش‌پذیری بالایی برخوردار است.

نتایج حاصل از اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان در نمونه‌های حقیقی نیز بیانگر این می‌باشد که روش پیشنهادی با دقت و صحت خوبی در اندازه‌گیری ای داروها در نمونه‌های ادرار، سرم و قرص قابل کاربرد است.

#### ۴-۲- مقایسه روش پیشنهادی با برخی روش‌های موجود

با توجه به اینکه اندازه‌گیری همزمان این دو دارو برای اولین بار در این پژوهش انجام گرفته است، لذا در جدول (۴-۱) فهرستی از برخی از روش‌های پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری به صورت تک دارو برای

اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان آورده شده است. در این جدول پارامترهای مختلف، مانند حد تشخیص و دامنه خطی برای مقایسه آورده شده است. روش پیشنهادی نسبت به روش‌های گزارش شده بهتر هستند. مقایسه ارقام شایستگی گزارش شده برای این روش‌ها در اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان با روش پیشنهادی نشان می‌دهد که روش ارائه شده در این پروژه در برخی از ارقام شایستگی مطلوب‌تر از سایر روش‌هاست، حجم محلول نمونه لازم برای استخراج تیکلوپیدین و لوزارتان و حجم حلال آلی مصرف شده در این روش بسیار کم است. بنابراین HF-LPME یک روش ساده، ارزان، موثر و سازگار با محیط زیست می‌باشد.

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

#### لوزارتان

روش استفاده شده	دامنه خطی (میلی گرم بر لیتر)	حد تشخیص (میلی گرم بر لیتر)	آنالیت / نمونه	مرجع
MSC <sup>۱</sup> - on-line solid-phase extraction	۰/۴-۱/۸	۰/۰۹	لوزارتان / آب سطحی و فاضلاب	[۲۶]
HPLC-ms-ms	۰/۰۰۲-۲/۰	۰/۰۰۲	تیکلوپیدین / پلاسما انسان	[۶]
DLLME- HPLC-UV	۰/۱-۱/۰	-۰/۰۷ ۰/۰۱۱	لوزارتان / پلاسما و ادرار انسان	[۲۴]
MEPS-C18-UHPLC-UV	۰/۰۳-۲۰/۰	۰/۰۰۹	تیکلوپیدین / ادرار انسان	[۷۴]
IL- DLLME-HPLC-UV	۰/۱-۲۰/۰	۰/۰۱۸	لوزارتان / سرم موش	[۷۵]
RP- HPLC-UV	۰/۰۶۵-۱۰/۰	۰/۰۳۴	لوزارتان / قرص	[۱۶]
HF-LPME-HPLC-UV	۰/۰۰۳-۵/۵	۰/۰۰۱۱	لوزارتان و تیکلوپیدین / سرم و ادرار انسان	کار حاضر

۱- Multi-syringe chromatography

#### ۴-۳- نتیجه گیری

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 مایع با کارایی بالا از روش‌های اندازه‌گیری با حساسیت بالا می‌باشد که کاربرد گسترده‌ای در صنعت دارد.

تکنیک میکرواستخراج فاز مایع با فیبر توخالی، یک روش ساده، سریع و ارزان برای تعیین داروها با مقادیر بسیار پایین در حجم کم نمونه می‌باشد. فاکتور پیش‌تغلیظ بالا و مصرف حجم کم از نمونه و حلال آلی از مزایای اصلی این روش می‌باشد.

در این مطالعه برای اولین بار از سیستم دوفازی روش HF-LPME برای جداسازی و پیش‌تغلیظ داروهای تیکلوپیدین و لوزارتان و اندازه‌گیری به وسیله HPLC-UV استفاده شده است.

با بهینه‌سازی پارامترهای مؤثر بر فرایند استخراج و رسم منحنی کالیبراسیون و محاسبه ارقام شایستگی حاصل از این روش، مشخص می‌شود که روش میکرواستخراج فاز مایع با فیبر توخالی (HF-LPME) همراه با اندازه‌گیری بوسیله کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا مجهز به آشکارساز ماوراء بنفش (HPLC-UV) یک شیوه مناسب و حساس با حد تشخیص بسیار پایین برای جداسازی، پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری مقادیر بسیار کم تیکلوپیدین و لوزارتان (میلی‌گرم بر لیتر) در نمونه‌های حقیقی می‌باشد.

نتایج درصد بازیابی حاصل از اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان در نمونه‌های مختلف، نشان دهنده صحت بالای نتایج حاصله با استفاده از تکنیک فوق است. در این پروژه فاکتور غنی‌سازی برای لوزارتان ۱۷۶ و برای تیکلوپیدین ۲۷۲ تنها از ۱۰ میلی‌لیتر نمونه به دست آمد. همچنین کاهش مصرف حلال‌های آلی سمی در حد میکرولیتر می‌باشد. همچنین روش دارای دامنه خطی روش مناسب می‌باشد.

#### ۴-۴- آینده نگری

- ۱- کاربرد روش میکرواستخراج پیشنهادی در پیش تغلیظ و اندازه‌گیری دیگر ترکیبات دارویی
- ۲- استفاده از EME<sup>۱</sup> همراه با همزن مغناطیسی در روش HF-LPME برای افزایش راندمان انتقال جرم و کاهش زمان استخراج
- ۳- استفاده از دیگر روش‌های میکرواستخراج جهت پیش تغلیظ و اندازه‌گیری داروهای تیکلوپیدین و لوزارتان

---

۱- Electromembrane extraction

پیوست

نمودارها و نتایج بررسی یک متغیر در زمان برای اندازه‌گیری تیکلوپیدین و لوزارتان به روش

