

Nghiên cứu điều kiện phân tích beta lactam bằng phương pháp điện di mao quản

Phạm Nho

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên; Khoa Hóa học
Chuyên ngành: Hóa phân tích; Mã số: 60 44 29
Người hướng dẫn: PGS.TS Nguyễn Văn Ri
Năm bảo vệ: 2011

Abstract. Lựa chọn phương pháp nghiên cứu là phương pháp điện di mao quản mixen (MECC) với detector Diod Array (DAD) có độ nhạy cao. Nghiên cứu chọn -lactam như: pH, nồng độ chất điều kiện tối ưu tách một số kháng sinh điện ly, điện thế, nhiệt độ... Nghiên cứu điều kiện chiết pha rắn; tách và -lactam từ nước tiểu. Đánh giá thống kê phương pháp phân tích. làm giàu Áp dụng phân tích một số mẫu nước tiểu. Đánh giá ưu khuyết điểm của phương pháp điện di mao quản.

Keywords. Hóa phân tích; Phương pháp điện di mao quản; Chất kháng sinh

Content:

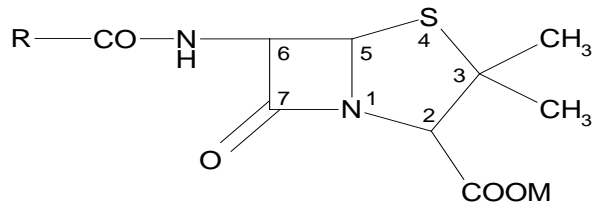
Do tình hình lạm dụng kháng sinh nên xảy ra hiện tượng nhờn thuốc kháng thuốc, nên phân hàm lượng thuốc trong nước tiểu là cần thiết
Với lý do nêu trên, tôi chọn đề tài nghiên cứu luận văn là: *“Nghiên cứu điều kiện phân tích β -lactam bằng phương pháp điện di mao quản”*

CHƯƠNG 1 - TỔNG QUAN

1.1 Giới thiệu về chất kháng sinh β -lactam [1,2,10,35]

*** Các penicillin**

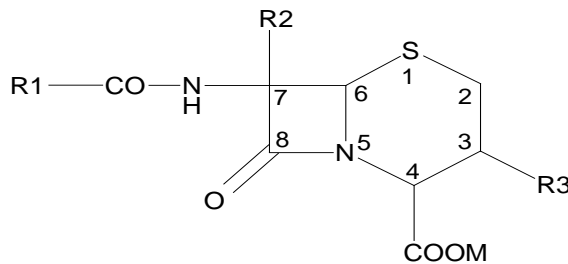
Các penicillin đều có cấu trúc cơ bản gồm 2 vòng: vòng thiazolidin, vòng β -Lactam



Hình 1.1 Công thức cấu tạo các kháng sinh penicillin

* Các cephalosporin

Các cephalosporin có cấu trúc chung gồm 2 vòng: vòng β -lactam 4 cạnh gắn với 1 dị vòng 6 cạnh, những carbon bất đối có cấu hình 6R, 7R. Khác nhau bởi các gốc R.



Hình 1.2 Công thức cấu tạo các kháng sinh cephalosporin

Các phương pháp phân tích β -lactam

CHƯƠNG 2 - ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Đối tượng và nội dung nghiên cứu

2.1.1 Đối tượng

Phân tích MECC các Penicillin(PENG), cloxacillin(CLO), oxacilin(OXA) ampicillin(AMP), amoxicillin(AMO) và cephalexin(CEP) là các kháng sinh β -lactam được sử dụng phổ biến hiện nay.

