مجله شیمی کوانتومی و اسپکتروسکوپی
۲:۵ (۱۳۹۱) ۴۷-۵۷
Journal of Quantum Chemistry and Spectroscopy (JQCS)

طراحی وساخت الکترود شناسایی سیپروفلوکساسین بر پایه مولکول های پلیمر قالبی (*MIP*)

افسانه امیری*، کبری لشگری، ناهید اطیابی، زهرا حسن زاده
دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکزی، دانشکده علوم پایه، گروه شیمی، تهران، ایران

تاریخ ثبت اولیه: ۱۳۹۰/۱۱/۱۶، تاریخ دریافت نسخه اصلاح شده: ۱۳۹۰/۱۲/۲۷، تاریخ پذیرش قطعی: ۱۳۹۱/۱/۱۸

چکیده

روش پلیمریزاسیون مولکول های نشاندار برای تهیه پلیمرهای حساس با جایگاه حساس نسبت به مولکول مورد نظر ساخته می شود. واکنش غیرکوالانسی بین الگو و مونومر از انعطاف پذیرترین روش ها برای انتخاب مونومر عاملی و مولکول الگو در میان روش های مختلف موجود است. با توجه به مشکل بالقوه ای که ممکن است از حضور کینولون ها در بدن انسان به وجود بیاید. استفاده از پلیمرهای قالبی در فارماکوکینتیک کینولون ها و همچنین در طراحی و توسعه داروسازی جدید در کنترل غلظت باقیمانده این آنتی بیوتیک در بدن انسان ضروری به نظر می رسد. در ساخت الکترود در پلیمر قالب مولکولی PVC.NaTPB (MIP) به عنوان افزودنی و نیترو فنیل اکتیل به عنوان پلاستی سایزر و تتراهیدرو فوران به عنوان حلال استفاده می کنیم. حسگر پتانسیومتری که در این تحقیق ساخته و بهینه سازی شده شیب پاسخ نرنستی ۶۲/۲۹ را در محدوده 10^{-7} – 10^{-3} مولار را نشان می دهد همچنین زمان پاسخ دهی سریع و کمتر از ۳۰ ثانیه است که در گستره اسیدیته ۵ تا ۹ عمل می کند و پاسخ آن در این گستره به اسیدیته وابسته نیست. این الکترود می تواند برای تعیین مقدار سیپروفلوکساسین در قرص ها و نمونه پلاسما مورد استفاده قرار می گیرد.

واژه های کلیدی: مولکول های قالبی، حسگر پتانسیومتری، سیپروفلوکساسین.

۱. مقدمه

قالب زنی مولکولی واژه ای است قدیمی که در بسیاری از متون قدیمی دیده می شود [۱]. عبارت کامل قالب زنی مولکولی برای اولین بار در متون مربوط به سال ۱۹۸۰ مشاهده شد [۲]. از آن پس این عبارت عمومیت بیشتری یافت و عبارت قالب زنی مولکولی همراه با عبارت پلیمرهای قالب مولکولی امروزه به صورت وسیع مورد استفاده قرار گرفته و این عبارت به عنوان اصطلاحی استاندارد در این زمینه به کار می رود [۳]. قالب مولکولی در پلیمر ها، تکنیکی است که طی فرآیند پلیمریزاسیون، ساختار هایی ماکروسکوپی تهیه می شوند که دارای مکان های ویژه برای بر هم کنش با یک مولکول معین هستند. ابتدا مولکول هدف با مونومر قابل پلیمریزاسیون (دارای

* **عهده دار مکاتبات:** افسانه امیری
نشانی: دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی دانشکده علوم پایه، گروه شیمی
تلفن: ۰۹۱۹۲۱۵۵۰۹۴ **پست الکترونیکی:** afsaamiri@gmail.com

پیوند دو گانه کربن –کربن) که در یک سر خود دارای گروه عاملی توانا برای برهم کنش با مولکول هدف است تشکیل کمپلکس داده و سپس این کمپلکس در حضور مقادیر زیادی از یک مونومر اتصال دهنده، کو پلیمر شده و بنابراین شکل کمپلکس در پلیمر تثبیت می شود. با خروج مولکول هدف از پلیمر مکان هایی ایجاد خواهد شد که از نظر اندازه و جهت گیری گروه های عاملی دقیقا مکمل مولکول هدف است [۴].

۱-۱. عوامل موثر بر ساخت پلیمرهای قالب مولکولی

۱-۱-۱. انتخاب آنالیت هدف

آنالیت هدف اهمیت بسیاری دارد. از آن جهت که سازماندهی گروه های عاملی متعلق به مونومرهای عاملی را برعهده دارد. البته همه آنالیت های هدف باید تحت شرایط پلیمریزاسیون، از نظر شیمیایی بی اثر باشند.

در واقع مولکول هدف در این فرآیند دو نقش ارائه می کند:

به عنوان پرکننده فضای خالی سه بعدی که نسبت به حفرات پلیمر مکمل است و به عنوان برهم کنش کننده مکمل برنامه ریزی شده بین گروه ها و مونومر عاملی در طی پلیمریزاسیون.

۱-۱-۲. مونومرهای عاملی

مونومرهای عاملی مسئول برهم کنش های نقاط اتصال نقش زده شده در MIP هستند و معمولا در نسبت های مولی بیشتری در مقایسه با آنالیت هدف استفاده می شوند. در نقش زدن غیر کوالانسی این نکته که مشخصه آنالیت هدف با مشخصه مونومر عاملی مکمل باشد، خیلی مهم است. مثلا پیوند هیدروژنی دهنده با پیوند هیدروژنی گیرنده در افزایش کمپلکس تشکیل شده و تاثیرات نقش زدن اثر به سزایی دارد.

۱-۱-۳. شبکه ساز

شبکه ساز، ساختار ماتریکس پلیمر را در پلیمرهای قالب مولکولی کنترل می کند و نقاط اتصال پایداری را در نقش زدن ایجاد می نماید که نهایتا پایداری مکانیکی خوبی به ماتریکس پلیمر می دهد . اتیلن گلیکول دی متا اکریلات (EGDMA)، تری متیل پروپان و تری متیل اکریلات شبکه سازهای عمومی قابل استفاده اند. اخیرا چندین نوع دیگر شبکه ساز هم به وجود آمده است. بنابراین اکریلات ۳ یا ۴ عاملی شبکه سازها مثل پنتا اریترول برای تهیه MIP نسبت به پپتید گزینش پذیر تهیه شده اند. علاوه بر شبکه سازهای غیر قطبی که قطبیت ضعیفی در طبیعت دارند، شبکه سازهای دارای گروه عاملی موثر نیز بررسی شدند [۵].

