

اندازه‌گیری آتورواستاتین در نمونه‌های قرص با روش میکرو استخراج مایع-مایع پخشی براساس جامد کردن قطره شناور و بهینه‌سازی طرح مرکب مرکزی با استفاده از سوانگاری مایع با عملکرد بالا

فرشته شیری^{۱*}، به‌شماره هاشمی^۲، ایمان فضلی‌پور^۳ و مسعود نجاتی یزدی‌نژاد^۱

۱- استادیار گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه زابل، زابل، ایران

۲- دکترای شیمی تجزیه دانشکده شیمی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

۳- کارشناس ارشد شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه زابل، زابل، ایران

دریافت: اردیبهشت ۱۳۹۶، بازنگری: مرداد ۱۳۹۶، پذیرش: مهر ۱۳۹۶

چکیده: روش ساده، سریع و ارزان میکرواستخراج مایع-مایع پخشی براساس جامد کردن قطره شناور با استفاده از سوانگاری مایع با عملکرد بالا (HPLC) برای استخراج و تعیین مقادیر آتورواستاتین در نمونه‌های قرص به کار برده شده است. اثر عامل‌هایی مانند حجم حلال استخراج‌کننده، حجم حلال پخش‌کننده و pH با استفاده از طراحی آزمایش بهینه شدند. تحت شرایط بهینه، منحنی واسنجی با دامنه خطی ۱ تا ۲۰۰ میکروگرم بر لیتر با حد تشخیص ۰٫۳ میکروگرم بر لیتر به دست آمد. روش بهینه شده دقت و انحراف استاندارد نسبی خوبی را با مقدار ۲٫۲٪ نشان داد. توانایی روش معرفی شده برای اندازه‌گیری آتورواستاتین در نمونه‌های قرص نیز مورد آزمون قرار گرفت. نتایج این کار نشان داد که روش معرفی شده کارایی استخراج بالا و حد تشخیص پایین دارد. مهم‌ترین مزیت این روش استفاده از حجم بالای نمونه و حذف حلال‌های آلی سمی است.

واژه‌های کلیدی: آتورواستاتین، روش میکرواستخراج مایع-مایع پخشی، طراحی آزمایش

مقدمه

که این حلال‌ها با مجموعه فاز معکوس HPLC^۱ سازگار نیستند. همچنین، بیشتر این حلال‌ها سنگین‌تر از آب هالوژن دار هستند و به‌طور معمول اثر منفی روی محیط زیست دارند که این به‌عنوان بزرگ‌ترین عیب این روش شناخته شده است [۵]. روش ساده میکرواستخراج مایع-مایع پخشی بر اساس جامد کردن قطره آلی شناور^۲ (DLLME-SFO) توسط لی‌انگ^۴ و همکارانش معرفی شد [۶]. اساس این روش DLLME و جامدسازی قطره شناور است. در این روش حلال‌هایی با چگالی کمتر از آب استفاده و

در سال‌های اخیر، یک روش میکرواستخراج نوین به نام میکرواستخراج مایع-مایع پخشی (DLLME)^۱ توسط اسدی و همکارانش معرفی شد [۱ تا ۴]. اساس روش DLLME یک مجموعه سه حلاله است که در آن مخلوط حلال پخش‌کننده و استخراج‌کننده به سرعت به محلول‌های حاوی آنالیت تزریق شده که باعث تولید حالت ابری می‌شود. در رایج‌ترین حالت DLLME، حلال‌های استخراج‌کننده با چگالی بیشتر از آب استفاده می‌شوند

1. Dispersive liquid-liquid microextraction method based on solidification of floating organic drop (DLLME-SFO) 2. High performance liquid chromatography 3. Dispersive liquid-liquid microextraction method based on solidification of floating organic drop (DLLME-SFO) 4. Leong

به‌دست آوردن بهترین عملکرد مجموعه است. در این کار، روش DLLME-SFO برای استخراج آتورواستاتین در نمونه‌های قرص استفاده و اثر عامل‌های تجربی متفاوت بر عملکرد کارایی روش بررسی شده است.

بخش تجربی

مواد

آتورواستاتین و حلال‌های استونیتریل، متانول، آندکانول، اکتانول نرمال، ۱-دکانول با خلوص HPLC از شرکت مرک خریداری شد. محلول استاندارد آتورواستاتین ۱۰۰۰ ppm آتورواستاتین تهیه شد. در دمای ۱۰- درجه سانتی‌گراد در فریزر نگهداری شد. محلول‌های استاندارد ضمن کار از رقیق کردن محلول استاندارد اولیه تهیه شدند.

