عنوان طرح: طراحی کیت اندازه گیری مقدار استامینوفن با کمک روش رنگ سنجی

کد علمی: 140315

روش اجرا:

جهت ست آپ روش نمونه خون مورد نیاز پس از اخذ رضایت از بیماران تهیه شد. سپس سرم ها جداسازی و در فریزر منفی ۲۰ نگه داری شدند.

جهت آنالیز نمونه ها، نمونه ها در دمای محیط قرار داده شد تا دفریز شود. سپس ۵۰۰ میکرولیتر از هر نمونه سرم به لوله جدید منتقل شد و بقیه کار طبق روش زیر پیگیری شد:

۱- ۱ سی سی از محلول تری کلرواستیک اسید به هرکدام از لوله ها اضافه شد.
۲- لوله ها به صورت کاملا مدور ورتکس و با ۵ هزار دور در دقیقه سانتریفیوژ شد.
۳- لایه رویی برداشت و به لوله های آزمایش جدید منتقل شد.
۴- به هرکدام از لوله ها ۵۰۰ میکرولیتر محلول اسید کلریدریک مولار اضافه شد.
۵- به هرکدام از لوله ها ۱ سی سی نیتریت سدیم افزوده و ۲ دقیقه به حال خود باقی گذاشته شد.
۶- به آرامی محلول سولفات آمونیوم به هر لوله اضافه شد.
۷- ۱ سی سی محلول سود به لوله ها اضافه و ورتکس شد.

در سرعت ۱۲ هزار دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید تا هرگونه حباب خارج شود.

۹- جذب دستگاه اسپکتروفتومتر به وسیله شاهد معرف درطول موج ۴۳۰ نانومتر صفر شد و آنگاه جذب نمونه ها خوانش شد (۱۲, ۱۳).

جهت مشاهده جذب داروها در محدوده بین ۲۶۰ نانومتر تا >۵۰۰ نانومتر ، از آنها طیف گرفته شد.

شاهد معرف (بلانک): سرم تهیه شده ار فرد سالم که در چند روز گذشته دارو مصرف نکرده بود، تهیه شد. شاهد ها از مجری اصلی گرفته شده است.

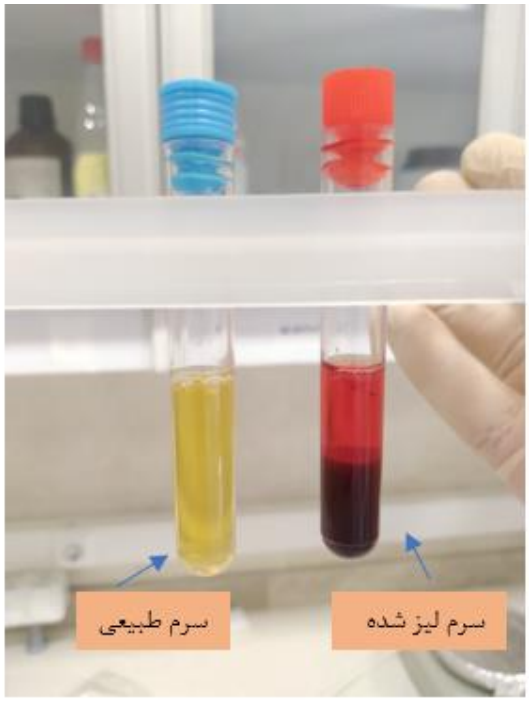
پس از راه اندازی اولیه روش، مراحل اعتبار سنجی به صورت زیر انجام شد (۲-۱):

۱- اختصاصیت روش: در این مرحله میزان اخصاصی بودن روش در شناسایی داروی استامینوفن در حضور سایر مواد ناخالصی و مزاحم نظیر داروهای دیگر، ترکیبات موجود در ماتریکس و حلال ها بررسی خواهد شد.

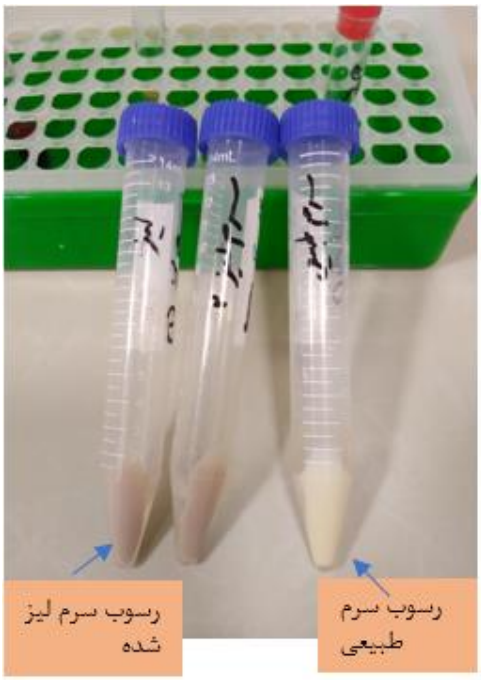
۱-۱: بررسی اثر همولیز:

جهت این کار به یک سی سی خون آب مقطر اضافه شد و سپس نمونه ها سانتریفیوژ شد. رسوب ناشی از نمونه های همولیز تیره رنگ بوده اما رسوب سرم طبیعی سفید رنگ می باشد. دیده شد که سوپرناتانت نمونه لیز شده شبیه نمونه طبیعی است که نشان دهنده رسوب خوب و موثر پروتئین ها در نمونه لیز شده می باشد.

جهت بررسی میزان جذب نمونه لیز شده در طول موج ۴۳۰ نانومتر، دستگاه با نمونه سرم طبیعی در طول موج ۴۳۰ نانومتر صفر شد. مشاهده شد که در مقایسه با نموه طبیعی، نمونه سرم لیز شده جذب قابل ملاحظه ای ندارد و عدد آن نزدیک به صفر است (شکل ۱ و ۲).

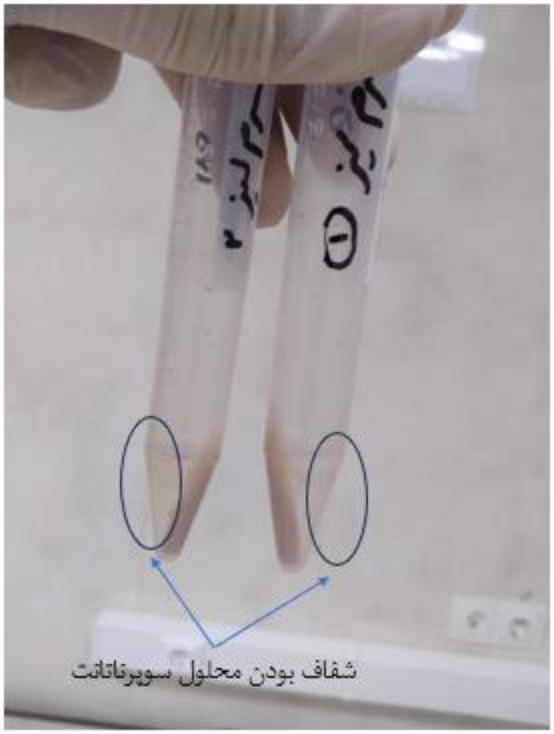


الف) مقایسه نمونه سرم لیز شده با سرم طبیعی



ب) مقایسه رسوب سرم لیز شده با سرم طبیعی پس از افزودن TCA

شکل ۱: تصویر نمونه همولیز در مقایسه با سرم طبیعی(الف) و رسوب آنها (ب).



شکل ۲: تصویر نمونه همولیز پس از سانتریفیوژ و شفاف بودن محلول رویی.

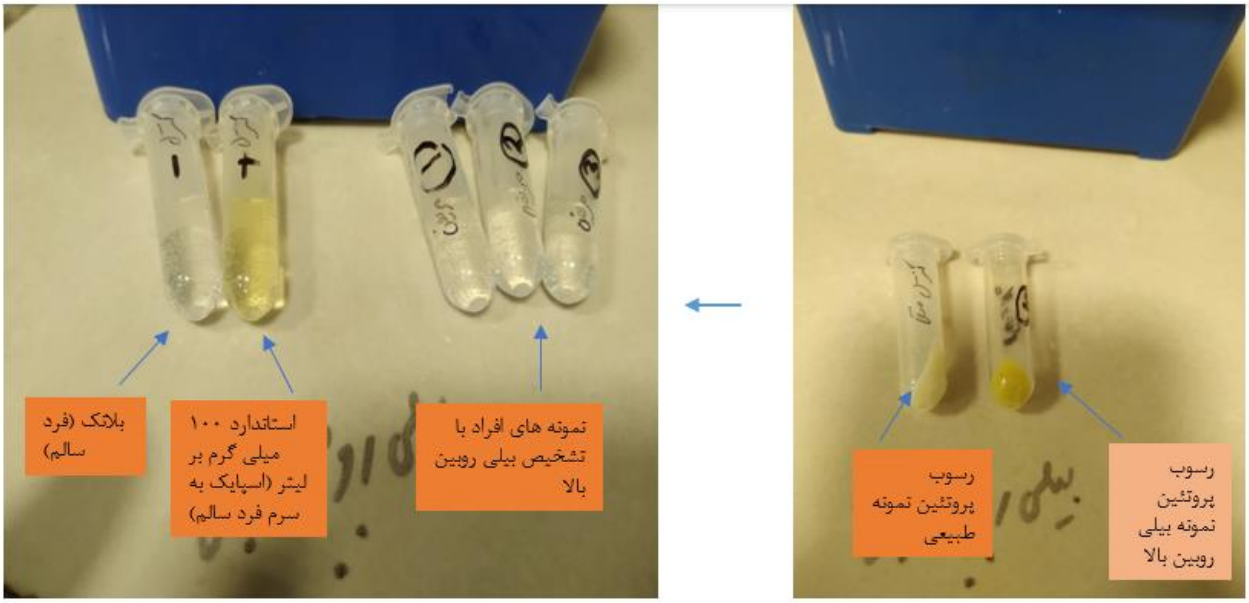
۱-۲: بررسی اثر ایکتریک

جهت این کار ۳ نمونه از خون کودکان با تشخیص زردی بالا (آزمایشگاه و متخصص اطفال) تهیه شد.

و سرم آنها جدا و تا روز آنالیز در فریزر منفی ۲۰ درجه نگه داری شد.

جهت آنالیز نمونه ها، سرم ها در دمای محیط دفریز شد و طبق روش فوق، کار شناسایی و اندازه گیری ها صورت گرفت.

نتایج نشان داد که رسوب ناشی از نمونه های زردی، زرد رنگ بوده اما رسوب سرم طبیعی سفید رنگ می باشد. همچنین دیده شد که سوپرناتانت نمونه ها، شبیه نمونه طبیعی است که نشان دهنده رسوب خوب و موثر پروتئین ها در نمونه زردی شده می باشد (شکل ۳).



ب) محلول های نهایی پس از طی مراحل استخراج و مشتق سازی

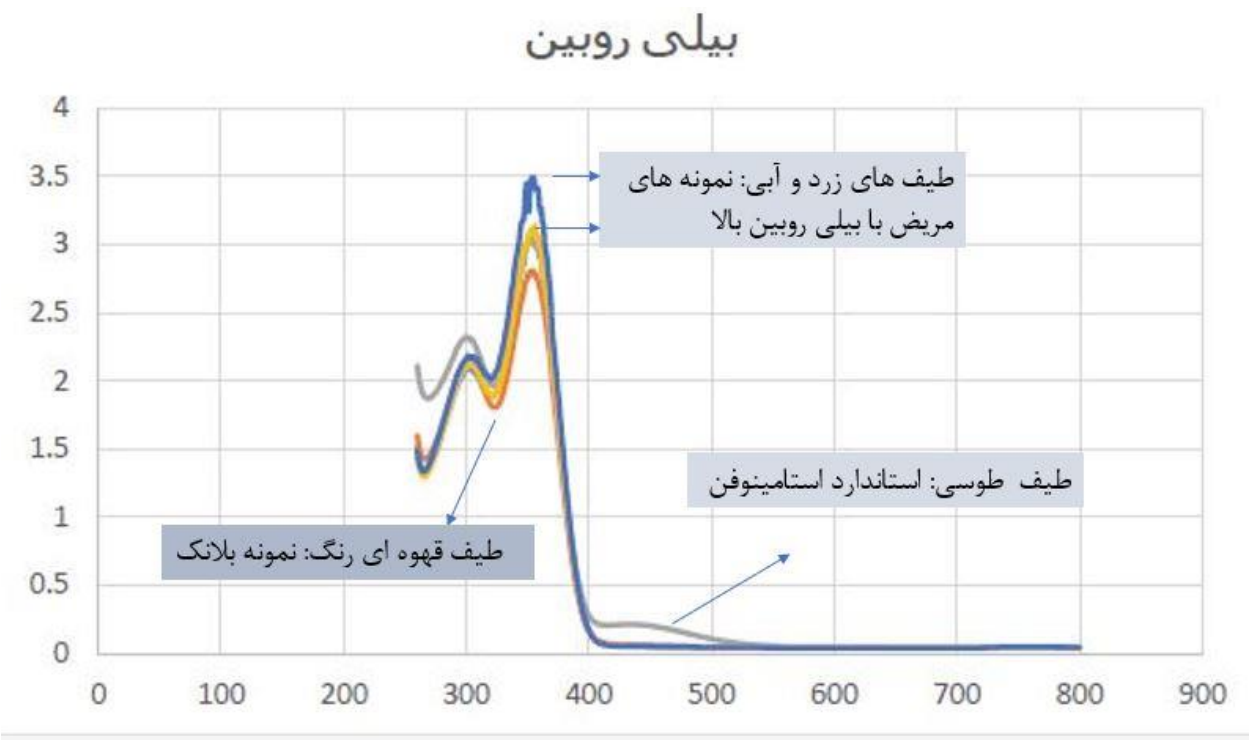
الف) مقایسه رسوب پروتئین در فرد سالم با بیمار بیلی روبین بالا

شکل ۳: تصویر نمونه ایکتریک پس از سانتریفیوژ و شفاف بودن محلول رویی.

