

Nghiên cứu xác định một số hợp chất hữu cơ có hoạt tính sinh học bằng phương pháp von-ampe hòa tan

Nguyễn Thị Thu Hòa

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 Hoàng Thọ Tín

Năm bảo vệ: 2011

Abstract. Giới thiệu tổng quan về hợp chất hữu cơ có hoạt tính sinh học: Giới thiệu về chất kháng sinh β -lactam; Các phương pháp phân tích định lượng β -lactam; Một số phương pháp xác định Cefaclor; Giới thiệu về phương pháp Von-ampe hòa tan (SV). Tiến hành thí nghiệm. Trình bày kết quả và thảo luận: Khảo sát các điều kiện thủy phân; Khảo sát các kỹ thuật quét; Khảo sát các thông số đo; Xây dựng đường chuẩn, đánh giá phương pháp; Phân tích một số mẫu thuốc trên thị trường.

Keywords. Hóa phân tích; Chất hữu cơ; Hợp chất sinh học; Phương pháp Von-Ampe; Chất kháng sinh

Content:

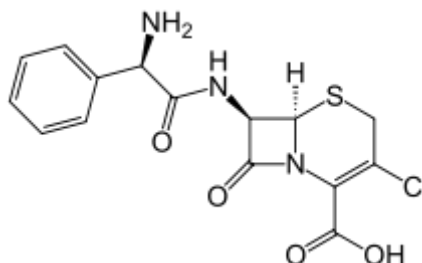
Trong các phương pháp điện hóa hòa tan, phương pháp von-ampe hòa tan có độ nhạy cao, kỹ thuật phân tích không quá phức tạp, máy móc thiết bị phổ biến trong các phòng thí nghiệm lại không quá đắt tiền, có độ lặp và độ chính xác cao. Ứng dụng chính của phương pháp này là: phân tích môi trường, phân tích lâm sàng, phân tích thực phẩm. Đặc biệt là hướng ứng dụng mới trong phân tích dược phẩm, mẫu sinh học bằng phương pháp von-ampe hòa tan hấp phụ. Tuy quá trình ứng dụng phân tích điện hóa vào phân tích thuốc và mẫu sinh học đã được làm nhiều trên thế giới nhưng ở Việt Nam vẫn còn tương đối mới mẻ, chưa có nhiều công trình về lĩnh vực này, trong luận văn này chúng tôi chỉ dừng lại ở việc xác định một chất trong thuốc kháng sinh và định lượng trên một số mẫu thuốc thật. Có nhiều loại kháng sinh đặc biệt các chất thuộc họ β -lactam, cefa, quinolone... khá phổ biến song

trong luận văn này chúng tôi chọn chất nghiên cứu là Cefaclor thuộc họ β - lactam.

CHƯƠNG I. TỔNG QUAN

Cefaclor tên theo IUPAC : 3-chloro-7-D-(2-phenylglycinamido)-3-cephem- 4-carboxylic acid monohydrate

Cấu trúc phân tử của Cefaclor



Công thức hóa học : $C_{15}H_{14}ClN_3O_4S$

Khối lượng phân tử : 367,8 g/mol

Công thức hóa học dạng monohidrat : $C_{15}H_{14}ClN_3O_4S \cdot H_2O$

Các nhà nghiên cứu thuộc Brazil và Anh đã tiến hành nghiên cứu xác định gián tiếp cefaclor bằng phương pháp von-ampe hoà tan catôt. Cefaclor không bị khử trên điện cực thủy ngân, nhưng nó lại được xác định bằng phương pháp cực phổ von ampe hoà tan catot dưới dạng sản phẩm thủy phân trong môi trường kiềm, sản phẩm này đạt được hiệu suất cao trong dung dịch đệm Britton-Robinson pH =10 ở 50°C trong 30 phút (pic khử tại pH = 10 ở thế -0,7V). Đường chuẩn theo phương pháp cực phổ xung vi phân tuyến tính đến khoảng 10^{-4} M. Hiệu suất thu hồi 93% cefaclor trong nước tiểu có nồng độ cefaclor 38,6 μ g/ml. Sử dụng phương pháp von-ampe hoà tan và hấp phụ lên điện cực thủy ngân ở thế hấp phụ là -0,2 V trong 30s, đường chuẩn tuyến tính thu được trong khoảng 0,35 đến 40 μ g/ml trong dung dịch đệm B-R pH =10. Độ lệch chuẩn tương đối 4,2%, giới hạn phát hiện 2,9 ng/ml. Phương pháp này có thể được dùng để xác định trực tiếp cefaclor trong nước tiểu mà không cần xử lý mẫu.[28]