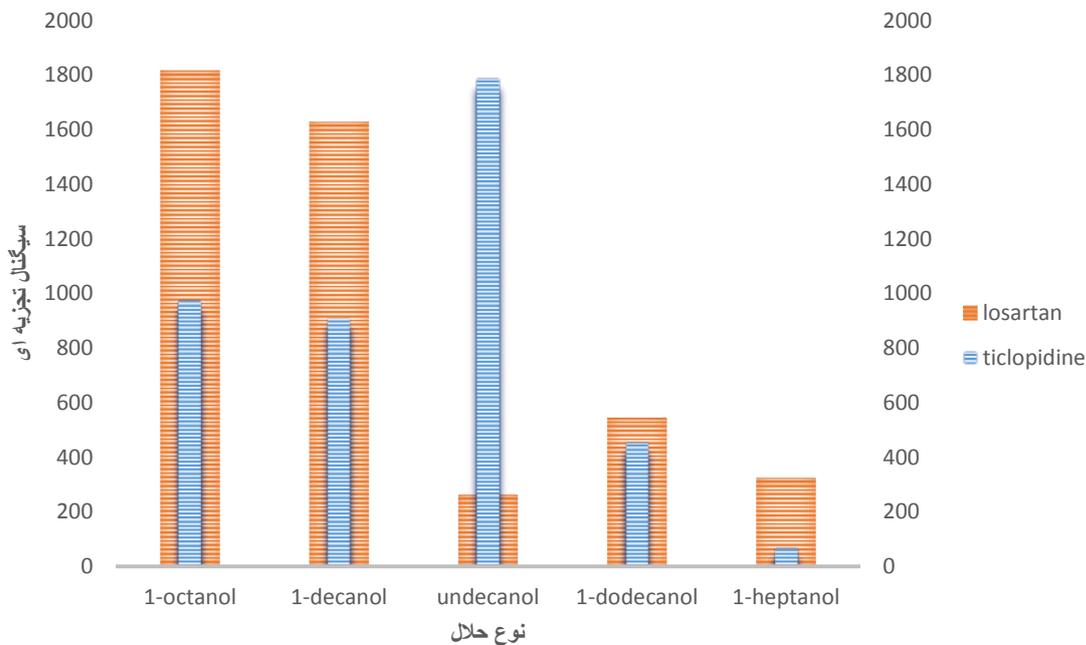
HF-LPME

روش کار:

در یک ظرف نمونه، ۱/۰ میلی‌لیتر از محلول ۱۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر تیکلوپیدین و ۱/۰ میلی‌لیتر محلول لوزارتان ۵/۰ میلی‌گرم بر لیتر، مقداری بافر با pH مورد نظر، مقدار نمک مورد نظر افزوده شد و سپس با آب دو بار تقطیر به حجم ۱۰/۰ میلی‌لیتر رسانده شد. به موازات تهیه نمونه، فیبرهای پلی‌پروپیلن در ابعاد مورد نظر بریده و مطابق بخش ۳-۳ آماده‌سازی شدند. اکنون فیبر را داخل یک میکروتیوپ حاوی حلال آلی به صورت عمودی قرار داده تا کاملاً به حلال آغشته و در این حین، فاز گیرنده (با همان حلال آلی سطح فیبر) به داخل میکروسرنگ کشیده شد. سپس حلال به داخل فیبر تزریق و انتهای فیبر با فویل آلومینیومی کوچک بسته شد. سپس کل مجموعه، یعنی میکروسرنگ و ظرف آزمایش روی یک همزن مغناطیسی قرار داده شد. سرعت چرخش محلول روی سرعت مورد نظر تنظیم گردید. بعد از اتمام زمان استخراج، فیبر از داخل محلول آبی خارج و انتهای فیبر با قیچی بریده و فاز داخل فیبر (حلال آلی اکتانول حاوی آنالیت‌ها) به داخل سرنگ کشیده شد. حلال به یک میکروتیوپ ۱/۵ میلی‌لیتری (ویال) منتقل و مقداری از آن با دقت به HPLC تزریق شد.

جدول ۱) بررسی اثر نوع حلال بر میزان استخراج تیکلوپیدین و لوزارتان

سیگنال لوزارتان	سیگنال تیکلوپیدین	نوع حلال استخراج
۱۸۱۶/۲۵	۹۷۶/۱۷	۱- اکتانول
۱۶۲۷/۸۹۵	۹۱۲/۴۷	۱- دکانول
۲۶۲/۴۷	۱۷۸۶/۹۷	آندکانول
۵۴۴/۵	۴۵۶/۶۵	۱- دو دکانول
۳۲۵/۱۵۳۵	۷۰/۵۷	۱- هپتانول



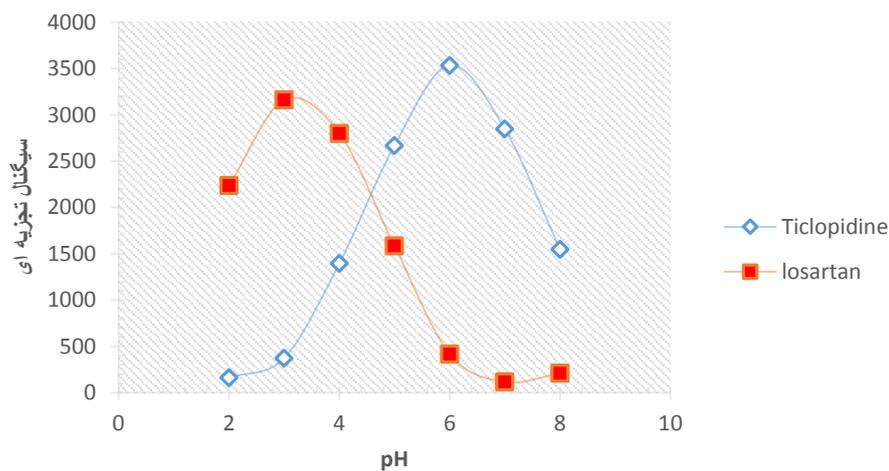
شکل ۱ پ): نمودار تاثیر نوع حلال استخراج کننده بر میزان استخراج

ستون‌های باریک مربوط به پاسخ تیکلوپیدین و ستون‌های پهن تر مربوط به پاسخ لوزارتان

شرایط آزمایش: نمونه حاوی غلظت ۱/۰ و ۰/۵ میلی گرم بر لیتر به ترتیب برای تیکلوپیدین و لوزارتان، ۱/۰ میلی لیتر بافر فسفات با pH=۳، حجم نمونه ۱۰/۰ میلی لیتر، زمان استخراج ۶۰ دقیقه، سرعت چرخش ۹۰۰ دور در دقیقه، طول فیبر ۶/۰ سانتی-متر، قدرت یونی ۰/۰٪

جدول ۲) بررسی اثر pH بر میزان استخراج تیکلوپیدین و لوزارتان

سیگنال لوزارتان	سیگنال تیکلوپیدین	محدوده pH
۲۰۳۵/۶۵۵	۱۶۱/۶۵	۲
۲۱۵۹/۹۵۵	۹۶۰/۴۴	۳
۲۷۹۹/۰۴۵	۱۳۹۴/۵۳	۴
۱۵۸۴/۳۴۵	۱۹۸۰/۸۱	۵
۴۱۶/۹۶	۳۵۳۳/۹۸	۶
۱۱۵/۸۳	۲۸۴۶/۸۲	۷
۲۰۷/۸	۱۵۴۶/۶۶	۸

