

1. Bevezetés és célkitűzések

A kefalosporinok a jelenleg leggyakrabban használt antibiotikumok, amit széles antibakteriális spektrumuknak és atoxicitásuknak köszönhetnek. A kutatások az egyre növekvő antibiotikum rezisztencia miatt újabb és újabb kefalosporin antibiotikumok kifejlesztésére irányulnak, ami szükségessé teszi nagyhatékonyságú, gyors analitikai módszerek kidolgozását.

Jelenleg, az elméletileg leghatékonyabb elválasztási technikák az elektroforézis elvén alapulnak. A kapilláris elektroforézis (CE) mára a nagyteljesítőképességű kromatográfiás módszerek mellett a legfontosabb alternatív analitikai technika. A CE egy rendkívül univerzálisan alkalmazható módszer, hiszen a kis méretű szerves ionoktól a nagy molekulatömegű nukleinsavakig sokféle anyag elválasztását leírták már, különösen alkalmas biológiai és gyógyászati szempontból fontos vegyületek hatékony elválasztásához.

Munkánk során célul tűztük ki:

1. Kapilláris elektroforetikus módszer kidolgozása, mérési paraméterek tanulmányozása és a kidolgozott módszer analitikai teljesítőképességének meghatározása.
2. Klinkai minták antibiotikumtartalmának meghatározására orvosdiagnosztikai céllal.
3. Kefalosporinok fizikai kémiai paramétereinek meghatározása.
4. Mikrofluidikai csipek készítése és csipben történő elektroforézis tanulmányozása.

2. Alkalmazott vizsgálati módszerek

Kapilláris elektroforézis. Kísérleteinkhez egy 3DCE (Hewlett Packard) kapilláris elektroforézis készüléket használtunk. A mintákat hidrodinamikus injektálással (100 mbar·s) juttattuk a kapilláris anódos végébe. Az elválasztáshoz többnyire 64,5 cm (effektív hossz: 56 cm) hosszú 50 µm belső átmérőjű kvarckapillárist (Polymicro Technology) használtunk. Az alkalmazott feszültség +25 kV volt, a kapilláristartó kazettát 25 °C-on termosztáltuk. A kapillárist 25 mM koncentrációjú, 6,8 pH-jú foszfát pufferrel tölttük meg, mely fehérjetartalmú minták esetében anionos felületaktív anyagot, nátrium-dodecil-szulfátot (SDS) is tartalmazott. A detektálás spektrofotometriásan történt, és a diódasoros detektor alkalmazása miatt lehetőség volt 190-600 nm között spektrum felvételére is. Az elektroferogramokat ChemStation 7.01 programmal (Agilent) értékeltük ki. A klinikai minták elemzése során a készülék mintatartóját (Julabo F12) +10°C-on termosztáltuk.

Kapilláris elektroforézis-tömegspektrometria. A CE-MS méréseket CE^{3D}-MSD-TRAP-XCT készüléken (Agilent Technologies, USA) végeztük, amely elektropray ionforrással (ESI) és ioncsapdás tömeganalizátorral volt felszerelve. Az elektroforézis folyamán 50 mM koncentrációjú (pH 9,8) ammóniumacetát puffert használtunk. Az ionizáció 3 kV feszültség felhasználásával negatív módban történt (-MS).

pH-potenciometria. A potenciometriás titrálásokat egy Radiometer pHM 93 készülékkel végeztük, melyhez egy Metrohm kombinált üvegelektrod (típus: 6.0234.100) és egy Metrohm 715 Dosimat büretta tartozik. A titrálások megkezdése előtt az elektródot 20 percen át 0,05 M kálium-hidrogén-ftalát oldattal puffereltük 25 °C-on.

Mikrofluidikai csip. A PDMS csip készítéséhez ún. lágy litográfiai technikát használtunk. A PDMS oligomer és a térhálósító (Sylgard 184, Dow Corning, Midland, MI) 10:1 arányú elegyét az öntőformára öntöttük, majd egy órára 65°C-os kemencébe tettük, ahol megkeményedett. A PDMS réteget óvatosan lehúztuk az öntőformáról, megkapva az öntőforma lenyomatát a PDMS felületén. A csatornák végeinél lyukasztással kialakítottuk a 300 µm átmérőjű portokat. A csip alsó és felső részének megfelelő felületeit levegő plazmában (PDC-32G, Harrick) történő aktiválás után egymásra helyezve irreverzibilisen összekapcsolódtak. A kész csip szeparációs csatornájának a végébe kb. 1 cm hosszúságban, 5 µm szemeseátmérőjű C18-as kromatográfiai részecskékből (Microsorb 100-5 Varian) egy tömör töltetet alakítottunk ki, hogy hidrodinamikus injektálást tudjunk végezni. A töltet kialakítása után a csipet megfelelő pufferrel átmostuk, és az elektródok, a perisztaltikus pumpacső csatlakoztatásával, valamint az optikai szálak pozicionálásával elkészült a mikrofluidikai csip az analitikai munkához.