۱-۱-٤. حلال

حلال نقش مهمی در شکل گیری ساختار حفرات پلیمر قالب مولکولی، فرآیندهای قالب زدن، به ویژه در روش خود تجمعی برقدرت برهم کنش های غیرکوالانسی پلیمریزاسیون ایفا می کند. نقش حلال گرد آوری اجزا و عوامل پلیمریزاسیون است. حلال مونومر عاملی، مولکول هدف، شبکه ساز و آغاز کننده را در یک فاز جمع آوری می کند و به عنوان دومین عامل مهم در ایجاد حفرات در پلیمر های درشت حفره محسوب می شود.

انتخاب نوع حلال مناسب اهمیت به سزایی دارد، چرا که باید مونومرها را حل نموده و حتی در نقش زدن غیر کوالانسی مانع برهم کنش های بین مولکول های قالب شده و مونومر های عاملی نگردد. حلال همچنین به عنوان مهم ترین عامل تعیین کننده ساختار و شکل نهایی پلیمر است [۶]. معمولا حلال های غیر قطبی یا آپروتیک (مثلا تولوئن) ترجیح داده می شود. بعضی حلال ها نیز ایجاد پیوند های هیدروژنی می نمایند، زیرا احتمال تشکیل کمپلکس مونومر عاملی و مولکول هدف افزایش می یابد.

۱-۱-۵. آغازگرها

بسیاری از آغازگر های شیمیایی با خصوصیات شیمیایی مختلف به عنوان منبع رادیکال در رادیکال های آزاد در پلیمریزاسیون مورد استفاده قرار می گیرند. سرعت تجزیه رادیکال های آغازگر می توانند به چندین طریق شامل گرما، نور و توسط روش های شیمیایی/ الکتروشیمیایی رها شده و کنترل شوند [۷]. اگر آنالیت هدف از لحاظ نور شیمیایی یا گرمایی ناپایدار باشند، باید از آغازکننده هایی که جاذب نوری نیستند استفاده نمود. چنانچه کمپلکس توسط پیوند هیدروژنی ایجاد شود، دمای پلیمریزاسیون

پایین تری مورد نیاز است [۸].

گاز اکسیژن سرعت رادیکال های آزاد را در سنتز و تشکیل پلیمر کاهش می دهد، بنابراین برای افزایش سرعت انتشار مونومر ها باید قبل از تکثیر شدن اکسیژن در محلول مونومر ها، محلول را توسط گاز نیتروژن یا گاز بی اثر آرگون اکسیژن زدایی نمود [۹].

۱-۲. خواص پلیمرهای قالب مولکولی

۱. مقاومت در مقابل ضربات مکانیکی، فشار بالا و درجه حرارت بالا
۲. پایداری شیمیایی بالا در مقابل اسیدها، بازها و حلال های آلی
۳. توانایی نگهداری در مدت زمان بالا
۴. دارای ظرفیت جذب ۰/۱ تا ۱ میلی گرم از مولکول هدف به ازای هر گرم از پلیمر

۱-۳. تکنولوژی قالب زنی مولکولی

MIP توسط مخلوطی از مولکول نمونه همراه با مونومر های عاملی و مونومر های اتصال دهنده عرضی و یک آغازگر رادیکالی در یک حلال مناسب که مهمترین آنها حلال های غیر قطبی هستند تهیه می شود. سپس برای آغاز این پلیمریزاسیون به آن یک نور UV تابانده می شود یا به این مخلوط گرما داده می شود [۱۰].

ایجاد قالب هایی در ابعاد آنگستروم و یا نانومتر در داخل مواد مختلف، با تکنیک های متنوع و برای مولکول های مختلف شامل یکسری از دانش ها و علوم مرتبطی است که در اصطلاح قالب زنی مولکولی نامیده می شود. در این میان تکنیک قالب مولکولی از طریق پلیمر های سه بعدی با ساختار سخت که دارای اتصالات عرضی هستند بیش از بقیه موارد امروزه گسترش پیدا کرده است و روز به روز هم توسعه پیدا می کند. این پلیمر ها به پلیمر های قالب مولکولی معروف هستند و در اصطلاح MIP نامیده می شوند. تاکنون ساخت قالب برای انواع متنوعی از مولکول های آلی، معدنی، کاتیون ها، اسیدهای نوکلئیک، باکتری ها، ویروس ها، و غیره طراحی و ساخته شده و به تفصیل مورد بررسی قرار گرفته است و در زمینه های مختلفی مانند جداسازی، استخراج، حسگرها، کاتالیزور و غیره مورد استفاده قرار گرفته است.

۱-٤. شبکه های پلیمرهای NIP

در اغلب سیستم های قالب زده، توده پلیمر از دو مونومر عاملی و شبکه ساز تشکیل شده است. که بر خلاف MIP حاوی آنالیت هدف نیستند. در ابتدا کمپلکس بین مولکولی که حک می شود و مونومر های عاملی که ساختار تشخیصی را فراهم می آورند، به وجود می آید. در هر مورد تشکیل کمپلکس باید برگشت پذیر باشد تا قادر به استخراج و شکستن آنالیت گردد. این کمپلکس با کوپلیمریزاسیون شبکه ساز، آغازگر و پروژن با روش پلیمریزاسیون رادیکالی تشکیل می شود. انتخاب شرایط و روش آغازی بسته به حساسیت آنالیت، دما و تابش نور شیمیایی است. پلیمری که تولید می شود اغلب جامد مونولیت است. برای قالب شدن غیر کووالانسی و خارج ساختن آنالیت از پلیمر اغلب حلال هایی مانند اتانول استفاده می شود [۱۲-۱۱].

۱-۵. مزایا و معایب تکنیک قالب مولکولی

• یکی از مزایای پلیمر های قالب مولکولی آن است که این پلیمر قالب مولکولی می تواند از ترکیبات متضاد ساخته شود که برای استفاده از آنتی بادی ها به کار می رود.

• مزیت دیگر آن پایداری طولانی آن و مقاومت نسبت به محیط هایی با pH بالا یا پایین است.

در طی دو دهه اخیر MIP ها توجه دانشمندان را در زمینه پیشرفت حسگرهای شیمیایی و بیولوژیکی جلب نموده است. بعضی از محققین سعی دارند که سیستم های شناسایی مولکولی مصنوعی را در اشکال آنتی بادی ها بهبود بخشند و MIP از پتانسیل خوبی برای این کار برخوردار است. در طی سال های اخیر MIP به عنوان روش تجزیه ای مفید در تولید عناصر تشخیص، با تقلیدی از گیرنده های بیولوژیکی به کار رفته است.

