

# Nghiên cứu xác định Cloramphenicol trong dược phẩm bằng phương pháp Von-ampe sử dụng điện cực giọt thủy ngân treo

Nguyễn Phương Hà

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên

Khoa Hóa học

Luận văn Thạc sĩ ngành: Hóa phân tích; Mã số: 60 44 29

Người hướng dẫn: PGS.TS. Hoàng Thọ Tín

Năm bảo vệ: 2011

**Abstract.** Trình bày cơ sở lý luận về: Thuốc kháng sinh, tính chất hóa lý và dược lý của Cloramphenicol; Phương pháp von-ampe và một số phương pháp xác định Cloramphenicol. Xây dựng quy trình xác định lượng thuốc kháng sinh Cloramphenicol theo phương pháp von-ampe, dùng điện cực thủy ngân treo (HMDE) và áp dụng quy trình tìm được để phân tích mẫu thực tế. Khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố như điện hóa, nồng độ dung dịch đệm, tốc độ quét thế, ... đến thế đỉnh pic ( $E_p$ ) và giá trị dòng ( $I_p$ ) khi xác định Cloramphenicol theo phương pháp von-ampe trên cực làm việc HMDE.

**Keywords.** Hóa phân tích; Dược phẩm; Phương pháp Von-Ampe; Thủy ngân

## Content

### MỞ ĐẦU

Ngày nay, cuộc sống hiện đại đòi hỏi con người phải lao động ở cường độ cao. Thêm vào đó, môi trường sống ô nhiễm là một trong những nguyên nhân khiến tỉ lệ mắc các bệnh do nấm và khuẩn ở người ngày càng tăng. Việc nghiên cứu thuốc chữa trị các loại bệnh này rất được quan tâm chú ý. Kháng sinh là chất có khả năng ức chế hoặc tiêu diệt một số loài nấm, vi khuẩn gây bệnh cho người và sinh vật. Vì vậy các loại thuốc kháng sinh đóng vai trò quan trọng trong việc bảo vệ và nâng cao sức khỏe của sinh vật nói chung và con người nói riêng. Hoạt động kiểm soát hàm lượng thuốc kháng sinh đưa vào cơ thể sao cho phù hợp với các mức độ nhiễm khuẩn đóng vai trò quyết định trong pháp đồ điều trị bệnh. Do đó, việc xác định được chính xác hàm lượng thuốc là điều cần thiết.

Hiện nay, có rất nhiều phương pháp được dùng để xác định hàm lượng kháng sinh. Trong số đó, phương pháp cực phổ được đánh giá là một trong những phương pháp có rất nhiều thuận lợi, đặc biệt là đối với các chất kháng sinh có tính điện hoạt như cloramphenicol. Việc nghiên

cứu xác định hàm lượng kháng sinh cloramphenicol đã được nghiên cứu nhiều trên thế giới cũng như ở trong nước. Tuy nhiên các phương pháp chủ yếu được nghiên cứu là các phương pháp sắc ký và các phương pháp quang. Trong luận văn này, chúng tôi tiến hành nghiên cứu sử dụng phương pháp cực phổ với kỹ thuật đo xung vi phân để xác định hàm lượng kháng sinh cloramphenicol trong một số loại dược phẩm khác nhau, ở dạng dung dịch cũng như ở dạng bột.

Sóng cực phổ của cloramphenicol là sóng cực phổ anot, thể xuất hiện pic nằm xung quanh vị trí 0V, do đó ít bị ảnh hưởng bởi các hóa chất khác. Việc sử dụng phương pháp cực phổ một lần nữa khẳng định tính ưu việt của các phương pháp phân tích điện hóa, cho phép xác định nhanh hàm lượng các chất, việc xử lý mẫu trước khi tiến hành đo đơn giản và tránh làm mất chất trong quá trình phân tích

## TỔNG QUAN

Cloramphenicol được phân lập từ *Streptomyces venezuelae* vào năm 1947. Tên quốc tế của cloramphenicol là *2,2-dichloro-N-[1,3-dihydroxy-1-(4-nitrophenyl)propan-2-yl]acetamide*.

Vào năm 1948 được cho rằng chống lại bệnh sốt phát ban có hiệu quả và trở thành kháng sinh đầu tiên trải qua quy mô sản xuất lớn. Đến năm 1950, cộng đồng y khoa đã nhận thức được rằng thuốc có thể gây ra thiếu máu bất sản nghiêm trọng và có khả năng gây tử vong, và nó nhanh chóng bị ghét bỏ. Năm 1980: cloramphenicol được coi là chất gây ung thư cho con người. Năm 1981: theo đánh giá lại của Cơ quan Nghiên cứu Ung thư Quốc tế, IARC đã kết luận rằng các dữ liệu gây ung thư trên của cloramphenicol ở người là không đủ sức mạnh để làm chứng cứ và không có dữ liệu trên thực nghiệm động vật. Năm 1987 và năm 1990: cloramphenicol được kết luận rằng cũng có những bằng chứng nhất định để kết luận chất này gây ung thư ở động vật thực nghiệm nhưng khả năng ở người là rất hạn chế