3. Új tudományos eredmények

3.1. Kapilláris zónaelektroforetikus módszert fejlesztettünk ki nagyszámú kefalosporin meghatározásához. Megállapítottuk, hogy az elektrolit SDS tartalma nem volt befolyással az elválasztás mechanizmusára, ugyanakkor a nagy fehérjetartalmú minták esetében az SDS tartalom jelentősen csökkentette a zavaró hatásokat.

Munkánk során a CZE elemzés kísérleti paramétereinek kiválasztásánál megvizsgáltuk, hogy a mérési körülmények változtatása (a pufferelektrolit pH-ja, koncentrációja, felületaktív anyag alkalmazhatósága, kapilláris hossza, injektált minta mennyisége és az elválasztás során alkalmazott feszültség) hogyan befolyásolja az elválasztás hatékonyságát. A kifejlesztett módszerrel 14 kefalosporinra megfelelő elválasztást tudtunk elérni. A felületaktív anyag (SDS) jelenléte nem változtatta meg az elválasztás mechanizmusát, csupán az ionerősség megváltoztatásán keresztül volt hatással a komponensek migrációs idejére. A kidolgozott módszerrel a kimutatási határok 0,42 és 1,62 µg/ml között alakultak (a klinikai minták antibiotikumtartalma általában ezen értékek felett van), a migrációs idők szórása 1,3 RSD%, a jelterületek szórása pedig 2,8 RSD%-nál kisebb volt.

Fehérjetartalmú minták elemzésekor a puffer SDS tartalma javította a mérés szelektivitását és reprodukálhatóságát. Ennek oka, hogy az SDS a fehérjék felületére adszorbeálódva a fehérjék nettó negatív töltésre tesznek szert, így a kefalosporinoktól elkülönülten, azok után jelentek meg az elektroferogramon. A negatív töltésű fehérjék nem adszorbeálódtak a kapilláris falára. Nagy mátrixtartalmú mintákban (klinikai minták, fermentlevek, stb.) a 270 nm-en való detektálás előnyös.

3.2. Megállapítottuk, hogy 10 órával vízben való feloldásukat követően a kefalosporinok 20-40 %-a bomlott el. Igazoltuk, hogy a cefuroxim bomlástermékei a hatóanyag hidrolízise és dekarboxileződése révén jöttek létre.

Eredményeink azt igazolták, hogy a kefalosporinok bomlásának sebessége nagymértékben függ attól, hogy milyen körülmények között és mennyi ideig tároljuk az antibiotikum oldatokat. A legtöbb antibiotikum mennyisége a kimutathatósági határ alá csökkent 260 órával a feloldást követően. A cefuroxim esetében azt is megvizsgáltuk milyen bomlástermékek keletkeznek, és hogyan változnak ezek koncentrációi. A bomlástermékek azonosítására CE-MS technikát használtunk.

A +4°C és -18°C-on tárolt mintákban jelentősen csökkent a bomlás sebessége a szobahőmérsékleten tárolt oldattal összehasonlítva (-18°C-on tárolva a kefalosporinok bomlása nem volt kimutatható 50 óra alatt).

3.3. Igazoltuk, hogy nagy mátrixanyag tartalmú minták (szérum, sebváladék, liquor, vizelet) közvetlenül, mintaelőkészítés nélkül a kapillárisba injektálhatók, és a kefalosporinok mennyiségileg meghatározhatók. Bizonyítottuk a liofilizálási mintaelőkészítés hatékonyságát és helyességét a nagy viszkozitású, inhomogén tracheobronchiális váladék minták elemzésénél.

Igazoltuk, hogy a vizelet, sebváladék, liquor és szérum minták elemzése CZE-vel mintakezelés nélkül is lehetséges. Magas fehérjetartalmú minták (szérum, sebváladék) elemzése esetén SDS-t adalékoltunk a puffer elektrolithoz. A tracheobronchiális váladék minták (köpet) direkt injektálása nem eredményezett reprodukálható méréseket nagy

viszkozitása és inhomogenitása miatt, ezért ezen minták hatékony mintaelőkészítésére liofilizálási eljárást dolgoztunk ki.