دستگاه‌ها

دستگاه سوانگاری^۵ با عملکرد بالا (Knauer) با آشکارساز فتودیود برای بررسی سوانگاری به کار رفت. فرایند جداسازی روی ستون C ۱۸ (مدل ۱۰۰-۵) به طول ۲۵۰ میلی‌متر، قطر داخلی ۴٫۶ میلی‌متر و اندازه ذره‌های ۵ میکرومتر انجام شد. مخلوط آب و استونیتریل به نسبت ۹۷:۳ با سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه به عنوان فاز متحرک برای شویش بکنواخت استفاده شد. طول موج آشکارساز در ۲۳۷ نانومتر برای آشکارسازی آنالیت تنظیم شد.

آماده‌سازی نمونه

۱۰۰ میکروگرم بر لیتر از آتورواستاتین را در یک لوله دستگاه گریزانه^۲ که حاوی ۵ میلی‌لیتر آب بود تزیق کرده، قدرت یونی و pH محلول تنظیم شد (pH=۴ و سدیم کلرید ۱٪ V/V). از محلول هیدروکلریدریک اسید و سدیم هیدروکسید برای تنظیم pH استفاده شد. سپس، با تزریق ۱٫۵ میلی‌لیتر متانول حاوی ۴۰ میکرولیتر آندکانول به این مخلوط، محتویات لوله گریزانه ابری شکل شده و آنالیت به داخل قطرات ریز آندکانول استخراج شد.

سپس قطره شناور، جامد و برای آزمون جمع‌آوری می‌شود [۵] و [۷]. آتورواستاتین جزئی از ترکیب‌های آلی به نام دیفنیل پیرول‌ها و عضو خانواده استاتین‌ها است که توسط شرکت فایزر به صورت نمک کلسیم و با عنوان تجاری لیپیتور^۱ تولید می‌شود. این ماده از طریق مهار آنزیم HMG CoA^۲ ردوکتاز سطح، کلاسترول خون را کاهش می‌دهد. در زیست‌سنتز^۳ کلاسترول HMG CoA نقش اساسی دارد. همچنین، آتورواستاتین برای درمان چربی خون و جلوگیری از بیماری‌های قلبی-عروقی استفاده می‌شود [۸ و ۹]. افزون بر این، به عنوان یک داروی کمکی در درمان سرطان است [۱۰ تا ۱۲]. به هر حال برخی اثرهای جانبی از قبیل آسیب عضله و آسیب ماهیچه اسکلتی پس از مصرف آتورواستاتین گزارش شده است. بنابراین، تعیین و اندازه‌گیری آتورواستاتین در نمونه‌های حقیقی مانند قرص بسیار پراهمیت است [۱۳ تا ۱۶]. بهینه‌کردن فرایندی است که عملکرد یک مجموعه، فرایند یا فرآورده را برای بهبود کارایی، افزایش می‌دهد. در شیمی تجزیه بهینه‌کردن به معنای پیدا کردن شرایطی است که در آن فرایند موردنظر بهترین کارایی را دارد. بهینه‌کردن و الگوکردن می‌تواند توسعه یک روش را که بیشتر یک فرایند وقت‌گیری است، تسریع کند [۱۷]. متأسفانه هنوز هم روش‌های کلاسیک تجربی بهینه‌کردن یک متغیر در زمان استفاده می‌شود. گرچه بهینه‌کردن یک متغیر در زمان در بعضی زمینه‌ها به خوبی کار می‌کند اما به داده زیادی نیاز دارد [۱۸]. همچنین، زمانی که این متغیرها با هم برهم‌کنش دارند این روش مشکل‌ساز خواهد بود. روش‌های چند متغیره که در آن تمام متغیرها هم‌زمان تغییر می‌کنند یک زمینه جالب است. همچنین، این روش‌ها زمان کمتری در مقایسه با روش‌های تک متغیره نیاز دارند [۱۹]. بهینه‌سازی به روش سطح پاسخ (RSM)^۴ ترکیبی از روش‌های ریاضی و آماری بر پایه برازش یک معادله چندجزیی است که می‌تواند رفتار داده‌ها را با آزمون‌های آماری توصیف کند [۲۰]. این روش زمانی که در آن یک پاسخ یا تعدادی از پاسخ‌ها با چند متغیر مستقل تحت تأثیر قرار می‌گیرد، کارآمد است. هدف این روش بهینه‌کردن هم‌زمان سطوح متغیرها برای

1. Lipitor 2. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG CoA) 3. Biosynthesis 4. Response surface methodology (RSM)
5. Chromatography 6. Centrifuge

که X1، X2 و X3 متغیرهای مستقل و b0...b9 مقادیر ضرایب به دست آمده از وایزش کمترین مربعات با مینی تب هستند. نمودارهای سطح پاسخ با روش‌های آماری به دست آمدند که روش طراحی و داده‌های الگو CCD را توضیح می‌دهند. روش سطح پاسخ به صورت گرافیکی ارتباط بین عامل‌ها و پاسخ آن‌ها را در شرایط بهینه توضیح می‌دهند [۲۲ و ۲۳]. جدول ۱ ماتریس طراحی را برای سه متغیر به همراه پاسخ‌های مشاهده شده، بیان می‌کند.