## TÍNH CHẤT HÓA LÝ

Tinh thể hình kim hoặc tấm kéo dài

Mất thường ở dạng bột mịn màu trắng xám, trắng hoặc vàng trắng

Nhiệt độ nóng chảy vào khoảng 150,5°C đến 151,5°C

Thăng hoa trong chân không cao và nhạy cảm với ánh sáng

Các nhóm nitro là dễ dàng khử thành các nhóm amino

Trong 4 chất đồng phân lập thể, chỉ có dạng  $\alpha R$ ,  $\beta R$  (hay còn gọi là dạng D) là có hoạt tính (IARC 1990)

Tính chất	Thông tin	Tài liệu tham khảo
Khối lượng phân tử	323,1322 g/mol	Budavari et al. 1996, Chemfinder 2000
Màu sắc	Trắng xám hoặc trắng vàng	Budavari et al. 1996, CRC 1998, Chemfinder 2000
Vị	Đắng	HSDB 1995
Trạng thái vật lý	Tinh thể hình kim hoặc tấm kéo dài, bột tinh thể	Budavari et al. 1996, Chemfinder 2000
Nhiệt độ nóng chảy	150,5°C - 151,5°C	Budavari et al. 1996, HSDB 1995
pH	Trung tính đối với giấy quỳ	HSDB 1995
Áp suất bay hơi	$1,73 \cdot 10^{-12}$ mmHg	HSDB 1995
Thời gian bán hủy trong cơ thể người	1,6 – 4,6 giờ	HSDB 1995

Tính tan		
Nước 25°C	Tan ít, 2,5 mg/mL	Chemfinder 2000, HSDB 1995
Propylen glycol	150,8 mg/mL	HSDB 1995
50% acetamid	5%	HSDB 1995
Clorofom	Tan	HSDB 1995
Methanol	Tan tốt	HSDB 1995
Etanol	Tan tốt	HSDB 1995
Butanol	Tan tốt	HSDB 1995
Etyl acetat	Tan tốt	HSDB 1995
Axeton	Tan tốt	HSDB 1995
Ete	Tan	HSDB 1995
Benzen	Không tan	HSDB 1995
Ete dầu hỏa	Không tan	HSDB 1995
Dầu thực vật	Không tan	HSDB 1995

#### CƠ CHẾ TÁC ĐỘNG CỦA KHÁNG SINH (4)

Ức chế quá trình tổng hợp vách của vi khuẩn (vỏ) của vi khuẩn.

Ức chế chức năng của màng tế bào.

Ức chế quá trình sinh tổng hợp protein Ức chế quá trình tổng hợp acid nucleic

#### DƯỢC LÝ VÀ CƠ CHẾ TÁC DỤNG

Cloramphenicol thường có tác dụng kìm khuẩn, nhưng có thể diệt khuẩn ở nồng độ cao hoặc đối với những vi khuẩn nhạy cảm cao

Đối với Cloramphenicol, cơ chế kháng khuẩn được cụ thể hóa qua việc ức chế sinh tổng hợp protein ở những vi khuẩn nhạy cảm bằng cách gắn vào tiểu thể 50S của ribosom

Cloramphenicol cũng ức chế tổng hợp protein ở những tế bào tăng sinh nhanh của động vật có vú. Nhiều vi khuẩn có sự kháng thuốc cao với cloramphenicol ở Việt Nam. thuốc này gần như không có tác dụng đối với *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Enterobacter spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*

Cloramphenicol không có tác dụng đối với nấm.

Tỷ lệ kháng thuốc đối với cloramphenicol, thử nghiệm Việt Nam trong năm 1998 rất khác nhau ở các loại khuẩn khác nhau (85% → 28%) là do sử dụng quá mức và được lan truyền qua plasmid

Dược động học của Cloramphenicol được hấp thu nhanh qua đường tiêu hóa. Cloramphenicol palmitat thủy phân trong đường tiêu hóa và được hấp thu dưới dạng cloramphenicol tự do

Sau khi tiêm tĩnh mạch cloramphenicol natri succinat, có sự khác nhau đáng kể giữa các cá thể về nồng độ cloramphenicol trong huyết tương, tùy theo độ thanh thải của thận

Sau khi dùng tại chỗ ở mắt, cloramphenicol được hấp thu vào thủy dịch. Những nghiên cứu ở người bệnh đục thể thủy tinh cho thấy mức độ hấp thu thay đổi theo dạng thuốc và số lần dùng thuốc. Nồng độ thuốc trong thủy dịch cao nhất khi dùng thuốc mỡ tra mắt cloramphenicol nhiều lần trong ngày

Cloramphenicol phân bố rộng khắp trong phần lớn mô cơ thể và dịch, kể cả nước bọt, dịch cổ trướng, dịch màng phổi, hoạt dịch, thủy dịch và dịch kính. Nồng độ thuốc cao nhất trong gan và thận

Cloramphenicol gắn kết khoảng 60% với protein huyết tương

Cloramphenicol bị khử hoạt chủ yếu ở gan do glucuronyl transferase

## SẢN XUẤT

Cloramphenicol được sản xuất một cách tự nhiên từ *Streptomyces venezuelae*

Hiện nay nó được sản xuất theo phương thức tổng hợp hóa học

Năm 1948, cloramphenicol được sản xuất một cách thương mại hóa lần đầu tiên tại Hoa Kỳ.

