





دانشگاه الزهراء (س)

دانشکده علوم پایه

پایان نامه

جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد

رشته شیمی، گرایش تجزیه

عنوان

بررسی رفتار الکتروشیمیایی سیپروفلوکساسین در سطح الکتروود کربن

شیشه‌ای اصلاح شده با ذرات نانوتیوپ چند دیواره کربن

استاد راهنما

دکتر لیدا فتوحی

دانشجو

سیده مهناز الهیاری

شهریور ۱۳۸۹

تقدیم به

فرشتگان بی همتای زندگی ام

پدر و مادر مهربانم

و

یاران راهم

خواهران و برادرم



تقدیر

از میان تمام واژه‌هایی که می‌شناسم، نام تورا ای بزرگ برزبان می‌رانم. هر گاه که در تاریکی کورسویی می‌جستم، تو پنجره‌ای از آفتاب را به رویم می‌گشودی و هنگامی که قطره‌ای می‌طلبیدم، تو دریا دریا کرامت را بر من ارزانی می‌داشتی. تو را سپاس می‌گویم که از لحظه عزیمت تا هنگام رسیدن، هر گشایشی که در راه بود با نام و یاد بی‌مانند تو بود و اینک در پایان راه، از زحمات اساتید خستگی‌ناپذیرم قدردانی می‌نمایم. عزیزانی که امروز سپاس بایسته‌شان در این مجمل نمی‌گنجد.

سپاس خدای بزرگ را که الطاف خود را شامل حال من کرد تا بتوانم در سایه دانشمندان و اساتید بزرگ گروه شیمی دانشگاه الزهرا شاگردی کنم و به کسب علم بپردازم. سپاس و درود بی‌پایان بر استاد بزرگوار و مهربانم، سرکار خانم دکتر لیدا فتوحی که با راهنمایی‌های بی‌شائبه خود مرا در به انجام رساندن این پژوهش یاری و همراهی کردند. سپاس بی‌شمار بر همراهان همیشگی‌ام، خانواده عزیزم، که همواره چتر حمایت و هدایتشان را بر سر داشته‌ام. سپاس فراوان بر استادان گرانقدرم، سرکار خانم دکتر ژیلآ آزاد و جناب آقای دکتر جباری که توفیق داوری ایشان، راه گشای من در رفع کاستی‌های این راه بود. از دوستان دلسوز و مهربانم که همواره همراهان همیشگی‌ام بودند، از صمیم قلب سپاسگذارم.



چکیده

در این بررسی، اکسایش الکتروشیمیایی سیپروفلوکساسین در محلول بافر فسفات 0.1 M و $\text{pH}=7$ به وسیله الکتروود کربن شیشه‌ای اصلاح شده با نانو ذرات کربن چند دیواره (MWCNT) و به کمک روش‌های ولتامتری چرخه‌ای و کروئوآمپرومتری مورد مطالعه قرار گرفت.

سیپروفلوکساسین در محلول بافر فسفات یک پیک آندی برگشت‌ناپذیر با پتانسیل آندی $1/1$ ولت نشان می‌دهد، که در حضور MWCNT، پتانسیل پیک به سمت مقادیر کمتر مثبت جابه‌جا شده و جریان پیک آندی افزایش می‌یابد. این جابه‌جایی پتانسیل و افزایش جریان در حضور نانو ذرات کربن، به دلیل ریز بودن ذرات و افزایش سطح فعال الکتروود، چشمگیر است و به دلیل خصوصیت الکتروکاتالیزی ذرات نانو می‌باشد.

پتانسیل فرمال، E° ، سیپروفلوکساسین وابسته به pH می‌باشد، به طوریکه نمودار pH بر حسب پتانسیل، شیبی برابر 66 میلی ولت نشان می‌دهد که تقریباً نزدیک به شیب بدست آمده (59 میلی ولت) در رابطه نرنست است. بر این اساس می‌توان گفت که تعداد الکترون و پروتون فرآیند برابر است. همچنین پارامترهای سینتیکی از جمله ضریب نفوذ D ، غلظت سطحی گونه‌های الکترواکتیو Γ ، ثابت سرعت استاندارد واکنش k_s و ضریب انتقال الکترون α در سطح الکتروود کربن شیشه‌ای محاسبه گردید.

بعد از بهینه کردن شرایط، (سوسپانسیون MWCNT با غلظت 4 mg/ml و حجم $4\text{ }\mu\text{l}$) منحنی کالیبراسیون برای سیپروفلوکساسین رسم گردید که در گستره $40 - 1000$ میکرو مولار خطی بود. تکرارپذیری و حد تشخیص روش، $1/0.9\%$ و $6/28\text{ }\mu\text{M}$ بدست آمد.