Theo [42] tác giả đã nghiên cứu xác định Cefaclor bằng phương pháp von – ampe xung vi phân với điện cực làm việc là điện cực giọt thủy ngân và điện cực so sánh là Ag/AgCl , thủy phân cefaclor trong dung dịch NaOH 0,5M , pic của cefaclor xuất hiện tại – 0,85V. Trong khoảng nồng độ từ 1.10^{-8} M đến 5.10^{-6} M

nồng độ cefaclor có độ tuyến tính cao với chiều cao pic. Phương pháp có giới hạn phát hiện là 5.10^{-9} M.

CHƯƠNG 2. NỘI DUNG NGHIÊN CỨU

Mục đích nghiên cứu của đề tài là xây dựng quy trình phân tích định lượng cefaclor bằng phương pháp von-ampe hòa tan, từ đó áp dụng xác định hàm lượng Cefaclor trong một số mẫu thuốc trên thị trường. Vì vậy nội dung nghiên cứu bao gồm:

1. Khảo sát các điều kiện thủy phân
2. Khảo sát các phương pháp ghi đường hòa tan
3. Khảo sát các điều kiện đo tối ưu
4. Xây dựng đường chuẩn, đánh giá phương pháp
5. Phân tích một số mẫu thuốc trên thị trường

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khảo sát các điều kiện thủy phân

3.1.1. *Khảo sát sự xuất hiện pic của cefaclor*

Sự xuất hiện pic của Cefaclor khi đo trong nền dung dịch NaOH có thể được lí giải do sản phẩm thủy phân của Cefaclor đã có phản ứng điện hóa. Do đó, chúng tôi chọn nền là dung dịch NaOH trong các lần đo sau.

3.1.2. *Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ NaOH đến sự thủy phân*

Chúng tôi tiến hành khảo sát ảnh hưởng của nồng độ NaOH sau khi đã thủy phân Cefaclor 5.10^{-7} M trong dung dịch NaOH khoảng 30 phút. Chiều cao pic đạt giá trị cao nhất ở nồng độ NaOH 0,1M. Căn cứ vào kết quả trên chúng tôi chọn nồng độ NaOH là 0,1M cho các lần đo sau.

3.1.3. *Khảo sát thời gian thủy phân*

Chúng tôi tiến hành khảo sát ảnh hưởng của thời gian đến quá trình thủy phân chất phân tích trong dung dịch NaOH. Kết quả trên cho thấy khi thời gian thủy phân tăng từ 5 phút đến 40 phút thì chiều cao pic cũng tăng tới 25 phút thì không tăng nữa. Do đó chúng tôi chọn thời gian thủy phân là 25 phút trong các lần đo sau.

3.2. Khảo sát các kĩ thuật quét

3.2.1. Phương pháp von-ampe vòng (CV)

Chúng tôi tiến hành ghi đường CV của chất phân tích để tìm hiểu quá trình là hòa tan anot hay hòa tan catot. Chúng tôi chọn quét thế theo chiều âm (hòa tan catot) cho các lần đo tiếp theo.

3.2.2. Kĩ thuật xung vi phân và kĩ thuật quét sóng vuông

Chúng tôi thấy với kĩ thuật xung vi phân cho pic thon và đẹp hơn kĩ thuật sóng vuông. Vì vậy chúng tôi chọn kĩ thuật xung vi phân (DP) cho các lần đo sau.