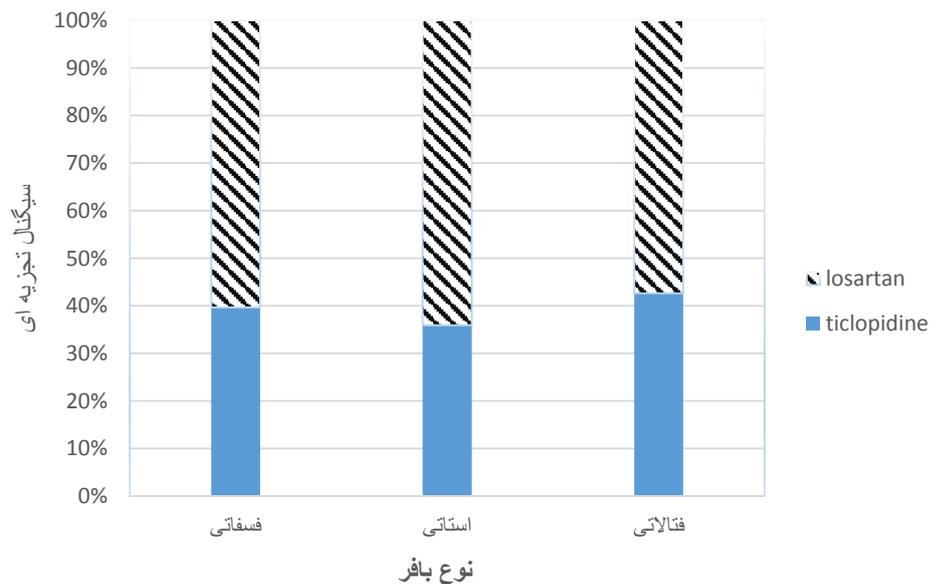


شکل ۲ پ): نمودار تاثیر pH بر میزان استخراج

نمودار با مربع‌های توپر مربوط به پاسخ لوزارتان و نمودار با مربع‌های توخالی مربوط به پاسخ تیکلوپیدین شرایط آزمایش: نمونه حاوی غلظت ۱/۰ و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر به ترتیب برای تیکلوپیدین و لوزارتان، ۱/۰ میلی‌لیتر بافر فسفاتی، ۱۰/۰ میلی‌لیتر حجم نمونه، زمان استخراج ۶۰ دقیقه، سرعت چرخش ۹۰۰ دور در دقیقه، حلال استخراج ۱-اکتانول، طول فیبر ۶/۰ سانتی‌متر، قدرت یونی ۰/۰٪.

جدول ۳ پ) نتایج بررسی اثر نوع بافر بر میزان استخراج تیکلوپیدین و لوزارتان

سیگنال لوزارتان	سیگنال تیکلوپیدین	نوع بافر
۱۴۷۰/۶۲	۱۶۵۱/۲۷	فسفاتی
۱۰۱۰/۶۱	۱۱۵۲/۲۴	استاتی
۱۱۴۹/۷	۱۳۰۰/۳۹	فتالاتی

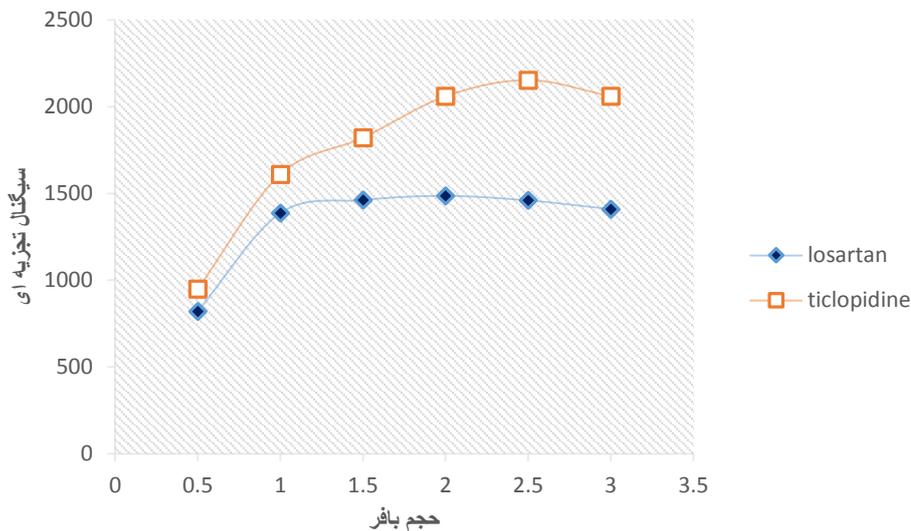


شکل ۳ پ): نمودار تاثیر نوع بافر بر میزان استخراج

ستون‌های توپر مربوط به پاسخ تیکلوپیدین و ستون‌های هاشور زده مربوط به پاسخ لوزارتان  
 شرایط آزمایش: نمونه حاوی غلظت ۱/۰ و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر به ترتیب برای تیکلوپیدین و لوزارتان، ۱/۰ میلی‌لیتر بافر با pH= ۴/۵، ۱۰/۰ میلی‌لیتر حجم نمونه، زمان استخراج ۶۰ دقیقه، سرعت چرخش ۹۰۰ دور در دقیقه، حلال استخراج ۱- اکتانول، طول فیبر ۶/۰ سانتی‌متر، قدرت یونی ۰/۰٪

جدول ۴پ) بررسی اثر حجم بافر بر میزان استخراج تیکلوپیدین و لوزارتان

سیگنال لوزارتان	سیگنال تیکلوپیدین	حجم بافر
۷۱۱/۵	۱۰۰۰	۰/۵
۱۳۶۰/۵۴	۱۵۱۰	۱/۰
۱۴۱۸	۱۶۲۰/۲	۱/۵
۱۴۸۶/۶	۱۶۹۰/۱	۲/۰
۱۴۲۰/۴۸	۱۶۳۲	۲/۵
۱۳۹۰/۵	۱۶۰۲/۳۶	۳/۰