سیپروفلوکساسین در دو نمونه تزریقی به سرم جنین گاو و ادرار، با استفاده از الکتروود اصلاح شده با MWCNT به طور موفقیت‌آمیزی اندازه‌گیری شد.

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
	فصل ۱: مقدمه
۲	۱-۱- مقدمه.....
	فصل ۲: بررسی منابع
۶	۱-۲- بررسی منابع.....
	فصل ۳: بررسی روش‌های الکتروشیمیایی
۱۶	۱-۳- روش‌های الکتروشیمیایی.....
۱۶	۱-۱-۳- انواع روش‌های الکتروشیمیایی.....
۱۷	۲-۱-۳- ولتامتری.....
۱۹	۱-۲-۱-۳- ولتامتری با روبش خطی پتانسیل.....
۲۰	۲-۲-۱-۳- ولتامتری چرخه‌ای.....
۲۳	۳-۲-۱-۳- روابط پتانسیل-جریان در ولتامتری کلاسیک.....
۲۵	۴-۲-۱-۳- کروئوآمپرومتری.....
۲۵	۳-۱-۳- محاسبه ضریب انتقال الکترون، ثابت سرعت استاندارد و پتانسیل فرمال.....
۲۶	۲-۳- الکتروود.....
۲۶	۱-۲-۳- الکترودهای کار.....
۲۶	۱-۱-۲-۳- الکترودهای کربن.....

۲۷	۲-۱-۲-۳ الکترودهای کربن شیشه‌ای
۲۸	۲-۲-۳ الکترودهای اصلاح شده
۲۸	۱-۲-۲-۳ روش‌های اصلاح الکتروود
۲۸	۲-۲-۲-۳ کاربرد الکترودهای اصلاح شده
۳۰	۳-۲-۳ نانولوله‌های کربنی
۳۱	۱-۳-۲-۳ تهیه الکترودهای اصلاح شده با نانولوله‌های کربنی
۳۱	۲-۳-۲-۳ الکتروشیمی نانولوله‌های کربنی
۳۴	۳-۳ دستگاهوری
۳۴	۱-۳-۳ دستگاهوری 746 VA Trace Analyzer
۳۴	۲-۳-۳ کاربردها و مزیت‌ها

فصل چهارم : مطالعات تجربی

۳۷	۱-۴ مطالعات تجربی
۳۷	۲-۴ شرایط تجربی
۳۷	۱-۲-۴ مواد شیمیایی
۳۷	۲-۲-۴ دستگاهوری
۳۹	۳-۲-۴ مراحل انجام کار
۴۴	۱-۳-۴ بررسی رفتار الکتروشیمیایی سیپروفلوکسازین بر سطح GC
	۱-۱-۳-۴ بررسی رفتار الکتروشیمیایی سیپروفلوکسازین در حضور و غیاب
۴۴	MWCNT
۴۶	۲-۱-۳-۴ تاثیر pH
۵۰	۳-۱-۳-۴ مطالعات اثر سرعت روبش
۵۲	۱-۳-۱-۳-۴ محاسبه ثابت سرعت استاندارد واکنش و ضریب انتقال الکترون

۲-۳-۱-۳-۴	بررسی نفوذی یا جذبی بودن فرآیند	۵۶
۳-۳-۱-۳-۴	محاسبه غلظت سطحی گونه‌های الکترواکتیو Γ	۵۷
۴-۱-۳-۴	مطالعات کروئوآمپرومتری	۵۸
۲-۳-۴	اندازه‌گیری کمی سیپروفلوکساسین در سطح الکتروود GC اصلاح شده	۶۲
۱-۲-۳-۴	تأثیر مقدار MWCNT	۶۲
۲-۲-۳-۴	تأثیر حجم MWCNT	۶۵
۳-۲-۳-۴	رسم منحنی کالیبراسیون	۶۶
۴-۱-۳-۴	حد تشخیص (LOD)	۶۶
۵-۱-۳-۴	تکرارپذیری (RSD%)	۶۷
۶-۱-۳-۴	بررسی اثر مزاحمت	۷۲
۷-۱-۳-۴	تعیین مقدار سیپروفلوکساسین در نمونه‌های حقیقی	۷۲