3.3. Khảo sát các thông số đo

3.3.1. Khảo sát thế hấp phụ

Kết quả cho thấy khi thay đổi thế hấp phụ từ -0,5V đến -0,1V thì chiều cao pic tăng dần sau đó lại giảm. Do đó chúng tôi chọn thế hấp phụ là -0,2V cho các khảo sát tiếp theo.

3.3.2. Khảo sát thời gian làm giàu

Kết quả cho thấy khi tăng thời gian làm giàu thì chiều cao pic tăng dần, nếu tiếp tục tăng chiều cao pic lại giảm vì xuất hiện sự hấp phụ đa lớp. Nhìn vào kết quả trên chúng tôi chọn thời gian làm giàu cho nồng độ Cefaclor 10^{-7} M là 120 giây, còn nồng độ Cefaclor 10^{-6} M là 90 giây vì ở giá trị này pic khá cao và cân đối.

3.3.3. Khảo sát thời gian cân bằng

Kết quả cho thấy khi tăng thời gian cân bằng thì chiều cao pic có tăng nhưng tăng chậm. Nói chung thời gian cân bằng không ảnh hưởng nhiều đến chiều cao pic. Do đó chúng tôi chọn thời gian cân bằng là 5 s cho các lần đo sau.

3.3.4. Khảo sát tốc độ quét thế

Căn cứ vào kết quả chúng tôi chọn tốc độ quét thế 20 mV/s cho các khảo sát tiếp theo vì tại đây pic khá cao và cân đối.

3.3.5. Khảo sát ảnh hưởng của biên độ xung

Kết quả cho thấy khi thay đổi biên độ xung thì cường độ dòng và thế đỉnh pic cũng thay đổi. Qua kết quả nghiên cứu cho thấy tại biên độ xung 0,05 V thì chiều cao pic tương đối lớn và pic khá cân đối. Do đó chúng tôi chọn biên độ xung là 0,05 V cho các khảo sát tiếp theo.

3.3.6. Khảo sát ảnh hưởng của bước thế

Chúng tôi chọn bước thế 0,005V cho các khảo sát tiếp theo.

3.3.7. Khảo sát tốc độ khuấy

Qua kết quả phân tích cho thấy ở 2000 rpm cường độ pic đạt giá trị tương đối cao và pic khá cân đối. Do đó chúng tôi chọn tốc độ khuấy là 2000 rpm cho các khảo sát tiếp theo.

3.3.8. Khảo sát thời gian sục khí

Thấy thời gian sục khí không ảnh hưởng nhiều đến chiều cao pic, từ 200s trở đi hầu như lượng oxi hòa tan trong dung dịch đã bị đuổi hết nên ở thời gian sục khí lâu hơn pic cũng không thay đổi đáng kể, do đó chúng tôi chọn thời gian sục khí là 200s cho các khảo sát tiếp theo.

3.4. Xây dựng đường chuẩn, đánh giá phương pháp

3.4.1. Xây dựng đường chuẩn

Để xây dựng đường chuẩn của chất phân tích chúng tôi tiến hành đo 6 mẫu có nồng độ từ 10^{-7} M đến nồng độ $10 \cdot 10^{-7}$ M với các điều kiện tối ưu đã được khảo sát ở trên.

→ Phương trình hồi qui đầy đủ của đường chuẩn có dạng :

$$Y = (0,01595 \pm 0,20159) + (1,29885 \pm 0,03321) \cdot X$$

3.4.2. Khảo sát độ lặp lại và giới hạn phát hiện của phương pháp

3.4.2.1. Độ lặp lại

Khảo sát độ lặp lại là một yếu tố quan trọng để đảm bảo sự chính xác và độ tin cậy của phép đo. Để đánh giá độ lặp lại của phương pháp chúng tôi tiến hành đo lặp lại 8 lần với 2 mẫu dung dịch Cefaclor 10^{-7} M và 10^{-6} M thủy phân trong dung dịch NaOH 0,1M trong 25 phút. Độ lệch chuẩn và hệ số biến động tương đối nhỏ vì vậy phương pháp có thể đáp ứng nhu cầu phân tích.