2.1.2 Nội dung nghiên cứu

Nội dung đề tài cần giải quyết là:

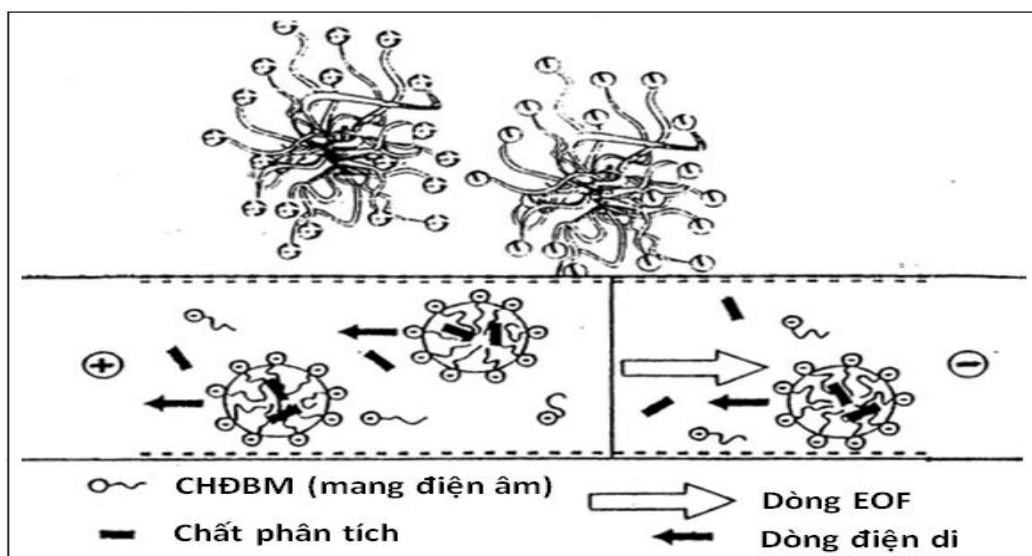
- Lựa chọn phương pháp nghiên cứu là phương pháp điện di mao quản mixen (MECC) với detector Diod Array (DAD) có độ nhạy cao.
- Nghiên cứu chọn điều kiện tối ưu tách một số kháng sinh β -lactam như: pH, nồng độ chất điện ly, điện thế, nhiệt độ...
- Nghiên cứu điều kiện chiết pha rắn; tách và làm giàu β -lactam từ nước tiểu

- Đánh giá thống kê phương pháp phân tích
- Áp dụng phân tích một số mẫu nước tiêu
- Đánh giá ưu khuyết điểm của phương pháp

2.2 Phương pháp nghiên cứu:

Phương pháp điện di mao quản điện động học kiểu Mixen (MECC)

Bản chất và trung tâm của sự tách ở đây là sự hình thành các phần tử Mixen (tiểu phân Mixen - pha tĩnh giả) trong ống mao quản và các tiểu phân này sẽ dẫn dắt và đóng góp vào khả năng của quá trình tách sắc ký điện di các chất trên nền của dung dịch chất đệm và chất điện ly trong ống mao quản.



Hình 2.1 Cấu trúc của các Mixen và dòng EOF trong MECC

Cơ chế của sự tách các phần tử trung tính trong MECC về cơ bản vẫn là kiểu tương tác phân bố của chất tan, tương tự như trong sắc ký cột lỏng-rắn (LC) hấp phụ, nhưng lại được điều khiển bởi lực điện trường E của điện thế cao V giữa hai đầu mao quản tạo, mà không phải bằng áp suất đẩy pha động như trong HPLC. Trong kỹ thuật phân tích MECC, các tính toán về hệ số dung tích k'_i , số đĩa N của cột mao quản, độ phân giải R,... cũng dựa trên cơ sở tương tự với các tính toán của hệ sắc ký cột LC, và có bổ sung thêm một số yếu tố cho thích hợp và đúng đắn hơn cho hệ pha MECC.