فصل پنجم : نتیجه گیری

۱-۵	نتیجه گیری	۷۶
	فهرست منابع و مآخذ	۷۸

فهرست جدول ها

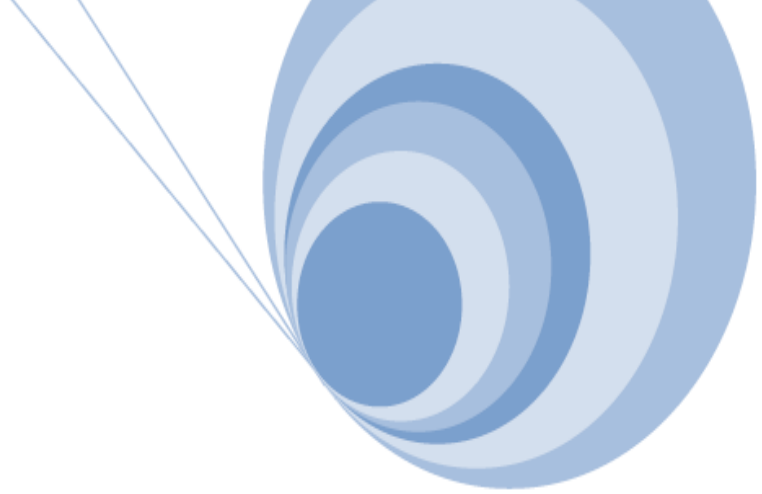
عنوان	صفحه
جدول ۱-۴ نتایج حاصل از ولتاموگرام‌های چرخه‌ای سیپروفلوکساسین ۱ میلی‌مولار در سرعت‌های روبش مختلف در سطح الکتروود کربن شیشه‌ای اصلاح شده با MWCNT.....	۵۱
جدول ۲-۴: نتایج حاصل از منحنی کالیبراسیون.....	۶۷
جدول ۳-۴: نتایج مربوطه به محاسبه حداقل مقدار قابل تشخیص سیپروفلوکساسین.....	۶۹
جدول ۴-۴ : نتایج حاصل از تکرار اندازه‌گیری در غلظت ۱ میلی مولار سیپروفلوکساسین.....	۷۱
جدول ۵-۴ : نتایج حاصل از بررسی گونه‌های مزاحم بر روی جریان پیک سیپروفلوکساسین.....	۷۳
جدول ۶-۴: نتایج مربوط به تعیین سیپروفلوکساسین در نمونه‌های حقیقی.....	۷۴

فهرست شکل ها

صفحه	عنوان
۲	شکل ۱-۱: ساختار ملکولی سیپروفلوکساسین.....
۱۹	شکل ۱-۳: روبش پتانسیل در ولتامتری روبش خطی.....
۲۰	شکل ۲-۳: منحنی جریان - پتانسیل در ولتامتری روبش خطی.....
۲۱	شکل ۳-۳: روبش پتانسیل در ولتامتری چرخه‌ای.....
۲۱	شکل ۴-۳: منحنی جریان-پتانسیل در ولتامتری چرخه‌ای.....
۲۳	شکل ۳-۵: ولتاموگرام سیستم های برگشت پذیر، نیمه برگشت پذیر و برگشت ناپذیر.....
	شکل ۳-۶- A) ساختار یک نانولوله کربنی تک دیواره. B) ساختار یک نانولوله کربنی چند دیواره.....
۳۰	دیواره.....
۳۸	شکل ۱-۴: نمای دستگاه Metrohm model 746 VA trace.....
۳۸	شکل ۲-۴: نمای دستگاه Ultrasonic Model elma Sonic.....
	شکل ۳-۴: ولتاموگرام چرخه‌ای پتاسیم فروسیانید ۰/۱ میلی مولار و سرعت روبش 100 mVs^{-1}
۴۱
۴۲	شکل ۴-۴: کروماتوگرام پتاسیم فروسیانید ۰/۱ M.....
۴۳	شکل ۵-۴: رسم نمودار I بر حسب $t^{-1/2}$ برای محلول ۰/۱ میلی مولار پتاسیم فروسیانید.....
	شکل ۶-۴: ولتاموگرام چرخه‌ای سیپروفلوکساسین با غلظت ۱ mM در بافر فسفات ۰/۱ M و pH=۷ در غیاب و حضور سیپروفلوکساسین و MWCNT (a)، غیاب سیپروفلوکساسین و MWCNT (b)، غیاب سیپروفلوکساسین و حضور MWCNT (c)، حضور سیپروفلوکساسین و غیاب MWCNT (d)، حضور سیپروفلوکساسین و MWCNT.....
۴۵