MIP به علت هزینه پایین در مواد اولیه نسبت به آنزیم ها و پایداری گرمایی و مکانیکی بالا در درجه حرارت های بالا، کاربرد های گوناگونی در حلال های آلی دارد. مواد سنتزی MIP به آسانی قابل حمل هستند و تحقیقات نشان داده شده که خواص تشخیصی آنها بعد از گذشت زمان های طولانی بدون از دست دادن گزینش پذیر، میکروراکتور، غشاهای عبوری و کاتالیز ها کاربرد دارند. عمر

طولانی و قدرتمندی پلیمر های قالب مولکولی سبب استفاده از آنها در کاربردهایی چون علم جداسازی، کاتالیزور در دمای صنعتی و تشخیص های پزشکی گردیده است. در اصل از هر ترکیبی می توان در پلیمر های قالب مولکولی استفاده کرد [۱۴-۱۳].

اگر چه تا به حال فقط تعداد محدودی از ترکیبات در MIP استفاده شدند. از عوامل مهم برای بدست آوردن MIP با گزینش پذیری بالا ایجاد نوعی از ساختاری است که با آنالیت هدف سازگار باشد. پلیمر های قالب شده در تئوری می توانند برای هر نوعی از مواد تهیه شوند. اگر چه موانعی مثل استفاده از حلال های آلی هنگام سنتز، عدم رسیدن به ویژه گزینی گیرنده های طبیعی، نامحلول بودن پلیمر ها در آب، عدم کنترل کافی بر شکل گیری مکان ها در هنگام سنتز و مسایلی از این قبیل کاربرد گسترده این پلیمر ها را محدود ساخته است [۱۵].

۱-۶. پتانسیومتری (*Potentiometry*)

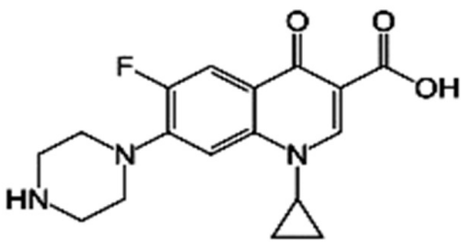
روش های پتانسیومتری تجزیه براساس اندازه گیری پتانسیل سلول های الکتروشیمیایی در غیاب جریان های قابل توجه می باشد. گرچه از آغاز قرن بیستم، تکنیک های پتانسیومتری برای تشخیص نقاط پایانی در روش های تیتراسیون تجزیه ای بکار گرفته شده اند. با این حال در روش های جدیدتر، غلظت یون ها به طور مستقیم از پتانسیل یک الکترود غشایی یون گزین (Ion-selective membrane electrodes) به دست می آید. این گونه الکترود ها به طور نسبی عاری از مزاحم بوده و وسیله راحت و سریع را برای تخمین کمی تعداد بی شماری از آنیون ها و کاتیون ها در اختیار می گذارد. وسایل لازم برای پتانسیومتری ساده و ارزان است و عبارت از یک الکترود مرجع و یک الکترود نشان دهنده و یک وسیله اندازه گیری پتانسیل است.

همان طوری که می دانیم در اندازه گیری های الکتروشیمیایی تنها می توان پتانسیل نسبی پیل را اندازه گیری نمود و هیچ روشی برای تعیین قدر مطلق پتانسیل یک الکترود وجود ندارد، زیرا تمام وسایل اندازه گیری ولتاژ، تنها اختلاف پتانسیل را تعیین می کنند. البته این مسئله مشکل جدی نیست زیرا پتانسیل های نسبی نیم سل ها که نسبت به یک الکترود مرجع مشترک اندازه گیری می شود نیز به همان اندازه سود مند هستند. برای به دست آوردن فهرست مفیدی از پتانسیل های نسبی الکترود ها یا نیم سل ها لازم است، الکترود مرجع دقیقاً تعریف شده ای وجود داشته باشد که مورد پذیرش تمام جامعه شیمیدان ها قرار گیرد. الکترود هیدروژن استاندارد و یا الکترود هیدروژن نرمال یک چنین سلولی است [۱۶]. پتانسیومتری براساس ایجاد اختلاف پتانسیل مابین غشای قرار داده شده بین دو محلول شامل گونه های باردار با فعالیت های متفاوت استوار است. به منظور تولید حسگر های MIP توجه به این نکته مهم است که ایجاد پتانسیل غشایی نیاز به استخراج مولکول هدف از غشا ندارد، و این یک مزیت محسوب می شود زیرا استخراج مولکول هدف مکان های مشخصی را بر جای می گذارد که آماده پیوند زنی است. این امر اغلب یک منبع غیر قابل اطمینان در تشخیص یا فاکتور محدود کننده حساسیت می باشد. جنبه ممتاز دیگر این روش این است که لازم نیست گونه ها به درون غشا نفوذ کنند بنابراین محدودیت های اندازه در مورد ترکیبات هدف وجود ندارد [۱۷].

۱-۷. سیپرو فلوکساسین

سیپرو فلوکساسین (شکل۱) یک آنتی بیوتیک طیف خارجی است که در برابر گرم مثبت و منفی باکتری ها فعال است.

این دارو با جلوگیری از زنجیره DNA، یک نوع دو ایزومری و نوع پنج آن عمل می کند. برای جدا کردن DNA باکتریایی، آنزیم لازم است. در نتیجه جلوگیری از تقسیم سلولی، این مکانیسم می تواند بر دفاع سلولی پستانداران، نیز اثر بگذارد (سیستم دفاع سلولی در پستانداران را مختل نماید). خصوصا برخی مشابه های خانواده ی این دارو، به تنهایی در برابر عوامل باکتریایی و همچنین انواع تومور بسیار فعال هستند.



شکل ۱. ساختار شیمیایی سیپروفلوکساسین.

