Archive of SID

بهینه سازی ساختار فاز متحرک در جداسازی همزمان شش داروی ضد صرع توسط روش‌های کمومتریکس و بررسی اثر مزاحمت‌های فیزیکی و شیمیایی محیط سرمی بر اندازه‌گیری آنها

پونه ابراهیمی *+
گنبد، مجتمع آموزش عالی گنبد، دانشکده علوم پایه، صندوق پستی ۱۶۳

فرشته پورمراد، سهیلا هنری
ساری، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، دانشکده داروسازی

چکیده: اندازه‌گیری غلظت برخی از داروها در سرم انسان در مطالعه‌های فارماکوکینتیک و تعیین سمیت دارویی از اهمیت بنیادی برخوردار است. بین سطح خونی دارو واثرات حاصل از آن، ارتباط قابل ملاحظه‌ای وجود دارد که اطلاع از این ارتباط، در تدوین یک استراتژی درمانی بسیار مفید می‌باشد. هدف از انجام این پژوهش، یافتن بهترین شرایط مناسب برای جداسازی همزمان شش داروی ضد صرع شامل پریمیدون، فنوباربیتال، فنی توئین، کاربامازپین، اتوسوکسیماید و دیازپام در نمونه‌های سرمی با روش کمومتریکس و نیز بررسی مزاحمت های فیزیکی و شیمیایی حاصل از محیط سرمی بر نمودار کالیبراسیون مربوطه در اندازه‌گیری همزمان این داروها بوده است. به منظور بهینه سازی زمان آنالیز و تفکیک بین پیکهای همسایه، از روشهای کمومتریکس طراحی آزمایش، آنالیز چند متغیره و تصمیم گیری چند مقیاسی بهینگی پارتو استفاده شد. متغیرهای مطالعه شده شامل pH فاز متحرک و درصد حجمی اصلاحگر آلی بودند. پس از تعیین شرایط بهینه، نمودار کالیبراسیون در حضور و غیاب سرم، برای بررسی اثر مزاحمت‌های فیزیکی و شیمیایی محیط سرمی، رسم شد. از نمودار کالیبراسیون به‌دست آمده، برای تعیین مقدار این داروها در سرم کنترل، به منظور بررسی صحت روش، استفاده شد. بررسی نتیجه‌ها نشان دادند که مهم‌ترین اثرها بر زمان بازداری داروها، به غلظت متانول مربوط می‌شود. سایر متغیرها اثر کمتری را بر زمان بازداری نشان دادند. همچنین ظاهر شدن عبارت برهمکنش دو فاکتوری بین این‌دو متغیر در مدل بازداری، ضرورت انجام روشهای بهینه‌سازی چند متغییری را در فرایند جداسازی داروهای ضد صرع در RP-HPLC تأکید می کند. بررسی ها نشان دادند که شرایط بهینه شامل pH= ۲،۶ و ٪۶۰ =V می‌باشد. همچنین بررسی اثر مزاحمت‌های فیزیکی و شیمیایی موجود در محیط سرمی بر اندازه گیری داروها، نشان داد که برای فنوباربیتال، فنی توئین و کاربامازپین، مقدارهای شیب خطوط نمودار کالیبراسیون به تقریب اختلافی ندارند، درنتیجه می‌توان از روش استاندارد معمولی برای آنالیز HPLC آنها استفاده نمود. در حالی که برای اتوسوکسیماید و دیازپام شیب خط‌های نمودار کالیبراسیون اختلاف داشته و لازم است از روش افزایش استاندارد برای اندازه گیری کروماتوگرافی آنها استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: داروهای ضد صرع، طراحی آزمایش، برازش خطی چند گانه، روشهای کمومتریکس، بهینه سازی.

KEY WORDS: *Anticonvulsant drugs, Experimental design, Multiple linear regression, Chemometrics approaches, Optimization.*

*عهده دار مکاتبات
+E-mail: epouneh@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

اندازه گیری غلظت داروها در سرم انسان در مطالعه‌های فارماکوکینتیک از اهمیت اساسی برخوردار است و برای دسته‌های گوناگونی از داروها مانند داروهای قلب وعروق، آنتی بیوتیک‌ها، عوامل ضد تشنج و داروهای ضد سرطان، تعیین سمیت دارویی در TDM[۱] ضروری است. تجویز دوز درمانی معمول از داروهای ضد صرع براساس میزان خون بدن ممکن است، غلظت‌های نامناسبی را در خون تولید نماید. بین سطح خونی دارو و اثرهای حاصل از آن، ارتباط قابل ملاحظه‌ای وجود دارد که اطلاع از این ارتباط، در تدوین یک استراتژی درمانی بسیار مفید خواهد بود. ضریب درمانی در بیشتر داروهای ضدصرع پایین بوده و مسمومیت‌زایی آنها بسیار شایع است. بنابراین در درمان مؤثر حملات تشنجی به آگاهی در مورد سطح درمانی دارو، ویژگی فارماکوکینتیک و ویژگی‌های مسمومیت‌زایی آنها نیاز است [۱]. گرچه درمان تک دارویی با دوز درمانی مناسب و قابل تحمل، در شروع درمان توصیه می‌شود، اما برای آن‌دسته از بیمارانی که به انواع گوناگونی از صرع مبتلا هستند، و یا اینکه صرع آنها با حداکثر مقدار داروی ضد صرع خط اول قابل کنترل نیست، درمان چند دارویی در نظر گرفته می‌شود. درنتیجه یافتن روشی مناسب و کارآمد با صحت و دقت کافی برای اندازه‌گیری همزمان این داروها، می‌تواند به پزشک معالج در به‌دست آوردن غلظت دارویی مناسب در خون که دارای بیشتری اثر درمانی و کمترین اثر جانبی باشد، در طی مدت زمانی کوتاه یاری برساند. HPLC به علت توانایی‌های ویژه در جداسازی اجزای نمونه‌های آبکی پیچیده، با قدرت جداسازی بسیار بالا، می‌تواند روش جذابی برای آنالیز داروها به شمار آید [۲]. از برتری‌های این روش می توان به عدم نیاز به فرآیند مشتق سازی ترکیبات، حجم کم نمونه جهت انجام آنالیز و عدم تخریب نمونه پس از جداسازی اشاره نمود. این داروها با استفاده از روشهای سریع و دقیق ایمنولوژیک نیز قابل اندازه‌گیری هستند، اما در هر بار آزمایش تنها می‌توان یک ترکیب را تعیین مقدار نمود. در حالی که با استفاده از روش HPLC می‌توان تعیین مقدار داروهای گوناگون و متابولیت‌های آنها را همزمان انجام داد.