2.3 Phân tích định lượng trong phương pháp điện di mao quản

Dựa vào công thức

$$S_i = k_2 * C_i$$

Trong đó: S_i là diện tích pic (mAU)

C_i là nồng độ chất (mg/l)

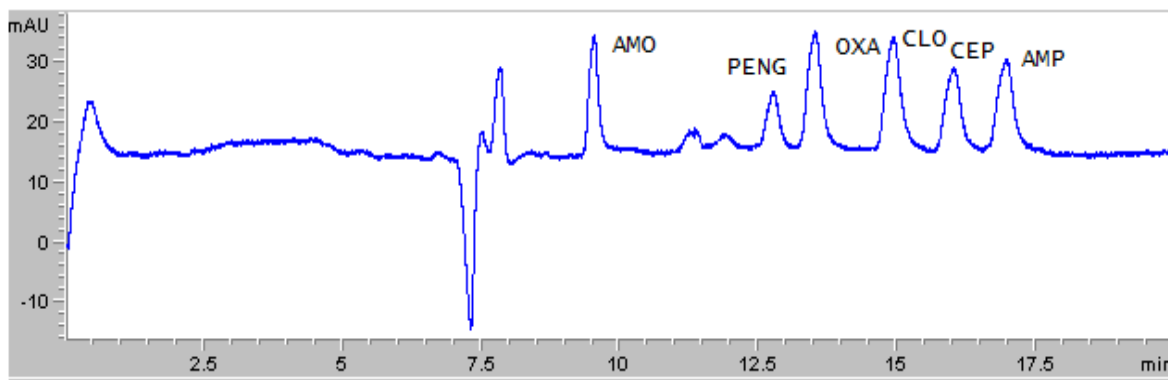
CHƯƠNG 3 - KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Nghiên cứu khảo sát tối ưu điều kiện tách β -Lactam

Sau khi khảo sát các điều kiện chạy điện di phân tách đồng thời 6 β -lactam, chúng tôi tổng kết được điều kiện tối ưu để nghiên cứu tiếp theo như sau

Bảng 3.8 Tổng kết các điều kiện tối ưu

Các yếu tố	Điều kiện
Detetor	DAD, loại high sense cell
Chiều dài bước sóng	198nm
Kích thước mao quản	Mao quản silica trần, tổng chiều dài $L = 73\text{cm}$, chiều dài hiệu dụng $L_1 = 68\text{cm}$, đường kính trong mao quản $50\mu\text{m}$
Chất tạo mixen	SDS
Phương pháp bơm mẫu	Thủy động học: 10s, 50mbar
Thế điện di	22kV
Dung dịch điện di	15mM đệm Borat + 75mM SDS, pH = 6,8
Nhiệt độ mao quản	25°C



Hình 3.1 Sắc đồ ở điều kiện tối ưu:

3.2 Xác định khoảng tuyến tính của phương pháp

Kết quả chạy mẫu chuẩn tại các nồng độ từ 0,5mg/l đến 15mg/l, sắc đồ điện di của 6 β -lactam nghiên cứu đẹp, các pic tách nhau hoàn toàn, hình pic cân đối. Với kết quả thực tế trên, chúng tôi chọn khoảng nồng độ tuyến tính cho phép phân tích điện di nghiên cứu là **0,5mg/l – 15mg/l**.

3.3 Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) của đường chuẩn

Giới hạn phát hiện (LOD) được định nghĩa là nồng độ chất phân tích nhỏ nhất mà phương pháp phân tích có thể phát hiện được.

- Giới hạn phát hiện là thông số đặc trưng cho độ nhạy của phương pháp phân tích. Để xác định LOD của các β -lactam chúng tôi tiến hành xác định LOD dựa vào đường chuẩn theo công thức sau:

$$\text{LOD} = 3 * \frac{S_y}{b} \quad (28)$$

Trong đó: S_y - độ lệch chuẩn của phương trình đường chuẩn

b - là hệ số góc của phương trình hồi qui

- Giới hạn phát hiện cũng được tính dựa trên tỷ số tín hiệu/nhiều (S/N)

LOD được chấp nhận tại nồng độ mà tại đó tín hiệu lớn gấp 2-3 lần nhiễu đường nền, thông thường lấy $S/N=3$

- Giới hạn định lượng của phương pháp (LOQ) được định nghĩa là nồng độ chất phân tích nhỏ nhất mà phép phân tích vẫn định lượng được chính xác với độ tin cậy 95%. Theo lý thuyết thống kê thì giới hạn định lượng là nồng độ chất phân tích có tín hiệu phân tích gấp 10 lần tín hiệu nhiễu của đường nền.