۲. مواد و روش ها

۲-۱. مواد شیمیایی مورد استفاده :

اتیلن گلیکول دی متا اکریلات

EGDMA (Ethylen Glycol Di Meta Acrylat)

FW= 164.21 g/mol $C_{10}H_{14}O_4$

متا اکریلیک اسید MAA (Meta Acrylic Acid)

FW = 86.09 g/mol $C_4H_6O_2$

آزوبیس ایزو بوتیرو نیتریل AIBN (Azo Bis Iso Butironitryl)

FW = 164.21 g/mol $C_8H_{12}N_4$

سیپروفلوکساسین (Ciprofloxacin)

FW = 331.346 g/mol $C_{17}H_{18}FN_3O_3$

تترا هیدرو فوران THF (Tetrahydrofuran) From : Merck

FW = 72.11 g/mol C_4H_8O

استو نیتریل AC (Acetonitril) From : Romil

FW = 41.05 g/mol C_2H_3N

پلی وینیل کلراید PVC (Polyvinil Chloride) From : Merck

با وزن مولکولی بالا n $(C_2H_3CL)_n$

دی بوتیل فتالات DBP (Dibutyl phthalate)

FW = 278.34 g/mol $C_{16}H_{22}O_4$

دی اکتیل فتالات DOP (Dioctyl phthalate)

FW = 390.56 g/mol $C_{24}H_{38}O_4$

سدیم تترافنیل بورات NaTPB (Sodium Tetraphenyl Borate)

FW = 342.22g/mol $(C_6H_5)_4BNa$

اولیک اسید OA (Oleic Acid)

FW = 282.46 g/mol $C_{18}H_{34}O$

نیترو بنزن NB (Nitrobenzene)

FW =126.06 g/mol $C_6H_5NO_2$

۲-۲. مراحل سنتز MIP

در سنتز MIP از متااکریلیک اسید (MAA) به عنوان مونومر عاملی، اتیلن گلیکول دی متا اکریلات (EDMA) به عنوان مونومر شبکه ساز، ۲-۲- آزوبیس ایزو بوتیرونیتریل (AIBN) به عنوان آغازگر، متانول/آب به عنوان حلال و سیپرو فلوکساسین به عنوان مولکول هدف استفاده شد. برای سنتز MIP مقدار ۰/۳۳۱ گرم (1mmol) از سیپروفلوکساسین را درون یک لوله آزمایش می ریزیم و به آن ۱۰ میلی لیتر متانول /آب (به نسبت حجمی ۷ به ۳) اضافه کرده و خوب تکان می دهیم تا دارو حل شود اگر حل نشد به مدت ۱۰ دقیقه در اولتراسونیک قرار داده، سپس مقدار ۶میلی مول از MAA درون لوله آزمایش ریخته و مدت ۱۵ دقیقه زمان داده می شود تا تعادل در سیستم بر قرار شود و در مرحله بعد به محلول حاصل ۳۰ میلی مول EGDMA افزوده می شود. محلول حاصل را به مدت ۱۰ دقیقه در اولتراسونیک قرار داده می شود تا برهم کنش های مولکولی به خوبی انجام شود. در مرحله بعد محلول حاصل را ۱۵ دقیقه با گاز نیتروژن اکسیژن زدایی شد. زیرا با توجه به مکانیسم پلیمریزاسیون که به صورت پلیمریزاسیون رادیکال آزاد است وجود اکسیژن محلول، رادیکال های آزاد ایجاد شده توسط آغازگر را از بین می برد و پلیمریزاسیون صورت نمی گیرد و پس از آن مقدار ۰/۰۸ گرم AIBN به آن افزوده می شود. پس از بستن کامل درب لوله آزمایش آن را با پارا فیلم مهر وموم کرده و محلول حاصل را برای مدت ۲۴ ساعت در دمای ۶۳ درجه سانتی گراد درون حمام آبی قرار داده شود تا پلیمریزاسیون صورت گیرد [۱۸].

۲-۳. مراحل سنتز NIP

در سنتز NIP مقادیر مونومر عاملی، شبکه ساز و آغاز گر و حلال مانند MIP است با این تفاوت که از مولکول هدف در سیستم استفاده نمی شود و شرایط سنتز دقیقا شبیه به شرایط سنتز MIP است [۲۰].

۲-٤. شستشوی پلیمر های قالب مولکولی

پس از سنتز پلیمر تهیه شده (MIP) بایستی برای خارج ساختن مولکول هدف شستشو می شود. پلیمر بدست آمده را ۲۴ ساعت در ۳۰ میلی لیتر متانول قرار داده بعد از این مرحله پلیمر را خشک کرده و آنرا با هاون به ذرات ریزی در حدود ۲۸-۳۲ میکرو خرد کرده و روی کاغذ صافی ریخته و با تترا هیدرو فوران و مخلوط حلال های متانول – اسید استیک – TFA (80:1:19 v/v) شستشو می دهیم. سپس MIP بدست آمده را در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد خشک می کنیم. مراحل شستشو NIP و MIP یکسان است.

۲-۵. بررسی ساختار با استفاده از FT-IR

طیف FT-IR پلیمر های قالب مولکولی (MIP) و NIP و Blank در شکل های ۲ تا ۴ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می شود هر دو پلیمر (MIP و NIP) دارای طیف مشابهی هستند که نشان دهنده ی شباهت در ساختار اولیه آنها است.

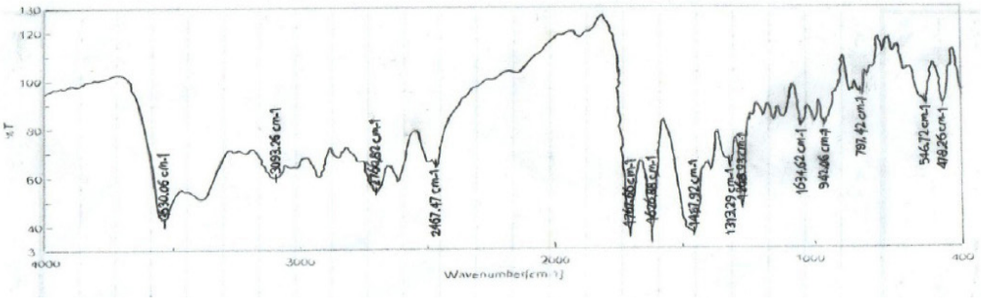
طیف MIP، FT-IR و NIP حاصل از پلیمریزاسیون رسوبی و همچنین طیف FT-IR سیپرو فلوکساسین در شکل های بالا آمده است. با توجه به تشابه ساختار پایه ای هر دو ترکیب، طیف FT-IR آنها نیز تشابه زیادی با هم دارد. از این طیف ها می توان نتیجه گرفت که:

• از مقایسه ی ابتدایی طیف MIP و سیپروفلوکساسین می توان به راحتی دریافت که MIP به خوبی شستشو داده شده و مولکول هدف (سیپرو فلوکساسین) کاملا از جایگاه های اتصال جدا و خارج شده است.