دستیابی به تفکیک[۲] کافی و زمان آنالیز مناسب، مهمترین هدف بهینه سازی جداسازی‌ها در کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالاست. استفاده از روش‌های سیستماتیک در HPLC به‌عنوان روشی بسیار کارا برای رسیدن به این منظور، می‌تواند برای توصیف اثر عامل‌های مؤثر بر بازداری و گزینش پذیری بسیار مفید باشد. این روش‌ها قادرند، شرایط بهینه جداسازی‌ها را با صرف کمترین وقت و هزینه مورد پیش بینی قرار دهند. دو روش کلی در بهینه‌سازی و بررسی اثر عامل‌های مختلف بر جداسازی کروماتوگرافی شامل روش‌های سنتی[۳] و روش‌های کموتریکس می‌باشند. روش‌های بهینه‌سازی سنتی شامل مطالعه هر عامل به طور جداگانه هستند. این نوع بهینه‌سازی منجر به افزایش تعداد آزمایش شده و بسیار وقت‌گیر و پرهزینه است. در موردهایی که بر هم کنش بین عامل‌ها وجود داشته باشد، در عمل این روش‌ها غیرقابل کاربرد هستند [۳]. در چنین موردهایی می‌توان از روش‌های کموتریکس برای حل مسئله استفاده نمود. کموتریکس فنونی را جهت کاهش تعداد آزمایش‌های لازم برای پیش‌بینی‌های قابل اعتماد درباره شرایط بهینه جداسازی‌های کروماتوگرافی مایع پیشنهاد می‌کند. این روش‌ها شامل تغییر همزمان کلیه متغیرهای آزمایشی مورد مطالعه بوده و به سه مرحله تقسیم می‌شوند:

۱ـ انتخاب یک مجموعه مناسب از آزمایش‌ها با عنوان طراحی آزمایشی[۴]

۲ـ انتخاب معیار بهینه سازی[۵]

۳ـ ارزیابی و تفسیر نتیجه‌ها

در طراحی آزمایش، بر طبق تکنیک‌های ریاضی روش‌ها به دو دسته تدریجی مانند الگوریتم تدریجی سیمپلکس و همزمان مانند طراحی فاکتوریل تقسیم می‌شوند که در هر مورد آزمایش‌ها توسط قانون‌های دقیقی تعیین می شوند. در روش همزمان یک مجموعه بهینه از آزمایش‌ها توسط یک طرح از قبل طراحی شده، انتخاب شده و داده‌های به‌دست آمده جهت پیش بینی شرایط بهینه، مدل‌سازی می‌شوند. به‌طور معمول فاکتور گزینش‌پذیری، فاکتور تفکیک بین دو پیک همسایه، فاکتور بازداری و گاهی نیز زمان بازداری به عنوان معیار بهینه سازی در مدل‌سازی انتخاب می‌شوند. در خاتمه دادهای حاصله می‌توانند توسط روش‌های گرافیکی و یا روش‌های ریاضی به صورت یک تابع ارزیابی شوند [۴]. در روش همزمان چند طراحی رویه پاسخ[۶] وجود دارد که انتخاب هر یک از این طرح‌ها به تعداد و طبیعت پارامترهای مؤثر و رفتار ترکیب

(۱) Therapeutic drug monitoring
(۲) Resolution
(۳) Traditional
(۴) Experimental design
(۵) Optimization criteria
(۶) Response surface design

www.SID.ir

Archive of SID

در سامانه بستگی دارد [۶ ، ۵]. با استفاده از طراحی فاکتوریل کامل، می‌توان اثرهای مربوط به هر عامل و کلیه برهمکنش‌های چند عاملی ممکن را که بر پاسخ مؤثرند، محاسبه نمود. یک طراحی فاکتوریل کامل دو سطحی نیاز به 2^p آزمایش دارد که در آن p تعداد عامل می‌باشد. در صورتی که تعداد عامل‌های مورد بررسی زیاد باشد، جهت انجام تعداد کمتری از آزمایش‌ها، از طراحی فاکتوریل ناقص استفاده می شود. برای محاسبه یک مدل برازش شامل عبارت‌های توان اول و توان دوم از طرح ستاره‌ای استفاده می‌شود که در آن آزمایش‌ها در سه سطح، در طول محور هر عامل و مرکز آن، انجام می‌گیرد. به این ترتیب آزمایش‌های مربوط به طرح ستاره‌ای و فاکتوریل، اطلاعات کافی برای محاسبه یک مدل شامل عامل‌های اصلی، برهمکنش عامل‌ها و عبارت‌های توان دوم (یا بالاتر) را مهیا نموده و منجر به ایجاد یک طرح مرکب مرکزی[۱] (CCD) می‌شوند.

گزارش‌های زیادی از آنالیز داروهای ضد صرع و متابولیت‌های آنها همراه با سایر داروها، توسط کروماتوگرافی مایع در دسترس است. *کوشیدا*[۲] و همکاران در سال ۱۹۸۳ میلادی مخلوطی از یک کلرا مفنیکول و داروهای ضد صرع را توسط HPLC جداسازی نمودند [۷]. مطالعه‌های دیگری نیز در زمینه جداسازی مخلوط ضدصرع‌ها، استامینوفن، تئوفیلین، کافئین، کلرا مفنیکول و نیز مخلوط سداتیوها و هایپنوتیک ها با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارکرد عالی انجام شد [۹ ، ۸]. پژوهشگران دیگر نیز HPLC را، روشی سریع برای اندازه‌گیری همزمان داروهای ضد صرع و متابولیت‌های آنها در نمونه‌های سرمی [۱۳–۱۰]، ادرار و بافت مغزی [۱۵–۱۴]، بزاق و پلاسما [۱۶] با روش استاندارد داخلی گزارش کرده‌اند. در سال ۱۹۹۹ میلادی نیز بهینه‌سازی شرایط جداسازی ۵ داروی ضد صرع (از شش داروی انتخاب شده دراین مطالعه) با روش RP-HPLC با تغییر pH و درصد متانول در فاز متحرک هیدروارگانیک با روش یکی در یک زمان[۳] مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت [۱۷]. آنچه کلیه این مطالعه‌ها را تا اندازه ای از هم متمایز می کند، تفاوت آنها در شیوه کار به‌ویژه نوع فاز متحرک و نحوه استخراج داروها از ماتریس نمونه است. به‌هرحال آنچه که مهم است، به‌دست آوردن کوتاه‌ترین زمان بازداری در کنار جداسازی خوب داروها از یکدیگر، با صرف حداقل زمان و هزینه می‌باشد.