جدول ۱ ماتریس طراحی برای سه عامل (مقادیر واقعی و کد شده) و پاسخ تجربی

شماره آزمایش	X1 pH	X2 حجم حلال استخراج کننده (میکرولیتر)	X3 حجم حلال پخشی (میلی لیتر)	سطح زیر پیک اتورواستاتین
۱	۵ (۰)	۳۵ (۰)	۲٫۵ (+۲)	۴۴۱۲۸
۲	۵ (۰)	۳۵ (۰)	۱٫۵ (۰)	۶۱۱۵۱
۳	۵ (۰)	۳۵ (۰)	۱٫۵ (۰)	۶۴۷۸۱
۴	۳ (-۱)	۲۰ (-۱)	۱ (-۱)	۲۰۸۶۱
۵	۵ (۰)	۳۵ (۰)	۱٫۵ (۰)	۶۶۵۲۱
۶	۷ (+۱)	۲۰ (-۱)	۲ (+۱)	۱۶۷۱۲
۷	۵ (۰)	۶۰ (+۲)	۱٫۵ (۰)	۲۲۸۴۳
۸	۵ (۰)	۳۵ (۰)	۱ (-۱)	۵۴۷۸۱
۹	۵ (۰)	۳۵ (۰)	۱٫۵ (۰)	۶۲۹۳۹
۱۰	۷ (+۱)	۵۰ (+۱)	۰٫۵ (۲)	۲۹۷۹۸
۱۱	۳ (-۱)	۲۰ (-۱)	۲ (+۱)	۲۳۱۰۱
۱۲	۷ (+۱)	۵۰ (+۱)	۲ (+۱)	۳۳۷۱۹
۱۳	۳ (-۱)	۵۰ (+۱)	۱ (-۱)	۳۴۸۱۱
۱۴	۵ (۰)	۱۰ (-۲)	۱٫۵ (۰)	۱۰۷۲۱
۱۵	۷ (+۱)	۲۰ (-۱)	۱ (-۱)	۱۶۸۳۹
۱۶	۳ (-۱)	۵۰ (+۱)	۲ (+۱)	۴۱۷۳۹
۱۷	۸ (+۲)	۳۵ (۰)	۱٫۵ (۰)	۴۲۷۸۱
۱۸	۲ (-۲)	۳۵ (۰)	۱٫۵ (۰)	۵۱۹۱۸

نتیجه‌ها و بحث

در این کار، روش DLLME-SFO همراه HPLC-UV برای تغلیظ و اندازه‌گیری اتورواستاتین استفاده شد. برای دستیابی به کارایی بالای روش جداسازی، تأثیر عامل‌های مؤثر بر جداسازی

سپس، مخلوط به مدت ۵ دقیقه در ۳۵۰۰ rpm سانتریفیوژ شده و لوله را داخل حمام یخ قرار داده تا بتوان قطره جامد شده را روی محلول جمع‌آوری کرد. قطره جامده شده داخل یک ظرف ریخته شد تا در دمای اتاق ذوب شود. در نهایت ۳۰ میکرولیتر از قطره ذوب‌شده به دستگاه HPLC تزریق شد.

طرح مرکب مرکزی^۱ (CCD)

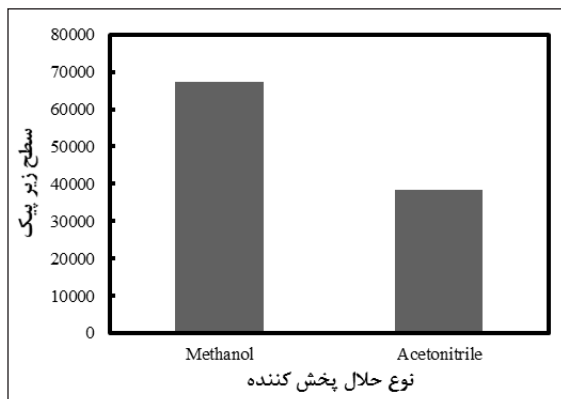
با استفاده از طراحی آزمایش یک سری آزمایش‌ها را می‌توان به صورت یک ماتریس با متغیرهای متفاوت تعریف کرد. نخستین بار طرح مرکب مرکزی (CCD) توسط باکس^۲ و ویلسن^۳ معرفی شد [۲۱] که یک طرح بسیار کارا برای برازش الگوهای درجه دوم است. برای طراحی و بهینه کردن عامل‌ها و عامل‌هایی مانند pH، حجم حلال پخش کننده و حجم حلال استخراج کننده روش RSM و CCD به کار می‌رود. برای بهینه کردن شرایط آزمایش اثر برخی عامل‌های متفاوت مانند pH (X1)، حجم حلال استخراج کننده (X2) و حجم حلال پخش کننده (X3) در پنج سطح بررسی شد تا یک الگو وایزش^۴ بین متغیرها و سطح زیر پیک سوانگار^۵ به دست آید. پس از آزمایش‌های اولیه سطوح بالا و پایین عامل‌های متفاوت مؤثر بر استخراج به صورت حجم حلال استخراج کننده (۳۰ و ۵۰ میکرولیتر)، حجم حلال پخش کننده (۰٫۵ و ۱٫۵ میلی‌لیتر) و pH (۴ و ۷) تعریف شدند. نقاط بالا (کد شده +۲) و نقاط پایین (کد شده -۲) برای سه متغیر تعریف شده معرفی شدند. مقادیر واقعی و کددار شده ۱۸ آزمایش طراحی شده همراه با مقادیر سطح زیر پیک اتورواستاتین با روش CCD با نرم‌افزار مینی تب نسخه ۱۶ در جدول ۱ خلاصه شده‌اند. معادله‌های چند جمله‌ای و سطح پاسخ با استفاده از نرم‌افزار مینی تب به دست آمد. معادله‌های ریاضی که ارتباط بین سه متغیر مستقل و پاسخ را توضیح می‌دهند به صورت زیر بیان می‌شوند:

$$\text{Response} = b_0 + b_1 \times X_1 + b_2 \times X_2 + b_3 \times X_3 + b_4 \times X_1 \times X_1 + b_5 \times X_2 \times X_2 + b_6 \times X_3 \times X_3 + b_7 \times X_1 \times X_2 + b_8 \times X_1 \times X_3 + b_9 \times X_2 \times X_3$$

1. Central Composite Design (CCD) 2. Box 3. Wilson 4. Regression model 5. Chromatogram

انتخاب حلال پخش کننده

نوع حلال پخش کننده نیز مورد بررسی قرار گرفت. این حلال باید با آب قابل اختلاط بوده و حلال استخراج کننده را نیز در خود حل کند. بنابراین، اثر دو حلال متانول و استونیتریل برای این منظور روی کارایی استخراج مورد بررسی قرار گرفت. نتایج شکل ۲ نشان داد که متانول کارایی استخراج بالاتری دارد و مراحل بعدی به‌عنوان حلال پخش کننده مورد استفاده قرار گرفت.



شکل ۲ بررسی نوع حلال پخش کننده بر مقدار استخراج آتورواستاتین (حجم حلال استخراج کننده ۴۰ میکرو لیتر، حجم حلال پخش کننده ۱/۵ میلی لیتر، حجم نمونه ۵ میلی لیتر، غلظت نمک ۱ درصد حجمی - وزنی، pH = ۴، غلظت آتورواستاتین ۱۰۰ میکروگرم بر لیتر)

طراحی آزمایش

همان‌طور که گفته شد سه عامل pH (X1)، حجم حلال استخراج کننده (X2) و حجم حلال پخش کننده (X3) کارایی استخراج را تحت تأثیر قرار می‌دهند. هدف روش CCD افزایش کارایی استخراج، تعیین عامل‌های مؤثر بر کارایی استخراج و نشان دادن برهم‌کنش بین عامل‌هاست. جدول ۱ مقادیر کددار شده، واقعی عامل‌های آزمایش و مقادیر سطح زیر پیک آتورواستاتین را نشان می‌دهد. در جدول ۲ معادله‌های ارتباط بین سه عامل و پاسخ آن‌ها آورده شده است. تحلیل واریانس برای تخمین اثر عامل‌های مهم به کار می‌رود. از بررسی ANOVA^۱ آزمون آماری

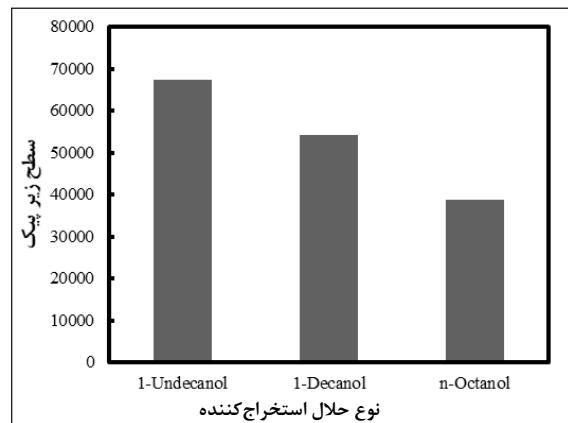
1. Analysis of variance

مانند pH، نوع حلال‌ها و حجم آن‌ها و غلظت نمک با روش‌های بهینه‌سازی یک عامل در زمان و طراحی آزمایش مورد بررسی قرار گرفتند.