- شکل ۴-۷: ولتاموگرام‌های چرخه‌ای سیپروفلوکساسین ۱ میلی‌مولار در pH های ۲(a) ۳(b) ۴(c) ۵(d) ۶(e) ۷(f) ۸(g) ۹(h) ۱۰(i)..... ۴۷
- شکل ۴-۸: نمودار پتانسیل بر حسب Ph ۴۸
- شکل ۴-۹: نمودار بررسی شیب منحنی پتانسیل بر حسب pH ۴۸
- شکل ۴-۱۰: مکانسیم اکسیداسیون سیپروفلوکساسین ۴۹
- شکل ۴-۱۱: ولتاموگرام چرخه‌ای محلول ۱ میلی‌مولار سیپروفلوکساسین در بافر فسفات ۰/۱ مولار با $pH = 7$ در سرعت‌های روبش (a) ۱۰، (b) ۲۰، (c) ۳۰، (d) ۴۰، (e) ۵۰، (f) ۶۰، (g) ۹۰، (h) ۱۵۰ mVs^{-1} ۵۰
- شکل ۴-۱۲: نمودار پتانسیل بر حسب لگاریتم سرعت روبش در شرایط ذکر شده در شکل ۴-۱۱ ۵۴
- شکل ۴-۱۳: نمودار پتانسیل بر حسب سرعت روبش بر اساس شرایط شکل ۴-۱۱ ۵۵
- شکل ۴-۱۴: نمودار جریان بر حسب سرعت روبش سیپروفلوکساسین در سرعت‌های روبش ۱۰ تا ۱۰۰ میلی‌ولت بر ثانیه بر اساس شرایط ذکر شده شکل ۴-۱۱ ۵۶
- شکل ۴-۱۵: کرونوآمپروگرام‌های مربوط به بافر فسفات $pH = 7$ و محلول‌های سیپروفلوکساسین با غلظت‌های (a) ۱/۵، (b) ۰/۸، (c) ۰/۶، (d) ۰/۱ میلی‌مولار با اعمال پتانسیل ۹۸۰ میلی‌ولت در مدت زمان ۵۰ ثانیه در سطح الکتروود اصلاح شده با MWCNT ۵۹
- شکل ۴-۱۶: نمودارهای جریان بر حسب $t^{-1/2}$ بر اساس شرایط ذکر شده در شکل ۴-۱۵ ۶۰
- شکل ۴-۱۷: نمودار شیب خطوط در شکل ۴-۱۷ بر حسب غلظت سیپروفلوکساسین بر اساس شرایط ذکر شده در شکل ۴-۱۶ ۶۱
- شکل ۴-۱۸: ولتاموگرام‌های سیپروفلوکساسین ۱ میلی‌مولار در بافر فسفات ۰/۱M در $pH = 7$ همراه با مقادیر مختلف MWCNT (a) ۲، (b) ۳، (c) ۴، (d) ۸ میلی‌گرم MWCNT بر میلی‌لیتر DMF ۶۳
- شکل ۴-۱۹: نمودار جریان بر حسب غلظت MWCNT بر اساس شرایط ذکر شده در شکل ۴-۱۸ ۶۴

- شکل ۴-۲۰: ولتاموگرام چرخه‌ای سیپروفلوکساسین ۱ میلی مولار در بافر فسفات ۰/۱ مولار و pH=۷ با حجم‌های مختلف MWCNT ، ۱(a ، ۲(b ، ۲.۵(c ، ۳(d ، ۴(e ، ۵(f ، ۶(g میکرو لیتر از MWCNT ، سرعت روبش 100 mVs^{-1} ۶۶
- شکل ۴-۲۱: نمودار جریان بر حسب حجم MWCNT بر اساس شرایط ذکر شده در شکل ۴-۲۰ ۶۶
- شکل ۴-۲۲: ولتاموگرام‌های چرخه‌ای سیپروفلوکساسین در بافر فسفات ۰/۱ مولار و pH=۷ در غلظت‌های مختلف (a) ۲۰ ، (b) ۴۰ ، (c) ۵۰ ، (d) ۱۰۰ ، (e) ۳۰۰ ، (f) ۴۰۰ ، (g) ۵۰۰ ، (h) ۸۰۰ ، (i) ۱۰۰۰ میکرو مولار با اعمال شرایط بهینه ۶۷
- شکل ۴-۲۳: نمودار جریان بر حسب غلظت بر اساس شرایط ذکر شده در شکل ۴-۲۲ ۶۸
- شکل ۴-۲۳: ولتاموگرام‌های بافر فسفات ۰/۱ مولار، pH=۷ در سطح الکتروود GC اصلاح شده با MWCNT با ۱۰ بار تکرار ۷۰