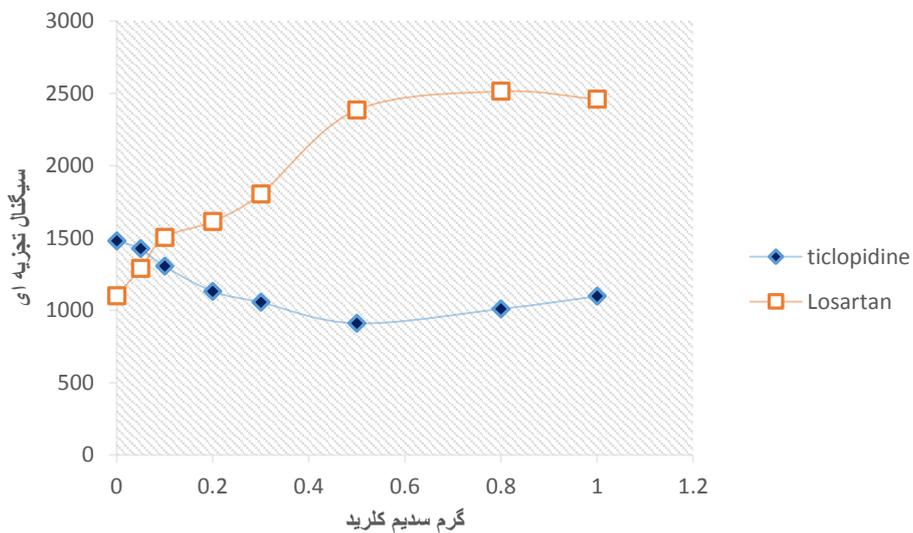


شکل ۴پ) نمودار اثر حجم بافر بر استخراج

نمودار با مربع‌های توپر مربوط به پاسخ لوزارتان و نمودار با مربع‌های توخالی مربوط به پاسخ تیکلوپیدین. شرایط آزمایش: نمونه حاوی غلظت ۱/۰ و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر به ترتیب برای تیکلوپیدین و لوزارتان، بافر فسفات با pH=۴/۵، ۱۰/۰ میلی‌لیتر حجم نمونه، زمان استخراج ۶۰ دقیقه، سرعت چرخش ۹۰۰ دور در دقیقه، حلال استخراج ۱-اکتانول، طول فیبر ۶/۰ سانتی‌متر، قدرت یونی ۰/۰٪.

جدول ۵ پ) نتایج بررسی اثر قدرت یونی بر میزان استخراج تیکلوپیدین و لوزارتان

سیگنال لوزارتان	سیگنال تیکلوپیدین	نمک افزوده شده (گرم) NaCl
۱۲۴۱/۱۶	۱۴۸۰/۶۲	۰/۰۰
۱۲۹۰/۴۸	۱۴۲۶/۱۱	۰/۰۵
۱۵۰۵	۱۳۰۴/۳۲	۰/۱۰
۱۶۱۴/۹۱۵	۱۱۳۱/۹۵	۰/۲۰
۱۸۰۵/۰۶۵	۱۰۵۵/۳۵	۰/۳۰
۲۳۸۵/۲۴	۷۸۷/۳۰۶	۰/۵۰
۲۵۱۴/۰۹	۱۰۱۰/۲۳	۰/۸۰

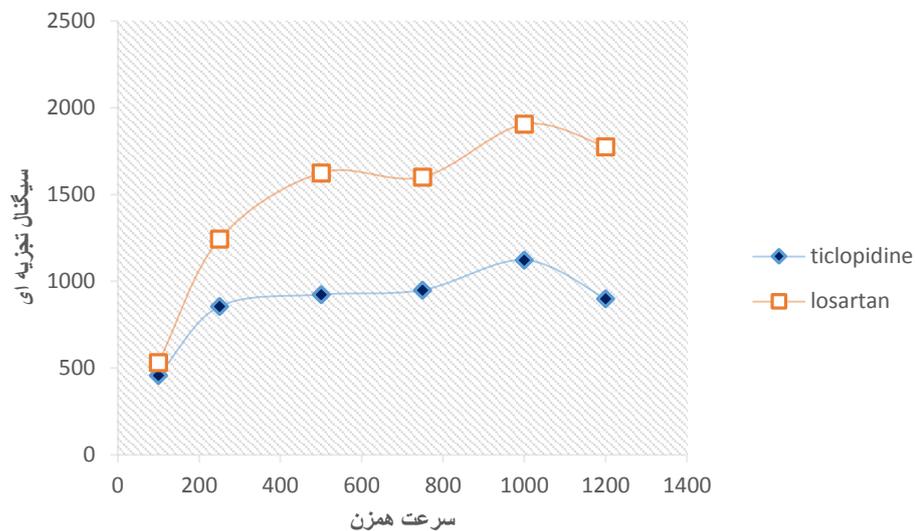


شکل ۵ پ): نمودار تاثیر اثر قدرت یونی (اثر نمک) بر میزان استخراج

نمودار با مربع‌های توپر مربوط به پاسخ لوزارتان و نمودار با مربع‌های توخالی مربوط به پاسخ تیکلوپیدین شرایط آزمایش: نمونه حاوی غلظت ۱/۰ و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر به ترتیب برای تیکلوپیدین و لوزارتان، ۲/۰ میلی‌لیتر بافر فسفاتی با pH=۴/۵ در ۱۰/۰ میلی‌لیتر نمونه، زمان استخراج ۶۰ دقیقه، طول فیبر ۶/۰ سانتی‌متر، حلال استخراج ۱-اکتانول، سرعت همزدن ۹۰۰ دور در دقیقه

جدول ۶ پ) بررسی اثر سرعت همزدن محلول نمونه بر میزان استخراج تیکلوپیدین و لوزارتان

سیگنال لوزارتان	سیگنال تیکلوپیدین	سرعت همزن مغناطیسی (rpm)
۵۳۲/۱۲	۴۵۸/۶	۱۰۰
۱۲۴۳/۰۵۵	۸۵۵/۴	۲۵۰
۱۶۲۵	۹۲۴/۳	۵۰۰
۱۶۰۱/۸۸۵	۹۵۰/۵	۷۵۰
۱۹۰۵/۵۲۵	۱۱۲۳	۱۰۰۰
۱۷۷۵/۸۶	۸۹۹/۷	۱۲۰۰