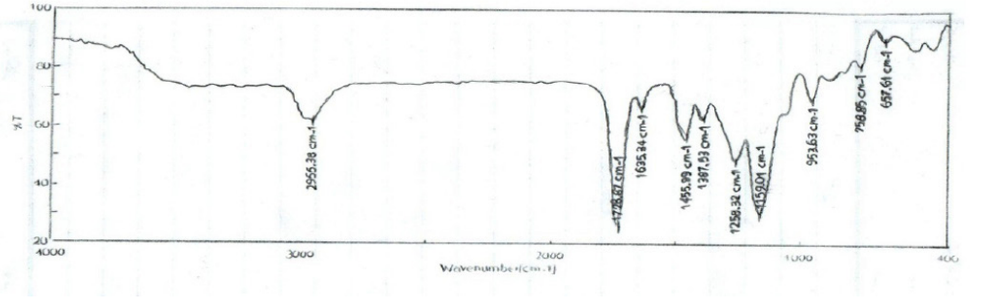
• از مقایسه طیف های MIP و NIP نیز می توان به راحتی دریافت که گروه های عاملی مشابهی دارند در نتیجه MIP مولکول هدفی به همراه نداشته و عاری از سیپروفلوکساسین است. در نتیجه شستشو به خوبی انجام شده است.

۲-۶. ساخت و تهیه الکترود های کار

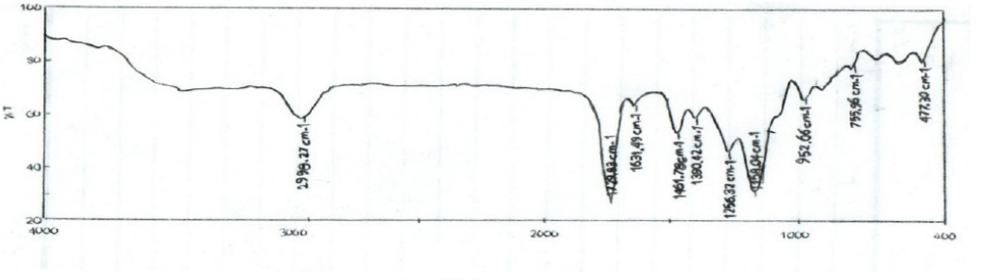
برای ساخت الکترود از پلیمر قالب مولکولی (MIP), PVC, NaTPB



شکل۲. طیف FT-IR از سیپرو فلوکساسین.



شکل۳. طیف FT-IR از MIP.



شکل٤. طیف FT-IR از NIP.

به عنوان افزودنی و نیترو فنیل اکتیل (2-Nitro phenyl octyl) به عنوان پلاستی سایزر و تتراهیدروفوران(THF) به عنوان حلال استفاده می کنیم. به این ترتیب که ابتدا NPO 0.060 gr + NaTPB 0.004 gr + PVC 0.031 gr + MiP 0.005 gr را در THF 2 cc حل کرده و به مدت ۱۵ الی ۲۰ دقیقه محلول را هم می زنیم. تا محلول حالت ژله ای پیدا کند (البته نباید خیلی هم چگال شود). محلول حاصل با استفاده از خاصیت ویسکوزیته به لوله پیرکسی به قطر ۵ mm و طول ۳ cm الصاق می گردد . سپس به مدت ۱۲ الی ۱۶ ساعت در دمای اتاق قرار داده می شود تا غشاء ساخته شده خشک شود.

۲-۷. آماده سازی الکترود

پس از خشک شدن غشا، محلول 1×10^{-3} mol سیپروفلوکسا سین در درون لوله پیرکس ریخته می شود و ۲۴ ساعت به محلول داخلی و غشاء زمان داده می شود تا به تعادل برسند.

۲-۸. اندازه گیری نیروی الکترو موتوری

اندازه گیری emf برای الکترود غشایی توسط مجموعه سل زیر :

Ref . elect . || test solution | MIP membrance | internal solution | internal Ref. elect

برای اندازه گیری پتانسیل ابتدا محلول 1×10^{-3} تا 1×10^{-7} mol سیپروفلوکساسین را تهیه و از رقیق به غلیظ به عنوان محلول خارجی استفاده کرده و اندازه گیری ها در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد انجام می شود.

بعضی مواقع پتانسیل پتانسیومتر ثابت نمی شود و دائم نوسان می کند که می تواند به علت عدم به تعادل رسیدن غشا باشد.

۳. نتایج و بحث

۳-۱. بررسی اثر ترکیب درصد غشاء بر پاسخ سیپروفلوکساسین

در آزمایشات اولیه دریافت شد که الکترود پتانسیومتری بر پایه MIP، بعد از آماده سازی الکترود در محلول 1×10^{-3} مولار سیپروفلوکساسین، پتانسیل پایدار در محلول حاوی سیپرو فلوکساسین تولید می کند. این الکترود ها گزینش پذیری بالایی برای سیپروفلوکساسین نشان می دهند و این موضوع نشان دهنده گزینش پذیری بالای MIP برای سیپروفلوکساسین نسبت به سایر یون ها است.

آزمایشات مکرر نشان می دهد که خواص و ویژگی های غشا از قبیل پایداری شیمیایی غشاء، زمان پاسخ دهی، طول عمر و گزینش پذیری بستگی به غشاء دارد، که به وسیله نسبت های متفاوتی از مواد افزونی، پلاستی سایزر ها، PVC، MIP بررسی شده است و مطالعات اولیه نشان می دهد که غشایی با ساختار 4: 60: 5: 31 از PVC : MIP : Nitro phenyl octyl :NaTPB بهترین پاسخ را نشان می دهد. جدول۱ تعدادی از این اندازه گیری ها و آزمایش ها را نشان می دهد.

زمان لازم برای به تعادل رسیدن غشاء در حضور محلول 1×10^{-3} مولار سیپرو فلوکساسین و پاسخ سیپروفلوکساسین ۲۴ مشاهده شده است. پاسخ emf در غلظت های مختلف سیپروفلوکساسین در شکل۵ به ترتیب برای گستره خطی 1×10^{-7} تا 1×10^{-3} مولار با شیب ۲۹/۶۲ میلی ولت بر دهگان گزارش شده است. الکترود پتانسیومتری به NIP (ردیف۲۶) پاسخ غیر خطی نشان می دهد که در جدول۱ آمده است، از این جدول می توان فهمید که شیب در حد بسیار کم و حدود ۵/۸ میلی ولت بر دهگان است. الکترود پتانسیومتری ردیف ۲۷ نیز مربوط به الکترودی ساخته شده با همان شرایط اما بدون حضور MIP و NIP است، که اصطلاحا به آن الکترود Blank گفته می شود، که از جدول۱ و نمودار شکل۵ شیب بسیار کم آن قابل رویت است که حدودا ۱/۱ است. R^2 منحنی کالیبراسیون برای الکترود ردیف ۲۵ بدست آمده برابر $R^2 = ۰/۹۹۳$ است.

