

شناسایی و اندازه گیری داروی سیپروفلوکساسین در حضور نانو ذرات طلا به روش حساس و کاربردی اسپکتروفوتومتری

الهام مطلب پور سنگستانی^۱، جعفر ابوالحسنی^۲

Elham.motalebpour88@gmail.com

خلاصه

اسپکتروفوتومتری روش آنالیز وسیع و کاربردی هست که جهت تجزیه و بررسی داروها به دلیل حساسیت بالا و مقرون به صرفه بودن مورد استفاده قرار می گیرد. در این پژوهش، از روش اسپکتروفوتومتری جهت شناسایی و اندازه گیری داروی سیپروفلوکساسین در حضور نانو ذرات طلا بهره گرفته شده است. علاوه نمودن داروی آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین به محلول نانو ذره طلا حالت کلوخه ای ایجاد نموده و جذب نانو ذره طلا کاهش می یابد. در این کار تحقیقاتی پارامترهای کلیدی اعم از PH، دما، حجم نانو ذره و بافر مورد استفاده و نوع بافر مورد بررسی قرار می گیرند و قادر خواهیم بود بهترین نمودارهای کالیبراسیونی در محدوده های خطی ۱۰-۳۰ میکروگرم بر لیتر و با ضریب همبستگی بسیار بالا (نزدیک به یک) و دقت حدود ۱۰۰ درصد بدست آوریم.

در نتیجه روش پیش رو روشی به روز، ساده، کاربردی، در دسترس و تکرار پذیر با حساسیت بسیار بالا خواهد بود.

کلمات کلیدی: سیپروفلوکساسین، نانو ذره طلا، بافر، اسپکتروفوتومتری

۱. مقدمه

سیپروفلوکساسین (Ciprofloxacin) یک آنتی بیوتیک فلوروکینولون (Fluoroquinolone) است که برای درمان انواع مختلف عفونت های باکتریایی (عفونت دستگاه ادراری، شکم، پوست، پروستات، استخوان و...) استفاده می شود. همچنین، برای درمان افرادی که در معرض سیاه زخم یا انواع خاصی از طاعون قرار گرفته اند نیز کاربرد دارد. عملکرد قرص سیپروفلوکساسین از طریق متوقف کردن رشد میکروب ها است. این کار را با مسدود کردن آنزیم های مورد نیاز برای زنده ماندن باکتری ها انجام می دهد.

استفاده از داروی سیپروفلوکساسین در برابر دیگر آنتی بیوتیک ها دارای مزایایی به شرح ذیل است:

۱. این دارو جذب سریع تر و دایره تاثیر بالاتری نسبت به دیگر آنتی بیوتیک ها دارد.

۲. هزینه ساخت و فراواری این دارو به نسبت پایین تر می باشد.

۳. عوارض مصرف این نوع از آنتی بیوتیک بسیار کمتر هست.

اندازه گیری میزان ماده سیپروفلوکساسین در اشکال دارویی موجود در بازار دارویی ایران به روش HPLC با دتکتور فلوئورسانس و اسپکتروفوتومتری مقدور می باشد [1].

اخیرا استفاده از نانو ذرات در تحقیقات دارویی توجه زیادی به خود جلب کرده است بطوریکه ویژگی های منحصر به فرد و در دسترس بودن این ذرات از اهمیت بالایی برخوردار است. این نانو ذرات به سهولت سنتز شده و پیک های جذبی بالایی

در ناحیه UV ایجاد می‌کنند. در این کار تحقیقاتی، نانو ذرات طلا با اندازه کمتر از ۱۰ نانومتر سنتز شده و پیک جذب دارویی بالایی در طول موج ۵۲۰ نانومتر نشان می‌دهد [2]. سپس داروی سیپروفلوکساسین به محیط اضافه گردیده که باعث کاهش جذب نانوذرات طلا می‌شود. این کاهش جذب اساس روش سریع، آسان، حساس و مهم تر از همه روتین آزمایشگاههای تشخیص طبی و پاتولوژی می‌باشد [3].

۲. روش کار تجربی

۲-۱. مواد

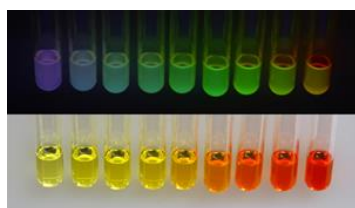
سدیم تری سیترات در حدود ۱۰ گرم

HAuCl₄ در حدود ۱.۵ میلی لیتر

پودر خالص داروی سیپروفلوکساسین از داروسازی اکسیر تهیه گردیده است. محلول طلا و سدیم تری سیترات محصول شرکت merck آلمان می‌باشد. سایر معرف های شیمیایی مورد استفاده هم بدون نیاز به خالص سازی بالاترین درجه خلوص از شرکت داروسازی بایر آلمان تهیه شده اند.