۲-۱: طیف نمونه های ایکتریک

جهت بررسی میزان جذب نمونه لیز شده در طول موج ۴۳۰ نانومتر، در محدوده ۲۶۰ تا ۸۰۰ نانومتر هم از نمونه های ایکتریک و هم از یک بلانک (سرم فرد سالم) طیف گرفته شد (شکل ۴).

شکل زیر نشان می دهد که طیف جذبی نمونه های افراد با بیلی روبین بالا با طیف بلانک تفاوتی ندارد (در محدوده ۴۳۰ نانومتر) . بنابراین نتایج نشان دهنده اینست که وجود بیلی روبین در نمونه سرم تداخلی با تست اندازه گیری استامینوفن ندارد.



شکل ۴: طیف های نمونه بلانک، استاندارد استامینوفن و افراد با تشخیص بیلی روبین بالا.

۱-۳: بررسی اثر کراتینین

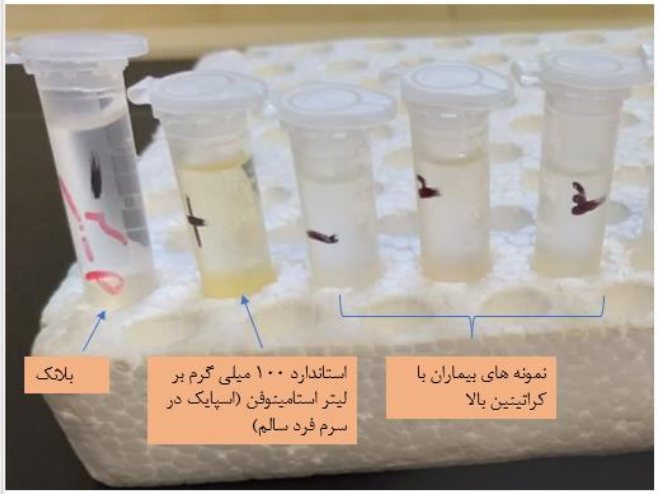
جهت این کار ۳ نمونه از سرم بیماران با تشخیص کراتینین بالا (براساس نتایج آزمایشگاه) پس از اخذ رضایت نامه تهیه شد. سرم بیماران در فریزر منفی ۲۰ درجه نگه داری شد.

جهت آنالیز نمونه ها، سرم ها در دمای محیط دفریز شد و طبق روش کار شناسایی و اندازه گیری ها صورت گرفت.

الف) نتایج نشان داد که رسوب پروتئین نمونه های افراد با کراتینین بالا رنگی یا سفید رنگ است که ممکن است به دلیل دریافت سرم و یا داروها در بیمارستان بوده باشد. اما رسوب سرم طبیعی سفید رنگ می باشد (شکل ۵).

آنچه که مهم است اینست که رنگ سوپرناتانت نمونه کراتینین بالا شبیه نمونه طبیعی است که نشان دهنده رسوب خوب و موثر پروتئین ها در نمونه زردی شده می باشد.

الف) رسوب پروتئین پس از افزودن TCA

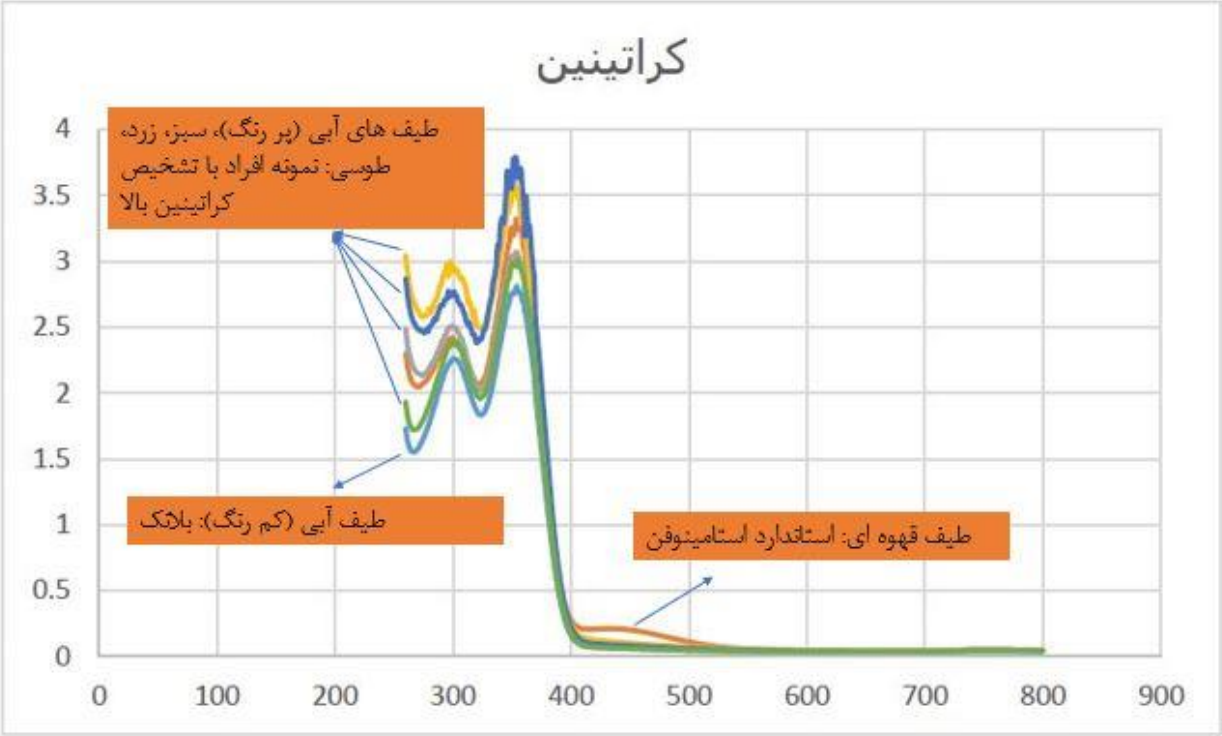


ب) رنگ محلول های نهایی کراتینین بالا پس از استخراج و مشتق سازی

شکل ۵: تصویر نمونه کراتینین بالا پس از سانتریفیوژ و شفاف بودن محلول رویی.

ب) *طیف نمونه های کراتینین بالا*

شکل زیر (۶) نشان می دهد که طیف جذبی نمونه های افراد با کراتینین بالا با طیف بلانک تفاوتی ندارد (در محدوده ۴۳۰ نانومتر) . بنابراین نتایج نشان دهنده اینست که وجود کراتینین در نمونه سرم تداخلی با تست اندازه گیری استامینوفن ندارد.



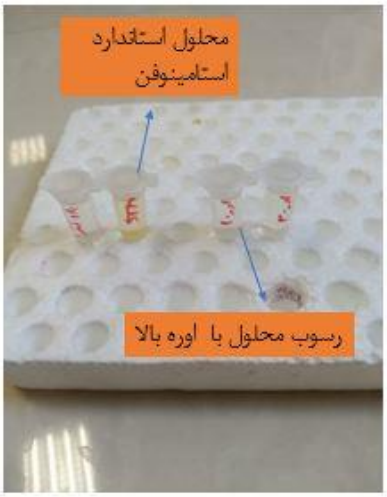
شکل ۶: طیف های نمونه بلانک، استاندارد استامینوفن و افراد با تشخیص کراتینین بالا.

۱-۴: بررسی اثر اورمی

جهت این کار محلول استاندارد ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر اوره در نمونه سرم فرد سالم تهیه شد (اسپایک به سرم).

الف) روش کار طبق مراحل فوق پیگیری شد. نتایج نشان داد که رسوب پروتئین نمونه با اوره بالا، تفاوتی با بلانک ندارد و طی مراحل مشتق سازی نیز رنگی تولید نمی شود (شکل ۷).

الف) رسوب پروتئین نمونه های بلانک، استاندارد استامینوفن و اوره

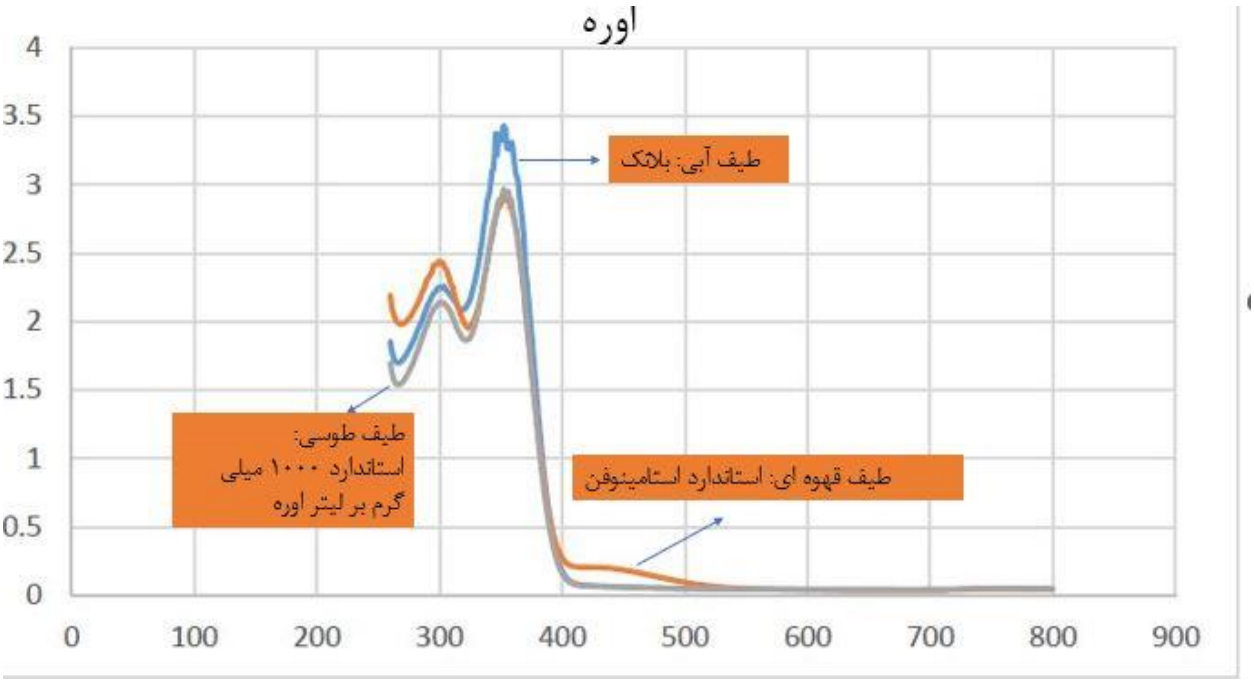


ب) محلول های نهایی پس از طی مراحل استخراج و مشتق سازی

شکل ۷: تصویر نمونه اوره بالا پس از سانتریفیوژ و شفاف بودن محلول رویی.

ب) *طیف نمونه با اوره بالا*

شکل زیر نشان می دهد که طیف جذبی نمونه با اوره بالا با طیف بلانک تفاوتی ندارد (در محدوده ۴۳۰ نانومتر) . بنابراین نتایج نشان دهنده اینست که وجود اوره در نمونه سرم تداخلی با تست اندازه گیری استامینوفن ندارد (شکل ۸).