Mỹ sản xuất của cloramphenicol được ước tính là lớn hơn 908 kg vào năm 1977 và 1979. Mỹ nhập khẩu cho những năm này được ước tính khoảng 8.150 kg và 8.200 kg

Hiện tại mức độ sản xuất cho cả hai loại dùng trong thú y và con người không được công bố trong các tài liệu (tính đến năm 2000).

## PHƯƠNG PHÁP VON-AMPE

Là nhóm các phương pháp phân tích dựa vào việc nghiên cứu đường von–ampe (đường phân cực), là đường biểu diễn sự phụ thuộc của cường độ dòng điện vào điện thế khi tiến hành nghiên cứu dung dịch chất phân tích

Quá trình điện cực được thực hiện trong một bình điện phân đặc biệt gồm 3 điện cực

Cực làm việc Cực so sánh Cực phụ trợ

Các cực làm việc thường dùng trong phương pháp von-ampe

Cực giọt Hg treo Cực màng Hg, Bi.. Cực đĩa rắn

Các kỹ thuật ghi đường von-ampe: Kỹ thuật xung vi phân, Kỹ thuật sóng vuông

## MỘT SỐ PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH CLORAMPHENICOL

### ***Phân tích bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao***

Pha tĩnh được sử dụng là pha tĩnh không phân cực C8 hoặc C18

Dung môi động có tính phân cực cao như: Hỗn hợp H<sub>2</sub>O/Acetonitril(75/25,v/v) hay hỗn hợp axit axetic 1% trong methanol/H<sub>2</sub>O (55/45,v/v). Tốc độ pha động 1ml/phút

Detector thường được sử dụng là UV-VIS ở bước sóng 278nm hay detector MS

Tài liệu [37] còn sử dụng thêm cột chiết pha rắn với ống cacbon đa vách làm chất hấp phụ trước khi mẫu được chạy qua cột sắc ký lỏng kết hợp detector khối phổ

Tài liệu [34] đã sử dụng hệ sắc ký lỏng hiệu năng cao để tách cloramphenicol và nhóm các dẫn xuất của nó sử dụng detector điện hóa thay vì detector UV thông thường

### ***Phân tích bằng sắc ký khí***

Pha tĩnh polysiloxan có độ phân cực từ thấp đến trung bình với tỷ lệ phenyl từ 5-50% (metyl 95-50%)

Pha động là khí N<sub>2</sub>, Tốc độ pha động: 1mL/phút

Detector thường được sử dụng là ECD hay MS

Khi phân tích bằng sắc ký khí, để tăng độ nhạy cho phép phân tích, cloramphenicol thường được dẫn xuất hóa thành trimetylsilyl-cloramphenicol (TMS-CAP). GC/MS, với kỹ thuật NCI, các m/z đặc trưng cho TMS-CAP là 466, 468, 470, 376, 378. GC/MS/MS, với kỹ thuật NCI cho các m/z đặc trưng 304, 322, 358, 394, 430

### ***Phân tích bằng phương pháp quang***

Nguyên tắc chung của phương pháp quang này là khử nhóm nitro của cloramphenicol thành nhóm amino để tạo thành hợp chất có màu. Các nhóm nghiên cứu khác nhau có thể sử dụng các chất khác nhau để làm tác nhân khử

Tài liệu [23] khử nhóm nitro ở gốc hydrocacbon thơm bằng hỗn hợp Zn và Ca/HCl, cho sản phẩm tác dụng với trisodium pentacyanoaminoferrat để tạo thành sản phẩm có màu đỏ tía có độ hấp thụ cực đại giữa 480 – 540 nm

Hoặc tài liệu [22] khử cloramphenicol bằng  $TiCl_3$ , trong dung dịch axit axetic băng ở nhiệt độ phòng trong vòng 10 phút. Sản phẩm khử được gia nhiệt với p-dimetylaminobenzaldehyt trong 20 phút, sản phẩm tạo thành có màu vàng tươi, hấp thụ mạnh ánh sáng ở vùng khả kiến và tuân theo định luật Beer ở 440nm

### ***Cực phổ xung vi phân***

Dung dịch nền là đệm axetat pH từ 4 đến 6, khoảng xuất hiện pic  $E_p = -0,23V$

Khoảng nồng độ có thể xác định là 300ppb đến 20ppm đối với máy Mode 174 và 100ppb đến 20ppm đối với máy Mode 374

### ***Cực phổ sóng vuông***

[14] sử dụng điện cực cacbon thủy tinh (glasy cacbon) đã được tiền xử lý để tiến hành xác định cloramphenicol trong môi trường đệm axetat 0,05M pH 5,3. Đường von-ampe vòng cho thấy pic khử của cloramphenicol xuất hiện ở thế  $-0,646V$ . Khoảng tuyến tính làm việc tốt là  $1,0.10^{-7} - 7,0.10^{-5} M$  và giới hạn phát hiện là  $6,0.10^{-9} M$ .

### ***Phân tích dòng chảy sử dụng detecto điện hóa***

[15] sử dụng hệ điện cực trong đó điện cực làm việc là màng kim cương mỏng gắn nguyên tố Bo (boron-doped diamond thin-layer). Nền đệm được chọn là đệm photphat pH 6 chứa 1% etanol. Thế làm việc  $E = -0,7V$ , khoảng tuyến tính thu là  $0,1-50 \mu M$  ( $R^2=0.9948$ ), giới hạn phát hiện là  $0,3\mu M$ .