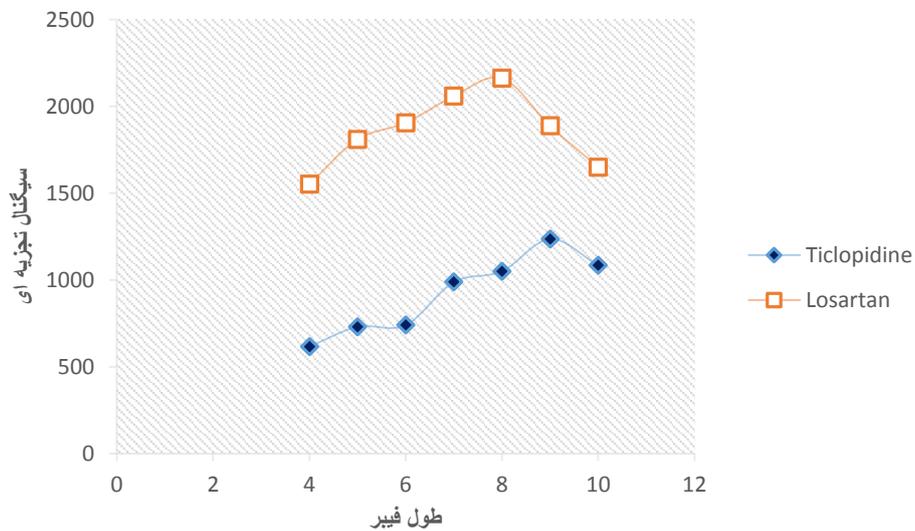


شکل ۶ پ) نمودار اثر سرعت همزن بر استخراج

نمودار با مربع‌های توپر مربوط به پاسخ تیکلوپیدین و نمودار با مربع‌های توخالی مربوط به پاسخ لوزارتان شرایط آزمایش: نمونه حاوی غلظت ۱/۰ و ۰/۵ میلی گرم بر لیتر به ترتیب برای تیکلوپیدین و لوزارتان، ۲/۰ میلی لیتر بافر فسفات‌ی با  $\text{pH} = 4/5$ ، قدرت یونی ۰/۵٪ در ۱۰/۰ میلی لیتر نمونه، زمان استخراج ۶۰ دقیقه، طول فیبر ۶/۰ سانتی متر، حلال استخراج ۱-اکتانول

جدول ۷ پ) بررسی اثر طول فیبر یا حجم حلال استخراج بر میزان استخراج تیکلوپیدین و لوزارتان

سیگنال لوزارتان	سیگنال تیکلوپیدین	طول فیبر (cm)
۱۵۵۲	۶۱۶	۴/۰
۱۸۱۰	۷۳۰	۵/۰
۱۹۰۵	۷۴۰	۶/۰
۲۰۵۹	۹۸۸	۷/۰
۲۱۶۲	۱۰۵۶	۸/۰
۱۸۸۸	۱۲۳۶	۹/۰
۱۶۵۰	۱۰۸۴	۱۰/۰

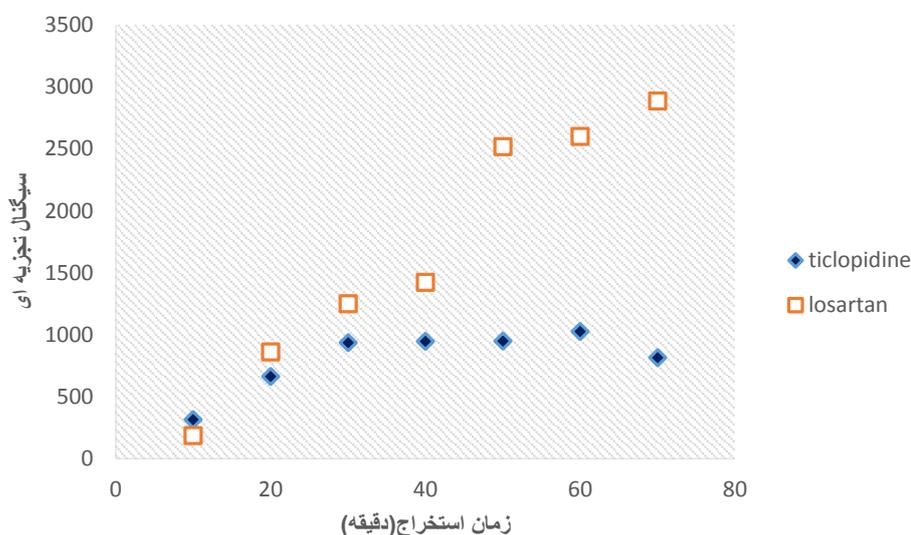


شکل ۷ پ): نمودار تاثیر طول فیبر بر میزان استخراج

نمودار با مربع‌های توپر مربوط به پاسخ تیکلوپیدین و نمودار با مربع‌های توخالی مربوط به پاسخ لوزارتان شرایط آزمایش: نمونه حاوی غلظت ۱/۰ و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر به ترتیب برای تیکلوپیدین و لوزارتان، ۲/۰ میلی‌لیتر بافر فسفات با pH=۴/۵، قدرت یونی ۵/۰٪ در ۱۰/۰ میلی‌لیتر نمونه، زمان استخراج ۶۰ دقیقه، سرعت چرخش ۱۰۰۰ دور در دقیقه، حلال استخراج ۱- اکتانول

جدول ۸ پ) نتایج بررسی اثر زمان بر میزان استخراج تیکلوپیدین و لوزارتان

سیگنال لوزارتان	سیگنال تیکلوپیدین	زمان استخراج (دقیقه)
۱۸۷/۹	۳۱۴/۹	۱۰
۸۶۰/۸۹	۶۶۴/۶	۲۰
۱۲۵۰/۳۸	۹۳۷/۵	۳۰
۱۴۲۳/۶۵	۹۴۶/۷	۴۰
۲۵۱۷/۸۵	۹۴۸/۱	۵۰
۲۶۰۰	۱۰۲۵	۶۰
۲۸۸۶/۷	۸۱۶/۹	۷۰



شکل ۸ پ): نمودار تاثیر زمان بر میزان استخراج

نمودار با مربع‌های توپر مربوط به پاسخ تیکلوپیدین و نمودار با مربع‌های توخالی مربوط به پاسخ لوزارتان شرایط آزمایش: نمونه حاوی غلظت ۱/۰ و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر به ترتیب برای تیکلوپیدین و لوزارتان، ۲/۰ میلی‌لیتر بافر فسفاتی با pH= ۴/۵، قدرت یونی ۵/۰٪ در ۱۰/۰ میلی‌لیتر نمونه، طول فیبر ۸/۰ سانتی‌متر، سرعت چرخش ۱۰۰۰ دور در دقیقه، حلال استخراج ۱- اکتانول