فصل اول

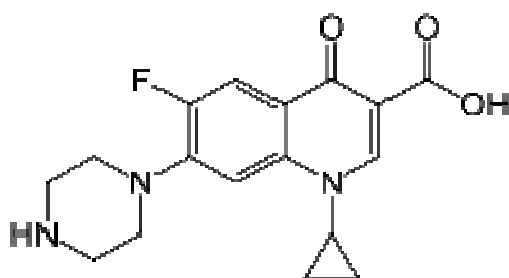
مقدمه



۱-۱ مقدمه

سیپروفلوکساسین^۱ اولین فلوروکینولون^۲ ضدباکتری است که برای درمان عفونت‌های سیستمیک در دسترس قرار گرفت و یک ترکیب پایه می‌باشد که سایر فلوروکینولون‌ها با آن مقایسه می‌شوند. این آنتی‌بیوتیک دارای فرمول شیمیایی $C_{17}H_{18}FN_3O_3$ با وزن مولکولی ۳۳۱/۳۴ گرم می‌باشد که به صورت نمک هیدروکلراید موجود است.

سیپروفلوکساسین هیدروکلراید با فرمول شیمیایی $C_{17}H_{18}FN_3O_3.HCl.H_2O$ و وزن مولکولی ۳۸۵/۸۲ گرم، شکل تزریقی سیپروفلوکساسین است.



شکل ۱-۱: ساختار مولکولی سیپروفلوکساسین

این آنتی‌بیوتیک دارای حلالیت زیاد در آب می‌باشد. pH این ماده در آب بین ۳، ۴ و ۵ است. این دارو مثل سایر فلوروکینولون‌ها با مهار DNA-پلیمراز^۳ منجر به قطع رونوشت‌برداری^۴ DNA باکتری می‌شود. اخیراً مهار توپوایزومراز^۵ IV به عنوان یک هدف جدیدی برای فلوروکینولون‌ها و مکانیسم‌های مقاومت مطرح شده است. سیپروفلوکساسین به عنوان یک داروی ضد باکتری از گروه فلوروکینولون‌ها است. از زمان کشف آن در دهه ۸۰، اکثر باکتری‌های گرم منفی در آزمایشگاه همچنان نسبت به این دارو حساس می‌باشند. باکتری‌های گرم مثبت نیز، عموماً حساس بوده و یا به طور متوسط حساس می‌باشند. نتایج

^۱ -Ciprofloxacin

^۲ - Fluoroquinolone

^۳ -DNA-Polymerase

^۴ -Replication

^۵ -Topo isomerasis IV

بررسی‌های بالینی با سیپروفلوکساسین اثرات جانبی این دارو را مورد تایید قرار داده است. سیپروفلوکساسین در درمان عفونت‌های مختلف بویژه عفونت‌های ناشی از پاتوژن‌های منفی موثر است.

پاتوژن‌های منفی موارد شامل عفونت‌های پیچیده مجاری ادراری، بیماری‌های انتقالی از طریق جنسی (سوزاک و شانکروئید)، عفونت‌های پوست و استخوان، گوارشی ناشی از اورگانیزم‌های مقاوم به چند دارو^۱، عفونت‌های قسمت تحتانی دستگاه تنفسی، عفونت‌های داخل شکمی (همراه با یک داروی دیگر که موثر بر اورگانیزم‌های هوازی باشد) و عفونت گوش خارجی^۲ بدخیم می‌باشند.

سیپروفلوکساسین یکی از ضد باکتری‌های انگشت شماری است که هم به صورت قابل تزریق وریدی و هم به صورت فرآورده‌های خوراکی وجود دارد و لذا می‌تواند امکان کم‌نمودن هزینه درمان و ترخیص سریع بیمار از بیمارستان را فراهم کند. نتیجه‌گیری کلی این است که، سیپروفلوکساسین فعالیت عالی خود علیه اثر باکتری‌های گرم منفی را حفظ کرده است و استفاده منطقی می‌تواند کمک به ایجاد اطمینان درباره سودمندی بالینی آن باشد.

برای شناسایی و تشخیص سیپروفلوکساسین به صورت خالص یا به صورت محلول در سیستم از روش‌های طیف‌سنجی مادون قرمز IR ، طیف‌سنجی ماورابنفش، و همچنین از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا استفاده می‌شود(۷-۱).