هنگامی که جداسازی کمتر از سه نمونه مدنظر باشد، به‌دست آوردن چنین شرایطی به‌راحتی امکان‌پذیر است، اما هنگامی که مخلوط نمونه پیچیده‌تر شود، باید از روش‌های سیستماتیک برای حل مسئله سود جست. در چنین مواردی استفاده از روش معمول یکی در یک زمان به‌طور عموم کارا نبوده و مستلزم صرف هزینه و وقت زیاد است.

با توجه به مطالعه‌های انجام شده، در هیچ یک از گزارش‌ها از روش کمومتریکس به عنوان یک روش سیستماتیک در جدا سازی همزمان شش داروی ضدصرع شامل اتوسوکسیماید، فنوپاربیتال، فنی توئین، پریمیدون، کاربامازپین و دیازپام استفاده نشده است. از این‌رو در این پژوهش، به منظور بهینه‌سازی زمان آنالیز و تفکیک بین پیکهای همسایه که دو معیار مغایر در کروماتوگرافی مایع محسوب می شوند، از روشهای کمومتریکس طراحی آزمایشی، آنالیز چندمتغیره و تصمیم‌گیری چند مقیاسی[۴] (MCDM) بهینگی پارتو استفاده شد. اثر دو متغیر آزمایشی شامل pH فاز متحرک و درصد حجمی اصلاحگر آلی (V%) بر جداسازی این ترکیبات مطالعه شد. در ابتدا آزمایش‌ها مطابق طراحی آزمایش CCD از نوع مکعب وجه مرکزی[۵] (FCC) که یکی از مناسب‌ترین طرحها، برای مدل‌سازی پارامترهای بازداری برحسب شرایط آزمایشی می‌باشد، انجام شد. با این طرح می‌توان، حتی وابستگی غیرخطی بین پاسخ و متغیرها را در نظر گرفت [۶–۵]. سپس با استفاده از روش برازش خطی چندگانه مرحله‌ای، مهمترین اثرها انتخاب شده و ضریب مربوط به هر اثر محاسبه شد. پس از ایجاد بهترین مدل برای زمان بازداری هر ترکیب، برای ارزیابی نقاط بهینه، روش بهینگی پارتو به‌کار گرفته شد. در این روش، معیارهای جداسازی متفاوت مانند تفکیک و زمان آنالیز برای کل فضای طراحی آزمایش مربوطه، از مدل‌های به دست آمده محاسبه شده و سپس جهت دستیابی به مقدارهای مناسب این معیارها، یک نمودار MCDM ساخته شد. این نمودار شامل مجموعه‌ای از نقاط بوده که در آن تنها نقطه‌های مرزی پارتو (PO)[۶] مورد بررسی قرار می‌گیرند. نقطه‌های PO، بهترین مقدارها از دو معیار کیفیت جداسازی و زمان آنالیز را برای شرایطی از فاز متحرک در فضای عاملی مورد نظر، در اختیار قرار می‌دهند. پس از تعیین شرایط بهینه، نمودار کالیبراسیون در دو حالت بدون حضور سرم و با حضور

(۱) Central composite design
(۲) Kushida
(۳) One-at-a time
(۴) Multi-criteria decision making
(۵) Face centered cube
(۶) Pareto optimal

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱ـ غلظت ترکیب‌ها در پنج مخلوط استاندارد بر حسب mg/L در بالن ژوژه ۱۰ mL.

نام ماده	مخلوط استاندارد ۱	مخلوط استاندارد ۲	مخلوط استاندارد ۳	مخلوط استاندارد ۴	مخلوط استاندارد ۵
اتوسوکسیماید	۲	۲۰	۵۰	۹۰	۱۵۰
فنوباربیتال	۲	۱۰	۳۰	۵۰	۹۰
فنی توئین	۲	۸	۱۰	۳۰	۴۰
کاربامازپین	۲	۸	۱۰	۲۰	۳۰
دیازپام	۰،۱	۰،۵	۱	۲	۲،۵

غلظت درمانی به ترتیب از بالا به پایین برای هردارو mg/L ۵۰-۱۰۰ ، mg/L ۲۰-۴۰ ، mg/L ۱۰-۲۰ ، mg/L ۰-۵ ، mg/L ۰،۱-۲

سرم در گستره غلظت‌های زیر درمانی، درمانی و سمی، جهت بررسی اثر مزاحمت های فیزیکی و شیمیایی محیط سرمی، رسم شد. از نمودار کالیبراسیون به‌دست آمده، برای تعیین مقدار این داروها در سرم کنترل استفاده و صحت روش، مورد بررسی قرار گرفت.

بخش تجربی

مشخصات دستگاه HPLC مورد استفاده

دستگاه HPLC مورد استفاده شامل یک پمپ مدل k-1001، یک آشکارساز UV مدل k-2600 و تحت کنترل یک کامپیوتر با نرم افزار Eurochrom2000 از شرکت Knauer (Germany) بود. ستون مورد استفاده در این مطالعه از نوع C18(Shim-pack VP-ODS 250×4.6 mm) بوده و طول موج آشکارساز UV در کلیه مراحل انجام آنالیز در ۲۰۷nm تنظیم شد.

مواد مصرفی

کلیه مواد شیمیایی مورد استفاده، شامل متانول با درجه HPLC، سدیم دی هیدروژن فسفات، سدیم تری فسفات و اسید فسفریک از شرکت Merck (Germany) بوده و استاندارد داروهای ضد صرع (شامل اتوسوکسیماید، پریمیدون، فنوباربیتال، فنی توئین، کاربامازپین و دیازپام) از شرکت‌های دارویی الحاوی، سبحان و پارس دارو و سرم کنترل (Lyphochek Maternal Serum Control) نیز از محصولات شرکت Bio-Rad Laboratories تهیه شد. همچنین برای تهیه سرم عاری از دارو، از خون اشخاص سالم استفاده شد.