3.4.2.2. Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) của phương pháp

Như vậy với các điều kiện đo như trên phương pháp có thể đạt giới hạn phát hiện là $6,27 \cdot 10^{-9}$ M (2,31 ppb) và giới hạn định lượng là $2,09 \cdot 10^{-8}$ M (7,69 ppb).

3.5. Phân tích một số mẫu thuốc trên thị trường

3.5.1. Mẫu Cefaclor của công ty cổ phần hóa dược MEKOPHAR (MKP)

Kết quả phân tích đạt 100,46%. So với lượng Cefaclor trong 1 viên nang mà nhà sản xuất đưa ra là 250 mg thì độ sai lệch là 0,46 %.

3.5.2. Mẫu Cefaclor của công ty cổ phần hóa dược phẩm TW 25

Kết quả phân tích đạt 98,31%. So với lượng Cefaclor mà nhà sản xuất đưa ra là 250 mg/1 viên nang thì độ sai lệch là 1,69%.

3.5.3. Mẫu CEFACLOR 125 mg

Kết quả phân tích đạt 98,28 %. So với lượng Cefaclor có trong 1 gói mà nhà sản xuất đưa ra là 125 mg thì độ sai lệch là 1,72 %.

KẾT LUẬN

Luận văn đã đạt được một số kết quả như sau:

Với qui trình phân tích và các điều kiện đo tối ưu đã được xác định ở trên, cefaclor có độ tuyến tính cao trong khoảng nồng độ 10^{-7} M đến 10^{-6} M, đường chuẩn có dạng $Y = (1,305 \pm 0,0199) \cdot X$, phương pháp có độ lặp lại cao. Phân tích mẫu thuốc có trên thị trường của công ty cổ phần hóa dược Mekophar bằng phương pháp thêm chuẩn

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. Chương trình hợp tác khoa học kỹ thuật Việt Nam-Hà Lan, Đề tài VH2, *Một số phương pháp phân tích điện hóa hiện đại*, Đại học Quốc Gia Hà Nội.
4. Trần Thị Thu Hằng (2010), *Tách và xác định β -Lactam trong đối tượng sinh học bằng phương pháp điện di mao quản*, Luận văn thạc sĩ khoa học, ĐHQGHN.
5. Trần Văn Hiều, Từ Vọng Nghi, Nguyễn Văn Ri, Nguyễn Xuân Trung (2003), *Hóa phân tích-phần 2-các phương pháp phân tích công cụ*, Đại học Quốc Gia Hà Nội, Hà Nội.
6. <http://tusach.thuvienkhoahoc.com/wiki/Cefaclor>
7. <http://www.thuocbietduoc.com.vn>
8. Nguyễn Việt Huyền (1999), *Cơ sở các phương pháp phân tích điện hóa học*, Đại học quốc gia Hà Nội.
9. Nguyễn Thị Nga (2009), *Nghiên cứu xác định Trimethoprim trong dược phẩm bằng phương pháp von-ampe hòa tan hấp phụ sóng vuông*, Luận văn tốt nghiệp đại học, Trường đại học khoa học tự nhiên.
10. Từ Vọng Nghi (1969), *Phương pháp phân tích cực phổ-các bài tập*, bộ môn hóa phân tích-khoa hóa học-đại học tổng hợp.
11. Phạm Luận (1997), *Chuẩn bị dung dịch trong hóa học phân tích*.
12. Tạ Thị Thảo (2005), *Bài giảng chuyên đề thống kê trong hóa phân tích*, ĐH Quốc gia Hà Nội, Hà Nội.
13. Nguyễn Thu Thủy (2009), *Nghiên cứu xác định Ciprofloxacin trong một số dược phẩm bằng phương pháp điện hóa*, Luận văn thạc sĩ khoa học, Trường đại học khoa học tự nhiên.
14. 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.
15. 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.
16. Vũ Thị Tuyết (2008), *Nghiên cứu xác định Niphedipine trong dược phẩm bằng phương pháp von-ampe hòa tan catot trên điện cực giọt thủy ngân treo*, Luận văn tốt nghiệp đại học, Trường đại học khoa học tự nhiên.