۳-۲. تاثیر غلظت محلول داخلی در پاسخ الکترود

الکترود پیشنهادی در غلظت های 1×10^{-3} و 1×10^{-4} مولار مورد بررسی قرار گرفت. همانطور که در شکل۶ مشاهده می شود محلول داخلی 1×10^{-3} مولار نتایج مطلوب تری را نشان می دهد.

۳-۳. منحنی کالیبراسیون (استاندارد)

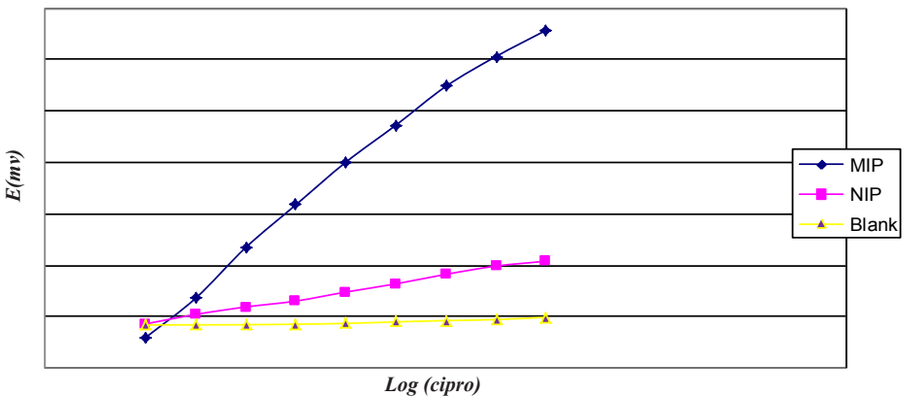
پاسخ پتانسیل غشاء به تغییرات غلظت سیپروفلوکساسین در محدوده 1×10^{-3} تا 1×10^{-7} مولار قابل قبول است و همان طور که از منحنی کالیبراسیون (شکل۷) مشاهده می شود در شیب ۲۸/۶۲ میلی ولت بر دهگان را نشان می دهد .

جدول۱. ترکیب درصد غشا سیپروفلوکساسین.

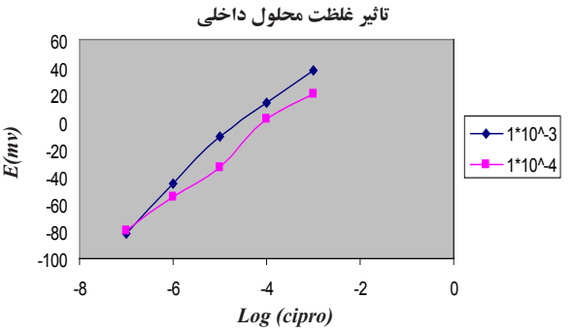
Membrane NO	polymer (mg)	PVC (mg)	NB (mg)	AP (mg)	DOP (mg)	DBP (mg)	NPO (mg)	NaTPB (mg)	OA (mg)	SLOP (mv/decode)	
1	5	30	60	_	_	_	_	5	_	21.25	
2	5	29	58	_	_	_	_	8	_	20.9	
3	7	30	60	_	_	_	_	_	3	25.27	
4	5	30	60	_	_	_	_	_	5	24.97	
5	3	29	59	_	_	_	_	_	9	25.85	
6	3	30.2	_	61	_	_	_	6	_	24.77	
7	5	30.2	_	60	_	_	_	5.1	_	22.12	
8	4	30	_	60	_	_	_	6	_	25.7	
9	3.2	30.3	_	60.2	_	_	_	_	6.4	24.85	
10	5.1	30.3	_	60.2	_	_	_	_	4.6	25.5	
11	4.2	30	_	60	_	_	_	_	6.4	23.46	
12	3	30	_	_	63	_	_	_	4	25.4	
13	5	30	_	_	60	_	_	_	5	25.32	
14	2	30	_	_	60	_	_	_	8	26.52	
15	4	30	_	_	60	_	_	_	6	25	
16	6	30.5	_	_	_	61	_	3	_	26	
17	5	30.5	_	_	_	62.4	_	3	_	23.15	
18	4.1	30	_	_	_	60	_	_	6	23.1	
19	5	30	_	_	_	60.4	_	_	5	22.37	
20	6.1	30	_	_	_	60	_	_	4	26.22	
21	4	29.5	_	_	_	60.9	_	_	6	26.45	
22	4	31	_	_	_	_	60	_	5	29.25	
23	4	29.5	_	_	_	_	58.5	_	8	27.05	
24	5	30	_	_	_	_	60	_	5	28.17	
25	5	31	_	_	_	_	60	4	_	29.62	*
26	5	31	_	_	_	_	60	4	_	5.8	**
27	_	31	_	_	_	_	60	4	_	1.1	***

*ترکیب درصد بهینه (MIP), **NIP , *** Blank

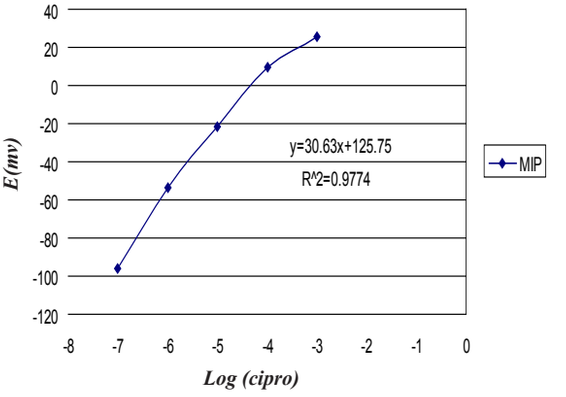
منحنی کالیبراسیون بر پایه MIP:NIP:Blank.



شکل۵. منحنی کالیبراسیون الکترود سیپروفلوکساسین(با ترکیب در صد بهینه) بر پایه NIP، MIP و Blank.