$$LOQ = 10 * \frac{S_y}{b} \quad (29)$$

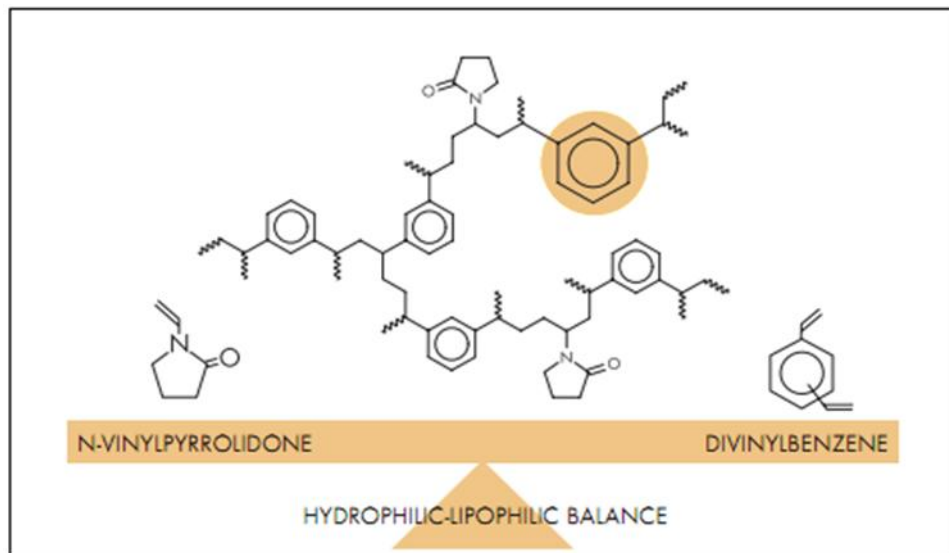
Chất phân tích	Phương trình $y = a + bx$	Hệ số góc (b)	Độ lệch chuẩn (S_y)	LOD (mg/l)	LOQ (mg/l)
AMO	$y = 11,18 + 97,23x$	97,23	19,23	0,59	1,97
PENG	$y = 9,86 + 53,67x$	53,67	14,39	0,81	2,68
OXA	$y = 5,07 + 121,43x$	121,43	20,86	0,51	1,72
CLO	$y = -11,28 + 127,02x$	127,02	24,15	0,57	1,92
CEP	$y = -6,22 + 112,02x$	112,02	16,28	0,43	1,42
AMP	$y = 3,28 + 103,21x$	103,29	25,44	0,73	2,41

3.4 Phân tích mẫu thực

3.4.1 Chọn cột chiết pha rắn các β -lactam trong mẫu nước tiểu

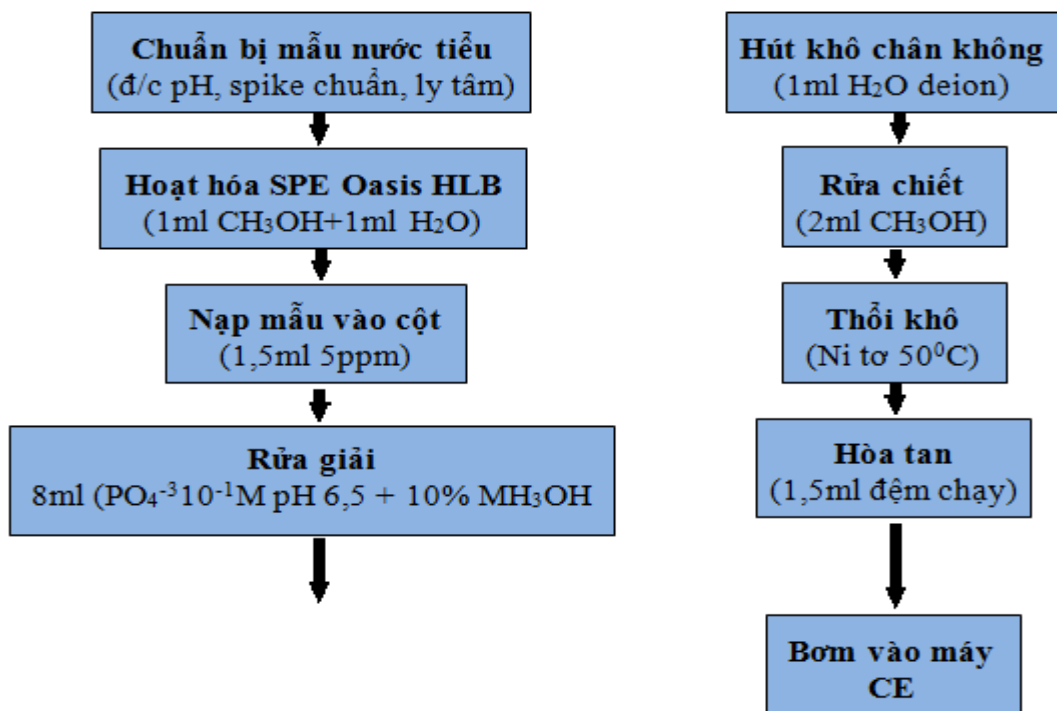
Kháng sinh β -lactam là những hợp chất vừa có tính axit, vừa có tính bazơ, là những hợp chất có độ phân cực tương đối mạnh và tan tốt trong môi trường nước và các dung môi hữu cơ phân cực mạnh như methanol, acetonitril...