### ***Điện di mao quản sử dụng đầu dò vi sợi cacbon***

Phương pháp này đòi hỏi thế áp vào rất cao, khoảng 20kV, trong mỗi lần đo cung cấp một xung 5kV trong thời gian 5s. Điều kiện tối ưu cho phương pháp này là sử dụng dung dịch đệm  $8,4.10^{-4}mol/L HOAc - 3,2.10^{-4}mol/L NaOAc$ . Trong phương pháp này, không cần đuổi oxi, điện tích điện cực càng nhỏ thì ảnh hưởng của oxi càng giảm. Khoảng tuyến tính  $5.10^{-6} - 1.10^{-3}mol/L$ , giới hạn phát hiện  $9,1.10^{-7} mol/L$ .

### ***Một số phương pháp khác***

Xét nghiệm miễn dịch men (enzyme immunoassay) lại cho thấy các ưu điểm rõ rệt so với các phương pháp truyền thống. Không cần dùng đến các nguyên liệu phóng xạ, cũng như thời gian thực hiện xét nghiệm giảm đáng kể so với khi thực hiện phương pháp sắc ký khí

Hiện nay phương pháp phân tích miễn dịch cạnh tranh (ELISA) là phương pháp tương đối đơn giản, chi phí không quá cao, kết quả xét nghiệm lại chính xác và có độ tương hợp cao với phương pháp sắc ký. Đây phương pháp xét nghiệm nhanh (GICA), dùng để định lượng Chloramphenicol trong mô thịt, cá, tôm... có thời gian xét nghiệm 20 phút, cho độ chính xác trên 95%.

## **CHƯƠNG II: NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

**MỤC ĐÍCH:** Nghiên cứu xây dựng quy trình xác định lượng thuốc kháng sinh cloramphenicol theo phương pháp von-ampe, dùng điện cực thủy ngân treo (HMDE). Sau đó áp dụng quy trình tìm được để phân tích một số mẫu thực tế

### **NỘI DUNG:**

Tìm hiểu đặc tính điện hóa của cloramphenicol trên cực HMDE

Khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố đến thế đỉnh pic ( $E_p$ ) và giá trị dòng ( $I_p$ ) khi xác định cloramphenicol theo phương pháp von-ampe trên cực làm việc HMDE

Các yếu tố khảo sát bao gồm: - Thành phần nền, pH, nồng độ nền

- Ảnh hưởng của oxy hòa tan và các chất khác

Đánh giá độ lặp lại và độ phục hồi, độ nhạy, GHPH và khoảng tuyến tính khi dùng cực HMDE. Qua đó, đánh giá khả năng ứng dụng của phương pháp.

Toàn bộ quá trình ghi đường von-ampe hòa tan và xác định  $E_p$ ,  $I_p$  đều được thực hiện tự động trên máy cực phổ 757 VA theo một chương trình được đưa vào từ bàn phím.

Dung dịch nghiên cứu chứa thành phần nền được điều chỉnh pH phù hợp và chất chuẩn cloramphenicol được cho vào bình điện phân 3 cực: cực HMDE, cực so sánh Ag/AgCl và cực phụ trợ Pt

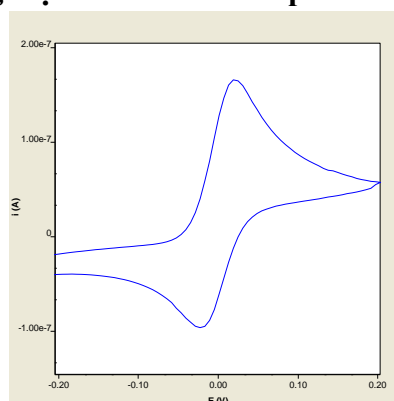
Tất cả các thí nghiệm đều được tiến hành ở nhiệt độ phòng, thường là 25oC

Các kỹ thuật ghi được sử dụng là kỹ thuật ghi đường quét von-ampe vòng và kỹ thuật quét xung vi phân

Số liệu được xử lý thông qua phần mềm Excel, các yếu tố đánh giá độ tin cậy của phương pháp phân tích (độ lặp lại, độ hồi phục...) được xử lý qua phần mềm Origin 6.0

### CHƯƠNG III: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### Khảo sát đáp ứng điện hóa của cloramphenicol trên HMDE



$$\Delta E_p = E_{p,a} - E_{p,c} = \frac{0,059}{n} = 0,0357 \Leftrightarrow n \approx 2$$

Thực chất pic tín hiệu được ghi nhận trong bài luận văn này là của quá trình 1. Do ảnh hưởng của quá trình trao đổi chậm 2e nên kết quả cho thấy sự chênh lệch giữa thực nghiệm và lý thuyết.

Việc lựa chọn sử dụng pic anot hay catot phụ thuộc vào chiều cao pic của chúng. Hình 3.1 cho chúng ta thấy chiều cao pic oxi hóa và khử là tương đối cân nhau, 145 nA đối với pic anot và 120 nA đối với pic catot. Tuy nhiên do pic anot cho tín hiệu cao hơn, rõ ràng hơn nên trong khuôn khổ luận văn này chúng tôi sẽ tiến hành các bước thực nghiệm tiếp theo bằng kỹ thuật ghi xung vi phân lấy pic anot.