تهیه فاز متحرک

فازهای متحرک مورد استفاده، مطابق طرح آزمایش، توسط متانول با درجه HPLC تهیه شد. در کلیه مراحل آنالیز از آب دو بار تقطیر و یون‌زدایی شده، برای تنظیم در صد حجمی متانول استفاده شد.

برای تهیه محلول بافر و استفاده از آن در فاز متحرک، از محلول‌های ذخیره‌ای سدیم دی هیدروژن فسفات با غلظت یک مولار استفاده شد. سپس غلظت بافر در فاز متحرک مورد استفاده در حد ۰،۰۱ مولار تنظیم شد. pH فاز متحرک توسط بافر فسفات و اسید فسفریک در بازه‌ی ۲/۵ الی ۷ تنظیم شد که سپس با میکروفیلتر ۰/۴۵µm. صاف وگاززدایی شد. سرعت جریان فاز متحرک در ستون درتمام مراحل آنالیز mL/min ۱ بود. کلیه آزمایش‌ها بر طبق طراحی آزمایش به‌طور تصادفی انجام شدند.

تهیه محلول های استاندارد از داروها (غیر سرمی)

محلول‌های ذخیره‌ای هر یک از نمونه‌ها با غلظت mg/mL ۱ در حلال متانول تهیه شدند، به‌جز برای پریمیدون که از حلال استونیتریل استفاده شد. سپس برای تهیه غلظت های کمتر هر دارو، از هر کدام از محلول‌های ذخیره‌ای، غلظت mg/mL ۰/۲ از پریمیدون در استونیتریل، mg/mL ۰/۰۱ دیازپام و mg/mL ۰/۲ از سایر داروها در حلال آبی ساخته شد. برای رسم نمودار کالیبراسیون، ابتدا استانداردهای دارویی در غلظت های زیر درمانی، درمانی و سمی (با توجه به غلظت درمانی هر دارو) مطابق جدول ۱ تهیه شدند. سپس به µL ۱۰۰ از هرکدام از مخلوط های استاندارد جدول ۱، حدود µL ۲۵ از محلول استاندارد داخلی پریمیدون به غلظت mg/L۲۰ و µL ۲۵ حلال استونیتریل اضافه شده و به دستگاه HPLC تزریق شد. به منظور بررسی تکرار پذیری، کار تزریق در هر آزمایش ۳ بار تکرار شد و از نتیجه میانگین در مراحل بعدی مطالعه، استفاده شد.

تهیه محلول های استاندارد سرمی از داروها

به‌منظور بررسی اثر مزاحمت‌های فیزیکی و شیمیایی محیط سرمی بر نمودار کالیبراسیون این داروها، کلیه مخلوط‌های استاندارد

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳ـ طراحی آزمایشی مکعب وجه مرکزی مورد استفاده برای مطالعه دو عامل در جدا سازی همزمان شش داروی ضدصرع و نتایج تجربی زمان بازداری آنها (دقیقه).

شماره آزمایش	pH	V (%)	اتوسوکسیاید	پریمیدون	فنوباربیتال	فنی توئین	کاربامازپین	دیازپام
۱	−۱	−۱	۵٫۳۵۸	۶٫۶۷۳	۹٫۹۷۷	۱۰٫۱۵۵	۲۲٫۵۶۴	۳۹٫۸۸۴
۲	−۱	+۱	۳٫۸۲۱	۳٫۹۹۵	۴٫۷۲۴	۵٫۸۸۳	۵٫۹۰۹	۱۳٫۴۷۵
۳	+۱	−۱	۵٫۱۱۸	۷٫۳۶۰	۴٫۰۵۶	۸٫۴۰۲	۲۱٫۷۰۵	۶۷٫۳۵۵
۴	+۱	+۱	۳٫۸۸۷	۴٫۰۱۸	۴٫۵۷۳	۴٫۹۲۵	۵٫۵۵۸	۱۰٫۷۷۳
۵	۰	−۱	۵٫۰۲۵	۷٫۱۶۷	۹٫۵۷۳	۹٫۶۲۶	۲۱٫۴۷۱	۴۹٫۳۲۱
۶	۰	+۱	۳٫۵۴۸	۴٫۱۴۲	۴٫۰۶۶	۴٫۷۸۰	۵٫۳۲۵	۹٫۹۲۵
۷	−۱	۰	۴٫۶۰۳	۵٫۳۲۱	۷٫۳۵۱	۸٫۰۱۹	۱۴٫۲۳۷	۲۶٫۶۸۰
۸	+۱	۰	۴٫۵۰۳	۵٫۶۷۸	۶٫۳۰۹	۶٫۶۶۳	۱۳٫۶۳۱	۳۹٫۰۴۲
۹	۰	۰	۴٫۲۲۷	۵٫۶۵۵	۶٫۸۲۰	۷٫۲۰۳	۱۳٫۳۹۸	۲۹٫۶۲۳
۱۰	۰	۰	۴٫۳۶۲	۵٫۱۶۳	۶٫۴۵۶	۷٫۶۷۸	۱۳٫۰۲۵	۲۹٫۸۶۵
۱۱	۰	۰	۴٫۲۸۷	۵٫۹۳۶	۶٫۳۲۵	۷٫۰۲۳	۱۳٫۱۴۷	۲۹٫۱۴۵

جدول ۲ـ عامل‌های کروماتوگرافی مطالعه شده و سطوح مربوطه.

سطح	pH	V%
−۱	۲٫۵۰	۵۰
۰	۴٫۷۵	۶۰
+۱	۷٫۰۰	۷۰

موجود در جدول ۱، با حضور mL ۲ سرم خون عاری از دارو نیز تهیه و سپس با آب مقطر دیونیزه به حجم mL ۱۰ رسانده شد. سپس برای رسم نمودار کالیبراسیون، کار تزریق با ۳ بار تکرار همانند مرحله قبل انجام شد.