Nagy mátrixtartalmú minták elemzése esetén a mérések reprodukálhatóságának javításához háromlépcsős (NaOH, SDS, puffer) posztkondicionálási eljárást alkalmaztunk.

3.4. Igazoltuk, hogy kapilláris elektroforézis alkalmas egyszerre több kefalosporin pK-jának a meghatározására. A meghatározások nemcsak tiszta oldatokban, hanem különböző mátrixokban (0,9 % NaCl-oldat, fermentlé, szérum) is elvégezhetők.

A CE nagy hatékonyságú elválasztási képességét kihasználva öt különböző kefalosporin (cefaklor, cefadroxil, cefoperazon, cefotaxim, cefoxitin) pK-ját egyszerre határoztuk meg. Az ötféle kefalosporint tartalmazó oldat különböző pH-n készült elektroferogramjai alapján számolt effektív mozgékonyági adatokat felhasználva számoltuk ki a pK értékeket. Az így meghatározott pK értékek jó egyezést mutattak a pH-potenciometriásan meghatározott eredményekkel, illetve az irodalmi adatokkal.

A cefalexin különböző mátrixokban felvett elektroforetikus mobilitási görbéi gyakorlatilag megegyeztek a tiszta vizes oldatban meghatározott mobilitási görbéjével, ezért a számolt pK értékek sem különböznek számottevően.

3.5. Megállapítottuk, hogy PDMS mikrofluidikai csipekben az egymást követő mintainjektálások folyamán változik a PDMS fal töltése és ennek következtében az elektroosztatikus áramlás (EOF) mértéke. Megállapítottuk, hogy anionos felületaktív anyag csipbe injektálását követően állandó EOF alakítható ki. A PDMS mikrofluidikai csipben hasonló elválasztások érhetők el az antibiotikumokra mint a hagyományos kvarckapillárisokban mind a CZE, mind a MEKC technikák esetén.

A kapilláris/csatorna felületének (töltésének) nagy hatása van az elválasztásokra; mivel a kvarckapillárisban és a PDMS csipben a felületek töltése jelentősen különbözik, az lenne várható, hogy az elválasztások is különböznek. Négy antibiotikum elválasztását csipekben elvégezve zónaelektroforetikusan és MEKC technikával, a kapott elektroferogramjaink azonban igen hasonlóak a hagyományos kapilláris elektroforézissel kapott eredményekhez. Mindezek alapján nagyságrendileg hasonló EOF-et kell feltételeznünk a kvarckapillárisban és az alkalmazott PDMS csipben.

Elemzéseink során bizonyítottuk a PDMS csip fal adszorpciójának összetett voltát és jelentőségét a kefalosporinok elválasztásán keresztül. A mintaoldatok általában tartalmazznak fal adszorpcióra hajlamos vegyületeket. Amíg a PDMS felület képes adszorpcióra (van szabad rész, ahová nem adszorbeálódott még ionos komponens), addig az EOF erőssége az egymást követő elemzések folyamán változik. Anionos felületaktív anyag (SDS) csipbe injektálásával azonnal kialakítható egy időben állandó, viszonylag erős EOF.

3.6. Igazoltuk, hogy hat vizsgált kefalosporin közül csak a ceftriaxon esetében érhető el terápiás koncentráció a tracheobronchiális váladékban. Kimutattuk, hogy a hosszabb idejű agyműtétek során csak úgy biztosítható a terápiás antibiotikum koncentráció a szérumban, liquorban és sebváladékban, ha nemcsak a műtét kezdetén, hanem annak harmadik órájában is adnak 1 g cefazolint a betegeknek.

Az antibiotikum kezelés ellenére a várt terápiás hatás sokszor elmaradt, és a mortalitási adatok nőttek a pneumóniában szenvedő betegek körében.

Ez a probléma felvetette a gyógyszeres terápia során adott kefalosporinok penetrációjának a vizsgálatát a tracheobronchiális váladékba (köpet).

A cefazolin, cefamandol, cefuroxim, ceftazidim és a cefepim koncentrációja a köpetben 0,4-0,8 µg/ml koncentráció alatt maradt, ami nem éri el a baktériumok pusztulásához szükséges minimális gátló koncentrációt (MIC). A tracheobronchiális váladékban csak a ceftriaxon jelenlétét tudtuk igazolni, melynek koncentrációja 1,9±1,3 µg/ml között alakult. A ceftriaxon mennyisége a szérumban a legnagyobb, ettől kisebb a liquorban és a tracheobronchiális váladékban a legkisebb a koncentrációja, ami megfelel a gyógyszer különböző mátrixokba való penetrációjának várható mértékével. A többi vizsgált antibiotikum kis mértékű penetrációja a tracheobronchialis váladékba az oka annak, hogy a terápia nem mindig hozott javulást a betegek állapotában.