Sau khi khảo sát, so sánh từ thực nghiệm, chúng tôi nhận thấy sự dụng cột SPE Oasis HLB để chiết và làm giàu các kháng sinh họ β -lactam trong mẫu nước tiểu có hiệu quả hơn cột C_{18} . Kết luận trên hoàn toàn phù hợp với lý thuyết [34]; pha tĩnh Oasis là sự kết hợp giữa tính tương tác không phân cực của monomer divinylbenzen và tính tương tác phân cực N-vinylpyrrolidone, đồng thời có cấu trúc không gian lớn, tạo ra nhiều lỗ xốp nên có khả năng lưu giữ tốt các cấu tử phân cực β -lactam. Nhờ có khả năng lưu giữ β -lactam lớn mà làm tăng khả năng làm sạch và làm giàu các β -lactam trong mẫu nước tiểu. Vì những ưu việt trên, chúng tôi chọn cột SPE Oasis[®] HLB trong nghiên cứu này.



Hình 2.9 Cấu trúc của pha tĩnh cột SPE dùng cho các mẫu sinh học

Sơ đồ phân tích mẫu thực nước tiểu như sau:



Hình 3.2 Sơ đồ phân tích β -lactam trong mẫu nước tiểu kết hợp cột chiết pha rắn Oasis[®] HLB và MECC

Mẫu nước tiểu trắng (lấy từ người không uống kháng sinh β -lactam) bảo quản trong tủ đông (-15°C) [16] trước khi phân tích (để tránh phân hủy sinh học) trước

khi mang đi phân tích. Đầu tiên mẫu được thêm chuẩn ở nồng độ 5ppm của 3 thuốc kháng sinh β -lactam AMO, PENG và CEP, tiếp theo được axit hóa bằng axit sulfosalixylic (để kết tủa protein). Mẫu sau khi axit hòa được lắc trong 5 phút và cho vào ly tâm ở tốc độ 10.000 vòng/phút. Sau đó hút 1,5ml mẫu (dịch trong) cho vào cột SPE Oasis[®] HLB (được hoạt hóa bằng methanol và nước). Quá trình rửa (rửa các tạp chất trong nước tiểu như protein, ure, acid uric, creatinine, các muối vô cơ...) sẽ được thực hiện bằng 8ml dung dịch đệm phosphat $10^{-1}M$, pH 6,8 + 10% methanol. Tiếp theo rửa với 1ml nước deion rồi hút khô cột bằng hút chân không. Các beta lactam sau đó được rửa chiết bằng 2ml methanol. Dịch rửa chiết được làm khô dưới dòng khí ni tơ trong bể điều nhiệt $50^{\circ}C$, sau đó cặn được hòa tan bằng 1,5ml dung dịch đệm điện di, lọc qua màng lọc $0,45\mu m$ và bơm vào máy điện di. Mỗi mẫu đo được bơm lặp lại 3 lần. Lấy kết quả điện tích pic trung bình 3 lần bơm.