بهینه‌سازی یک عامل در زمان

انتخاب حلال استخراج کننده

انتخاب روش حلال استخراج کننده در روش DLLME بسیار پراهمیت است. حلال استخراج کننده باید چگالی کمتر از آب، حلالیت پایین در آب، قدرت استخراج آنالیت‌های متفاوت و نقطه ذوب نزدیک به دمای اتاق (۱۰ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد) را داشته باشد. به همین علت ۱-آندکانول ($d = 0.83 \text{ gml}^{-1}$, $mp = 19^\circ\text{C}$)، ۱-دکانول ($d = 0.83 \text{ gml}^{-1}$, $mp = 6.4^\circ\text{C}$) و n-اکتانول ($d = 0.824 \text{ gml}^{-1}$, $mp = 16^\circ\text{C}$) به‌عنوان حلال استخراج کننده مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج در شکل ۱ نشان داد که ۱-آندکانول کارایی استخراج بالاتری دارد. با توجه به این که ۱-آندکانول نقطه ذوب بیشتری نسبت به دو حلال دیگر دارد (۱-آندکانول 19°C ، ۱-دکانول 6.4°C و n-اکتانول 16°C) با دستگاه گریزانه راحت‌تر از سطح محلول جدا می‌شود. بنابراین، در تمام مراحل بعدی این حلال به‌عنوان حلال استخراج کننده به کار گرفته شد.



شکل ۱ بررسی نوع حلال استخراج کننده بر مقدار استخراج آتورواستاتین (حجم حلال استخراج کننده ۴۰ میکرو لیتر، حجم حلال پخش کننده (متانول) ۱/۵ میلی لیتر، حجم نمونه ۵ میلی لیتر، غلظت نمک ۱ درصد وزنی - حجمی، pH = ۴، غلظت آتورواستاتین ۱۰۰ میکروگرم بر لیتر)

جدول ۳ نتایج تحلیل واریانس

منبع	SS	df	مقدار F	مقدار p
Model	۵۴۲۴۳	۹	۱۶,۸۷	<۰,۰۰۰۱
Residual	۲۸۵۸	۸	-	-
Lack of fit	۲۶۹۷	۵	۱,۴۰	۰,۰۶۳
Pure error	۱۶۱	۳		

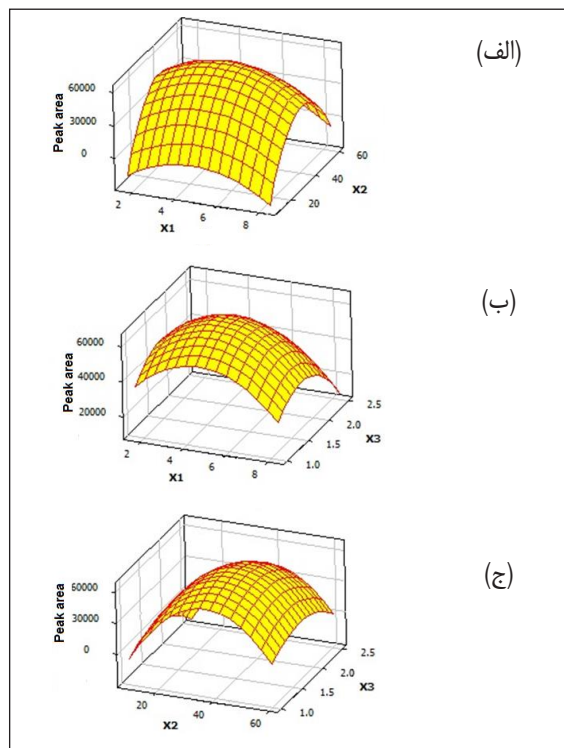
$R^2: ۰,۹۵۳۴, R^2_{adj}: ۰,۹۰۰۹, R^2_{pred}: ۰,۷۰۶۸$

مجموع مربعات: SS

درجه آزادی: df

روش سطح پاسخ و انتخاب شرایط بهینه

یکی از مزایای روش سطح پاسخ وجود نمودارهای سه بعدی است که ارتباط بین پاسخها و سطح تجربی هر عامل را نشان می‌دهد. این نمودارها باید شکل تقریبی سطح پاسخ و این که آیا بهینه کردن عاملها امکان پذیر است یا نه را نشان دهد (شکل ۳).



شکل ۳ منحنی سه بعدی سطح پاسخ از سطح زیر پیک سوانگار آتورواستاتین در مقابل عامل‌های مستقل در سطح پاسخ در مقدار بهینه از متغیرهای باقی مانده (X1=pH, X2= حلال پخشی, X3= حلال استخراجی)

F برای تعیین این که چه عامل‌هایی بر پاسخ تأثیر بیشتری دارند، به کار می‌رود. اهمیت هر عامل از وایزش با مقدار p (مقدار احتمال) تعیین می‌شود.