#### Khảo sát tính chất điện hóa của cloramphenicol trong một số nền

Nhận thấy  $[H^+]$  có tham gia vào quá trình khử cloramphenicol nên pH có ảnh hưởng tới hoạt tính cực phổ của nó

ta dễ dàng nhận thấy việc tiến hành thí nghiệm trong nền axit mạnh như  $H_2SO_4$  và HCl có tín hiệu của cloramphenicol. Tuy nhiên, pic xấu và không cân đối, thậm chí đối với HCl, tín hiệu pic thu được bị chệch ngọn. Đó là do trong môi trường axit mạnh, dạng tồn tại của

cloramphenicol chủ yếu ở dạng phân tử không phân ly, do đó chất có tính điện hoạt không ổn định.

Tín hiệu thu được của cloramphenicol trong các nền đệm axetat và amoni cho pic rất cân đối và đẹp. Độ lặp lại khi ghi nhận tín hiệu điện hóa trong 2 nền đệm này khá tốt. Dem so sánh số liệu thu được ở bảng 3.1, chúng tôi chọn nền đệm axetat làm nền đệm để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo vì chúng cho tín hiệu cao hơn và ổn định hơn so với nền amoni

#### ***Ảnh hưởng của pH***

Khi pH tăng thế đỉnh pic dịch chuyển dần về phía âm hơn, tại pH 3,2, giá trị thế đỉnh pic là 90,3mV trong khi tại pH 6,8, giá trị thế này là -88,2mV. Đó là do ion  $H^+$  có mặt trong phương trình khử cloramphenicol tại bề mặt điện cực. Nói chung, trong nền đệm axetat, tại các giá trị pH khác nhau, pic cloramphenicol đẹp và cân đối. Về cường độ dòng, ta dễ dàng nhận thấy sóng cực phổ của cloramphenicol tăng khi pH giảm từ 6,8 đến 5,5, đạt cực đại tại pH 5,5 sau đó cường độ pic lại bị giảm dần với cùng một nồng độ chất phân tích. Mặc dù đến pH thấp (pH 3,2) thì giá trị cường độ dòng có tăng lên nhưng chân pic có được không cân đối, do đó việc khảo sát pH dừng lại ở pH này. Vì vậy đệm axetat với pH 5,5 đã được chọn là pH tối ưu cho nền đệm đo cloramphenicol trong khuôn khổ luận văn này.

#### ***Ảnh hưởng nồng độ dung dịch đệm***

Tại một nồng độ của cloramphenicol, khi nồng độ nền giảm thì chiều cao pic tăng, đó là do độ nhớt của dung dịch giảm làm tăng hệ số khuếch tán của dung dịch. Tuy nhiên, khi dung dịch quá loãng, pic bị nghiêng, không cân đối và hệ số tương quan của phương trình hồi quy giảm. Ngược lại nồng độ dung dịch lớn sẽ triệt tiêu được dòng điện chuyển, tuy nhiên độ nhớt tăng, tạp chất nhiều cũng gây ảnh hưởng không nhỏ đến pic cloramphenicol, cụ thể là hệ số tương quan khi đó cũng nhỏ dần.

Với những nguyên nhân trên và dựa vào thực nghiệm, chúng tôi chọn nền axetat nồng độ 0,1M là thích hợp nhất

#### ***Khảo sát ảnh hưởng của tốc độ quét thế***

Kết quả cho thấy dòng anot và catot tăng tuyến tính theo tốc độ quét ( $10 \div 200 \text{mV/s}$ ), phương trình hồi quy tuyến tính của dòng anot và catot phụ thuộc theo tốc độ quét dọc tương ứng 32,679 nA và - 27,346 nA, hệ số tương quan tương ứng là 0,9978 và 0,9798. Vị trí thế anot và catot của cloramphenicol hầu như không thay đổi theo tốc độ quét thế, khoảng cách thế anot và catot trung bình khoảng 35,7mV. Từ kết quả trên cho thấy: quá trình hấp phụ và khuếch tán cloramphenicol xảy ra đồng thời trên bề mặt điện cực thủy ngân và đây là một phản ứng thuận nghịch.

#### ***Khảo sát ảnh hưởng của oxi***

Dễ dàng nhận thấy khi không đuổi khí oxi ra khỏi dung dịch, pic của oxi chèn vào pic của cloramphenicol làm cho tín hiệu thu được có sườn trái là pic của oxi, sườn bên phải là pic của cloramphenicol, hai pic chồng lên nhau dẫn đến cường độ tín hiệu bị cộng hưởng. Kết quả là chân pic rộng và cao, đồng thời hình ảnh của pic thu được không cân đối.

Sau khoảng sục khí 150s, pic cân đối và khá ổn định. Vì vậy, chúng tôi chọn thời gian sục khí trước khi đo là 150s.

#### ***Khảo sát ảnh hưởng của chất***

Một số chất hữu cơ và ion vô cơ đã được tiến hành nghiên cứu nhằm tìm ra những yếu tố cản trở có thể gặp phải trong quá trình phân tích cloramphenicol thông thường.