## منابع و ماخذ

- [1]. کورولکواس ا، (۱۳۷۶)، "شیمی دارویی"، جلد اول، ترجمه شفيعی ع، فرزام فر ب، مؤسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران، تهران
- [2]. N. A. Farid, A. Kurihara, S. A. Wrighton. ( 2010) "Metabolism and Disposition of the Thienopyridine Antiplatelet Drugs Ticlopidine, Clopidogrel, and Prasugrel in Humans", **Journal of Clinical Pharmacology**, 50, pp 126-142
- [3]. P. Zini, A. Marzo, L. Dal Bo, A. Rusca. (2002)." Bioequivalence of ticlopidine hydrochloride administered in single dose to healthy " **Pharmacological Research**, 46, pp 401-407
- [4]. E. Turkoz , A. Nur Onar. (2004) "Voltammetric determination and investigation of electrochemical behaviour of ticlopidine HCl" **Adnan Menderes University,4th AACD Congress**
- [5]. A. Pena, C. Lino, M. I. N. Silveira. (2003) "Determination of ticlopidine in human plasma by capillary gas chromatography with ion trap detection" **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 32 , pp 879-885
- [6]. J.Y. Cho, S. J. Yi, H. S. Shin, S. H. Yoon, K. S. Yu, I. J. Jang, S. G. Shin. (2011) "Quantification of Ticlopidine in Human Plasma Using Protein Precipitation and Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry ", **Journal of Bioanal Biomed**, 3, pp 059-063
- [7]. J. S. CHOI, Y. A. CHO, S. H. YANG. (2011) "Effects of ticlopidine on pharmacokinetics of losartan And its main metabolite EXP-3174 in rats " **Acta Pharmacologica Sinica**, 32, pp 967–972
- [8]. D. Durga Rao, N.V. Satyanarayana, S. S. Site, Y. Ramakoti Reddy, K. Mukkanti. (2009) "Simultaneous determination of Losartan Potassium, Atenolol and Hydrochlorothiazide in pharmaceutical preparations by stabilityindicating ultra

performance liquid chromatography" **chromatographia**, 70, pp 647-651

[9]. S. B. Bari ,S. R. Sathe. (2007) " Simultaneous analysis of losartan potassium, atenolol and hydrochlorothiazide in bulk and in tablets by high performance thin layer chromatography with uv absorption densitometry" **Acta chromatographica**,19, pp 270-278

[10]. کاتزونگ ب ج، مسترز س ب، (۲۰۰۹)، "فارماکولوژی کاتزونگ" جلد دوم، رهپور ا، مؤسسه انتشاراتی اندیشه رفیع، تهران

[11] S. G. Chrysant, G. S. Chrysant. (2006) "The pleiotropic effects of angiotensin receptor blockers". **Journal of Clinical Hypertension**, 8, 261-268

[12]. Z. Ji, C. Huang, C. Liang, B. Chen, S. Chen, W. Sun. (2005) "Protective effects of blocking renin-angiotensin system on the progression of renal injury in glomerulosclerosis" **Cellular & Molecular Immunology**, 2, pp 150-54.

[13]. Y. Iino, M. Hayashi, T. Kawamura, T. Shiigai, Y. Tomino, K. Yamada, et al (2004) "Renoprotective effect of losartan in comparison to amlodipine in patients with chronic kidney disease and hypertension a report of the Japanese Losartan Therapy Intended for the Global Renal Protection in Hypertensive Patients (JLIGHT)" **study of Hypertension Research**, 27:pp 21-30.

[14]. ترجمه ا. مهدی زاه، (۱۳۹۰) "پیشگیری از سکته مغزی مکرر." نشریه نوین پزشکی، شماره ۵۰۷، دوره ۱. ص ۷۵۴-۷۵۸

[15]. H. Jalalizadeh, E. Souri, H. Farsam, M. Ansari. (2003). AHigh-Performance Liquid Chromatographic Assay for the Determination of Losartan in Plasma. **Iranian journal of pharmacology & therapeutics IJPT**, 2, pp 18-21

[16]. T. S. Rajan, S. K. Afsar, I. Sarathchandiran, G. Srinivasan. (2013)"Development of a validated high-performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of losartan potassium and atenolol in tablets", **International Journal of**

**Chemical and Analytical Science**, 4, 100-105

[17]. J. R. Rao, S. S. Yadav. (2009)," RP-HPLC method for simultaneous estimation of losartan, hydrochlorothiazide and amlodipine in tablet dosage " **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, 7, pp 137-140.

[18]. A. R. Tengli, B. M. Gurupadayya, N. Soni. (2013)"Simultaneous estimation of hydrochlorothiazide, amlodipine, and losartan in tablet dosage form by RP-HPLC" **International Journal of Chemical and Analytical Science**, 4, pp 33-38

[19]. M.G. Quagliaa, E. Donati, G. Carlucci, P. Mazzeo, S. Fanali. (2002) "Determination of losartan and hydrochlorothiazide in tablets by CE and CEC" **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 29, pp 981– 987

[20]. E. Romão Sartori, M. C. Gardenal Santos, C. R. Teixeira Tarley, L. H. Dall’Antoniaa. (2013) "Evaluation of boron-doped diamond electrode for simultaneous voltammetric determination of hydrochlorothiazide and losartan in pharmaceutical formulations" **Sensors and Actuators B**, 188, pp 263– 270

[21]. N. Erk. (2001) "Analysis of binary mixtures of losartan potassium and hydrochlorothiazide by using high performance liquid chromatography, ratio derivative spectrophotometric and compensation technique", **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 24, pp 603 – 611

[22]. A. L. Giovanni Bellagamba, G. D’Ascenzo, A. Gentili, A. Marino. (1997) "Evaluation of ticlopidine in human serum and plaque by liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry" **Analytica Chimica Acta**, 354, pp 87-95

[23]. M. Barroso, E. Gallardo, C. Margalho, P. Monsanto, D.N. Vieira. (2006) "Analytical approach to determine ticlopidine in post-mortem blood" **Forensic Science International**, 162, pp 121–125

[24]. A. Jouyban, S. Soltani, A. M. Ramezani, N. Soltani. (2012) "Analysis of losartan and carvedilol in urine and plasma samples using a dispersive liquid–liquid

microextraction isocratic HPLC–UV method" **Bioanalysis**, 4, pp 2805–2821.

[25]. C.K.Oza, J.P. Prajapati, A.J.Vyas, P. Mehta. (2011) " RP-HPLC method for the determination of losartan potassium and perindopril erbumine in combined tablet dosage from. " **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, 2, pp 709-715.

[26]. V. Cerda, M. Antonieta Obandoa, J. Manuel Estela. (2008) " Multi-syringe chromatography (MSC) system for the on-line solid-phase extraction and determination of hydrochlorothiazide and losartan potassium in superficial water, groundwater and wastewater outlet samples" **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 48,pp 212–217

[27]. H. Joshi, V. Ram, G. Kher, K. Dubal, B. Dodiya. (2011) "Development and validation of a stability indicating UPLC method for determination of ticlopidine hydrochloride in its tablet formulation" **Saudi Pharmaceutical Journal**, 19, pp 159–164

[28]. K. Rona, K. Ary , B. Gachalyi, I. Klebovich. (1997) "Liquid chromatographic method for the determination of ticlopidine in human plasma" **Journal of Chromatography B**, 693 pp. 393–398

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

[30]. M. Villar Navarro, M. Ramos Payán, R. Fernández-Torres, M. A. Bello López (2013). Hollowfiber liquid-phase microextraction and determination of nonsteroidal antiinflammatories by capillary electrophoresis and sulfonamides by HPLC in human urine, **Biomedical Chromatography**, 27. Pp 246-253.