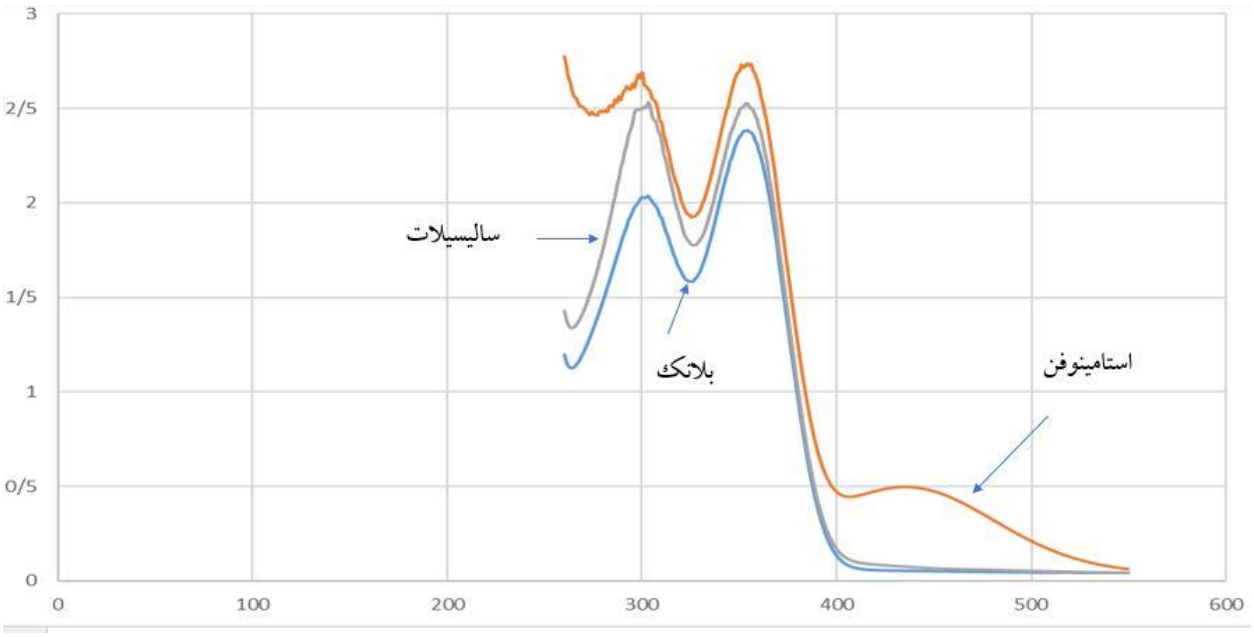
شکل ۸: طیف نمونه های بلانک، استاندارد استامینوفن و اوره.

۱-۵: بررسی تداخلات داروها

۱-۵-۱: بررسی اثر تداخلی داروی آسپرین (استیل سالیسیلیک اسید)

جهت این کار محلول استاندارد ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر سالیسیلات در نمونه سرم فرد سالم تهیه شد (اسپایک به سرم).

روش کار استخراج و مشتق سازی طبق روش فوق پیگیری شد. سپس از محلول نهایی طیف گرفته شد. نتایج نشان داد که استاندارد ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر سالیسلات در طول موج ۴۳۰ نانومتر جذب قابل ملاحضه ای ندارد (شکل ۹) و نشان دهنده این است که این دارو تداخلی با تست استامینوفن ندارد.(جذب آسپرین ۱۰۰ در ۴۳۰ نانومتر: هفت صدم است)

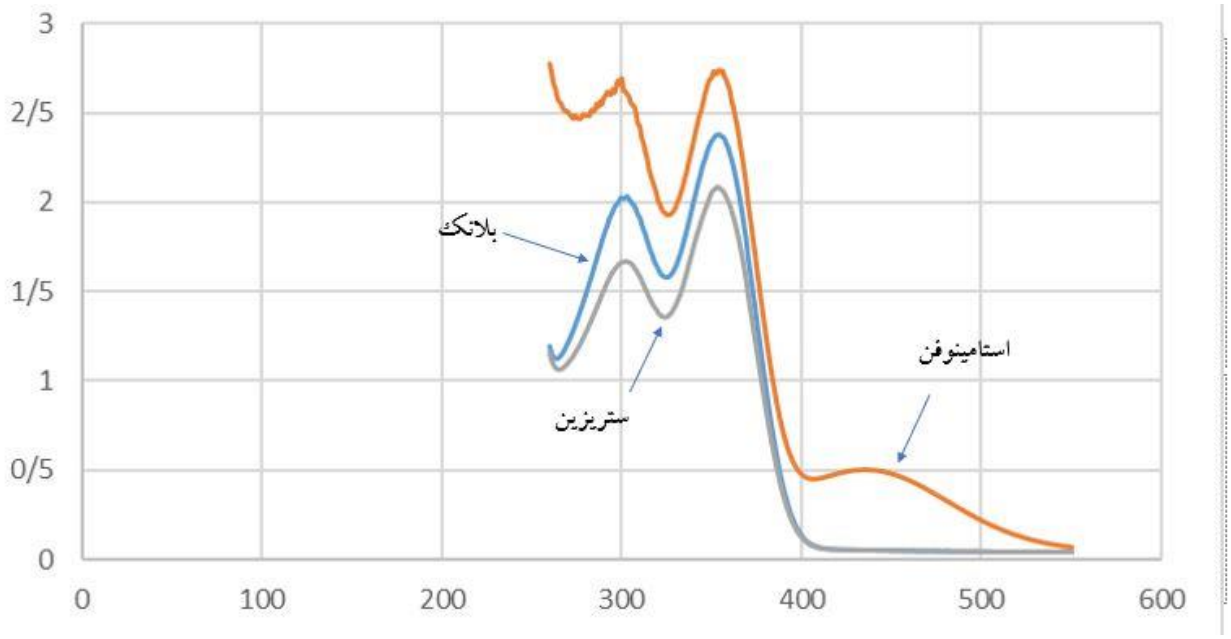


شکل ۹: طیف محلول استاندارد ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر دارو آسپرین.

۱-۵-۲: بررسی اثر تداخلی داروی ستریزین

جهت این کار محلول استاندارد ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر ستریزین در نمونه سرم فرد سالم تهیه شد (اسپایک به سرم).

روش کار استخراج و مشتق سازی طبق روش فوق پیگیری شد. سپس از محلول نهایی طیف گرفته شد. نتایج نشان داد که استاندارد ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر ستریزین در طول موج۴۳۰ نانومتر جذب قابل ملاحضه ای ندارد (شکل۱۰) و نشان دهنده این است که این دارو تداخلی با تست استامینوفن ندارد.

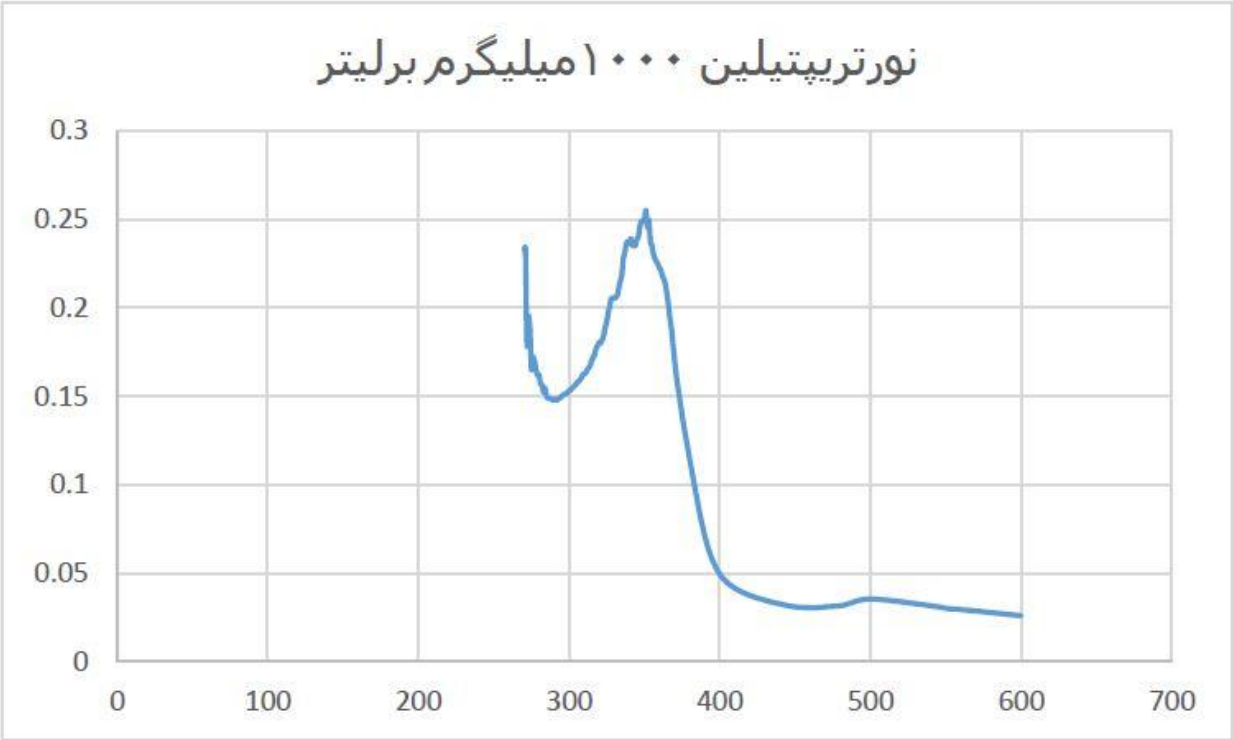


شکل ۱۰: طیف محلول استاندارد ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر دارو ستریزین.

۱-۵-۳: بررسی اثر تداخلی داروی نورتریپتیلین

جهت این کار محلول استاندارد ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر نورتریپتیلین در نمونه سرم فرد سالم تهیه شد (اسپایک به سرم).

روش کار استخراج و مشتق سازی طبق روش فوق پیگیری شد. سپس از محلول نهایی طیف گرفته شد. نتایج نشان داد که استاندارد ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر نورتریپتیلین جذب قابل ملاحضه ای در محدوده ۴۳۰ نانومتر ندارد (شکل ۱۱) و نشان دهنده این است که این دارو تداخلی با تست استامینوفن ندارد.

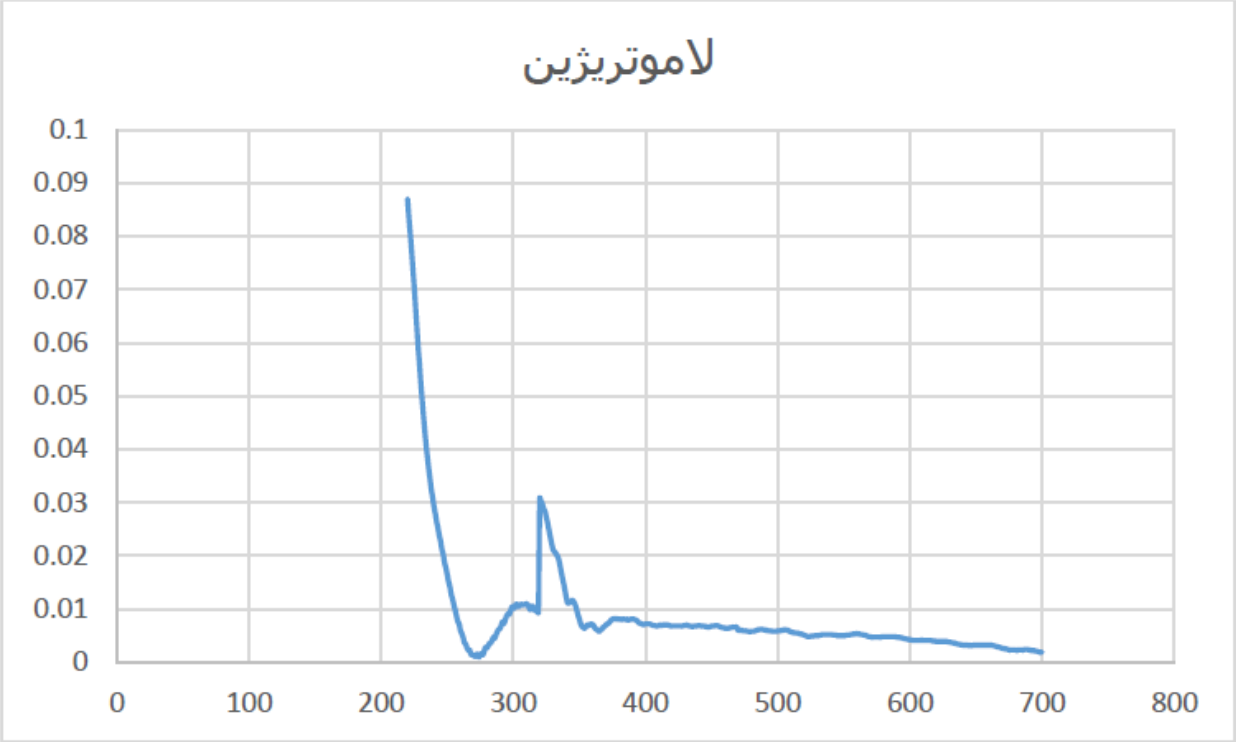


شکل ۱۱: طیف محلول استاندارد ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر دارو نورتریپتیلین.