Tiến hành đo sóng cực phổ của dung dịch cloramphenicol 2,5ppm trong sự có mặt của các chất cản được nghiên cứu với tỉ lệ khối lượng gấp n lần cloramphenicol, trong đó n lần lượt nhận các giá trị 0, 10, 20, 50, 100, 150 và 200

Các chất hữu cơ được nghiên cứu gồm có: axit oxalic, axit citric và glucozo

Các ion vô cơ được nghiên cứu gồm có: Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>

Nói chung các yếu tố khảo sát nói trên đều không có ảnh hưởng nhiều đến việc phân tích xác định hàm lượng cloramphenicol khi chúng ở nồng độ thấp, có axit citric và ion Ca<sup>2+</sup> là gây ảnh hưởng khi chúng ở nồng độ cao. Đặc biệt ion Fe(III) gây ảnh hưởng lớn đến tín hiệu đo ngay cả khi ở nồng độ thấp

### **Khảo sát khoảng tuyến tính và xây dựng đường chuẩn**

Phương trình hồi quy tuyến tính thu được là:  $Y = 38,9.X + 2,6$

Tương ứng:  $I (nA) = 38,9 \cdot C (ppm) + 2,6$

Hệ số tương quan  $R^2$  là 0,9992

Kiểm tra sự sai khác giữa hệ số a và 0  $F_{bảng}(0,95;10;9) = 3,1373$

→  $F_{tính} < F_{bảng}(0,95;10;9)$ , có nghĩa là sự sai khác giữa giá trị a và 0 không có ý nghĩa thống kê

→ phương pháp không mắc sai số hệ thống

Sai số tuân theo phân bố chuẩn Gauss: Điểm đầu và điểm cuối của vùng tuyến tính mắc sai số lớn hơn sai số điểm giữa

cả 3 mức nồng độ đầu, giữa và cuối khoảng tuyến tính những giá trị trung bình thu được và giá trị nồng độ thực khác nhau không có ý nghĩa thống kê. Như vậy ta có thể khẳng định độ đúng của phương pháp, có thể ứng dụng để phân tích mẫu thực tế.

Giới hạn phát hiện

$$LOD = 3 \cdot S_y \cdot (C_i/I_i) = 3 \cdot 0,658 \cdot (2/65,5) = 0,06 \text{ ppm}$$

Giới hạn định lượng

$$LOQ = 10 \cdot S_y \cdot (C_i/I_i) = 10 \cdot 0,658 \cdot (2/65,5) = 0,20 \text{ ppm}$$

### **Ứng dụng xác định Cloramphenicol trong mẫu thực tế**

#### **Kỹ thuật xử lý mẫu thực tế**

Gồm thuốc dạng viên nén, thuốc dạng bột và thuốc dạng lỏng. Các loại thuốc này thường dễ tan trong nước, chỉ cần dùng nước cất hai lần để pha dung dịch mẫu, có thể dùng thiết bị siêu âm lạnh để làm nhanh quá trình hòa tan mẫu. Dựa vào hàm lượng ghi trên nhãn mác để pha thuốc đến nồng độ thích hợp, nằm trong khoảng tuyến tính

#### **Phương pháp xử lý kết quả**

Xây dựng đường chuẩn theo phương pháp hồi quy tuyến tính dạng:

$$Y = a + b.x$$

Từ đồ thị ngoại suy nồng độ Cloramphenicol trong mẫu thực tế  $C_x$

Làm thí nghiệm 5 lần, thu được kết quả  $C = C_{xtb} \pm S$

#### **Xác định cloramphenicol trong mẫu thực tế**

*Mẫu thuốc nhỏ mắt*

Nồng độ cloramphenicol trong dung dịch đo là  $(0,91 \pm 0,01) \text{ ppm}$

Hàm lượng cloramphenicol trong thuốc là  $(3640 \pm 40) \text{ ppm}$

Hàm lượng này tương đương 0,364% cloramphenicol trong mẫu thuốc, so sánh với giá trị nhà sản xuất đưa ra là 0,4% thì sai lệch là 9%.

*Mẫu thuốc viên dạng nén*



Nồng độ cloramphenicol trong dung dịch đo là  $(2,30 \pm 0,02)$  ppm

Nồng độ cloramphenicol trong dung dịch ban đầu là:  $(230 \pm 0,2)$  ppm

Hàm lượng cloramphenicol trong thuốc là  $(230 \pm 0,2)$  mg/viên, so sánh với giá trị nhà sản xuất đưa ra là 250mg thì sai lệch là 8%

*Mẫu thuốc tiêm dạng bột*

Nồng độ cloramphenicol trong dung dịch đo là  $(4,90 \pm 0,06)$  ppm

Nồng độ cloramphenicol trong dung dịch ban đầu là:  $(980 \pm 12)$  ppm

Hàm lượng cloramphenicol trong thuốc là  $(980 \pm 12)$  mg/viên, so sánh với giá trị nhà sản xuất đưa ra là 1000mg (1g) thì sai lệch là 2%.