نتیجه‌ها و بحث

در این مطالعه، اثر دو عامل آزمایشی بر رفتار بازداری شش داروی ضد صرع مورد بررسی قرار گرفت. عامل‌های مورد نظر شامل pH فاز متحرک و درصد حجمی اصلاحگر آلی (V%) بودند. از آنجا که انجام آزمایش در کلیه سطوح از این دو عامل، نیازمند وقت و هزینه زیاد است. برای به‌دست آوردن بهترین شرایط جداسازی از نظر تفکیک و زمان آنالیز از روش طراحی آزمایش استفاده شد. برای این منظور لازم است، ابتدا محدوده کلیه عامل‌هایی را که به‌نحوی بر پاسخ موردنظر موثرند، تعیین شود. گستره‌ی عامل‌های کروماتوگرافی انتخاب شده، که در آن پاسخ بهینه جستجو می‌شد، در جدول ۲ لیست شده که با استفاده از یک‌سری آزمایش‌های مقدماتی و محدودیت‌های کروماتوگرافی تعیین شدند. با انجام این بررسی ها، مشخص شد که در زیر سطح ۵۰٪ از متانول، زمان بازداری این داروها، بسیار طولانی شده که عملا برای آنالیز روتین قابل قبول نیست (حدود ۱۰۵ دقیقه) و در بالای سطح ۷۰٪ از متانول نیز، همپوشانی و تداخل پیک‌ها زیاد می‌شود.

آزمایش‌های لازم برای مدلسازی و بهینه‌سازی جدا سازی این داروها، در سه سطح که توسط طرح FCC انجام شدند، همچنین مقدارهای تجربی زمان بازداری برای هر ترکیب در جدول ۳ نشان داده شده است. این طرح مرکب مرکزی ترکیبی از طرح فاکتوریل کامل و طرح ستاره‌ای می‌باشد.

طرح فاکتوریل کامل

طرح فاکتوریل کامل برای دو متغیر در دو سطح نیاز به ۴ آزمایش دارد. آزمایش‌های ۴ـ۱ در جدول ۳ مربوط به طرح فاکتوریال کامل می‌باشند. با استفاده از این طرح، می‌توان مهمترین اثرهای اصلی مربوط به هر عامل و برهم‌کنش‌های دو عاملی آنها را محاسبه کرد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۴ـ بهترین مدل چند جمله ای برای پیش بینی مقدارهای زمان بازداری ترکیب‌های مطالعه شده و آماره‌های آنها.

متغیر	اتوسوکسیماید	پریمیدون	فنوباربیتال	فنی توئین	کاربامازپین	دیازپام
Intercept	۴٫۲۹۰	۵٫۶۱۳	۶٫۶۴۸	۷٫۲۶۲	۱۳٫۲۷۳	۲۹٫۵۷۶
V	−۰٫۷۰۷ (−۰٫۹۶۴)	−۱٫۵۰۷ (−۰٫۹۷۷)	−۱٫۷۰۷ (−۰٫۶۵۳)	−۲٫۰۹۹ (−۰٫۹۴۰)	−۸٫۱۵۸ (−۰٫۹۹۸)	−۲۰٫۳۹۸ (−۰٫۹۱۴)
pH	−۰٫۰۴۶ (−۰٫۰۶۲)	۰٫۱۷۸ (۰٫۱۱۵)	−۱٫۱۸۶ (−۰٫۴۵۳)	−۰٫۶۷۸ (−۰٫۳۰۴)	−۰٫۳۰۳ (−۰٫۰۳۷)	۶٫۱۸۸ (۰٫۲۷۷)
pH^2	۰٫۲۵۹ (۰٫۲۳۷)	−۰٫۱۰۵ (−۰٫۰۴۶)	−۰٫۴۸۳ (−۰٫۱۲۵)	۰٫۰۷۹ (۰٫۰۲۴)	۰٫۶۶۱ (۰٫۰۵۴)	۳٫۲۹۳ (۰٫۱۰۰)
pH × V	۰٫۰۷۶ (۰٫۰۸۵)	−۰٫۱۶۶ (−۰٫۰۸۸)	۱٫۴۴۳ (۰٫۴۵۰)	۰٫۱۹۹ (۰٫۰۷۳)	۰٫۱۲۷ (۰٫۰۱۳)	−۷٫۵۴۳ (−۰٫۲۷۶)
R^2	۰٫۹۹۶	۰٫۹۷۸	۰٫۸۵	۰٫۹۸	۱	۰٫۹۹۹
R^2_{cv}	۰٫۹۳۷۸	۰٫۹۵۸۲	۰٫۸۰۶۷	۰٫۹۵۹۴	۰٫۹۸۶۲	۰٫۹۸۷۴
F	۳۹۶٫۳۸۶	۶۷٫۰۷۶	۸٫۴۸۵	۷۹٫۳۴۹	۲۵۶۲٫۷۱۶	۲۵۶۲٫۷۱۶
S.E.	۰٫۰۴۵	۰٫۲۸۸	۱٫۰۱۴	۰٫۳۰۴	۰٫۵۳۹	۰٫۵۳۹

R: ضریب همبستگی؛ F: آماره فیشر؛ S.E.: خطای استاندارد تخمین؛ R^2_{CV}: ضریب همبستگی ارزیابی کراس؛ اعداد در پرانتز، میانگین اثر برای هر فاکتور در مدل هستند.

طرح ستاره‌ای

به‌منظور وارد نمودن عبارت‌های توان دوم یا بالاتر برای هریک از فاکتورها در مدل برازشی، ۴ آزمایش دیگر تحت عنوان طرح ستاره‌ای (آزمایش‌های ۸ ـ ۵ در جدول ۳) به طرح فاکتوریال مربوطه اضافه شد. به این ترتیب، با این طرح مرکب می‌توان یک مدل برازشی کامل از مرتبه دوم یا بالاتر را برای هر ترکیب ایجاد نمود. برای تخمین‌زدن خطای آزمایشی محض[۱] و بررسی تکرارپذیری، آزمایش‌های ۱۱ ـ ۹ انجام شدند.

مدل‌سازی MLR

در این مرحله با استفاده از یک الگوریتم انتخاب متغییر مناسب (جستجوی مرحله‌ای[۲]) در نرم افزار SPSS، بهترین مدل برازشی برای هر ترکیب با توجه به آماره‌های F، R^2، خطای استاندارد (SE) تعیین شد (جدول ۴). مقدارهای بالا برای آماره‌های R^2 و F و مقدارهای پایین برای SE بیانگر آن است که مدل‌ها در محاسبه متغیر وابسته (t_R) موفق هستند.