روش‌های تعیین الکتروشیمیایی سیپروفلوکساسین را می‌توان به دو دسته تقسیم کرد:

- ۱- بهبود بخشیدن و تعدیل کردن سطح الکتروود با میانجی‌گرها و تعدیل کننده‌ها
- ۲- به کار بردن مواد جدید و نو برای تعیین مستقیم سیپروفلوکساسین در پتانسیل ثابت و پایدار در حد پایین

به طور کلی حسگرهای اصلاح شده دارای حد تشخیص کم و گستره خطی وسیعی می‌باشند. هر چند می‌توان برخی معایب آن‌ها، از جمله تکرارپذیری و ثابت سرعت پایین را در اثر غیرفعال شدن و یا شسته شدن و جدا شدن اصلاح کننده نام برد.

کربن نانوتیوپ‌ها دارای ساختار یکپارچه با شبکه‌های لانه زنبوری هگزاگونالی، دارای قطری

¹ -Multiresistant organisms

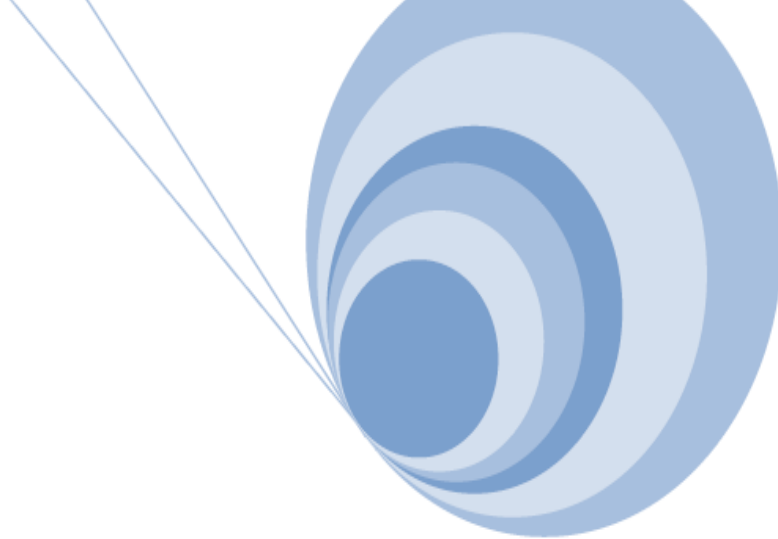
² -External otit

در حد چند نانومتر و طولی در حد چند میکرون می‌باشند. کربن نانوتیوپ‌ها به دو صورت، کربن نانوتیوپ چند دیواره ($MWCNT_s$) و کربن نانوتیوپ‌های تک دیواره ($SWCNT_s$) می‌باشند که $MWCNT_s$ به صورت لوله‌های گرافیتی نزدیک و هم مرکز با لایه‌های چندگانه از صفحات گرافیت با فاصله حدود 0.34 nm می‌باشند در حالیکه $SWCNT_s$ شامل یک صفحه گرافیتی لوله شده یکپارچه شبیه یک استوانه با قطر $1-2\text{ nm}$ هستند (۸).

کربن نانوتیوپ‌ها به عنوان فلز یا نیمه هادی وابسته به ساختار و قطر می‌توانند رفتار کنند (۹). این نانو ذرات اخیراً در تحقیقات الکتروشیمیایی پیشرو شده‌اند. خصوصیات الکترونیکی بی‌نظیر این نانو ذرات سبب شده که در الکتروشیمی به طور موثری به عنوان وسیله‌ای جهت پیشرفت واکنش انتقال الکترون در محدوده وسیعی از گونه‌های محیطی بیولوژیکی شامل کتکول آمین‌ها (۱۰)، $NADH$ (۱۱)، اسید اوریک (۱۲) و سیتوکروم C (۱۳) به کار گرفته شوند.

چندین روش برای آماده‌سازی اصلاح کننده‌ها با ساختار کربن نانوتیوپ گزارش شده است که عبارتند از:

- جذب شدن اصلاح کننده روی سطح کربن نانوتیوپ
 - سنتز شیمیایی پلیمرهای الکترواکتیو کربن نانوتیوپ
 - به دام انداختن اصلاح کننده روی ساختار پلیمری کربن نانوتیوپ
 - رسوب دادن و قراردادن الکتريکی اصلاح کننده روی سطح کربن نانوتیوپ (۱۴)
- در این کار از الکتروود GC اصلاح شده با $MWCNT$ ، به روش جذب سطحی، جهت بررسی رفتار الکتروشیمیایی سیپروفلوکسازین در سطح این الکتروود استفاده شد. سپس اندازه‌گیری در نمونه‌های تزریقی سرم خون جنین گاو و ادرار انجام شد.