Kết quả nồng độ β -lactam trong nước tiểu thêm chuẩn được tính bằng công thức sau:

$$x_0 = \frac{y_0 - a}{b} \text{ (mg/l)} \quad (34)$$

Kết quả tính toán:

B-lactam	Phương trình hồi qui	y_0 (mAU)	x_0 (mg/l)	x_t (mg/l)	Trong mẫu ban đầu (mg/l)
AMO	$y = 11,18 + 97,23x$	458,3	$4,6 \pm 0,5$	$5,7 \pm 0,6$	$28,5 \pm 3,1$
CEP	$y = - 6,22 + 112,02x$	934,7	$8,4 \pm 0,9$	$10,2 \pm 1,2$	$102 \pm 11,4$

3.4.2 Ưu và nhược điểm của phương pháp điện di mao quản điện động học kiểu mixen (MECC)

Phương pháp MECC là một phương pháp phân tích hiện đại cho độ tin cậy và hiệu quả tách cao. Phương pháp có thể xác định được trên nhiều đối tượng khác

nhau bao gồm cả chất mang điện tích và chất trung tính. Phương pháp có một số đặc điểm cơ bản sau:

- Lượng mẫu phân tích nhỏ, tốc độ phân tích nhanh, thao tác đơn giản hơn nhiều so với kỹ thuật phân tích HPLC. Trong thí nghiệm của chúng tôi, phân tích 6 chất chỉ trong vòng 16 phút.

- Dung dịch pha động cũng như mẫu phân tích thường được pha trong nước deion và sử dụng rất ít.

- Cột tách là ống mao quản nhỏ, rẻ, cho hiệu suất tách cao, dễ sản xuất hơn nhiều so với cột HPLC.

Tuy nhiên phương pháp cũng có một số nhược điểm sau:

- Do flowcell nằm ngay trên mao quản nên độ nhạy của phương pháp thấp hơn so với phương pháp khác. Giới hạn của nó cỡ mg/l đối với detector UV-VIS, DAD. Trong khi đó các phương pháp khác như: HPLC có giới hạn nhỏ hơn.

- Máy làm việc ở vùng điện áp rất cao nên phải cẩn trọng khi làm việc.

- Lượng mẫu sử dụng nhỏ là một ưu điểm của phương pháp, đồng thời cũng là nhược điểm của nó. Khi lượng mẫu nhỏ dẫn đến sai số lớn khi phân tích hàm lượng lớn do hệ số pha loãng cao. Đối với mẫu có hàm lượng nhỏ, khi tăng thời gian bơm mẫu thì gây ra hiện tượng doãng pic, hiệu suất tách không cao.

- Thời gian lưu của của dung dịch phụ thuộc rất nhiều vào thành phần đệm, dung dịch điện ly vì vậy đòi hỏi phải cẩn thận và tỉ mỉ.

3.5 Hướng phát triển của đề tài

Trong bản luận văn này, do điều kiện còn hạn chế nên chúng tôi chỉ xác định được hàm lượng của β -lactam bằng phương pháp MECC trong mẫu nước tiểu bằng kết hợp. Phương pháp còn có thể được mở rộng phân tích trong những dạng nền mẫu khác nhau ví dụ như: mẫu máu, mẫu cá, mẫu sữa... hay các mẫu môi trường như: nước thải bệnh viện, nước thải trại chăn nuôi gia súc... Vì vậy rất cần có những nghiên cứu tiếp theo để phát triển phương pháp áp dụng vào thực tiễn hơn.

CHƯƠNG 4 - KẾT LUẬN

3. Phân tích hàm lượng kháng sinh trong mẫu thuốc và mẫu nước tiểu

-Chiết SPE mẫu nước tiêu: Hiệu suất thu hồi các mẫu spike chuẩn AMO, PENG và CEP chiết bằng cột chiết SPE Oasis HLB từ 81 -84%. Như vậy cột chiết pha rắn Oasis[®] HLB sử dụng rất hiệu quả để chiết và làm giàu các kháng sinh β -lactam trong mẫu nước tiêu vì thế có thể mở rộng cho các nền mẫu sinh học khác.