با بررسی نتیجه‌های به‌دست آمده از آزمایش‌های طرح مرکب مرکزی و مدل‌های به‌دست آمده در جدول ۴ مشخص شد که مهم‌ترین اثرها بر زمان بازداری هر ترکیب، به غلظت متانول مربوط می‌شود. سایر متغیرها اثر کمتری بر مقادیر زمان بازداری نشان دادند. همانطور که در این جدول مشاهده می‌شود، ضریب متانول در معادله‌های منفی است. این مسئله بیانگر آنست که افزایش در غلظت متانول منجر به کاهش در زمان بازداری برای کلیه ترکیب‌ها می‌شود. ضریب متغیر pH نیز برای کلیه ترکیبات، به‌جز دیازپام و پریمیدون منفی است. همچنین اثر متغیر pH بر اتوسوکسیماید و کاربامازپین نسبت به سایر ترکیب‌ها بسیار کم بوده اما توان دوم این متغیر بر بازداری اتوکسیماید اثر بالاتری را داراست. درضمن وجود عبارت برهمکنش دو فاکتوری بین این دو متغیر در مدل بازداری، ضرورت انجام روش‌های بهینه‌سازی چند متغییره را در فرایند جداسازی این داروها در RP-HPLC تأکید می‌کند.

تصمیم‌گیری چند مقیاسی

پس از یافتن بهترین مدل برای هر ترکیب، کیفیت کروماتوگرام‌ها توسط دو معیار تفکیک بین گونه ها وزمان آنالیز مورد بررسی قرار گرفت. به این ترتیب، کمترین اختلاف در زمان بازداری بین پیک‌های همسایه ($\min \Delta t$) در هر کروماتوگرام به‌عنوان معیار جداسازی و

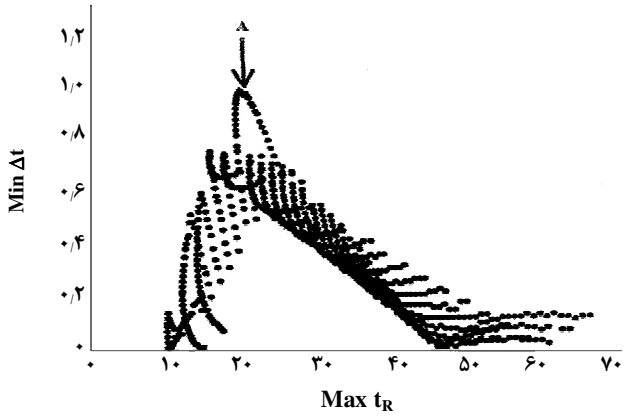
(۱) Pure experimental error

(۲) Stepwise search

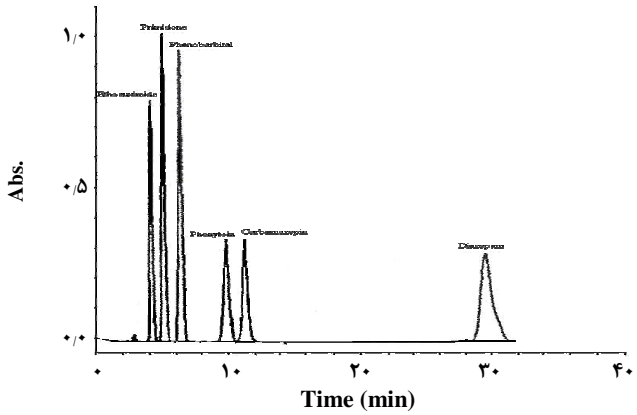
www.SID.ir

Archive of SID

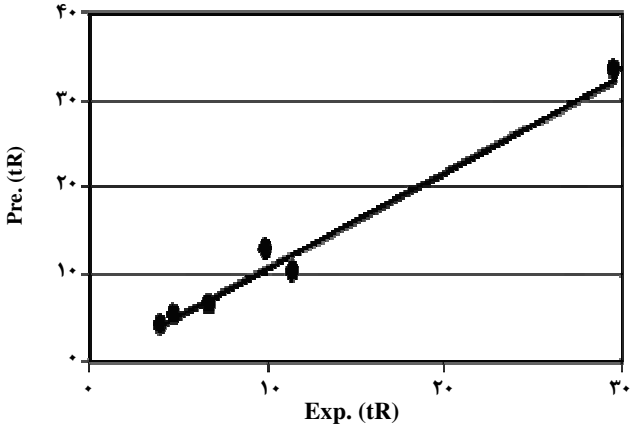
زمان بازداری آخرین پیک در کروماتوگرام (t_R max) به عنوان معیاری از زمان آنالیز برگزیده شد. سپس برای یافتن بهترین شرایط فاز متحرک جهت جداسازی کامل شش ترکیب، یک برنامه رایانه‌ای جستجوی شبکه‌ای[1] در MATLAB برای دستیابی به تمامی حالات موجود بین دو سطح از عامل‌های انتخاب شده، نوشته شد. در این برنامه برای هر شرایطی از فاز متحرک در فضای عاملی مورد نظر، زمان بازداری برای هر پیک با استفاده از مدل‌های به دست آمده محاسبه شده و اطلاعات مربوط به کمترین اختلاف زمان بازداری برای هرجفت پیک همسایه (min Δt) و زمان بازداری آخرین پیک به صورت خروجی برنامه دریافت شدند. سپس نمودار بهینه‌سازی پارتو مربوطه، در بازه‌ی زمانی t_R max ۱۰ الی ۷۰ دقیقه رسم شد (شکل ۱). بررسی نقاط PO حاصله، منجر به انتخاب نقطه بهینه A شد. مقدارهای هر یک از عامل‌ها در این نقطه شامل pH= ۲٫۶ و V= ۶۰٪ می باشد. کارآیی پیش بینی مدل‌های چند جمله‌ای با انجام آزمایش تحت شرایط PO انتخاب شده تأیید شد. شکل ۲، کروماتوگرام به‌دست آمده را تحت شرایط PO پیش بینی شده نشان می‌دهد. شکل ۳ نیز توافق خوبی را برای زمان‌های بازداری تجربی و پیش‌بینی شده در شرایط مورد نظربرای این ترکیب‌ها نشان می‌دهد.