### **So sánh kết quả đối chứng**

Mặc dù phương pháp cực phổ cho kết quả phân tích sai lệch trong khoảng từ 2% đến 9% so với hàm lượng ghi trên nhãn mác của sản phẩm nhưng thời gian phân tích nhanh hơn. Sai số gặp phải chủ yếu cũng là do tỷ lệ pha loãng lớn nên khi nhân hệ số cao gây sai lệch lớn cho kết quả phân tích cuối cùng

### **KẾT LUẬN**

Quy trình xác định cloramphenicol bằng phương pháp cực phổ xung vi phân với các điều kiện tối ưu:

+ Cloramphenicol được đo trong nền đệm axetat 0,1M pH5,5

+ Thời gian sục khí N<sub>2</sub> tối ưu là 150s

+ Khoảng quét thế từ -0,6V đến 0,2V

+ Tốc độ quét 50mV/s

Khoảng tuyến tính của đường chuẩn xác định cloramphenicol là từ 0,5ppm đến 15ppm tương đương  $1,5 \cdot 10^{-6}$ M đến  $4,6 \cdot 10^{-5}$ M,  $R^2 = 0,9992$

Sai số, độ lặp lại, độ đúng của phương pháp tốt, có thể áp dụng để phân tích mẫu thực tế

Phương pháp đã được ứng dụng xác định hàm lượng trong một số mẫu thuốc. Phương pháp có thời gian xác định chất nhanh, cho kết quả có độ tin cậy cao, sai số dưới 10% và được kiểm nghiệm đối chứng với kết quả mẫu phân tích bằng phương pháp sắc ký khí

### **References**

#### **Tiếng Việt**

[1]. Đặng Hoàng Hải (2010), “*Hóa dược*” – Đại học Y khoa Hà Nội

[2]. Trần Đức Hậu (2004), “*Hóa dược 1*” – Đại học Dược Hà Nội

[3]. Trần Tứ Hiếu, Từ Vọng Nghi, Nguyễn Văn Ri, Nguyễn Xuân Trung (2003), *Hóa học Phân tích, Phần II – Các phương pháp phân tích công cụ* – Đại học Khoa học Tự nhiên Hà Nội

[4]. Nguyễn Việt Huyền (1990), “*Cơ sở các phương pháp phân tích điện hóa*” – Đại học Khoa học Tự nhiên Hà Nội

[5]. Phạm Luận, “*Sổ tay pha chế dung dịch, phần 1,2*” – Đại học Khoa học Tự nhiên Hà Nội

[6]. Từ Vọng Nghi (1968), *Phương pháp phân tích cực phổ* - NXB Đại học và Trung học chuyên nghiệp

[7]. Từ Vọng Nghi (2001) “*Hóa học Phân tích*” – NXB Đại học Quốc gia Hà Nội

- [8]. NK dịch từ The Advocate 10/2003, “Nhìn lại vấn đề dư lượng chloramphenicol”, Thương mại thủy sản, Tạp chí Hiệp hội chế biến và xuất khẩu thủy sản Việt Nam, trang 26-38.
- [9]. Tạ Thị Thảo (2005), “Bài giảng thống kê trong hóa Phân tích” – Đại học Khoa học Tự nhiên Hà Nội
- [10]. Đào Hữu Vinh, Từ Vọng Nghi (1972), “Các phương pháp Hóa học phân tích” – NXB Đại học và Trung học chuyên nghiệp
- [11]. <http://www.thuocbietduoc.com.vn/thuoc/thuoc-goc137.aspx>
- [12]. <http://en.wikipedia.org/wiki/Chloramphenicol>

### **Tiếng nước ngoài**

- [13]. U.S. Department of Health and Human Services, Technology Planning and Management Corporation, *FINAL Report on Carcinogens Background Document for Chloramphenicol*, December 13 - 14, 2000, pp. 1-5
- [14]. L. Agui', A. Guzman', P. Yanez-Sedeno, J. M. Pingarro'n (2002), Voltammetric Determination of Chloramphenicol in milk at Electrochemically Activated Carbon Fiber Microelectrodes, *Analytica Chimica Acta*, 461, pp. 65-73
- [15]. Alemu, Hailemichael; Hlalele, Lebohang; Voltammetric determination of chloramphenicol at electrochemically pretreated glassy carbon electrode; *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia*, Volume 21, Number 1, April 2007 , pp. 1-12(12);
- [16]. Allen P. Pfenning, Jose E. Roybal, Heidi S. Rupp, Sherri B. Turnipspeed, Steve A. Gonzales and Jeffrey A. Hurbut (2000), Simultaneous determination of residues of chloramphenicol, Florfenicol, Florfenicol amine and Thiamphenicol in Shrimp Tissue by Chromatography with Electron Capture Detection, *Journal of AOAC International*, Vol. 83, No. 1, pp. 26-30
- [17]. Amati, P. (1970), Chloramphenicol; Effect of DNA synthesis during phage development in E. coli, *Science*, 168, pp. 1226-1228.
- [18]. Anbao Wang, Lan Zang, Yuzhi Fang (1999), Determination and Separation of Chloramphenicol and its Hydrolysis in Eye-Drops by Capillary Zone Electrophoresis with Amperometric detection, *Analytica Chimica Acta*, 394, pp. 309-316
- [19]. Chukwuenweniwe J Enoke, Johnson Smart and Sunday A Adelusi, An Alternative Colorimetric Method for the determination of Chloramphenicol, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, Vol. 2, Dec 2003, pp. 215-221
- [20]. Devani MB, Shishoo CJ, Doshi KJ, Shah AK, Spectrophotometric Determination of Chloramphenicol and its Esters in Complex Drug Mixtures, *J. Assoc. of Anal. Chem.* 1981 May, 64 (3), pp. 557-563
- [21]. D. Guha, U. Bhattacharjee, S. Mitra, R. Das, S. Mukherjee (1998), Interaction of 3-aminophthalhydrazide with 5-hydroxytetracycline and Chloramphenicol: a Fluorescence Quenching Study, *Spectrochimica Acta Part A*, pp 525-533
- [22]. M. Humayoun Akhtar, Claude Danisb, Andre Sauve, Carla Barry (1995), Gas Chromatography Determination of Incurred Chloramphenicol Residues in Eggs Following Optimal Extraction, *Journal of Chromatography A*, 696, pp. 123-130.
- [23]. A. F. Jackson, B. R. Wentzell, D. R. McCalla and K. B. Freeman (1977), Chloramphenicol damages bacterial DNA, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 78, pp. 151-157