۱-۵-۴: بررسی اثر تداخلی داروی لاموتریژین

جهت این کار محلول استاندارد ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر ن*لاموتریژین* در نمونه سرم فرد سالم تهیه شد (اسپایک به سرم).

روش کار استخراج و مشتق سازی طبق روش فوق پیگیری شد. سپس از محلول نهایی طیف گرفته شد. نتایج نشان داد که استاندارد ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر *لاموتریژین* جذب قابل ملاحضه ای در محدوده ۴۳۰ نانومتر ندارد (شکل ۱۲) و نشان دهنده این است که این دارو تداخلی با تست استامینوفن ندارد.

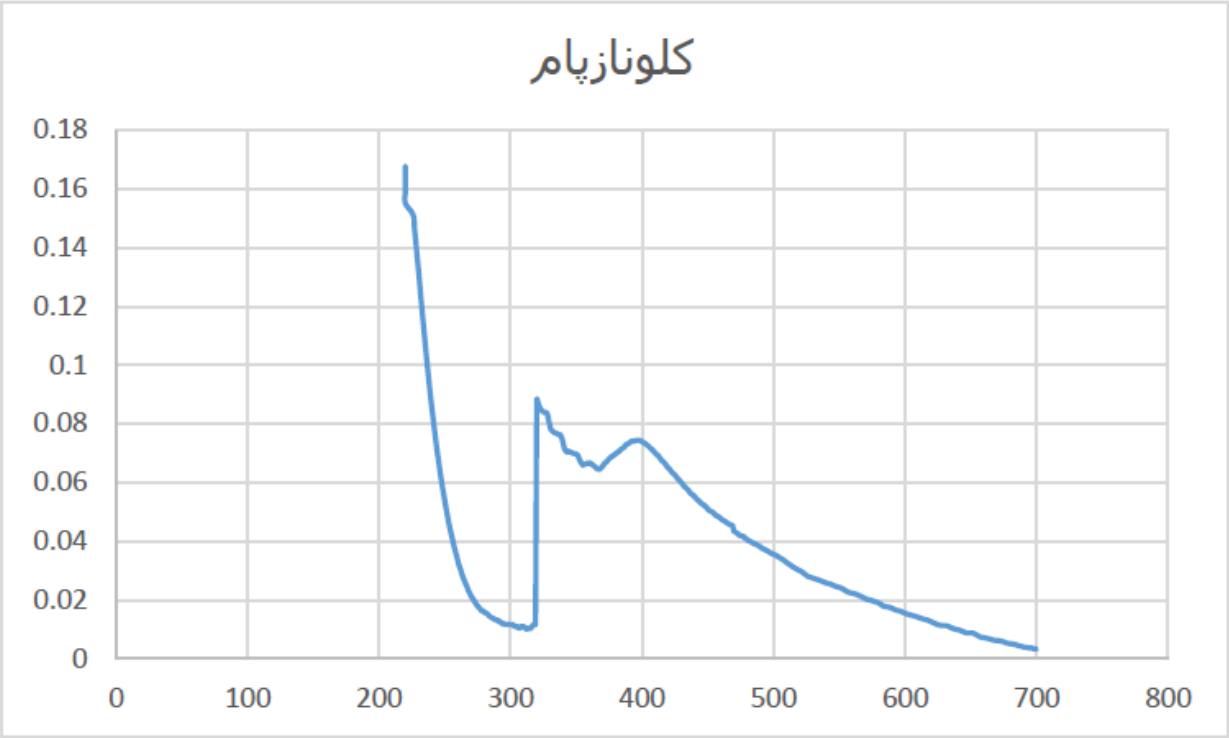


شکل ۱۲: طیف محلول استاندارد ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر دارو لاموتریژین.

۱-۵-۵: بررسی اثر تداخلی داروی کلونازپام

جهت این کار محلول استاندارد ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر کلونازپام در نمونه سرم فرد سالم تهیه شد (اسپایک به سرم).

روش کار استخراج و مشتق سازی طبق روش فوق پیگیری شد. سپس از محلول نهایی طیف گرفته شد. نتایج نشان داد که استاندارد ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر کلونازپام جذب قابل ملاحضه ای در محدوده ۴۳۰ نانومتر ندارد (شکل ۱۳) و نشان دهنده این است که این دارو تداخلی با تست استامینوفن ندارد.

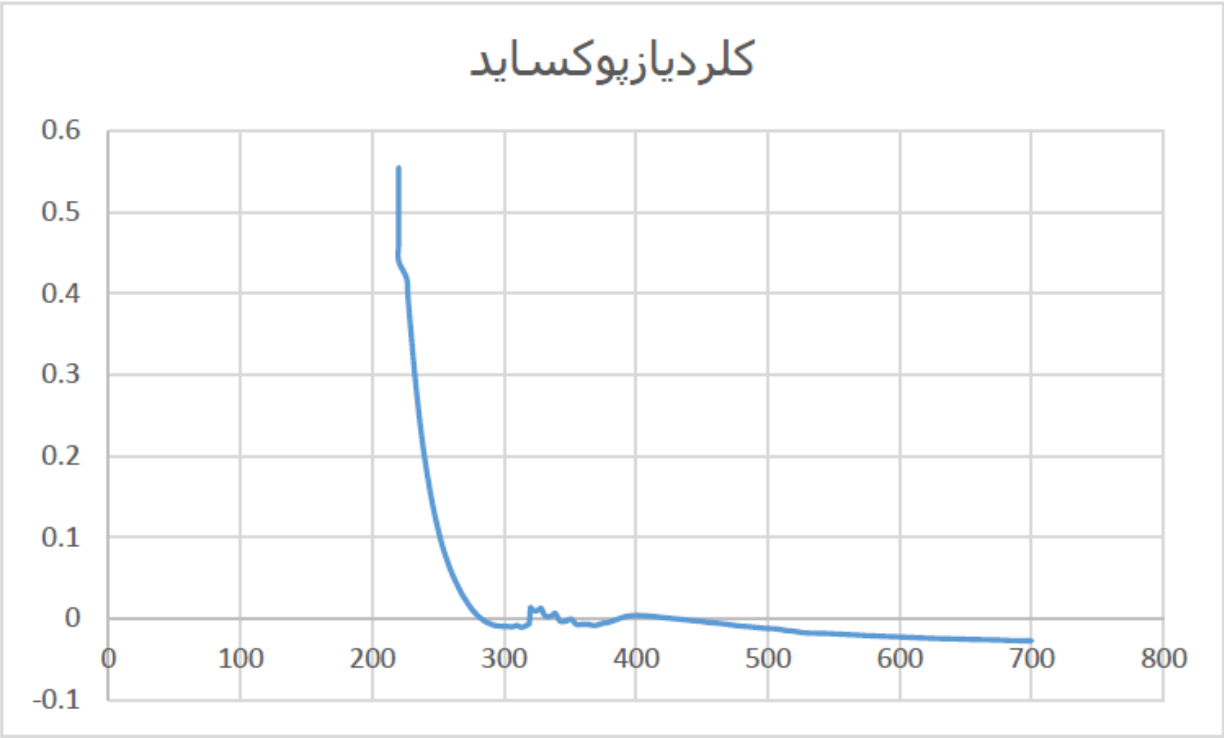


شکل ۱۳: طیف محلول استاندارد ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر دارو کلونازپام.

۱-۵-۶: بررسی اثر تداخلی داروی کلردیازپوکساید

جهت این کار محلول استاندارد ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر کلردیازپوکساید در نمونه سرم فرد سالم تهیه شد (اسپایک به سرم).

روش کار استخراج و مشتق سازی طبق روش فوق پیگیری شد. سپس از محلول نهایی طیف گرفته شد. نتایج نشان داد که استاندارد ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر کلردیازپوکساید جذب قابل ملاحضه ای در محدوده ۴۳۰ نانومتر ندارد (شکل ۱۴) و نشان دهنده این است که این دارو تداخلی با تست استامینوفن ندارد.

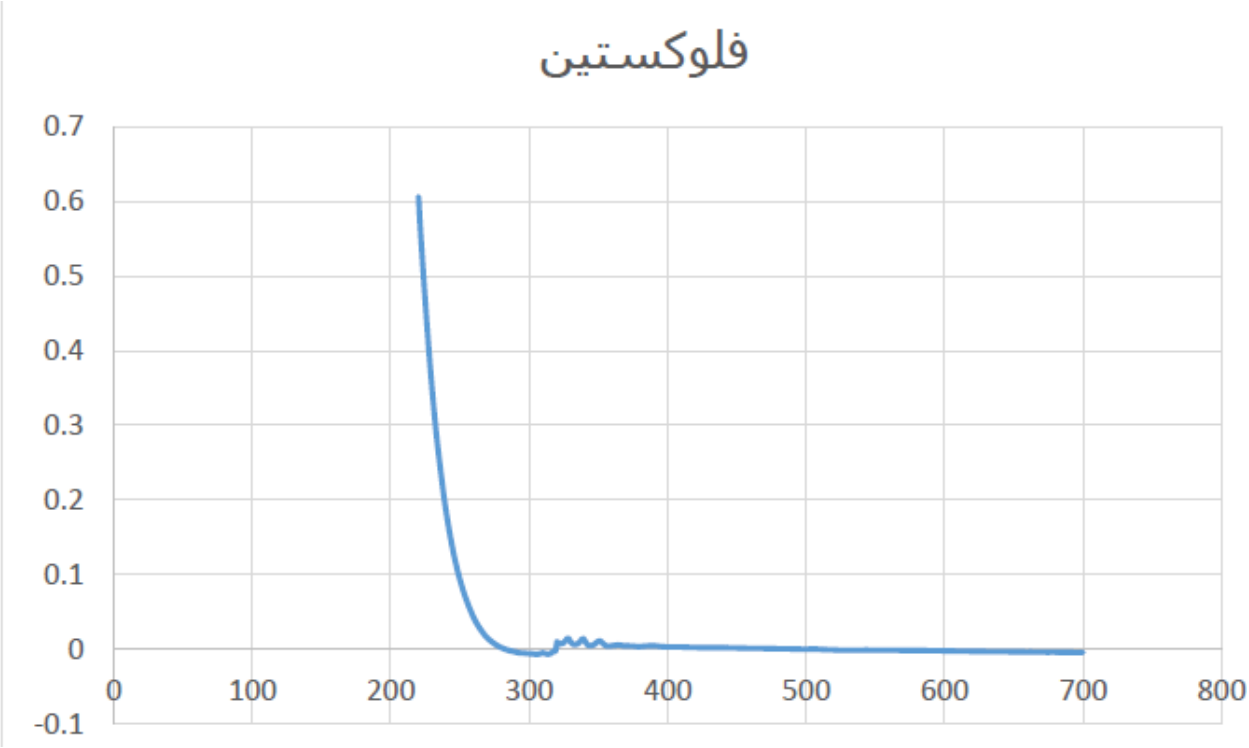


شکل ۱۴: طیف محلول استاندارد ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر دارو کلردیازپوکساید.

۱-۵-۷: بررسی اثر تداخلی داروی فلوکستین

جهت این کار محلول استاندارد ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر فلوکستین در نمونه سرم فرد سالم تهیه شد (اسپایک به سرم).

روش کار استخراج و مشتق سازی طبق روش فوق پیگیری شد. سپس از محلول نهایی طیف گرفته شد. نتایج نشان داد که استاندارد ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر فلوکستین جذب قابل ملاحضه ای در محدوده ۴۳۰ نانومتر ندارد (شکل ۱۵) و نشان دهنده این است که این دارو تداخلی با تست استامینوفن ندارد.