شکل ۱ـ نمودار تصمیم‌گیری چند مقیاسی (MCDM) یا بهینه‌سازی پارتو در جداسازی کروماتوگرافی شش داروی ضد صرع (نقطه PO با پیکان نشان داده شده است).



شکل ۲ـ کروماتوگرام به‌دست آمده تحت شرایط بهینه پیش بینی شده در جداسازی شش داروی ضد صرع، شرایط فاز متحرک: pH= ۲٫۶ و V= ۶۰٪ ، سرعت جریان mL/min ۱ و طول موج دتکتور nm ۲۰۷.



شکل ۳ـ نمودار زمان بازداری پیش بینی شده در مقابل تجربی برای شش دارو تحت شرایط بهینه

مقایسه نمودار کالیبراسیون استاندارد آبی و استاندارد سرمی

به منظور بررسی اثر مزاحمت های فیزیکی و شیمیایی موجود در محیط سرمی بر اندازه گیری داروهای مطالعه شده، با استفاده از داده های جدول ۱ و کروماتوگرام های حاصله در شرایط بهینه از فاز متحرک، منحنی کالیبراسیون (یک‌بار بدون حضور سرم و یک‌بار با حضور mL ۲ سرم خون عاری از دارو) چنان رسم شد که در آن نسبت مساحت پیک هر دارو به استاندارد داخلی (پریمیدون) به عنوان معیار سنجش کمی برگزیده شد. معادله‌های برازش و مقدارهای R^2 برای هر نمودار، در جدول ۵ داده شده است. بررسی این نمودارها در دو حالت نشان داد که مقدار شیب خط‌های نمودار کالیبراسیون سه داروی فنوباربیتال، فنی توئین و کاربامازپین به تقریب اختلافی ندارند و این حاکی از نبود مزاحمتهای فیزیکی و شیمیایی ناشی از محیط سرمی خون در اندازه‌گیری کمی این ترکیب‌ها است، درنتیجه می‌توان از روش استاندارد معمولی برای آنالیز HPLC آنها استفاده نمود. در حالی که

(۱) Grid search

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۵ ـ معادله‌های برازشی و مقدارهای R^2 به‌دست آمده از نمودار کالیبراسیون برای ۵ غلظت استاندارد متفاوت در حضور و غیاب سرم عاری از دارو.

ترکیب	معادله رگرسیون برای ۵ استاندارد بدون حضور سرم	معادله رگرسیون برای ۵ استاندارد در حضور سرم
اتوسوکسیماید	$y = ۰/۰۰۲۶X$ $R^2 = ۰/۹۹۴۶$	$y = ۰/۰۰۲۶X$ $R^2 = ۰/۹۹۳۵$
فنوباربیتال	$y = ۰/۰۳۸۰X$ $R^2 = ۰/۹۹۵۰$	$y = ۰/۰۳۸۴X$ $R^2 = ۰/۹۹۲۶$
فنی توئین	$y = ۰/۰۰۸۰X$ $R^2 = ۰/۹۹۳۶$	$y = ۰/۰۰۸۴X$ $R^2 = ۰/۹_{۸۲۵}$
کاربامازپین	$y = ۰/۰۸۵۰X$ $R^2 = ۰/۹۹۶۱$	$y = ۰/۰۸۷۶X$ $R^2 = ۰/۹۹۷۹$
دیازپام	$y = ۰/۰۴۶۸X$ $R^2 = ۰/۹۹۶۸$	$y = ۰/۰۵۶۰X$ $R^2 = ۰/۹۹۲۶$

جدول ٦ـ مقدارهای داروهای ضد صرع در سرم کنترل و داده های اندازه‌گیری شده آنها بر اساس نمودار کالیبراسیون در حضور و غیاب سرم.

ترکیب	زمان بازداری (دقیقه)	سرم کنترل (غلظت ۱×)	سرم کنترل (غلظت۲×)	اندازه‌گیری غلظت ۱ (بدون حضور سرم××)	اندازه گیری غلظت ۲ (بدون حضور سرم××)	اندازه‌گیری غلظت ۱ (با حضور سرم ××)	اندازه گیری غلظت ۲(با حضور سرم××)
کاربامازپین	۱۱/۲ (±۰/۳)	۲/۷۷_۴/۲۴ (۳/۵)[a]	۱۱/۶ _ ۱۷/۷ (۱۴/۷)[a]	۲/۹ (±۰/۲)	۱۴/۳ (±۰/۴)	۳/۸ (±۰/۲)	۱۵/۱ (±۰/۴)
فنوباربیتال	۶/۷۳ (±۰/۳)	۱۱/۱_۱۷/۰ (۱۴/۱)[a]	۳۹/۰ _ ۶۰/۰ [a](۵۰/۰)	۱۴/۸ (±۰/۵)	۴۹/۵ (±۰/۴)	۱۵/۱ (±۰/۵)	۴۹/۱ (±۰/۶)
فنی توئین	۹/۹۷ (±۰/۲)	۹/۰ _ ۱۴/۷ [a](۱۱/۹)	۱۸/۰ _ ۳۰/۰ (۲۴/۰)[a]	۱۱/۳ (±۰/۶)	۲۴/۱ (±۰/۲)	۱۰/۸ (±۰/۵)	۲۳/۵ (±۰/۶)

× مقدارهای این غلظت ها بر اساس بر چسب (label) سرم کنترل و بر حسب $\mu g/mL$ می‌باشد.
×× مقادیر این غلظت ها بر اساس نمودار کالیبراسیون جدول ۴ محاسبه و بر حسب $\mu g/mL$ میباشد.
[a] این اعداد میانگین گستره غلظت می باشند. سایر اعداد در پرانتزها انحراف استاندارد در اندازه گیری هستند.

برای اتوسوکسیماید و دیازپام این اختلاف مشاهده می‌شود و لازم است از روش افزایش استاندارد برای اندازه‌گیری کروماتوگرافی این داروها استفاده نمود.