فصل دوم

بررسی منابع



۱-۲ بررسی منابع

لی درگربر^۱ و همکارانش در سال ۱۹۸۵ دو روش کروماتوگرافی مایع با فشار بالا و زیست‌سنجی^۲ را جهت تعیین سیپروفلوکساسین در نمونه‌های سرم و ادرار مورد مقایسه قرار دادند (۱۵). در این بررسی ده داوطلب سالم دارو را به صورت خوراکی به مدت هفت روز متوالی با دوز ۲۵۰ میلی‌گرمی هر ۱۲ ساعت مصرف کردند و سرم و ادرارشان در زمان‌های مشخص بین صفر تا ۹۶ ساعت جمع‌آوری شد.

نمونه‌ها بوسیله کروماتوگرافی مایع با فشار بالا و روش میکروبیولوژیکی تجزیه و تحلیل شد. حد تشخیص‌های بدست آمده $0.06 \mu\text{l/ml}$ و 0.03 و ضریب خطا در غلظت‌های مختلف سرم و ادرار، کمتر از ۶/۱٪ بود. نتایج حاصل از روش زیست‌سنجی، به دلیل حضور متابولیت فعال ضد میکروبی به طور چشمگیری بالاتر از مقادیر کروماتوگرافی بدست آمد.

در سال ۱۹۸۵ از دستگاه HPLC، توسط جل‌اف^۳، جهت اندازه‌گیری سیپروفلوکساسین موجود در مایعات زیستی استفاده شد (۱۶). فرآیند حذف مزاحمت شامل یک مرحله استخراج شیمیایی بود که به دنبال آن کروماتوگرافی ایزوکراتیک روی ستون تجزیه‌ای فاز معکوس انجام شد. آشکارساز مورد استفاده در این روش، فرابنفش بود.

مورتون^۴ در سال ۱۹۸۶، روش HPLC را جهت اندازه‌گیری غلظت سیپروفلوکساسین و یا نورفلوکساسین^۵ موجود در مایعات زیستی ارائه داد و نتایج حاصل از آن را با یک سنجش زیستی استاندارد مقایسه کرد (۱۷). وی در روش ابداعی از یک ستون C18 فاز معکوس، یک استاندارد داخلی و یک آشکارساز فلورسانس استفاده کرد. ضریب ارتباط روش با سنجش زیستی ۰/۹۶۶ برای نورفلوکساسین و ۰/۹۵۲ برای سیپروفلوکساسین محاسبه شد.

در سال ۱۹۸۶، گرونولد^۶ از یک روش ساده و حساس HPLC جهت آنالیز کمی تعدادی از

^۱ -Le Dergerber

^۲ -Bioassay

^۳ -Jehl F

^۴ -Morton

^۵ -Norfloxacin

^۶ -Groeneveld

کینولون‌ها از قبیل سیپروفلوکساسین، نورفلوکساسین، افلوکساسین^۱ و پفلوکساسین^۲ موجود در سرم استفاده کرد (۱۸). این کینولون‌ها با استفاده از دی-کلرومتان، تحت شرایط طبیعی استخراج شده و سپس به کمک نیتروژن، خشک و قبل از آنالیز کروماتوگرافی در فاز متحرک حل شد. در این روش، از یک ستون استیلی ۵ میکرونی Ncleosil C18 استفاده شد که فاز متحرک شامل محلول ۰/۴۰ مولار فسفریک اسید، تترابوتیل آمونیوم آیودید^۳ به عنوان واکنشگر جفت یون کننده و متانول ۲/۲ pH= بود و از آشکارساز UV استفاده شد. روش نشان داده شده برای هر یک از کینولون‌ها، خطی، کمی و تکرارپذیر بوده و همچنین نتایج بدست آمده ارتباط خوبی با نتایج حاصل از سنجش میکروبی شناسی داشته است.

برنر^۴ و همکارانش در سال ۱۹۸۶ روش کروماتوگرافی مایع دو ستونه را جهت اندازه‌گیری سیپروفلوکساسین و سه متابولیتش ارائه دادند (۱۹). در هر دو ستون کروماتوگرافی فاز معکوس از Ncleosil C18 به عنوان فاز ثابت استفاده شد. در روش A، سیپروفلوکساسین، متابولیت M₁ (دیس اتیلن سیپروفلوکساسین) و دیگر متابولیت‌هایش را که ساختار ناشناخته‌ای داشتند به کمک آشکارساز فلوروسنجی، جداسازی کرد. روش B، امکان اندازه‌گیری متابولیت M₃ (اکسو- سیپروفلوکساسین) را در ادرار به کمک جذب UV مهیا کرد.