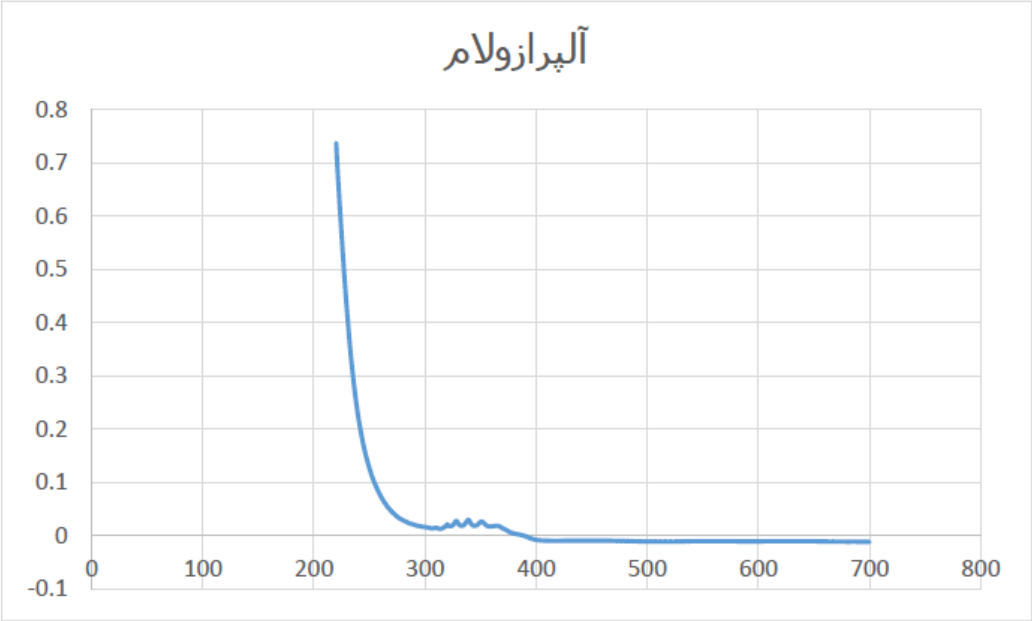


شکل ۱۵: طیف محلول استاندارد ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر دارو کلردیازپوکساید.

۱-۵-۸: بررسی اثر تداخلی داروی آلپرازولام

جهت این کار محلول استاندارد ۵۰۰ میلی گرم بر لیتر آلپرازولام در نمونه سرم فرد سالم تهیه شد (اسپایک به سرم).

روش کار استخراج و مشتق سازی طبق روش فوق پیگیری شد. سپس از محلول نهایی طیف گرفته شد. نتایج نشان داد که استاندارد ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر آلپرازولام جذب قابل ملاحضه ای در محدوده ۴۳۰ نانومتر ندارد (شکل ۱۶) و نشان دهنده این است که این دارو تداخلی با تست استامینوفن ندارد.

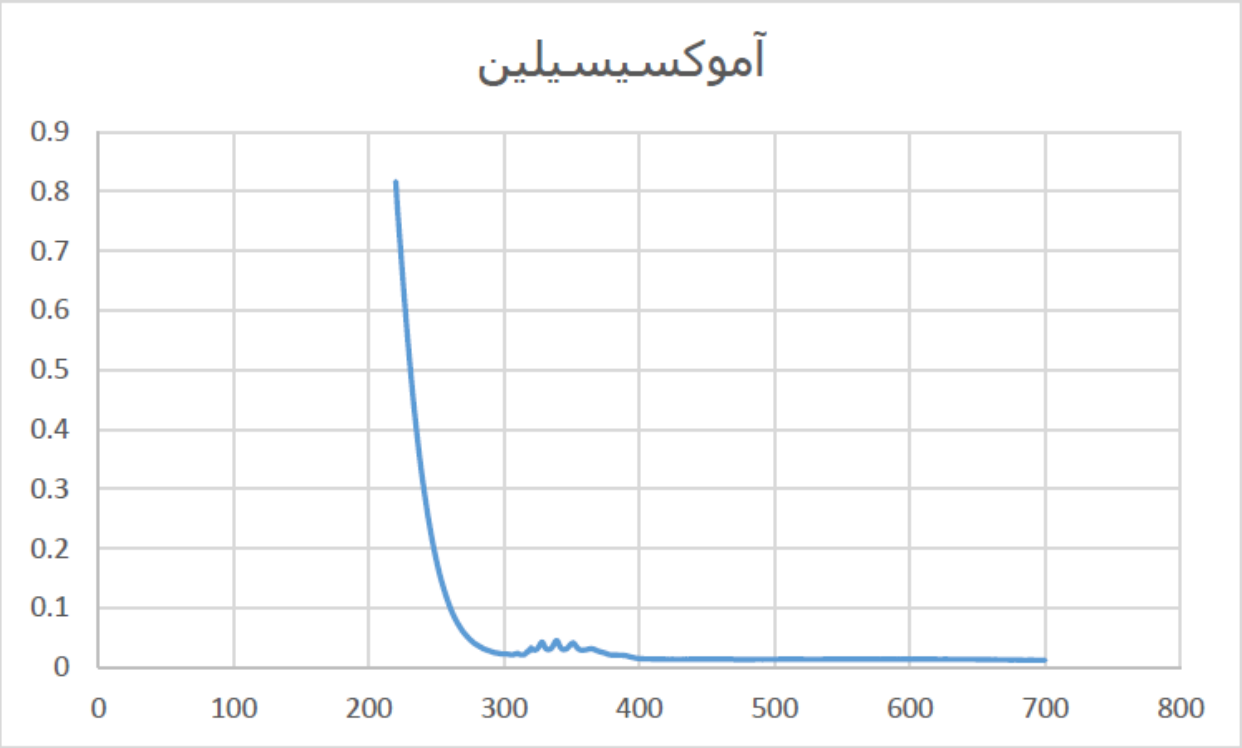


شکل ۱۶: طیف محلول استاندارد ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر دارو آلپرازولام.

۱-۵-۹: بررسی اثر تداخلی داروی آموکسی سیلین

جهت این کار محلول استاندارد ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر آموکسی سیلین در نمونه سرم فرد سالم تهیه شد (اسپایک به سرم).

روش کار استخراج و مشتق سازی طبق روش فوق پیگیری شد. سپس از محلول نهایی طیف گرفته شد. نتایج نشان داد که استاندارد ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر آموکسی سیلین جذب قابل ملاحضه ای در محدوده ۴۳۰ نانومتر ندارد (شکل ۱۷) و نشان دهنده این است که این دارو تداخلی با تست استامینوفن ندارد.

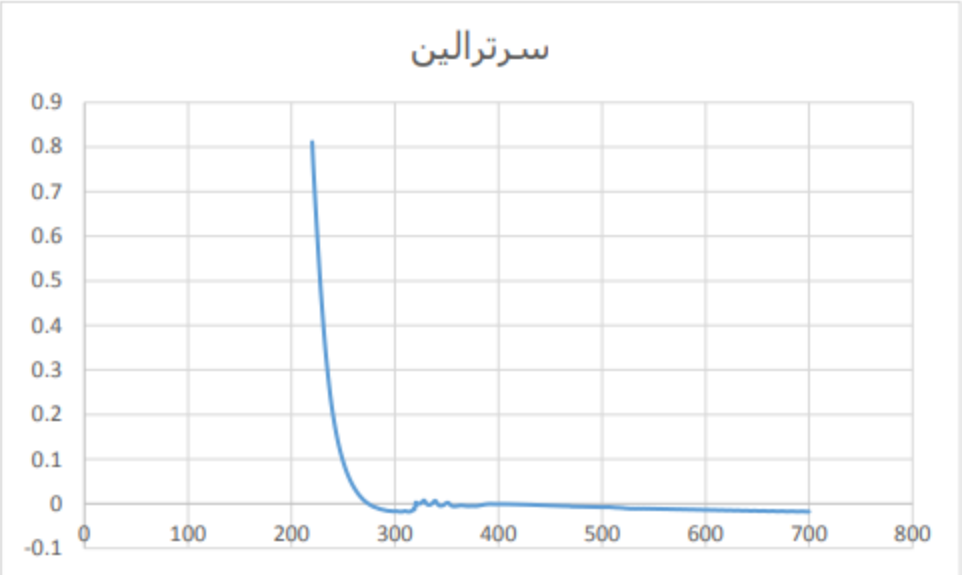


شکل ۱۷: طیف محلول استاندارد ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر دارو آموکسی سیلین.

۱-۵-۱۰: بررسی اثر تداخلی داروی سرترالین

جهت این کار محلول استاندارد ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر سرترالین در نمونه سرم فرد سالم تهیه شد (اسپایک به سرم).

روش کار استخراج و مشتق سازی طبق روش فوق پیگیری شد. سپس از محلول نهایی طیف گرفته شد. نتایج نشان داد که استاندارد ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر سرترالین جذب قابل ملاحضه ای در محدوده ۴۳۰ نانومتر ندارد (شکل ۱۸) و نشان دهنده این است که این دارو تداخلی با تست استامینوفن ندارد.

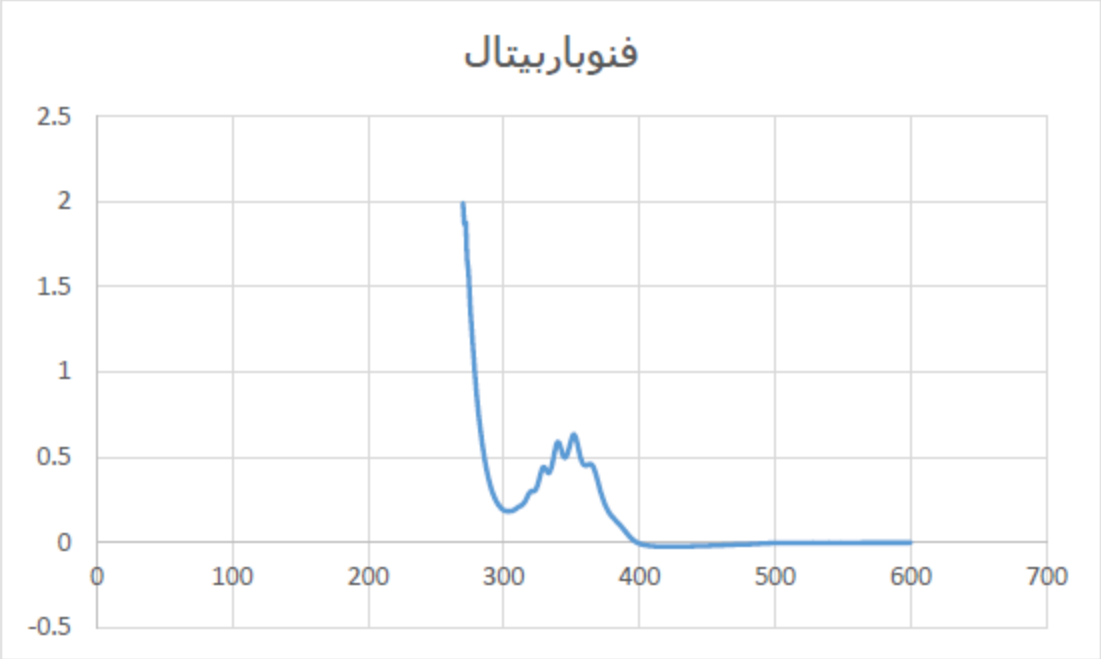


شکل ۱۸: طیف محلول استاندارد ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر دارو سرترالین.

۱-۵-۱۱: بررسی اثر تداخلی داروی فنوباربیتال

جهت این کار محلول استاندارد ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر فنوباربیتال در نمونه سرم فرد سالم تهیه شد (اسپایک به سرم).

روش کار استخراج و مشتق سازی طبق روش فوق پیگیری شد. سپس از محلول نهایی طیف گرفته شد. نتایج نشان داد که استاندارد ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر فنوباربیتال جذب قابل ملاحضه ای در محدوده ۴۳۰ نانومتر ندارد (شکل ۱۹) و نشان دهنده این است که این دارو تداخلی با تست استامینوفن ندارد.