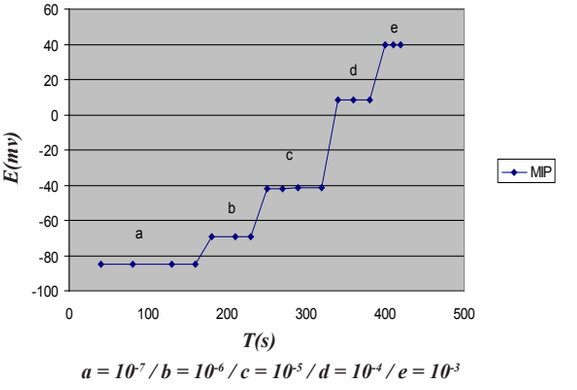
شکل٦. منحنی بررسی اثر غلظت های مختلف محلول داخلی.



شکل۷. منحنی کالیبراسیون برای الکترود با ترکیب درصد بهینه.

۳-٤. زمان پاسخ دهی

زمان پاسخ دهی عبارت است از مدت زمانی که طول می کشد تا پتانسیل سل به مقدار ۹۰% مقدار پتانسیل تعادلی نهایی برسد هنگامی که غلظت ده برابر تغییر می کند. در شکل۸ نتیجه پاسخ های زمان پتانسیل به دست آمده برای الکترود براساس MIP را نشان می دهد

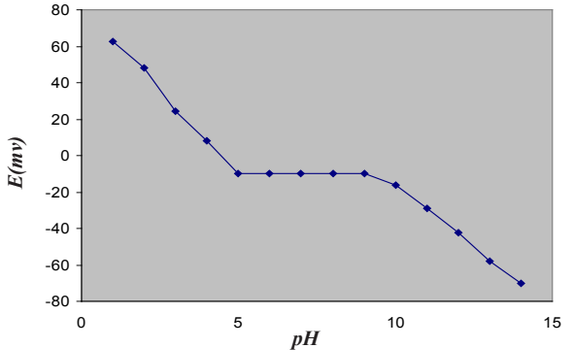


شکل۸. بررسی زمان پاسخ دهی واکنش برای الکترود با تغییر غلظت های سیپروفلوکساسین.

که براساس تغییر غلظت سیپروفلوکساسین از ۱×۱۰^{-۳} تا ۱×۱۰^{-۷} مولار است. این قضیه نشانگر آن است که پاسخ پتانسیل الکترود نسبتا سریع است.

۳-۵. اثر pH بر پاسخ دهی الکترود

پلیمر های قالب مولکولی روشی برای طراحی سایت های اتصال مانند آنتی بادی های مصنوعی هستند. تشخیص اتصالات ویژه بین مولکول هدف و MIP از طریق مونومر های عاملی امکان پذیر است. در این تحقیق وابستگی الکترود غشایی به pH در محدوده pH=۱ تا pH=۱۴ در غلظت های ۱×۱۰^{-۳} تا ۱×۱۰^{-۷} مولار سیپروفلوکساسین آزمایش شد، تنظیم pH با اسید نیتریک و محلول هیدروکسید سدیم انجام می شود، همانطور که در شکل۹ مشاهده می شود در محدوده pH=۵ تا pH=۹ مقدار پتانسیل تقریبا ثابت است و تغییر نکرده است ولی در pH های اسیدی و بازی مقدار پتانسیل تغییر می کند. در نتیجه این محدوده را باید به عنوان محدوده ی pH مناسب برای عملکرد الکترود در نظر بگیریم.



شکل۹. اثر pH بر واکنش برای الکترود بهینه.

۳-٦. بررسی اثر مزاحمت ها

به منظور بررسی گزینش پذیری حسگر، آزمایش هایی با MIP براساس الکترودهای پتانسیومتری در شرایط مشخص برای برخی از داروها با ساختار مشابه سیپروفلوکساسین و یون ها انجام شد. اثر یون های مزاحم بر پاسخ حسگر معمولا با اصلاح ضرایب گزینش پذیری بیان می شود. در واقع پاسخ نسبی حسگر اصلاح شده برای داروی اولیه در مقابل سایر داروهای موجود در محلول است. ضرایب انتخاب پذیری سیپروفلوکساسین با روش پتانسیل همتا شده محاسبه گردید.

هیچ یک از اجزا برای تعیین مقدار سیپروفلوکساسین با حسگر MIP مزاحمتی ایجاد نکرده است.

غلظت های مشخصی از گونه مورد نظر(A) به عنوان محلول مرجع آماده می شود و پتانسیل آنها اندازه گیری می گردد. در آزمایش دیگر به قدری از گونه های مزاحم (B) به محلول مرجع مشخص شده، به طور یکسان اضافه می شوند تا زمانی که پتانسیل دوم برابر پتانسیل محلول اول پس از افزایش گونه اولیه گردد. ضریب گزینش پذیری از روی نسبت نتایج فعالیت گونه اولیه به گونه مزاحم $K_{AB}= a_A/ - a_A /a_B$ محاسبه می گردد. شرایط آزمایش و نتایج در جدول۲ آمده است:

جدول۲. ضرایب انتخاب پذیری دارو ها و کاتیون های مختلف نسبت به غشا حسگر.

ردیف	مزاحم	$Log K^{pot}_{AB}$
1	نوفلوکساسین $(C_{16}H_{18}FN_3O_3)$	-4.17
2	افلوکساسین $(C_{18}H_{20}FN_3O_4)$	-3.66
3	Cu^{2+}	-2.89
4	Mg^{2+}	-4.21
5	Na^{2+}	-3.47

۳-۷. صحت اندازه گیری الکترود

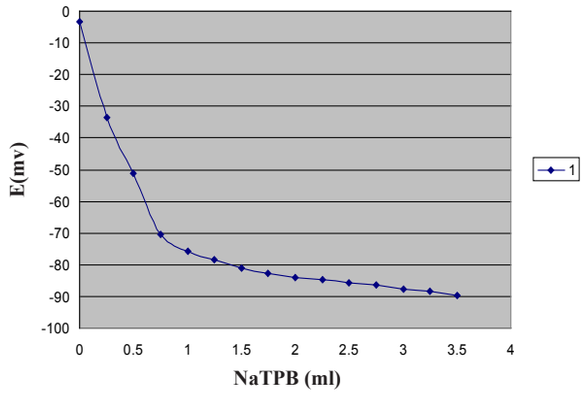
صحت اندازه گیری پتانسیومتری با محاسبه درصد بازیابی، غلظت مشخصی از سیپروفلوکساسین (1×10^{-3} مولار) بررسی شده است. درصد میانگین بازیابی بدست آمده با استفاده از منحنی کالیبراسیون ۹۵/۴۸ درصد است همچنین خطای مطلق آن ۴/۹۸ و درصد خطای نسبی آن برابر ۵/۳۵ درصد است.