[31]. R.A. Smith. (2003) "Before the injection-modern method of sample preparation for separation techniques" **Journal of Chromatography A**, 1000, pp 3-27.

[32]. صاری خان خلجانی م، (۱۳۹۰)، "اندازه‌گیری مقادیر کم نقره با لیگاند ۱- فنیل-۲،۱- پروپان

دیوم -۲- اکسیم تیوسمی کاربازون به عنوان عامل کمپلکس دهنده و با استفاده از میکرواستخراج مایع-

مایع پخشی- اسپکترومتری جذب اتمی شعله‌ای" دانشکده شیمی، دانشگاه صنعتی شاهرود

[33]. M. Ma, S. Kang, Q. Zhao, J. Pharm. (2006) "Liquid-phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography for the determination of local anaesthetics in human urine" **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 40, pp 128.

[34]. شاکری پ، (۱۳۹۲)، رساله دکتری، "بهینه‌سازی استخراج برخی از آلاینده‌های محیطی با میکرواستخراج مایع-مایع پخشی به کمک الکل و اندازه‌گیری آن‌ها توسط روش HPLC" دانشکده شیمی، دانشگاه مازندران

[35]. C. L. Arthur, J. Pawlisyn. (1990) " solid phase microextraction with thermal desorption using fused optical fibers" **Analytical Chemistry**, 62, pp 2145-2148.

[36]. M. A. Jeannot, F. Cantwell. ( 1996) " Solvent microextraction into a single drop".**Analytical Chemistry**, 68, pp 2236–2240

[37]. H. G. Liu, P. K. Dasgupta. (1996) "Analytical chemistry in a drop. Solvent extraction in a microdrop" **Analytical Chemistry**, 68, 1817–1821.

[38]. S. Pedersen-Bjergaard , K.E. Rasmussen (1999) "Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis" **Analytical Chemistry**, 71, pp 2650-265

[39]. J. Zhou, Q. Zhang, J. Bing Sun, X. Li Sun, P. Zeng. (2014)" Two-phase hollow fiber liquid phase microextraction based on magnetofluid for simultaneous determination of Echinacoside, Tubuloside B, Acteoside and Isoacteoside in rat plasma after oral administration of Cistanche salsa extract by high performance liquid chromatography" **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 94, pp 30–35

[40]. H. Jiang, B. Hu, B. Chen, W. Zu. (2008) "Hollow fiber liquid phase microextraction combined with graphite furnace atomicabsorption spectrometry for the determination of methylmercury in human hair andsludge samples" **Spectrochimica Acta Part B**, 63, 770–776.

[41]. Y. He. (2012), " Liquid-Based Microextraction Techniques for Environmental

Analysis" **Comprehensive Sampling and Sample Preparation**, 3, pp 835-862.

[42]. A. Namera, T. Saito. (2013) "Recent advances in unique sample preparation techniques for bioanalysis" **Bioanalysis**, 5, pp 915–932

[43]. L. Hou, et al. (2003) "Automated hollow fiber-protected dynamic liquid-phase microextraction of pesticides for gas chromatography–mass spectrometric analysis" **Journal of Chromatography A**, 985, pp. 107–116.

[44]. S. Pedersen-Bjergaard, A. Bjørhovde, T. G. Halvorsen, K. E. Rasmussen. (2003) "Liquid-phase microextraction of drugs from human breast milk" **Analytica Chimica Acta**, 491, pp 155–161

[45]. A. Gjelstad, K. E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard. (2012) "Hollow Fiber Liquid-Phase Microextraction" **Comprehensive Sampling and Sample Preparation**, 2, pp 445-496

[46]. B. Buszewski, M. Szultka<sup>1</sup>, P. Pomastowski, V. Railean-Plugaru. (2014) "Microextraction sample preparation techniques in biomedical analysis" **Journal of separation science**, 0, 1–12

[47]. A. Sarafraz-Yazdi, A. Amiri. (2010) "Liquid-phase microextraction" **TrAC Trends Analytical Chemistry**, 29, pp 1–14.

[48]. M. Dehghani, M. Abadia, N. Ashraf, M. Chamsaz, F. Shemirani. (2012) "Review An overview of liquid phase microextraction approaches combined with UV–Vis spectrophotometry" **Talanta**, 99, pp 1–12

[49]. Y. C. Chen, H. F. Wu. (2009), "Revolving hollow fiber–liquid phase microextraction coupled to GC/MS using electron ionization for quantification of five aromatic hydrocarbon isomers" **Journal of separation science**, 32, 3013–3019

[50]. Z. Es'haghi, H. Ali Hoseini, S. Mohammadi-Nokhandani, J. Ebrahimi. (2013), "Pseudo-stir bar hollow fiber solid/liquid phase microextraction combined with anodic stripping voltammetry for determination of lead and cadmium in water samples" **Journal of Advance Research**, pp 1-9.

[51]. X. Zhou, M. He, B. Chen, B. Hu. (2015). "Hollow fiber based liquid-liquid-liquid microextraction combined with sweeping micellar electrokinetic chromatography for the sensitive determination of second-generation antidepressants in human fluids" **Analyst**, 140, 1662-1671

[52]. J. L. Manzoori, J. Abulhassani, M. Amjadi. (2010) "Hollow fiber based-liquid phase microextraction using ionic liquid solvent for preconcentration of lead and nickel from environmental and biological samples prior to determination by electrothermal atomic absorption spectrometry" **Journal of Hazardous Materials**, 176 ,pp 481-486

[53]. S. Pedersen-Bjergaard, J. Lee, H. K. Lee, K. E. Rasmussen. (2008) " Environmental and bioanalytical applications of hollow fiber membrane liquid-phase microextraction: A review" **analytica chimica acta**, 624, 253-268

[54]. P. Wang, Y. Xiao, W. Liu, J. Wang, Y. Yang. (2015) "Vortex-assisted hollow fibre liquid-phase microextraction technique combined with high performance liquid chromatography-diode array detection for the determination of oestrogens in milk samples" **Food Chemistry**, 172 , pp 385-390

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

[56]. ادريسی م، (۱۳۸۵)، " روش تحقیق تجربی " چاپ اول، جهاد دانشگاهی دانشگاه امیرکبیر، تهران، ص ۹۳-۴

[57]. J.M. Cupello. (1991). " Training technologies in experimental design. " **Research Technology Management**, 42, PP. 47-50.