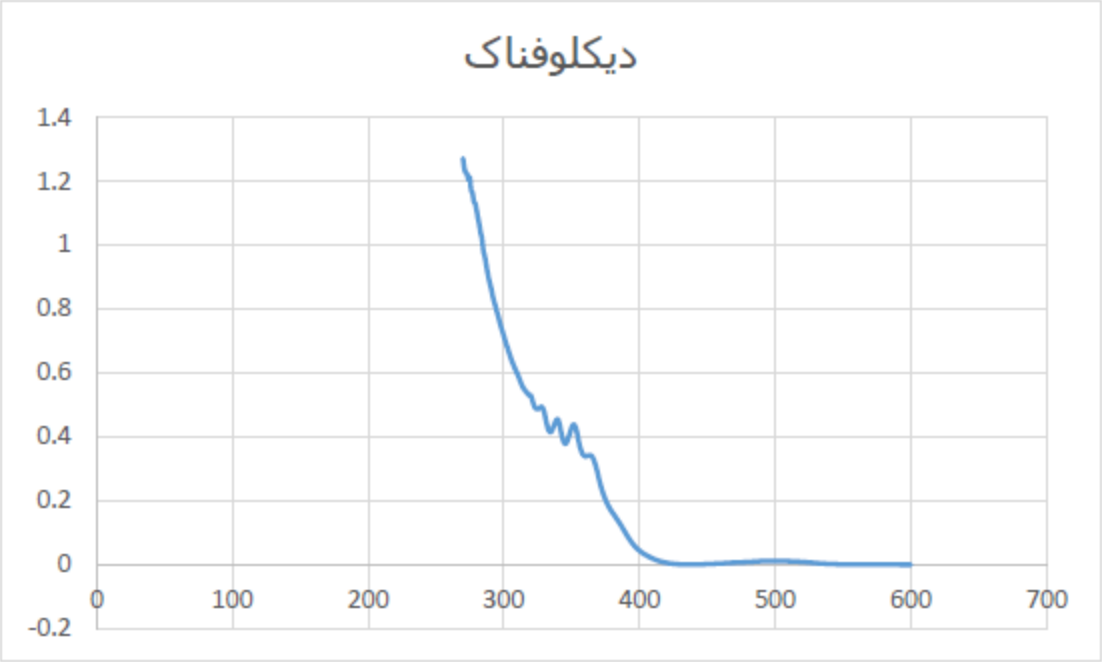


شکل ۱۹: طیف محلول استاندارد ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر دارو فنوباربیتال.

۱-۵-۱۲: بررسی اثر تداخلی داروی دیکلوفناک

جهت این کار محلول استاندارد ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر دیکلوفناک در نمونه سرم فرد سالم تهیه شد (اسپایک به سرم).

روش کار استخراج و مشتق سازی طبق روش فوق پیگیری شد. سپس از محلول نهایی طیف گرفته شد. نتایج نشان داد که استاندارد ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر دیکلوفناک جذب قابل ملاحضه ای در محدوده ۴۳۰ نانومتر ندارد (شکل ۲۰) و نشان دهنده این است که این دارو تداخلی با تست استامینوفن ندارد.

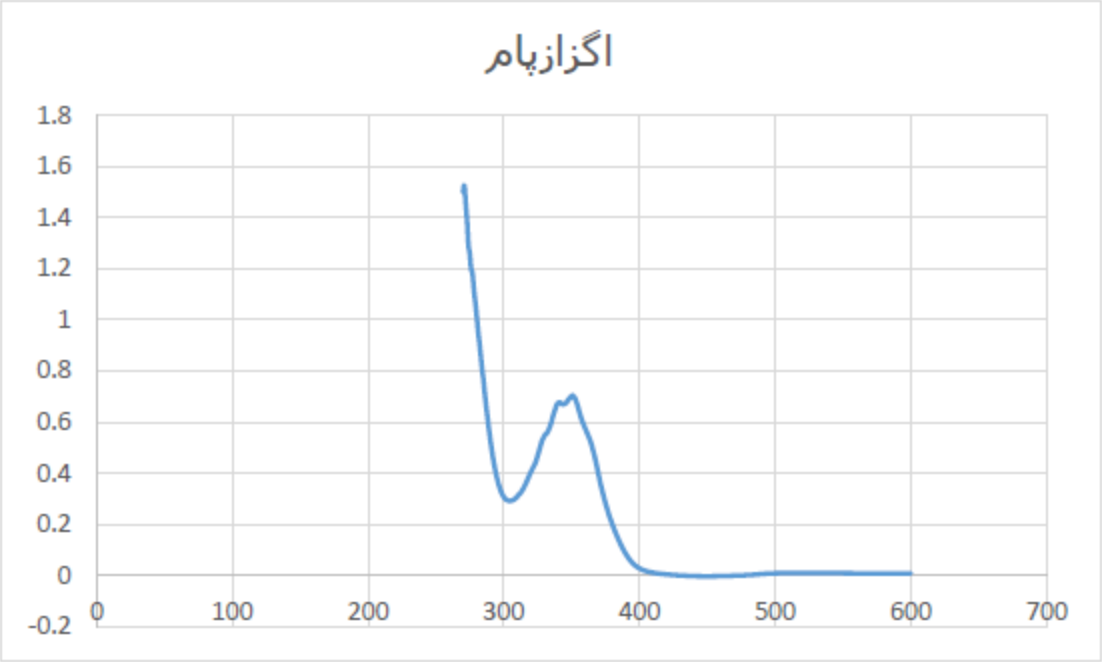


شکل ۲۰: طیف محلول استاندارد ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر دارو دیکلوفناک.

۱-۵-۱۳: بررسی اثر تداخلی داروی اگزازپام

جهت این کار محلول استاندارد ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر اگزازپام در نمونه سرم فرد سالم تهیه شد (اسپایک به سرم).

روش کار استخراج و مشتق سازی طبق روش فوق پیگیری شد. سپس از محلول نهایی طیف گرفته شد. نتایج نشان داد که استاندارد ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر اگزازپام جذب قابل ملاحضه ای در محدوده ۴۳۰ نانومتر ندارد (شکل ۲۱) و نشان دهنده این است که این دارو تداخلی با تست استامینوفن ندارد.

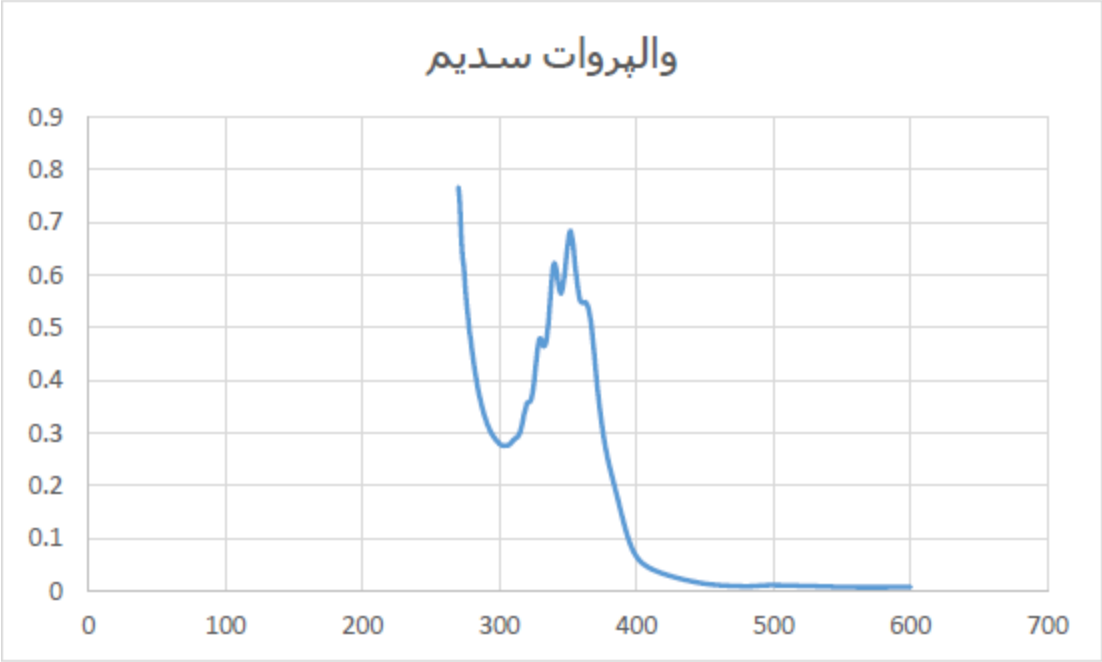


شکل ۲۱: طیف محلول استاندارد ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر دارو اگزازپام.

۱-۵-۱۴: بررسی اثر تداخلی داروی سدیم والپروات

جهت این کار محلول استاندارد ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر سدیم والپروات در نمونه سرم فرد سالم تهیه شد (اسپایک به سرم).

روش کار استخراج و مشتق سازی طبق روش فوق پیگیری شد. سپس از محلول نهایی طیف گرفته شد. نتایج نشان داد که جذب استاندارد ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر سدیم والپروات در طول موج۴۳۰ نانومتر ۰/۰۲ می باشد (شکل ۲۲) و نشان دهنده این است که این دارو تداخلی با تست استامینوفن ندارد.

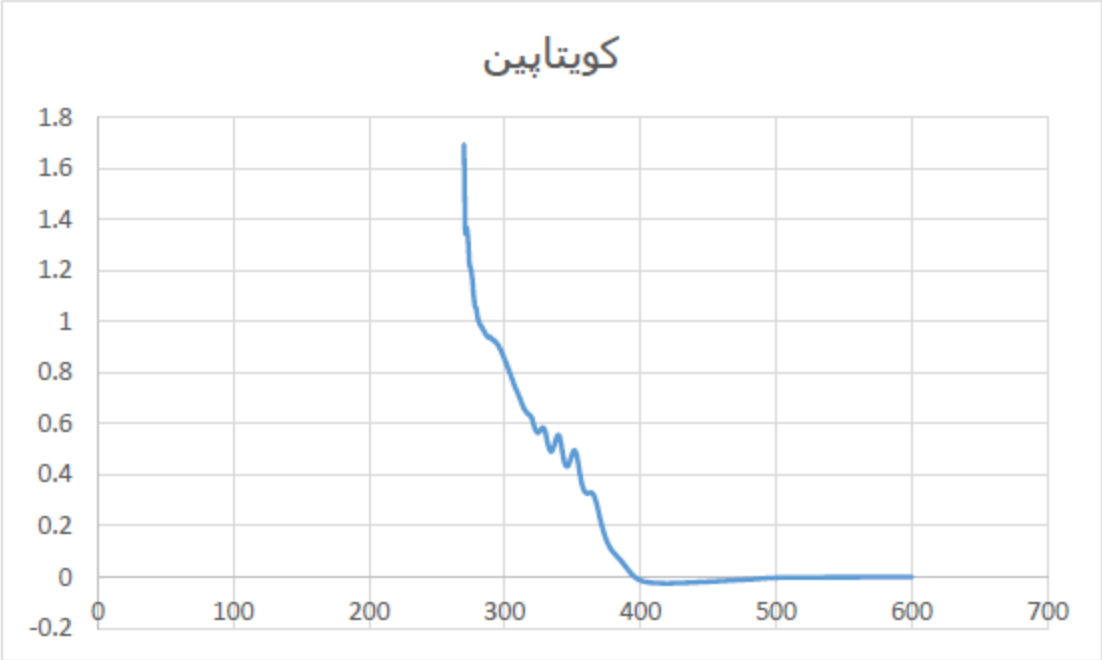


شکل ۲۲: طیف محلول استاندارد ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر دارو سدیم والپروات.

۱-۵-۱۵: بررسی اثر تداخلی داروی کوئیتاپین

جهت این کار محلول استاندارد ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر کوئیتاپین در نمونه سرم فرد سالم تهیه شد (اسپایک به سرم).

روش کار استخراج و مشتق سازی طبق روش فوق پیگیری شد. سپس از محلول نهایی طیف گرفته شد. نتایج نشان داد که جذب استاندارد ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر کوئیتاپین در طول موج۴۳۰ نانومتر منفی ۰/۰۲ می باشد (شکل ۲۳) و نشان دهنده این است که این دارو تداخلی با تست استامینوفن ندارد.