TIẾNG ANH

17. 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*, volume (484), pp. 223-231.
18. A.G.Fogg, N.M. Fâyd, C.Burgess and A.McGlynn (1979), "Differential pulse polarographic determination of cephalosporins and their degradation products", *Analytica Chimica Acta*, volume (108), pp. 205-211.
19. Al- Momani (2001), "Spectrophotometric determination of selected Cephalosporins in drug Formulations using flow injection analysis", *J. of Pharmaceutical and Biomedical Research*, 25, pp. 751-757.
20. Ari Ivaska and Fredrik Nordstrom (2002), "Determination of some cephalosporins by differential pulse polarography and linear scan voltammetry", *Analytica Chimica Acta*, volume (146), pp. 87-95.

21. 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*, volume (775), pp. 239–246.
22. 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*, volume (48), pp. 1249-1253.
23. Bohdar Ogorevcf and Sergej Gomieć (1991), "Electrochemical analysis of cephalosporin antibiotics", *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, volume (9), pp. 225-236.
24. 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*, volume (80), pp. 107-190.
25. Daniela P. Santos, Márcio F. Bergamini, Maria Valnice B. Zanoni, (2008) "Voltammetric sensor for amoxicillin determination in human urine using polyglutamic acid/glutaraldehyde film", *Sensors and actuators B: Chemical*, volume (133), pp. 398-403.
26. 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*, volume (55), pp. 680-686.
27. 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*, volume(1115), pp. 46-57.
28. L. N. C. Rodrigues, M. V. B. Zanoni and A. G. Fogg, (1999), "Indirect polarographic and cathodic stripping voltammetric determination of cefaclor as an alkaline degradation product", *J Pharm Biomed Anal*, pp.497-505.
29. 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*, volume (523), pp .21–28.
30. M.I Bailon-Perez, A.M.Garcia-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*, volume (185), pp. 273-280.
31. M.I Bailón-Pérez, L.CuadrosRodríguez,C.Cruces-Blanco (2006), "Analysis of different β -lactams antibiotics in pharmaceutical preparations Using micellar electrokinetic capillary chromatography ", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, volume(43), pp. 746–752.
32. 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*, volume (39), pp. 329 – 340.
33. Merk (1996), *The Merck Index*, 12th edition.

34. N. Abo El-Maali, A.H. Osman, A.A.M. Aly, G.A.A. Al-Hazmi (2004), "Voltammetric analysis of Cu (II), Cd (II) and Zn (II) complexes and their cyclic voltammetry with several cephalosporin antibiotics", *Bioelectrochemistry*, volume (65), pp. 95– 104.
35. Nagori BP and Shukla Shiv Shankar(2008), "New spectrophotometric determination of Cefaclor in bulk drug and synthetic mixtrure", *Asian Journal of research in chemistry*, volume (01), pp. 51-54.
36. Nagwa Abo El Maali , Azza M.M. Ali, Mahmoud Khodari and M.A. Ghandour (1991), "Cathodic stripping voltammetric determination of the cephalosporin antibiotic Ceftriaxone at the mercury electrode in aqueous and biological media", *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, volume (26), pp. 485-492.
37. Rolando Gonzalez-Hernandez , Nuevas-Paz Lauro, Soto-Mulet Laritza, Lopez-Lopez Miguel, Hoogmartens Joseph (2001), "Reversed phase high performance liquid chromatographic determination of cefixime in bulk drugs", *Journal of liquid chromatography & related technologies*, volume (24), pp. 2315-2324.
38. Viviane M. Ivama, Leticia N. C. Rodrigues, Cláudia C. I. Guaratini and Maria Valnice B. Zanoni(1999), "Spectrophotometric determination of cefaclor in pharmaceutical preparations", *Journal of Química Nova*, volume (22), pp. 201-204.
39. 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*, volume (592), pp. 187–192.
40. 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*, Volume (119), pp. 2595-2601.
41. Yahya Mrestani, Reinhard H. H. Neubert, Albert Hartl and Johannes Wohlra "Determination of cephalosprins in urine and bile by capillary zone electrophoresis", *Analytica Chimica b* (1997), *Acta*, volume (349), pp. 207-213.