[58]. C.D Hendrix. (1979). "What every technologist should know about experimental design." **Chemtech**, 9, PP. 167-174.

[59]. D. Brynn Hibbert, (2012) "Experimental design in chromatography: A tutorial

review", **Journal of Chromatography B**, 910, 2– 13

[60]. M. Rajabi, et al. (2012) " Application of response surface methodology for optimization of ionic liquid based dispersive liquid- liquid microextraction of cadmium from water samples". **Humanan Experimental Toxicology**, 32, pp 1–12

[61]. R. H. Myers, D. C. Montgomery. (2002) "**Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments.**" 2nd Ed. Wiley Pub Inc, New York. pp. 51-83.

[62]. M. A. Bezerra, R. E. Santelli, E. P. Oliveira, L. S. Villar, L. A. Escaleira, (2008)"Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry" **Talanta**, 76, pp 965–977

[63]. N. Aslan, Y. Cebeci, (2007)"Application of Box–Behnken design and response surface methodology for modeling of some Turkish coals" **Fuel**, 86, pp 90–97

[64]. منبوهی ا، بندرچیان ف، احمدی ح، شرافتی م، (۱۳۹۳)، "کمومتریکس" چاپ اول، فریده

بندرچیان، تهران، ص ۱۵۹-۱۶۱

[65]. S. L. C. Ferreira, R. E. Bruns, E. G. P. da Silva, W. N. L. dos Santos, C.M. Quintella, J. M. David, J. B. de Andrade, M. C. Breitreitz, I. C. S. F. Jardim, N. B. Barros, (2007), " Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems ", *Journal of Chromatography A*, 1158, pp, 2–14

[66]. Y. Yamini, A. Esrafil, M. Ghambarian. (2012) "Three-phase hollow fiber microextraction based on two immiscible organic solvents for determination of tricyclic antidepressant drugs: Comparison with conventional three-phase hollow fiber microextraction" **Journal of Chromatography A**, 1222, pp 5–12

[67]. M. Bashiry, A. Mohammadi, H. Hosseini, M. Kamankesh, S. Aenehvand and Z. Mohammadi. (2016) "Application and optimization of microwave-assisted extraction and dispersive liquid–liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography for sensitive determination of polyamines in turkey breast meat samples" **Food chemistry**, 190, pp 1168-1173.

[68]. Y. Zhang, J. Wang, G. Wang, C. Gao, Y. Yan, B. Wen.(2015) "Optimization of

derivatization procedure and gas chromatography–mass spectrometry method for determination of bensulfuron-methyl herbicide residues in water" **Journal of Chromatography B**, 995–996, pp 31–37

[69]. Montgomery, D.C., **Design and analysis of experiments**, Canada, pp1-12, 1991

[70]. نیرومند ح، (۱۳۸۷) "تحلیل رگرسیون خطی ابزاری برای تحقیق" چاپ اول، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ص ۳۰۵-۳۱۴ و ۴۸۲-۴۸۶

[71]. حاجیان اسرمی ف، (۱۳۹۲) "اندازه‌گیری ال-سیستئین به روش تزریق در جریان پیوسته با آشکارساز اسپکتروفتومتری" دانشکده شیمی، دانشگاه صنعتی شاهرود

[72]. Y. Yamini, Sh. Shariati, A. Esrafil, (2009) "Carrier mediated hollow fiber liquid phase microextraction combined with HPLC–UV for preconcentration and determination of some tetracycline antibiotics" **Journal of Chromatography B**, 877 393–400

[73]. N. Goudarzi, S. Farsimadan, M. Arab Chamjangali, and G. Bagherian. (2015) "Optimization of modified dispersive liquid-liquid microextraction coupled with high-performance liquid chromatography for the simultaneous preconcentration and determination of nitrazepam and midazolam drugs: An experimental design: Liquid Chromatography" **Journal of separation science**, 39, pp 1673-1679

[74]. M. Zhang, F. Wei, Y-F. Zhang, J. Nie, Yu-Qi. Feng,(2006). "Novel polymer monolith microextraction using a poly(methacrylicacid-ethylene glycol dimethacrylate) monolith and its application to simultaneous analysis of several angiotensin II receptor antagonists in human urine by capillary zone electrophoresis" **Journal of Chromatography A**, 1102, 294–301

[75]. R. N. Rao, S. S. Raju, R. M. Vali. (2013) "Ionic-liquid based dispersive liquid–liquid microextraction followed by high performance liquid chromatographic determination of anti-hypertensives in rat serum" **Journal of Chromatography B**, 931, 174–180

## **Abstract**

In the present study, a simple and efficient preconcentration method was proposed using two phase hollow fiber - liquid phase microextraction (HF-LPME) coupled with HPLC-UV(MWD) for simultaneous extraction and determination of trace amount of ticlopidine and losartan in tablet, serum and urine samples. 1- octanol was used as an extraction solvent with low volatility to prevent evaporation, low viscosity to ensure rapid mass transfer, low polarity to ensure compatibility with the hollow fiber, and to prevent leakage into the sample. Some parameters such as pH, extraction time, stirring rate, hollow fiber length and ionic strength as the effective factors in extraction's efficiency were optimized using experimental design. Under the optimized conditions; a linear calibration curve in the range of 0.004- 6.0 mg.L<sup>-1</sup> for ticlopidine and 0.003- 5.5 mg.L<sup>-1</sup> for losartan, with detection limit of 1.2 µg.L<sup>-1</sup> for ticlopidine and 1.1 µg.L<sup>-1</sup> for losartan and preconcentration factor of 272 for ticlopidine and 176 for losartan were achieved. The relative standard deviation for three replicate determinations of 0.1, 1.0 and 4.0 mg.L<sup>-1</sup> were 3.56%, 3.95% and 1.70% for ticlopidine and 3.06%, 3.48% and 1.89% for losartan, respectively.

**Keywords:** Ticlopidine, Losartan, Liquid phase microextraction based on two phase - hollow fiber, Experimental design



**University of Shahrood**

**Faculty of Chemistry**

**M.Sc. Thesis in Analytical Chemistry**

**Separation and determination of Ticlopidine and Losartan by using  
hollow fiber microextraction coupled with high performance liquid  
chromatography**

**Monire Shams**

Supervisor:

**Dr. N. Goudarzi**

Advistor:

**Dr.G. Bagherian Dehaghi**

**September 2015**