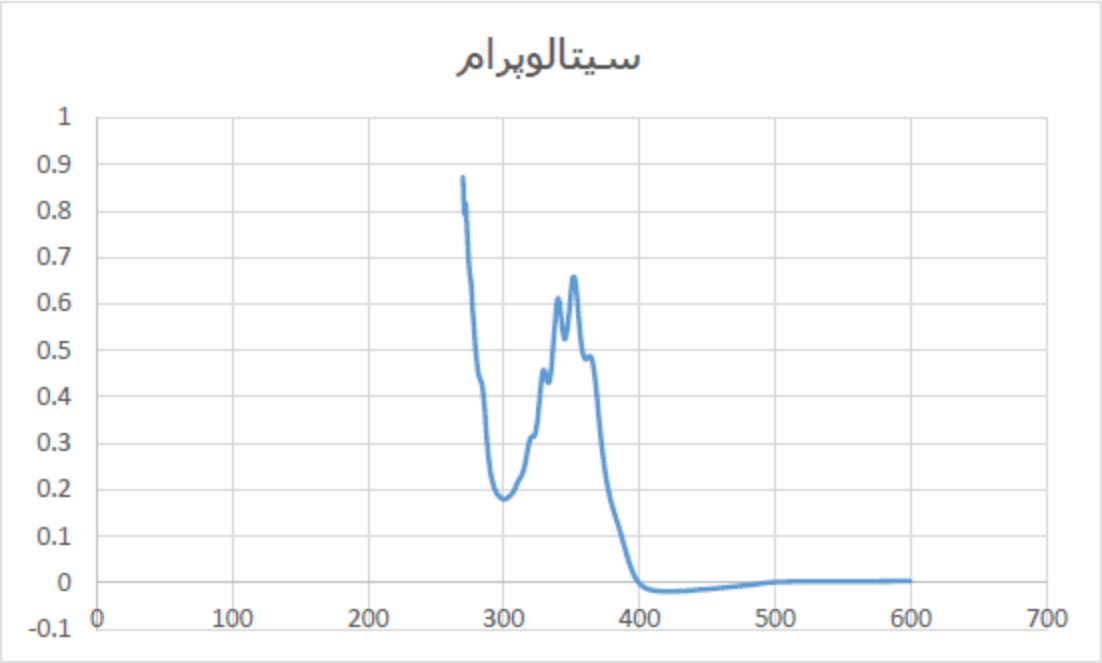


شکل ۲۳: طیف محلول استاندارد ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر دارو کوئیتاپین.

۱-۵-۱۶: بررسی اثر تداخلی داروی سیتالوپرام

جهت این کار محلول استاندارد ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر سیتالوپرام در نمونه سرم فرد سالم تهیه شد (اسپایک به سرم).

روش کار استخراج و مشتق سازی طبق روش فوق پیگیری شد. سپس از محلول نهایی طیف گرفته شد. نتایج نشان داد که جذب استاندارد ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر سیتالوپرام در طول موج۴۳۰ نانومتر منفی ۰/۰۱۸ می باشد (شکل ۲۴) و نشان دهنده این است که این دارو تداخلی با تست استامینوفن ندارد.

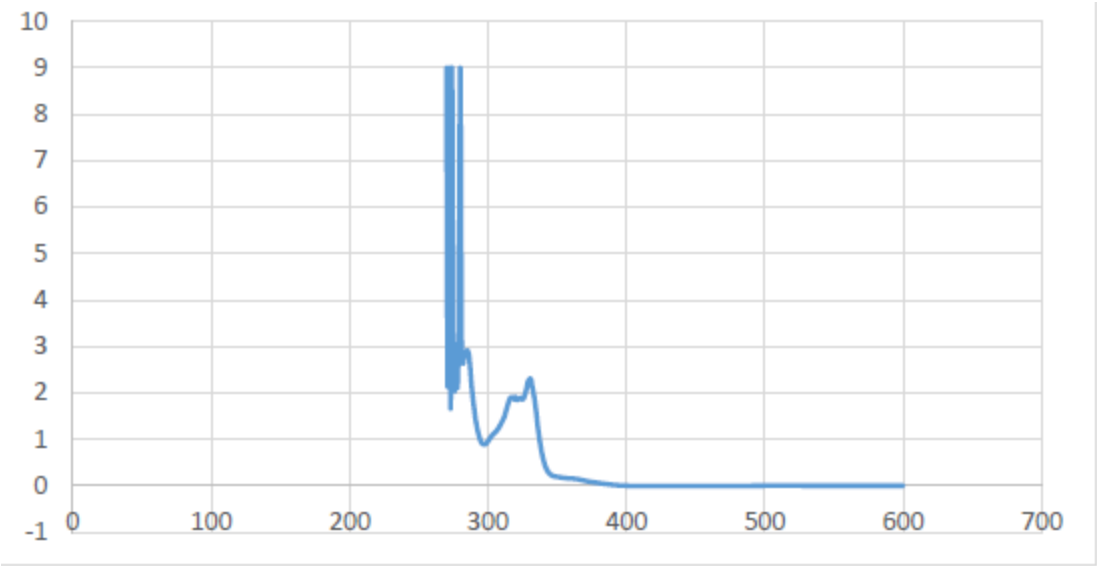


شکل ۲۴: طیف محلول استاندارد ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر دارو سیتالوپرام.

۱-۵-۱۷: بررسی اثر تداخلی داروی آمی تریپتیلین

جهت این کار محلول استاندارد ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر آمی تریپتیلین در نمونه سرم فرد سالم تهیه شد (اسپایک به سرم).

روش کار استخراج و مشتق سازی طبق روش فوق پیگیری شد. سپس از محلول نهایی طیف گرفته شد. نتایج نشان داد که استاندارد ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر آمی تریپتیلین در طول موج۴۳۰ نانومتر جذب قابل ملاحضه ای ندارد (شکل ۲۵) و نشان دهنده این است که این دارو تداخلی با تست استامینوفن ندارد.

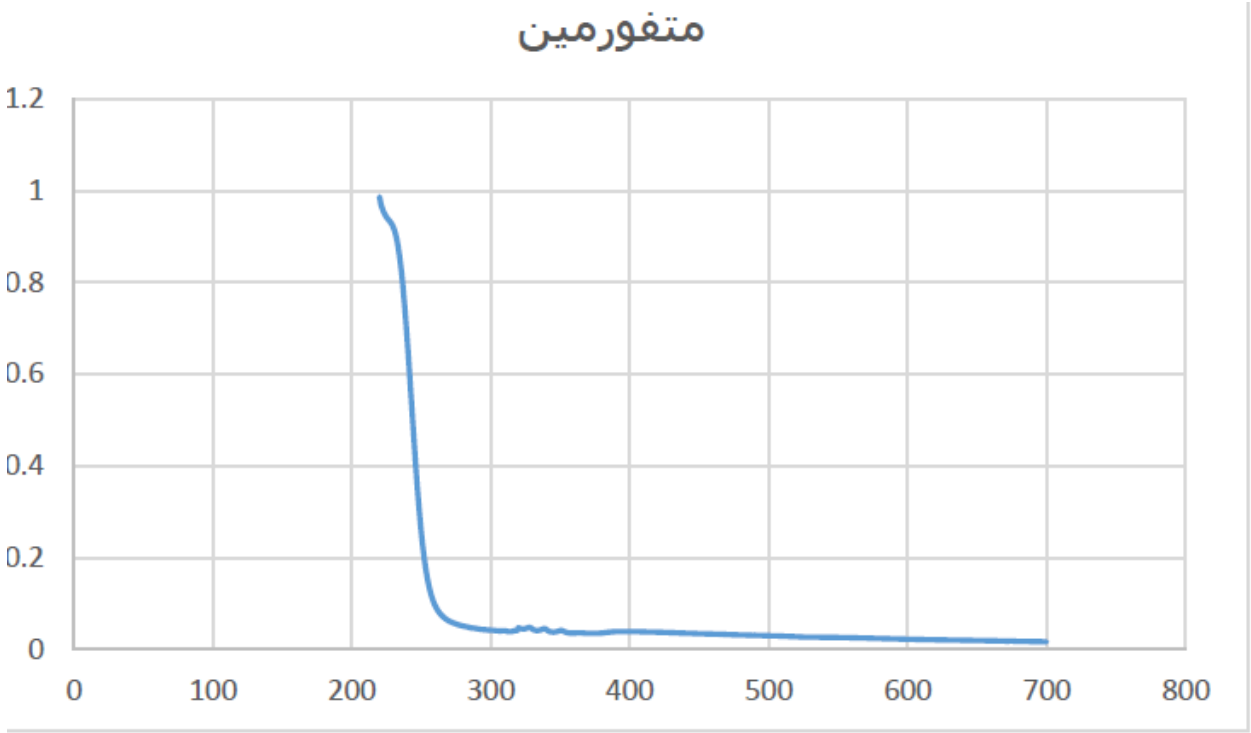


شکل ۲۵: طیف محلول استاندارد ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر دارو آمی تریپتیلین.

۱-۵-۱۸: بررسی اثر تداخلی داروی متفورمین

جهت این کار محلول استاندارد ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر متفورمین در نمونه سرم فرد سالم تهیه شد (اسپایک به سرم).

روش کار استخراج و مشتق سازی طبق روش فوق پیگیری شد. سپس از محلول نهایی طیف گرفته شد. نتایج نشان داد که استاندارد ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر متفورمین جذب قابل ملاحضه ای در محدوده ۴۳۰ نانومتر ندارد (شکل ۲۹) و نشان دهنده این است که این دارو تداخلی با تست استامینوفن ندارد. لازم به ذکر است که غلظت اسپایک ۱۰۰۰ میلی گرم عدد بسیار بالایی است که معمولا حتی در سمومیت های شدید هم رسیدن به چنین سطح سرمی بعید است.



شکل ۲۶: طیف محلول استاندارد ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر دارو متفورمین.

۲- صحت روش: در این مرحله میزان نزدیکی اعداد بدست آمده حاصل از روش با اعداد واقعی (رفرنس) بررسی شد. نتایج این قسمت به صورت درصد (Mean±SD) گزارش گردید (جدول ۱).

جدول۱: درصد بازیابی استامینوفن در سطوح ۳۰، ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی گرم بر لیتر.

سطح	سطح اسپایک		
	mg/L۳۰	mg/L ۱۵۰	mg/L۳۰۰
بازیابی (درصد)	۹۳/۳±۳/۳	۹۸±۴/۸	۹۷/۴±۵/۴

۳- دقت روش: جهت انجام این امر تست تغییرات درون روزی و برون روزی صورت انجام شد. جهت انجام تست های درون روزی و برون روزی، سه سطح غلظتی (۳۰،۱۵۰ و ۳۰۰ میلی گرم بر لیتر) انتخاب شد. سپس غلظت های انتخابی به ماتریکس اسپایک شده و طبق روش، جداسازی استامینوفن صورت گرفت.

نتایج نشان داد که ضریب تغییرات روش در تست های درون روزی و برون روزی کمتر از ۸/۴ درصد است که نشان دهنده دقت مناسب کیت است (جدول های ۲ و ۳).

جدول۲: درصد ضریب تغییرات روش در سطوح ۳۰، ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی گرم بر لیتر در تست درون روزی.

سطح	سطح اسپایک		
	۳۰ mg/L	۱۵۰ mg/L	۳۰۰mg/L
ضریب تغییرات در یک روز (درصد)	۸/۴	۱/۸	۰/۴

جدول۳: درصد ضریب تغییرات روش در سطوح ۳۰، ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی گرم بر لیتر در تست برون روزی.

سطح	سطح اسپایک		
	۳۰ mg/L	۱۵۰ mg/L	۳۰۰mg/L
ضریب تغییرات در چند روز (درصد)	۷/۷	۲/۶	۱/۲

۴- حد تشخیص: حد تشخیص روش بر اساس فرمول زیر محاسبه شد.

$$LOD = 3.3(\sigma / S)$$

σ: انحراف استاندارد پاسخ

S: شیب منحنی کالیبراسیون

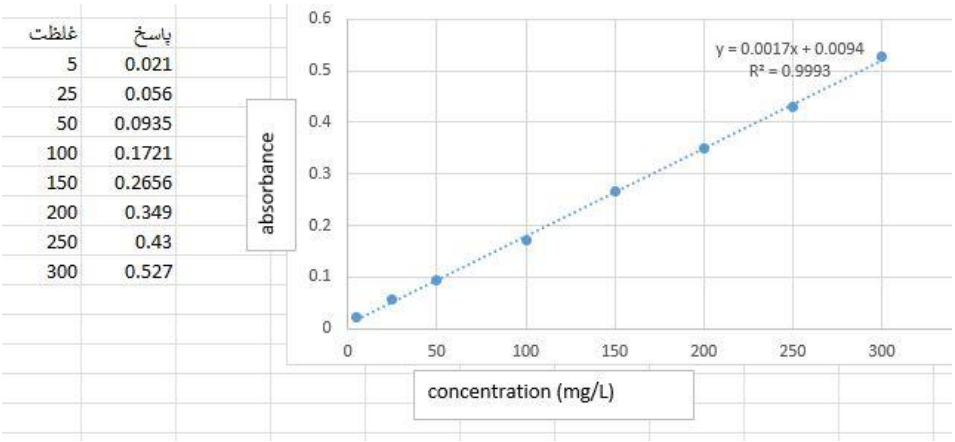
نتایج نشان داد که حد تشخیص کیت ۱۰ میلی گرم بر لیتر است.

۵- حد اندازه گیری: حد اندازه گیری روش بر اساس فرمول زیر محاسبه شد:

$$LOQ = 10(\sigma / S)$$

نتایج نشان داد که حد اندازه گیری کیت ۳۰ میلی گرم بر لیتر است.