- Với 2 mẫu nước tiêu của người tình nguyện: Nồng độ AMO phân tích được là 28,5 mg/l (lấy mẫu sau 5 giờ uống), và nồng độ CEP là 102mg/l (lấy mẫu sau 6 giờ uống). Các nồng độ AMO và CEP phân tích được như trên phù hợp với các thông số dược động học của chúng [2]. Đây là một kết quả rất có ý nghĩa trong nghiên cứu dược động học của thuốc; đánh giá hàm lượng β -lactam trong nước tiêu và trong mẫu máu để đưa ra nhưng đánh giá về việc sử dụng β -lactam có đúng cách và liều dùng hay không.

References :

TIẾNG VIỆT

1. Bộ Y Tế (2007), *Hóa dược*, tập 2, NXB Y học, Hà Nội
2. Bộ Y Tế (2002), *Dược điển Việt Nam*, xuất bản lần thứ 3, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội
3. Lê Thị Huyền Dương (2000), *Tách và phân tích đồng thời một số chất quan trọng trong nhóm vitamin A bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao và điện di mao quản*, Luận án tiến sĩ, ĐH Quốc Gia Hà Nội
4. Nguyễn Văn Đích (2005), “Không nên lạm dụng kháng sinh”, *Báo y học và đời sống*, số 27
5. Phạm Luận (2004), “*Cơ sở lý thuyết điện di mao quản hiệu năng cao*”, ĐH Quốc Gia Hà Nội
6. Nguyễn Kim Phượng và J.Chalker (1997), “Chuyên đề kháng sinh” , *Medicine and Modern Life Magazine*, Số 14, 1997
7. Ngọc Phương (2006), "Thảm họa lạm dụng kháng sinh cho trẻ", *Báo laodong.com.vn*, 10-10-2006.
8. Nguyễn Văn Ri (2007), “*Các phương pháp tách sắc ký, chuyên đề cao học*”, trường ĐH KHTN - ĐHQG Hà Nội

9. Tạ Thị Thảo (2005), *Bài giảng chuyên đề thống kê trong hóa phân tích*, ĐHQG Hà Nội
10. Trường ĐH Dược Hà Nội (1999), *Hóa Dược*, Tài liệu lưu hành nội bộ cho sinh viên trường ĐH Dược Hà Nội, NXB ĐH Dược Hà Nội
11. Ngô Quang Trung (2008), “*Xây dựng qui trình phân tích đồng thời một số kháng sinh học β -lactam và nghiên cứu sự tồn dư tại một số khu vực bệnh viện Hà Nội*”, Luận văn thạc sĩ khoa học, ĐHQGHN
12. Nguyễn Hùng Việt, “*Sắc ký khí, cơ sở lý thuyết và ứng dụng*”, trang 102-108, NXB Đại học Quốc gia Hà Nội.
13. Amber R. Solangi (2007), "Development of new analytical methods for 4-quinolone antibacterials and cephalosporin antibiotics", *National Centre of Excellence in Analytical Chemistry/ University of Sindh*
14. Althea W. McCormick (2003), "Geographic diversity and temporal trends of antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae* in the United States", *Journal Nature medicine*, 9: 424 - 430
15. Attila Gaspar, Melinda Andrasi, Szilvia Kardos (2002), "Application of capillary zone electrophoresis to the analysis and to a stability study of cephalosporins", *Journal of Chromatography B*, 775(2), pp 239–246
16. Biyang Deng, Aihong Shia, Linqiu Lia and Yanhui Kang (2008), "Pharmacokinetics of amoxicillin in human urine using online coupled capillary electrophoresis with electrogenerated chemiluminescence detection", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 48(4), 1249-1253
17. J.M. Cha, S. Yang, K.H. Carlson (2006), "Trace determination of β -lactam antibiotics in surface water and urban wastewater using liquid chromatography combined with electrospray tandem mass spectrometry", *Journal of Chromatography A*, 1115(1-2), 46-57
18. Dr. Ramon Companyo (2010) “Optimization of SPE Clean-up Approach for the Analysis of Sulfonamides in Animal Feed”, *Official Journal of the*