۲-۲. سنتز نانوذرات طلا

۱.۵ میلی لیتر محلول طلا را در بالن ۱۰۰ سی سی به حجم رسانده در روی هیتر و به کمک شیکر حرارت داده تا به جوش آید. در همین حین محلول سیترات ۱.۵٪ را نیز از کناره بشر به آرامی علاوه میکنیم. هم زدن محلول را ادامه داده تا از آبی تیره به قرمز تیره و ارغوانی تغییر رنگ دهد. همزدن محلول را متوقف کرده اجازه میدهیم تا خنک شود سپس به بالن ۱۰۰ سی سی منتقل کرده و به حجم می‌رسانیم [4].



شکل ۱. سنتز انواع نانوذره طلا

۲-۳. اندازه گیری داروی سیپروفلوکساسین

داروی سیپروفلوکساسین در غلظت های متفاوت در محیط آزمایشگاه و دمای اتاق تهیه شده به محلول نانو ذره طلا اضافه شده و جذب محلول توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه گیری و شناسایی می‌شود.

۲-۴. استانداردسازی پارامترهای اندازه گیری

در این مطالعه پارامترهایی همانند PH ، دما ، نوع بافر ، حجم بافر و نانو ذره بهینه سازی شده و نتایج بدست آمده در ذیل مطرح می شوند.

PH ۱-۴-۲

در محدوده ۵ تا ۹ ، تاثیر PH به علت انتخاب شرایط استاندارد آزمایشگاهی مور مطالعه قرار گرفت. شدت جذب نانو ذره طلا با افزایش PH افزایش یافته و در PH برابر ۵.۵ ماکزیمم جذب را به دست آوردیم. در PH های بالای ۶ شدت جذب بطور محسوس کاهش یافت که PH برابر ۵.۵ به عنوان PH مطلوب انتخاب گردید [5].

۲-۴-۲. انتخاب نوع بافر استاندارد و حجم مورد نیاز در مطالعه داروی سیپروفلوکساسین

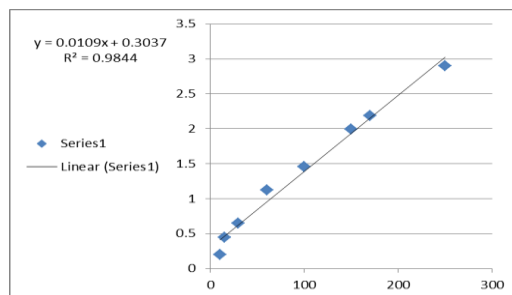
همانطور که میدانیم بافرها به توسط نیروی یونی خود و تاثیر بر ذرات محلول بر میزان جذب تاثیر گذاشته و بافرهای استاتی شدت جذب بیشتری نسبت به بافرهای فسفاتی دارند و با اشل مناطق برتری مواد شیمیایی مطابقت دارد. بنابراین بافر استات به عنوان بافر بهینه جهت تثبیت PH برابر ۵.۵ در اندازه گیری سیپروفلوکساسین مورد استفاده قرار گرفت. همچنین بافر استات در حجم های مختلف ما بین ۳۰۰ تا ۱۰۰۰ میکرولیتر تهیه گردید و نتایج بررسی ها نشان داد که بافر استات با حجم برابر ۴۰۰ میکرولیتر شدت جذب نسبی ماکزیمم را شرایط بهینه را فراهم نمود.

۲-۴-۳. تاثیر حجم نانو ذره طلا در شناسایی و اندازه گیری داروی منتخب

حجم های مختلف نانو ذره تهیه شد. پیک جذبی در حجم های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. در حدود حجم ۶۰۰ میکرولیتر از نانو ذره طلا، قله پیک به دست آمد. سپس با افزایش مقدار حجم نانوذره نمودار جذب به سمت مقادیر اندک افت نمود. بعد از بررسی های نهایی به این نتیجه رسیدیم که پیوند دارو با نانو ذره در حجم های پایین بسیار اندک بوده در مقادیر متوسط این پیوند مستحکم تر و پیک جذبی بالا می باشد. لذا حجم برابر ۶۰۰ تا ۶۵۰ میکرولیتر به عنوان استاندارد حجم نانو ذره تعیین گردید [6].