جدول ۲ مقدار ثابت و ضرایب برای معادله درجه دو

عامل	ضرایب	مقدار p
ثابت	۶۱۴۷۱	۰
X ₁	-۲۵۷۳	۰,۰۰۱
X ₂	۵۶۳۶	۰,۰۱۵
X ₃	۱۲۸۵۵	۰,۰۱۰
X ₁ ²	-۷۴۲۷	۰,۰۰۲
X ₂ ²	-۱۸۲۳۵	۰
X ₃ ²	-۱۵۴۱۲	۰,۰۰۲
X ₁ X ₂	-۳۲۷,۸	۰,۸۸۱
X ₁ X ₃	-۹۴۰,۴	۰,۷۵۹
X ₂ X ₃	۱۵۲۸,۸	۰,۶۱۹

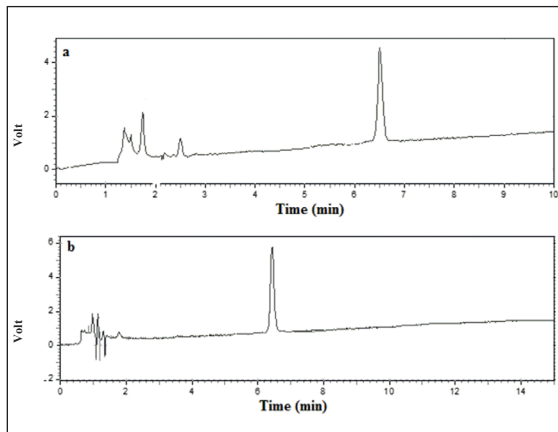
با سطح اطمینان ۹۵٪ اگر قدر مطلق مقدار p کمتر از ۰,۰۵ باشد عامل موردنظر روی پاسخ اثر بیشتری دارد. ضرایب وایزش و مقادیر p در جدول ۲ آورده شده‌اند. عامل R² به صورت نسبت تغییر در داده‌ها که با تحلیل واریانس تعیین می‌شود، تعریف شد. مقدار R² باید بین صفر و یک باشد که البته مقادیر بالاتر بهتر است. عیب این عامل این است که مقدار آن به عامل‌هایی که به الگو افزوده می‌شوند، بستگی دارد. با افزایش عامل‌های افزوده شده این مقدار آماری افزایشی است، حتی اگر این عاملها معنی‌دار نباشند. برای از بین بردن این عیب ضریب تنظیم شده R²_{adj} تعیین می‌شود. این عامل اندازه تغییر حول مقدار تعریف شده به وسیله الگو برای عامل‌ها به کار رفته است. افزایش عامل‌های بی معنی به الگو می‌تواند این مقدار آماری را کاهش دهد. R² پیش‌بینی شده (R² pred.)، معیاری از توانایی پیش‌بینی الگو است. در الگو ایجاد شده، R² برابر با ۰,۹۵۳۴، مقدار ۹۵,۳۴٪ تغییرات در سطح زیر پیک را نشان می‌دهد. در جدول ۳ مقدار R² پیش‌بینی شده برابر با ۰,۷۰۶۸ است که نشان می‌دهد الگو ایجاد شده توانایی پیش‌بینی را به ۷۰,۶۸٪ رسانده است.

استاندارد تزریق شد. نتایج در جدول ۴ نشان داده شده‌اند.

جدول ۴ تجزیه نمونه حقیقی (قرص و ادرار) به روش میکرواستخراج مایع- مایع پخشی

نمونه	مقدار افزوده شده (میکروگرم بر لیتر)	مقدار یافت شده (میکروگرم بر لیتر)	درصد بازیابی نسبی
قرص	۰	۹,۷۰ ± ۰,۴۱	-
	۱۰	۱۸,۳۴ ± ۰,۲۵	۸۶,۴۰
	۲۰	۲۶,۵۳ ± ۱,۲۳	۸۴,۱۵
	۳۰	۳۵,۱۳ ± ۱,۳۰	۸۴,۷۶
ادرار	۰	-	-
	۱۰	۹,۸۵ ± ۰,۳۶	۹۸,۵
	۲۰	۱۹,۲۰ ± ۰,۵۱	۹۶,۰

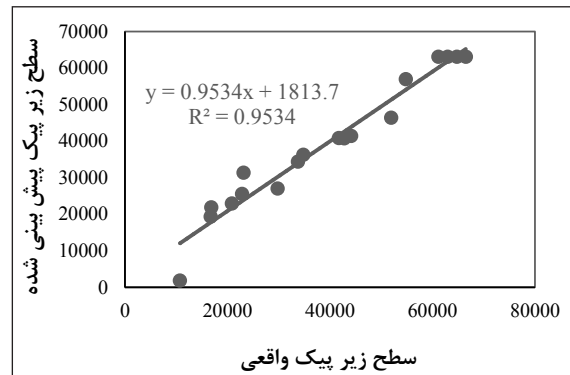
سوانگار نمونه شاهد و اسپایک شده از آنالیت تحت شرایط بهینه در شکل ۵ نشان داده شده‌اند.



شکل ۵ سوانگار نمونه قرص اولیه (الف) و اسپایک شده (ب) از آنالیت تحت شرایط بهینه

همچنین، روش به کار رفته با روش‌های دیگر برای اندازه‌گیری آنورواستاتین مقایسه شد. برپایه نتایج دقت روش پیشنهاد شده قابل مقایسه با سایر روش‌هاست. بر پایه نتایج، این روش برای اندازه‌گیری آنورواستاتین در نمونه‌های حقیقی به اندازه کافی حساس است.