به منظور ارزیابی صحت ودقت روش در اندازه‌گیری این داروها، از سرم کنترل با دو سطح غلظتی ۱و۲ استفاده شد. باید یادآوری شود که، سرم کنترل خریداری شده فقط شامل سه ترکیب کاربامازپین، فنی توئین و فنوباربیتال بوده است. جدول ۵، مقدارهای زمان بازداری، غلظت های واقعی داروها در سرم کنترل و داده‌های اندازه گیری شده آنها را با استفاده از نمودار کالیبراسیون در حضور و غیاب سرم نشان می‌دهد. در هر دو حالت از نمودارهای کالیبراسیون، مقدارهای قابل قبولی از هر سه دارو، مطابق با گستره ذکر شده در برچسب سرم کنترل، به‌دست آمد.

نتیجه‌گیری

استفاده از روش‌های کمومتریکس شامل طراحی آزمایشی، آنالیز چند متغیره و تصمیم گیری چند مقیاسی بهینگی پارتو در بهینه‌سازی جداسازی‌های کروماتوگرافی به عنوان یک روش کارآمد محسوب می‌شود. نتیجه‌های مطالعه نشان دادند که مهم‌ترین اثرها بر زمان بازداری داروها، به غلظت متانول مربوط می‌شود. سایر متغیرها اثر کمتری را بر زمان بازداری نشان دادند. وجود عبارت برهمکنش دو عاملی بین این دو متغیر در مدل بازداری ضرورت انجام روش‌های بهینه‌سازی چند متغیره را در فرایند جداسازی دارو های ضد صرع در RP-HPLC تأیید می‌کند. همچنین بررسی اثر مزاحمت های فیزیکی و شیمیایی موجود در محیط سرمی بر اندازه گیری داروها، نشان داد که برای

www.SID.ir

Archive of SID

فنوباربیتال، فنی توئین و کاربامازپین، مقدارهای شیب خطهای نمودار کالیبراسیون تقریباً اختلافی ندارند. درنتیجه می‌توان از روش استاندارد معمولی برای آنالیز HPLC آنها استفاده نمود. درحالی که برای اتوسوکسیماید و دیازپام شیب‌های خطهای نمودار کالیبراسیون گوناگون بوده و لازم است از روش افزایش استاندارد برای اندازه گیری کروماتوگرافی آنها استفاده شود.

تاریخ دریافت: ۱۳۸۷/۱۱/۷ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۴/۸

مراجع

[1] Mattson R.H., Cramer J.A., Collins J.F., Smith D.B., Delgado-Escueta A.V., Browne T.R. Williamson P.D., Treiman D.M., McNamara J.O, McCutchen C.B., et al. Comparison of Carbamazepine, Phenobarbital, Phenytoin, and Primidone in Partial and Secondarily Generalized Tonic-Clonic Seizures, *The New England Journal of Medicine*, **313**(3), p. 145 (1985).

[2] Fraser A.D., New Drugs for the Treatment of Epilepsy, *Clinical Biochemistry*, **29**, p. 97 (1996).

[3] Rukhadze M.D., Meyer V.R., Separation of Barbiturates with Micellar Liquid Chromatography and Optimization by a Second Order Mathematical Design, *Journal of Chromatography A*, **805**, p.45 (1998).

[4] Geowie C.E., Optimization of Mobile Phase Composition in Liquid Chromatography-A Survey of Most Commonly Used Chemometric Procedures**,** *Journal of Liquid.Chromatography,* **9**(7), p. 1431 (1989).

[5] Morgan E., "Chemometrics: Exprimental design", John Wiley, Chichester, UK (1991).

[6] Deming S.N., Morgan S.L., "Exprimental Design: A Chemometric Approach", Second Ed., Elsevier, Amsterdam (1993).

[7] Kushida K., Chiba K., Shizaki I., Simultaneons Liquid Chromatographic Determination of Chloramphenicol and Antiepileptic Drugs in Plasma, *Therapeutic Drug Monitoring,* **5**, p. 127 (1983).

[8] Meatherall R., Ford D., Isocratic Liquid Chromatographic Determination of the Theophylline, Acetaminophen, Chloramphenicol, Caffeine, Anticonvulsants and Barbiturates in Serum, *Therapeutic Drug Monitoring*, **10**, p. 101 (1988).

[9] Kabra P.M., Koo H.Y., Marton L.J., Simultaneons Liquid-Chromatographic Determination of the 12 Common Sedative and Hypnotics in Serum, *Clinical Chemistry*, **24**, p. 657 (1978).

[10] Joshi M.V., Pohujani S.M., Kshirsagar N.A., Shah P.H., Acharya V.N., Simultaneons HPLC of Phenobarbitone, Phenytoin and Carbamazepine from Plasma Samples, *Indian Journal of Pharmacology*, **22**(3), p. 177 (1990).

[11] Abdel-Hamid M.E., Comparative LC-MS and HPLC Analyses of Selected Antiepileptics and Beta-Blocking drugs, *IL Farmaco*, **55**, p. 136 (2000).

[12] Gerson B, Bell F., Chan S., Antiepileptic Agents-Primidone, Phenobarbital, Phenytoin, and Carbamazepine by Reversed-Phase Liquid Chromatography, *Clinical Chemistry*, **30(1)**, p. 105 (1984).

[13] Wad N., Simultaneous Determination of Eleven Antiepileptic Compounds in Serum by High-Performance Liquid Chromatography, *Journal of Chromatography B*, **305**, p. 127 (1984).

www.SID.ir

Archive of SID

[14] Kushida K., Ishizaki T., Concurrent Determination of Valproic Acid with Other Antiepileptic Drugs by High-Performance Liquid Chromatography, *Journal of Chromatography A*, **338**, p. 131 (1985).

[15] Soto-Otero R., Mendez-Alverez E., Sierra-Marcuno, High-Performance Liquid Chromatographic Measurement of Phenytoin, Phenobarbital and Their Major Metabolites in Serum, Brain Tissue and Urine, *Journal of Liquid Chromatography*, **11**(14), p. 3021 (1988).

[16] Hartley R., Lucock M., Cookman J.R., Becker M., Smith I.J., Smithells R.W., Forsythe W.I., High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Carbamazepine and Carbamazepine 10, 11-Epoxide in Plasma and Saliva Following Solid-Phase Sample extraction, *Journal of Chromatography B,* **380**, p. 347 (1986).

[17] Hadjmohammadi M.R., Ebrahimi P., Optimization of the Separation Conditions of Antiepileptic Agents Using RP-HPLC, *International Journal of Chemistry*, **9**, p. 101 (1999).

www.SID.ir