نمونه‌های سرم به کمک استونیتریل پروتئین‌زدایی و نمونه‌های ادرار با محلول بافر رقیق شدند. حد تشخیص سیپروفلوکساسین در سرم ۰/۰۱ mg/l ، در ادرار ۰/۲ mg/l و برای متابولیت M₃ (در ادرار) ۱ mg/l بود. ضریب تغییر برای سیپروفلوکساسین در سرم ۲/۴-۰/۸٪ و برای متابولیت‌هایش ۳/۹-۸/۴٪ و این ضریب برای نمونه‌های ادرار ۱/۷-۲/۱٪ و ۲/۴-۷/۲٪ محاسبه شد. نسبت بازیابی سیپروفلوکساسین از سه گروه سرم تزریق شده ۹۴/۵±۲/۶٪، ۱/۱±۹۷/۲٪ و ۱/۸±۹۵/۰٪ و از ادرار ۱/۵±۹۹/۶٪ گزارش شد. نتایج مشاهده شده در روش توصیفی با نتایج حاصل از سنجش میکروبیولوژی استاندارد مقایسه شد و در دو زیر مجموعه از داده‌ها، شیب معادله خط از ۱/۰۴۲ تا ۱/۵۵۶ متغیر دیده شد. همچنین سنجش‌های میکروبیولوژی بیانگر وجود متابولیت‌های فعال میکروبیولوژیکی بودند. در نهایت

¹-Ofloxacin

²-Pefloxacin

³-Tetrabutylammoniumiodide

⁴-Borner

نتیجه این بود که روش توصیف شده روشی خاص تر بوده و جهت مطالعات داروسازی و مشاهدات دارو درمانی کاربرد داشت.

اسکول^۱ و همکارانش در ۱۹۸۷ روشی تجزیه‌ای، جهت آشکارسازی و تعیین سیپروفلوکساسین و متابولیت‌های شناخته شده‌اش، M₁ (دیس اتیلن سیپروفلوکساسین) ، M₂ (سولفو سیپروفلوکساسین) ، M₃ (اکسو سیپروفلوکساسین) در ادرار، سرم، پلاسما، صفرا، مدفوع و نسج (بافت) توصیف کردند (۲۰). در بافت‌های مایع، رقیق‌سازی تنها مرحله آماده سازی نمونه بود. برای آنالیز از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا فاز معکوس به همراه آشکارساز فلورسانس استفاده شد. جهت متابولیت‌های M₂ و M₃ ، یک مشتق‌سازی پس‌ستون^۲ ، جهت نورکافت و گرماکافت مورد نیاز بود.

حد تشخیص برای تمام ترکیبات مابین ۰/۲-۲/۲ ng/ml بدست آمد. در مقایسه با آشکارساز فلورسانس تنها، مشتق‌سازی پس ستون، انتخاب‌پذیری روش را به طور معنی‌داری افزایش داد. همچنین خطی بودن، دقت و صحت روش اندازه‌گیری شد.

تعیین سیپروفلوکساسین به وسیله پلاروگرافی پالس تفاضلی (DPP) توسط فیلیپ ادا^۳ و همکارانش در سال ۱۹۸۹ انجام شده است (۲۱). رفتار DPP این ترکیب در pH= ۸/۵ ، دو پیک کاهشی در ۱/۴۴ - و ۱/۶۴ - ولت نشان داد.

در سال ۱۹۸۹، تی‌سیز کواسکا^۴ و همکارانش یک روش ساده و حساس HPLC را جهت اینترفلوکساسین و سیپروفلوکساسین موجود در نمونه‌های سرم سگ و بافت پروستات توسعه دادند (۲۲). مراحل آماده‌سازی نمونه، شامل مخلوط کردن سرم سگ به نسبت ۱:۱ با استونیتریل و سدیم هیدروکسید M ۰/۱ می‌باشد که در ادامه توسط اولترافیلتراسیون^۵ یک توده با جرم ملکولی ۱۰۰۰۰ جدا می‌شود. بافت پروستات قبل از فیلتراسیون به سونیکیت^۶ نیاز دارد. این دو ترکیب بوسیله آشکارساز UV-Vis در ۲۷۸/۶ nm تشخیص و به وسیله آشکارساز Photo diode array در محدوده ۲۳۰-۳۶۰ nm تأیید شد.

¹ -Scholl

² -Post-column derivatization

³ -Philip Odea

⁴ -Tyczkowaska

⁵ -Ultrafiltration

⁶ -Sonication