نمودارها پاسخ را در برابر مقادیر محاسبه شده در شکل ۴ نشان می‌دهند که مقادیر باقی مانده بسیار پایین هستند. این شرایط به ما اجازه استفاده از ابزار پیش‌بینی را برای به دست آوردن پاسخ در یک دامنه از عدم قطعیت می‌دهد. هدف اصلی و نهایی بهینه‌کردن این است که مقادیر بهینه عامل‌های مؤثر را روی پاسخ با استفاده از الگو ایجاد شده به دست می‌دهد. مقدار بیشتر سطح زیر پیک ۶۹۹۶۰ با استفاده از مقادیر بهینه ۳۸ میکرولیتر حلال استخراج کننده، ۱,۵ میلی لیتر حلال پخش کننده و pH برابر با ۴ به دست آمد.



شکل ۴ منحنی واسنجی آنورواستاتین پس از فرایند میکرواستخراج مایع- مایع پخشی

شرایط و عامل‌های تجزیه‌ای

روش مورد نظر، دامنه خطی خوبی از واسنجی را در حد ۱ تا ۲۰۰ میکروگرم بر لیتر با ضریب R^2 بیشتر از ۰,۹۹۶۶ را نشان داد. حد تشخیص (LOD) بر اساس $S/N = 3$ مقدار ۰,۳ میکروگرم بر لیتر به دست آمد. انحراف استاندارد نسبی (RSD) برای چهار اندازه‌گیری ۲,۲٪ است.

آزمون نمونه حقیقی

روش معرفی شده برای استخراج و اندازه‌گیری آنورواستاتین در آب، نمونه ادرار و نمونه‌های قرص به کار رفت. نمونه‌ها پس از فرایند DLLME-SFO با دستگاه HPLC-UV تحت شرایط بهینه بررسی شدند. همچنین، به نمونه‌ها مقادیر معینی از محلول

جدول ۵ مقایسه روش پیشنهادی با روش‌های قبلی برای اندازه‌گیری اتورواستاتین در نمونه قرص

روش اندازه‌گیری	گستره خطی میکروگرم بر لیتر	حد تشخیص میکروگرم بر لیتر	انحراف استاندارد نسبی %	Ref.
RP-HPLC	۲۰۰۰-۳۰۰۰۰	۶۵۰	۰,۶۵	[۲۴]
DLLME-HPLC-Q-TOF-MS ^a	-	۰,۰۰۰۲۶	۱۶,۴۰	[۲۵]
RP-HPLC-UV	۳-۱۵۰	۱,۲	۱۵,۱۰	[۲۶]
RP-HPLC-UV	۵۰۰۰-۱۵۰۰۰	۱۲۰	۰,۵۰	[۲۷]
LC-ESI-MS ^b	۰,۲۵-۲۰	-	۴,۲۴	[۲۸]
LLLME-HPLC-UV ^c	۱-۵۰۰	۰,۴	۷,۰۰	[۲۹]
SPE-LC-MS/MS ^d	۰,۲-۳۰	۰,۰۶	۱۵	[۳۰]
DLLME-SFO-HPLC	۰,۲-۶۰۰۰	۰,۰۷	۸,۴۰	[۳۱]
DLLME-SFO-HPLC	۱-۲۰۰	۰,۹۰	۲,۲۰	کار حاضر

a) High performance liquid chromatography coupled to quadrupole-time-of flight mass spectrometry.

b) Liquid chromatographic-electrospray ionization- mass spectrometric.

c) Liquid-liquid-liquid microextraction HPLC-UV.

d) Solid phase extraction followed by LC- tandem MS.

نتیجه‌گیری

حلال‌های آلی است که استفاده نمی‌شود. همچنین، به‌کار گرفتن روش سطح پاسخ به‌عنوان یکی از روش‌های طراحی آزمایش برای به‌دست آوردن شرایط بهینه تا اثرات متقابل عامل‌های مؤثر در پاسخ لحاظ شود و منجر به حذف روش‌های یکی در یک زمان شد.