- [24]. Joe Storey, Al Pfenning, Sherri Turnipseed, Gene, Nandrea, Rebecca Lee, Cathy Burns, Mark Madson, Determination of Chloramphenicol in Shrimp and Crap Tissues by Eletrospray Triple Quadrupole LC/MS/MS, Vol. 19, No. 6, June 2003
- [25]. Kjetil Fossdal and Jacobsen, Polarographic Determination of Chloramphenicol, *Analytica Chimia Acta*, 1971, pp. 105-107
- [26]. Laferriere CI, Marks MI, Chloramphenicol: properties and clinical use.; *Pediatr Infect Dis*. 1982 Jul-Aug;1(4):257-64
- [27]. Lúcia Codog noto & Eduar do Winter, Keity Marga reth Doretto, Gabri el Bezzan Mon teiro, Susan ne Rath, Electroanalytical perform ance of self-assembled monolayer gold electrode for chloramp henicol determination, *Microchim Acta* (2010) 169:345 – 351
- [28]. W. M. A Niessen (1998), Analysis of Antibiotics by Liquid Chromatography Mass Spectroscopy, *Journal of Chromatography A*, 812, pp. 53-75
- [29]. Rick W. Fedeniuk, Phillis J. Shand (1998), Theory an Methodology of Antibiotic Extraction from Biomatrices, *J. of Chrom. A*, 812, pp. 3-15
- [30]. C. Sánchez-Brunete, B. Albero, E. Miguel, J. L. Tadeo, (2005) Rapid Method for Determination of Chloramphenicol Residues in Honey Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 75:459–465
- [31]. Sandra Impens, Wim Reybroeck, Han Vercammen, Dirk Courtheyn, Sigrid Ooghe, Katia De Wasch, Walter Smedts and Hubert De Brabander (2002), Scening and Confirmation of Chloramphenicol in Shrimp Tissue Using ELISA in Combination with GC-MS and LC-MS, *Analytica Chimia Acta*, Vol. 224116, pp. 1-11
- [32]. Si Lin, Shi-qu an Han, Yi-bing Liu, Wen- ge Xu Guo- ying Guan, (2005) Chemiluminescence immunoassay for chloramphenicol, *Anal Bioanal Chem* 382: 1250–1255
- [33]. R. Stidl · M. Cichna-Markl, (2007) Sample clean-up by sol-gel immunoaffinity chromatography for determination of chloramphenicol in shrimp, *J Sol-Gel Sci Techn* 41:175–183
- [34]. Suchada Chuanuwatanakul, Orawon Chailapakul, Shoji Motomizu; (2008) Electrochemical analysis of chloramphenicol using boron-doped diamond electrode applied to a flow-injection system; *Analytical sciences the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry*; 24, Issue: 4, Pages: 493-498
- [35]. JJ Van der Lee, WP Van Bennekom and HJ. De Jong, (1980) Determination of Chloramphenicol at Ultra-trace Levels by High-Performance DPV, *Analytica Chimia Acta*, 117 171-182
- [36]. J.J. Van der Lee, H. B. J. Van der Lee-Rijsbergen, U. R. Tjaden and W. P. Van Bennekom, (1983) A liquid chromatographic method for chloramphenicol and its nitro degradation products with reductive amperometric detection at a mercury electrode, *Analytica Chimica Acta*, 149 29-38
- [37]. Wenrui Jin, Xiaoying Ye, Daiqing Yu, Qian Dong (2000), Measurement of Chloramphenicol be Capillary Zone Electrophoresis Following End-column Amperometric Detection at a Carbon Fiber Micro-disk Array Electrode, *Journal of Chromatography B*, Vol. 741, pp.155-162

- [38]. Yanbin Lu, Qing Shen, Zhiyu Dai, Hong Zhang, (2010) Multi-walled carbon nanotubes as solid-phase extraction adsorbent for the ultra-fast determination of chloramphenicol in egg, honey, and milk by fused-core C18-based high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Anal Bioanal Chem* 398:1819–1826
- [39]. J. L. Zhang, X. C. Tan, S. W. Tan, D. D. Zhao, L. Liu, Z. W. Huang and Z. Y. Huang; Fenxi Shiyanshi, (2011), Electrochemical study of chloramphenicol and its determination using cobalt nanoparticles modified glassy carbon electrodes; 30(1), 51-54
- [40]. Zhi-Yong Huang, Qing-Pi Yan, Qiang Zhang, Ai-Hong Peng, (2009) Sample digestion for determining chloramphenicol residues in carp serum and muscle, *Aquacult Int* 17:69–76