۶- محدوده خطی: در این قسمت، خطی بودن رابطه بین غلظت استاندارد استامینوفن با اعداد حاصل از روش در محدوده ۵ میلی گرم بر لیتر تا ۳۰۰ میلی گرم بر لیتر بررسی شد (شکل ۳۰).



غلظت	پاسخ
5	0.021
25	0.056
50	0.0935
100	0.1721
150	0.2656
200	0.349
250	0.43
300	0.527

شکل ۳۰: منحنی کالیبراسیون استامینوفن در محدود ۵ تا ۳۰۰ میلی گرم بر لیتر.

R^2 (۰/۹۹۹۳) نتایج نشان داد که در محدوده ۵ میلی گرم بر لیتر تا ۳۰۰ میلی گرم بر لیتر، نتایج خطی است.

۷- پایداری محلول ها

پایداری محلول ها با کمک معادله زیر ارزیابی شد:

$$Accelerated\ Aging\ Duration = \frac{Real\ Time\ Duration}{Q_{10}^{\frac{T_{AA}-T_S}{10}}}$$

در معادله فوق:

۱- Aging Factor (Q10) برابر ۲ در نظر گرفته شد.

۲- Accelerated Aging Temperature (T AA) برابر ۳۷ در نظر گرفته شد.

۳- TS برابر ۲۳ در نظر گرفته شد.

طبق معادله فوق حساب شد که اگر بخواهیم پایداری محلول را برای مدت ۶ ماه (real time duration) در دمای ۲۳ درجه سانتی گراد ارزیابی کنیم، لازم است محلول ها را به مدت ۶۹ روز در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگه داری کنیم.

جهت سنجش پایداری محلولها، غلظت لازم از همه محلول های مورد استفاده شامل TCA، اسیدکلریدریک، سدیم نیتریت، آمونیوم سولفات و سدیم هیدروکسید در آب دیونیزه تهیه شد. در روز اول با استفاده از این محلول ها، یک تست با استاندارد استامینوفن ۵۰ میلی گرم بر لیتر گذاشته شد و عدد جذب آن یادداشت شد. در همان روز، محلول ها به آون ۳۷ درجه سانتی گراد منتقل شد. ۳۰ روز بعد و ۷۰ روز بعد این تست ها با محلول های فوق تکرار شد (جدول ۴).

جدول ۴: تغییرات جذب استاندارد استامینوفن از طریق بررسی پایداری محلول ها در گذر زمان.

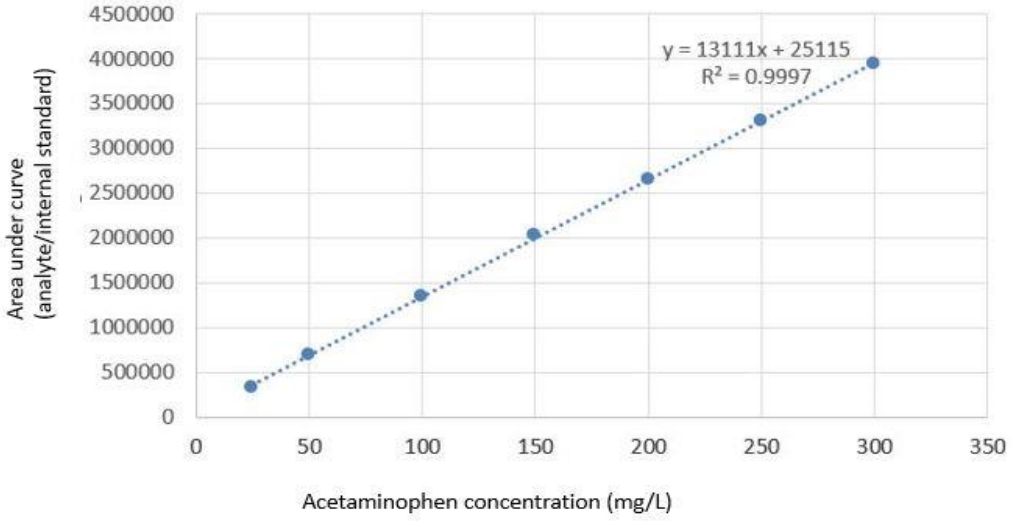
انحراف از استاندارد	میانگین جذب ها	جذب نمونه ۳	جذب نمونه ۲	جذب نمونه ۱	
۰/۰۰۲	۰/۱۴۴	۰/۱۴۶	۰/۱۴۵	۰/۱۴۲	روز ۱
۰/۰۰۵	۰/۱۴۷	۰/۱۴۲	۰/۱۴۷	۰/۱۵۲	روز ۳۰
۰/۰۱۳	۰/۱۵۲	۰/۱۶۷	۰/۱۴۵	۰/۱۴۴	روز ۷۰

میانگین و انحراف از استاندارد جذب ها نشان می دهد که پایداری محلول ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد خوب بوده و محلول ها پایدار هستند.

بنابراین، پاسخ ها نشان داد که محلول ها قادرند به مدت ۶ ماه در دمای ۲۳ درجه نگه داری شوند و در این شرایط پایدارند.

۸- تایید نتایج رنگ سنجی با کمک دستگاه HPLC-UV:

جهت این کار در ابتدا منحنی کالیبراسیون رسم شد. بدین منظور از استانیلید به عنوان استاندارد داخلی استفاده شد. فاز متحرک ۷۰ درصد آب و ۳۰ درصد استونیتریل بود، طول موج جذب ۲۷۵ نانومتر بود:



مقایسه روش رنگ سنجی با HPLC: سه نمونه از بیماران مسوم به استامینوفن گرفته شد و همزمان به روش رنگ سنجی و hplc مقایسه شد که نتایج به شرح زیر است.

	نمونه ۱	نمونه ۲	نمونه ۳
رنگ سنجی	۲۴۳	۱۱۱	۳۵
HPLC	۲۳۰	۹۷	۳۹

- ✓ جهت ارزیابی فاکتورهای مربوط به ست آپ روش از مقاله و رفرنس های زیر استفاده خواهد شد:

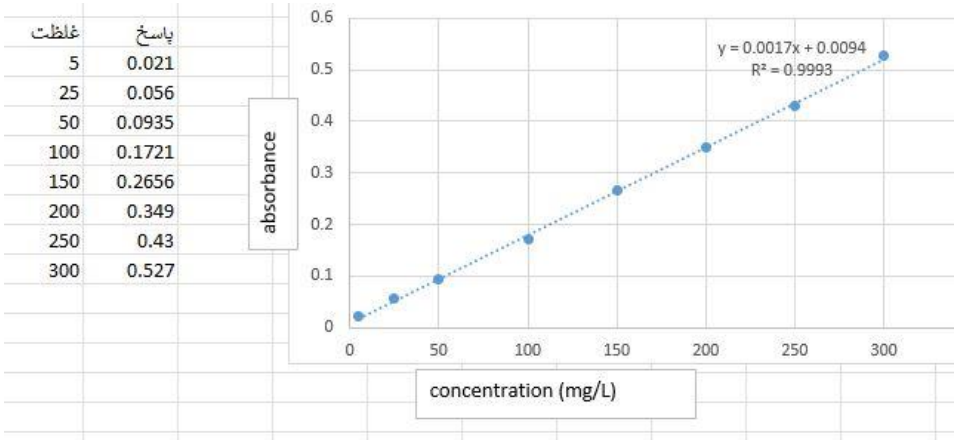
- ✓ 1. Chandran S, Singh R. Comparison of various international guidelines for analytical method validation. Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences. 2007;62(1):4-14.

2. ICH Topic Q 2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. European Medicines Agency. June 1995 CPMP/ICH/381/95. ✓

نتایج طرح قبل:

پاسخ:

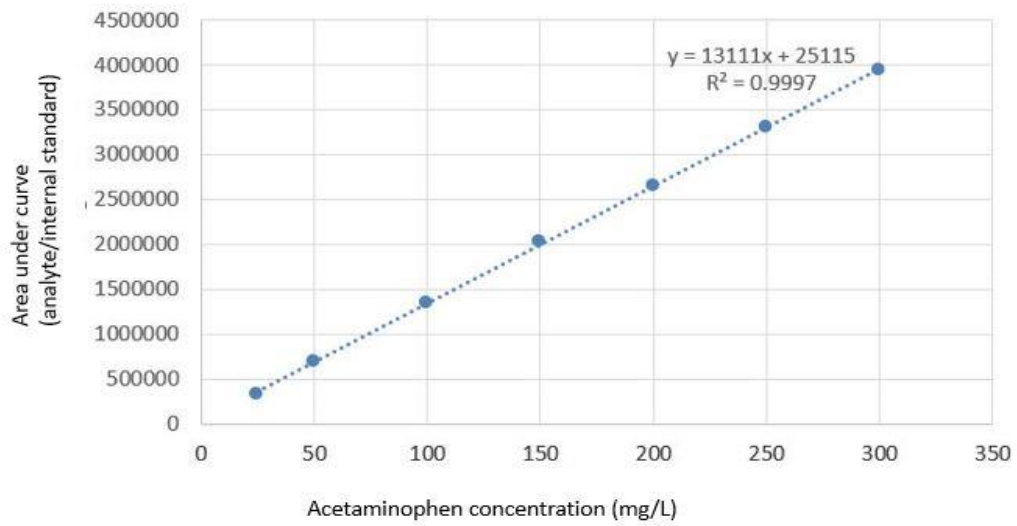
منحنی کالیبراسیون (Spectrophotometry):



غلظت	پاسخ
5	0.021
25	0.056
50	0.0935
100	0.1721
150	0.2656
200	0.349
250	0.43
300	0.527

منحنی کالیبراسیون (HPLC/UV):

در این روش از استانیلید به عنوان استاندارد داخلی استفاده شد. فاز متحرک ۷۰ درصد آب و ۳۰ درصد استونیتریل بود، طول موج جذب استامینوفن ۲۷۵ نانومتر بود:



دقت در روش رنگ سنجی:

	accuracy intraday		
	L1 (LOQ)	L2	L3
	30 mg/L	150 mg/L	300 mg/L
		0.2431	0.5006
	0.0739	0.2491	0.4996
	0.0656	0.2523	
mean	0.06975	0.248167	0.5001
SD	0.005869	0.00467	0.000707
CV %	8.414317	1.881991	0.141393

	accuracy interday		
	L1 (LOQ)	L2	L3
	30 mg/L	150 mg/L	300 mg/L
DAY 1		0.2431	0.5006
	0.0739	0.2491	0.4996
	0.0656	0.2523	0.4958
DAY 2	0.0606	0.2531	0.4989
	0.0578	0.2601	0.4883
	0.0599	0.2502	0.4868
DAY 3	0.0635	0.256	
	0.0621	0.2393	
	0.064	0.2576	
Mean	0.063425	0.2512	0.495
SD	0.004908	0.006714	0.006008
CV%	7.737717	2.67291	1.213804

حد تشخیص در روش رنگ سنجی:

۱۰ میلی گرم بر لیتر بدست آمد

صحت:

ریکاوری ها در محدوده بین ۹۳ تا ۹۸ درصد بدست آمد

تداخلات:

: در طرح قبل مجری، میزان تداخل اثر همولیز، ایکتریک و لیپیدمیا بررسی شده است. مشاهده شد که این مواد تداخل چشمگیری در اندازه گیری سطح سرمی ندارد. به علاوه تداخل داروهایی نظیر ترامادول و ایبوپروفن بررسی شد و دیده شد که این داروها تداخلی ندارند.

در این پروژه برآن هستیم تا اثر تداخلی طیف گسترده داروها (بیش از ۲۰ مورد از داروهای رایج و در دسترس) را بررسی کنیم: داروهای آسپرین، دیکلوفناک، ستیریزین، ناپروکسن، دیازپام، اگزازپام، کلونازپام، متفورمین، گاباپنتین...

از داروها طیف گرفته و آنهایی که احتمال تداخل بالا دارند (بر اساس لاندا ماکس) به طور خاص بررسی می شوند. با توجه به احتمال تداخل نمونه اورمی، این مسئله نیز بررسی خواهد شد.

هر کدام از ترکیبات جداگانه به نمونه سرم اسپایک شده و طبق روش ارائه شده در طرح آنالیز و شناسایی می شود. و نتایج با نمونه کنترل منفی (نمونه سرم فرد سالم بدون مصرف استامینوفن) و کنترل مثبت (نمونه سرم+ استامینوفن اسپایک شده) مقایسه خواهد شد. جذب داروهای مذکور در طول موج ۴۳۰ نانومتر به عنوان مداخله محسوب می شود و البته سطح و شدت تداخل هم مد نظر گرفته می شود.