۳-۸. تکرار پذیری

حساسیت بالای روش تجزیه ای معمولا با تکرار پذیری خوب همراه می باشد. این کار تجزیه ای با تکرار ۸ اندازه گیری پتانسیومتری محلول سیپروفلوکساسین 1×10^{-3} مولار ارزیابی شده است، دقت محاسبه روش برحسب درصد انحراف استاندارد نسبی بیان شد که برابر RSD =۰/۷ است.

۳-۹. بررسی منحنی تیتراسیون

باید به این نکته اشاره شود که الکترودهای غشایی انتخابی سیپروفلوکساسین، نه تنها می توانند به صورت مستقیم برای اندازه گیری یون های سیپروفلوکساسین استفاده شوند بلکه می توانند کاربردهای پتانسیلی در زمینه های مختلف نیز داشته باشند. ما الکترود MIP را به عنوان شناساگر در تیتراسیون پتانسیومتریک مقدار ۲۵ میلی لیتر محلول 1×10^{-3} مولار سیپروفلوکساسین در برابر محلول 1×10^{-1} مولار NaTPB به کار بردیم. منحنی تیتراسیون بدست آمده در شکل۱۰ نشان داده شده است.



شکل۱۰. منحنی تیتراسیون برای 25ml محلول سیپروفلوکساسین با NaTPB 0/1 M.

۳-۱۰. آنالیز قرص های سیپروفلوکساسین

۴ قرص با اندازه مشخص را در هاون خوب ساییده و طبق جدول۳ مخلوط می کنیم. سپس یک قسمت از پودر را که وزنی برابر با یک قرص دارد، برداشته و به یک بالن ۵۰۰ میلی لیتری منتقل کرده، با آب به حجم رسانده و به مدت ۲۰ دقیقه داخل Ultrasonic گذاشته تا سیپروفلوکساسین کاملا حل شود، حال محلول آبی را صاف کرده تا اگر ناخالصی وجود داشته باشد جدا شود و قسمت روی صافی را کنار گذاشته، سپس ۱۰ سی سی از محلول صاف شده را به بالن ۵۰ سی سی منتقل کرده و به حجم رسانده می شود. سپس غلظت محلول های ساخته شده توسط الکترود MIP ساخته شده مورد اندازه گیری قرار می گیرد.

جدول۳. آنالیز قرص های سیپروفلوکساسین.

نمونه	مقدار داروی موجود در قرص(mg)	مقدار قرص اضافه شده (mg)	مقدار بدست آمده (mg)	RSD%
1	100	95.6	95.6	1.28
2	100	142.15	142.15	1.39
3	100	197.3	197.3	1.94

۵. نتیجه گیری

حسگر پتانسیومتری سیپروفلوکساسین که در این تحقیق ساخته و بهینه سازی شد، شیب پاسخ نرنستی ۲۹/۶۲ را در محدوده ۱×۱۰^{-۳} تا ۱×۱۰^{-۷} مولار نشان می دهد. همچنین از خصوصیات برجسته این الکترود زمان پاسخ دهی سریع و کمتر از ۳۰ ثانیه است. در ضمن این الکترود در گستره pH ۵ تا ۹ عمل می کند و پاسخ آن در این گستره به pH وابسته نیست. این الکترود می تواند برای تعیین مقدار سیپروفلوکساسین در قرص ها، محلول ها و نمونه پلاسما مورد استفاده قرار گیرد. یکی دیگر از خصوصیات قابل تحسین این حسگر گزینش پذیری خوب آن نسبت به سیپروفلوکساسین در حضور گونه های مزاحم از دارو های هم خانواده یا یون های فلزی است. این نوع حسگر نسبت به دیگر حسگر های تعیین مقدار سیپروفلوکساسین که تا به حال مورد بررسی قرار گرفته است از قیمت، سرعت، حد تشخیص، گزینش پذیری و تکرار پذیری و زمان پاسخ دهی قابل قبولی برخودار است.

٦. مراجع

[1] A.H. Beckett and P.A. Anderson, *Nature.,* 179 (**1957**) 1074.

[2] K. Mobach, Novel affinity techniques. in affinity chromatography and Biological Rrecognition. Part IV: affinity methods-Design and Department; chaiken, I.M., M. Wilchek, I., Eds. Academic Press: Orlando, FL, (**1983**).

[3] O. Ramstrom, L.I. Anderson and K. Mosbach, *J. Org. Chem.,* 58 (**1993**) 7562.

[4] O. Ramstrom, K. Skudar, J. Haines, P. Patel and O. Bruggemann, *J. Agric. Food Chem.*, 49 (**2001**) 2105.

[5] P.A.G. Cormack and A.Z. Elorza, *J. Chromatography B.*, 804 (**2004**) 173.

[6] G. Wulff and A. Sarhan, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.,* 182 (**1981**) 687.

[7] H. Yan and K. Ho Row, *Int. J. Mol. Sci.,* 7 (**2006**) 155.

[8] J.L. Gong, *Talanta.*, 61 (**2003**) 447.

[9] S. Vidyasankar and F.H. Arnold, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 6 (**1995**) 218.

[10] H. Yan and K. Ho Row, Int. *J. Mol. Sci.,* 7 (**2006**) 155.

[11] G. Wulff and A.A. Sarchan, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 11(**1972**) 341.

[12] K. Haupt, *Analyst.*, 126 (**2001**) 747.

[13] N.H. Peny, C. dliaing, A. zhang, a. xie and S. Yaa, *Anal Chem.,* 423 (**2000**) 221.

[14] Olof. Ramsrrom. Pure & Applied Biochemistry, center for chemistry & chemical Engineering, LUND university, POB 12, 4s-221,SWDEN.

[15] P. Bures, Y. Huanry, E. Oral and N.A. Peopas, *Journal of controlled reeases.*, 72 (**2001**) 25.

[۱۶] اسکوگ، داگلاس، اصول تجزیه دستگاهی، ترجمه دکتر عبدالرضاسلاجقه، تهران، جلد دوم، چاپ سوم، (**۱۳۸۷**)

[17] J. Matsui, M. Okada, M. Tsuruoka and T. Takeuchi, *Anal. Commun.*, 43(**1996**)585.

[20] H. Sun, F. Qiao, G. Liu and *S. Liang. analytica chimica acta.,* 625(**2008**)154.