19. Daniela P. Santos and co-workers (2007), "Voltammetric sensor for amoxicillin determination in human urine using polyglutamic acid/glutaraldehyde film", *Science Direct*, 133 (2), pp 398-403
20. A. Fernández-González, R. Badía and M. E. Díaz-Gar (2003), "Micelle-mediated spectrofluorimetric determination of ampicillin based on metal ion-catalysed hydrolysis", *Analytica Chimica Acta*, 484(2), pp 223-231
21. F. Belal, M. M. El-Kerdawy, S. M. El-Ashry and D. R. El-Wasseef (2000), "Kinetic spectrophotometric determination of ampicillin and amoxicillin in dosage forms", *Il Farmaco*, 55(11-12), pp 680-686
22. James W. Jorgenson (1992), "High performance capillary electrophoresis", *Agilent Technologies*
23. L. Nozal, L. Arce, A. Ríos, M. Valcárcel (2004), "Development of a screening method for analytical control of antibiotic Residues by micellar electrokinetic capillary chromatography", *Journal of Analytica Chimica Acta*, 523(2004)21–28
24. M. I. Bailón-Pérez, A. M. García-Campana, C. Cruces-Blanco, M. del Olmo Iruela (2008), "Trace determination of β -lactam antibiotics in environmental aqueous samples using off-line and on-line preconcentration in capillary electrophoresis", *Journal of Chromatography A*, 185(2), pp 273-280
25. M. I. Bailón-Pérez, L. Cuadros Rodríguez, C. Cruces-Blanco (2006), "Analysis of different β -lactams antibiotics in pharmaceutical preparations Using micellar electrokinetic capillary chromatography", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 43(2007) pp 746–752
26. Masaaki Kai, Hiromi Kinoshita, Mikio Morizono (2003), "Chromatographic determinations of a β -lactam antibiotic, cefaclor by means of fluorescence, chemiluminescence and mass spectrometry", *Journal of Mass Spectrometry*, 39(3), 329 – 340
27. Merck (1996), *The Merck Index*, 12th edition
28. D. P. Raymond (2001), "Impact of a rotating empiric antibiotic schedule on infectious mortality in an intensive care unit", *Journal of Critical Care*

29. R. Gonzales (2001), "Clinical infectious diseases", *University of Chicago Press*, 23:757-762
30. Richard P. Wenzel, M.D Michael B. Edmond, M.D., M.P.H (2000), "Managing Antibiotic Resistance", *New England Journal of Medicine*, 343:1961-1963
31. Todd Barsby (2002), "New antibiotics from a marine isolate of *Bacillus laterosporus*", *Journal of Critical Care Medicine*, 1802-1348
32. Tomofumi Ohmori and fellow-worker (2011), "Simultaneous determination of eight β -lactam antibiotics in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry", *Journal of Chromatography B*, 1038-1042
33. C. Y. W Ang, W.H. Luo, E.B. Hansen, J.P. Freeman, H.C. Thompson (1996), "Rapid determination of ampicillin in bovine milk by liquid chromatography with fluorescence detection", *Journal of AOAC International*, 80(1),. 107-190
34. Water corporation (2003), "*Cartuchos Oasis*", pp 3-7
35. Wei Liu, Zhujun Zhang, Zuoqin Liu(2007), "Determination of β -lactam antibiotics in milk using micro-flow chemiluminescence system with on-line solid phase extraction", *Analytica Chimica Acta*,592(2), 187–192
36. WJ Blanchflower, Hewitt SA, Kennedy DG (1994), "Confirmatory assay for the simultaneous detection of five penicillins in muscle, kidney and milk using liquid chromatography - electrospray mass spectrometry", *Analyst*, 119(12), 2595-2601