۲-۴-۴. ارزیابی نمودار کالیبراسیونی داروی سیپروفلوکساسین

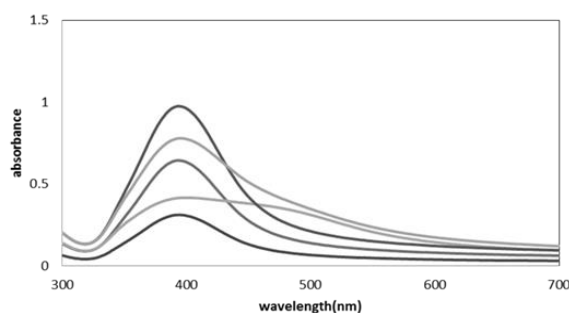
بعد از استانداردسازی پارامترهای آزمایشگاهی ، منحنی کالیبراسیونی بر اساس شدت جذب و غلظت دارو رسم گردید. نمونه های استاندارد تهیه شدند. ابتدا جذب نانو ذره در عدم حضور سیپروفلوکساسین مورد بررسی قرار گرفت سپس در حضور غلظت های مختلفی از دارو تحت شرایط استاندارد ثبت شد و نهایتا تفاضل حاصله از دو بررسی مختلف محاسبه گردید [7]. نمودار کالیبراسیونی بصورت خطی برای نانوذره طلا بدست آمد که توسط بیرلامبرت بیان گردیده است. معادله خطی بین غلظت دارو و میزان جذب ، بخوبی با معادله خطی بیر مطابقت دارد. ($y = 0.01.9x + 0.3037$) نمودار بدست آمده نمودار خطی بسیار دقیق با رابطه خوب بین شدت جذب و میزان غلظت در محدوده غلظتی وسیع در حدود ۵۰ تا ۳۰۰ میکروگرم بر لیتر با ضریب همبستگی ۰.۹۹۱ می باشد.



شکل ۲. نمودار شدت جذب و غلظت با ضریب همبستگی بالا

۳. نتیجه و بحث

همانطور که مورد بحث قرار گرفت نانوذرات در طول موج حدود ۵۰۰ نانومتر پیک جذبی مناسبی می‌دهد که این جذب در حضور داروی آنتی بیوتیکی سیپروفلوکساسین کاهش می‌یابد. میزان این کاهش به حضور دارو در محلول نسبت داده میشود.



شکل ۳. طیف های بدست آمده از حضور دارو و عدم حضور دارو و جذب نانوذرات طلا

۴. نتیجه گیری

از پروژه فوق نتیجه میگیریم که جذب نانوذره طلا در حضور غلظت های متفاوتی از سیپروفلوکساسین بطور قابل توجه کاهش یافته و روش اسپکتروفوتومتری به دلیل در دسترس بودن و مقرون به صرفه بودن انتخاب گردید.

۱۲. مراجع

- [1] Turkevich, J., Stevenson, P. C., Hillier, J., A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold., Discuss. Faraday. Soc. 1951, 11, 55–75.
- [2] S.D. Perrault; W.C.W. Chan, 2009. **Synthesis and Surface Modification of Highly Monodispersed, Spherical Gold Nanoparticles of 50-200 nm.** *J. Am. Chem. Soc.* 131 (47): 17042–17043.

[3] Virupaxappa, B.S., Shivaprasad, K.H., Latha, M.S., 2011. A simple method for the spectrophotometric determination of antibiotics in pharmaceuticals, Asian J. Res. Chem. 4: 1275-1277.

[4] S. Zeng, Y. Xia, W. Cheung, Y. Zhang, R. Hu, X. Dinh, H. Ho, K. Yong, 2012. Size dependence of Au NP-enhanced surface plasmon resonance based on differential phase measurement. Sensors and Actuators B: Chemical 176: 1128–1133.

[5] Rendina, George. Experimental Methods in Modern Biochemistry, 2009. W. B. Saunders Company: Philadelphia, PA. 1976. pp. 46-55.

[6] Bragio, D., Barnaby, R.J., Grossi, P., and Cugola, M.. A strategy for validation of bioanalytical methods. J. Pharm. Biomed. Anal. 15: 375-388 (1995).

[7] مجله علوم آزمایشگاهی، دوره پنجم (شماره ۲) پاییز و زمستان، ۱۳۹۰