در این کار، روش DLLME-SFO برای استخراج و اندازه‌گیری اتورواستاتین از نمونه‌های قرص استفاده شد. نتایج این کار نشان داد که روش معرفی‌شده کارایی استخراج بالا و حد تشخیص پایین دارد. مهم‌ترین مزیت این روش، سمی بودن حجم بالای

مراجع

- [1] Rezaee, M.; Assadi, Y.; Hosseini, M.R.M.; Aghaee, E.; Ahmadi, F.; Berijani, S.; Journal of Chromatography A 1116, 1-9, 2006.
- [2] Berijani, S.; Assadi, Y.; Anbia, M.; Hosseini, M.R.M.; Aghaee, E.; Journal of Chromatography A 1123, 1-9, 2006.
- [3] Fattahi, N.; Assadi, Y.; Hosseini, M.R.M.; Jahromi, E.Z.; Journal of Chromatography A 1157, 23-29, 2007.
- [4] Rezaee, M.; Yamini, Y.; Shariati, S.; Esrafil, A.; Shamsipur, M.; Journal of Chromatography A 1216, 1511-1514, 2009.
- [5] Hashemi, B.; Shamsipur, M.; Barati, A.; Journal of the Brazilian Chemical Society 26, 2046-2053, 2015.
- [6] Leong, M.I.; Huang, S.D.; Journal of Chromatography A 1211, 8-12, 2008.
- [7] Zanjani, M.R.K.; Yamini, Y.; Shariati, S.; Jönsson, J.Å.; Analytica Chimica Acta 585, 286-293, 2007.
- [8] Heinonen, T.M.; Stein, E.; Weiss, S.R.; McKenney, J.M.; Davidson, M.; Shurzinske, L.; Black, D. M.; Clinical Therapeutics 18, 853-863, 1996.

- [9] Kappelle, P.J.; Dallinga-Thie, G.M.; Dullaart, R.P.; Group, D.A.L.I.S.; BBA Molecular and Cell Biology of Lipids 1801, 89-94, 2010.
- [10] Yamamoto, A.; Harada-Shiba, M.; Kawaguchi, A.; Kubo, K.Oi.H.; Sakai, S.; Mikami, Y.; Imai, T.; Ito, T.; Kato, H.; Atherosclerosis 153, 89-98, 2000.
- [11] Osmak, M.; Cancer letters 324 ,1-12, 2012.
- [12] Yang, Z.; Lee, M.J.; Zhao, Y.; Yang, C. S.; Genes & Nutrition 7, 11-18, 2012.
- [13] Praveen Kumar, S.; Bhadregowda, D.; Vathsala, D.; Mantelingu, K.; Rangappa, K.; Journal of Chemical and Pharmaceutical Research 5, 359-364, 2013
- [14] Shitara, Y.; Sugiyama, Y.; Pharmacology & Therapeutics 112, 71-10, 2006.
- [15] Lemos, J.A.De.; Blazing, M.A.; Wiviott, S.D.; Lewis, E. F.; Fox, K. A.; White, H. D.; Rouleau, J. L.; Pedersen, T.R.; Gardner, L.H.; Mukherjee, R.; JAMA 292, 1307-1316, 2004.
- [16] Kashani, A.; Phillips, C.O.; Foody, J.M.; Wang, Y.; Mangalmurti, S.; Ko, D.T.; Krumholz, H.M.; Circulation 114, 2788-2797, 2006.
- [17] Jalali-Heravi, M.; Arrastia, M.; Gomez, F.A.; Analytical Chemistry 87, 3544-3555, 2015.
- [18] Hanrahan, G.; Montes, R.; Gomez, F.A.; Analytical and Bioanalytical Chemistry. 390, 169-179, 2008.
- [19] Rodionova, O.Y.; Analytical Chemistry 60, 994-996, 2005.
- [20] Gilmour, S.G.; Biometrics 62, 323-331, 2006.
- [21] Box, G.E.P.; Wilson, K.B.; "Breakthroughs in Statistics", Springer New York, 270-310, 1992.
- [22] Stephan, D.; Werner, J.; Yeater, R.; MS excel add in software package 2001, 1998
- [23] Burlacov, I.; Jirkovský, J.; Müller, M.; Heilmann, R.; Surface and Coatings Technology 201, 255-264, 2006
- [24] Martín, J.; Buchberger, W.; Alonso, E.; Himmelsbach, M.; Aparicio, I.; Talanta 85, 607-615, 2011.
- [25] Mohammadi, A.; Rezanour, N.; Dogaheh, M.A.; Bidkorbeh, F.G.; Hashem, M.; Walker, R.; Journal of Chromatography B 846, 215-221, 2007.
- [26] Chou, Y.C.; Wang, Y.K.; Charng, M.J.; Ueng, Y.F.; Journal of Food and Drug Analysis. 21, 147-153, 2013.
- [27] Talluri, M.K.; Kalyankar, A.; Ragampeta, S.; Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2, 285-292, 2012.
- [28] Ma, L.; Dong, J.; Chen, X.; Wang, G.; Chromatographia 65, 737-741, 2007.
- [29] Farahani, H.; Norouzi, P.; Beheshti, A.; Sobhi, H.R.; Dinarvand, R.; Ganjali, M.R.; Talanta 80, 1001-1006, 2009.
- [30] Hermann, M.; Christensen, H.; Reubsæet, J.; Analytical and Bioanalytical Chemistry 382, 1242-1249, 2005.
- [31] Taheri, S.; Jalali, F.; Fattahi, N.; Bahrami, G.; Journal of Separation Science 38, 309-315, 2015.