A műtét előtt beadott 1 g cefazolin koncentrációja a beadást követően 4-12 óra elteltével a baktériumok pusztulásához szükséges MIC érték alá csökken a szérumban, a liquorban és a sebváladékban, ezért hosszabb idejű (6-8 órás) műtétek alatt nem biztosított védelmet a fertőzések kialakulása ellen.

4. Az eredmények várható gyakorlati alkalmazása

Értekezésemben olyan hatékony analitikai eljárások kidolgozását tűztem ki célul, melyek természetszerűleg önmagukban hordozzák az alkalmazási lehetőségeket (gyógyszeripar, orvosdiagnosztika, élelmiszeripar).

A pK meghatározásoknál a CZE használatának előnyei (pl. több komponens pK-jának egyidejű meghatározása, bomlékony vagy szennyezett minták elemezhetősége, kis térfogatú, viszonylag kis koncentrációjú minták, automatizált elemzések) jól kihasználhatók. A CE-vel történő pK meghatározás különösen hasznosnak bizonyulhat a gyógyszeriparban, mert nem szükséges a vizsgálandó komponens extrakciója és tisztítása.

A kidolgozott liofilizálási eljárás lehetőséget ad a nagy viszkozitású, inhomogén minták hatékony mintaelőkészítésére. A különböző testfolyadékokban CE-vel meghatározott kefalosporin koncentráció a klinikai gyakorlatban fontos segítséget nyújthat a hatékony gyógyszeres terápia kialakításához.

Napjainkban a tudományos kutatások egyik fontos iránya a különböző analitikai műszerek méretének csökkentése, úgy, hogy ezzel együtt a hagyományos berendezésekhez képest nagyobb elemzési sebesség legyen elérhető kevesebb felhasznált minta és vegyszer mennyiség felhasználásával. Annak ellenére, hogy számos mikrofluidikai közleményt találunk, ezek közül viszonylag kevés cikk foglalkozik gyógyszervegyületek meghatározásával, mivel a parányi elválasztott mintazónak (< 100 pl) érzékeny detektálásának, illetve az elemzések megfelelő reprodukálhatóságának biztosítása még további kutatásokat igényel.

5. Tudományos közlemények

Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények:

1. A. Gáspár, M. Andrási, Sz. Kardos
Application of capillary zone electrophoresis in analysis and stability study of cephalosporins
J. Chromatogr. B, 2002, 775, 239-246. (IF₂₀₀₂: 1,913)
2. A. Gáspár, Sz. Kardos, M. Andrási, Á. Klekner
Direct determination of cephalosporins in clinical samples using capillary electrophoresis
Chromatographia, 2002, 54, 109-115. (IF₂₀₀₂: 1,230)
3. Á. Klekner, K. Bágyi, L. Bognár, A. Gáspár, M. Andrási, J. Szabó
Effectiveness of cephalosporins in the sputum of patients with nosocomial bronchopneumonia
J. Clinical Microbiology, 2006, 44 (9): 3418-3421. (IF₂₀₀₆: 3,537)
4. M. Andrási, A. Gáspár, Á. Klekner
Determination of cephalosporins in sputum samples using capillary electrophoresis
J. Chromatogr. B, 2007, 846, 355-358. (IF₂₀₀₇: 2,935)
5. M. Andrási, P. Buglyó, L. Zékány, A. Gáspár
Comparative study of determination of dissociation constants of cephalosporins using capillary electrophoresis and potentiometry
J. Pharmac. Biomed. Analysis, 2007, 44, 1040-1047. (IF₂₀₀₇: 2,761)
6. K. Bágyi, I. Márton, J. Szabó, M. Andrási, A. Gáspár, I. Varga, L. Bognár, Á. Klekner
Efficacy of pre-operative cephalosporin prophylaxis in controlling pathogenic oral bacterial growth in comatose patients
J. Med. Microbiol., 2008, 29, 66-79. (IF₂₀₀₈: 2,190)
7. K. Bágyi, A. Haczku, I. Márton, J. Szabó, A. Gáspár, M. Andrási, I. Varga, J. Tóth, Á. Klekner
Role of pathogenic oral flora in postoperative pneumonia following brain surgery: effects of preoperative cefazolin treatment,
BMC Infectious Diseases, 2009, 9, 104. (IF₂₀₀₈: 2.536)
8. A. Gáspár, M. Andrási
Separation of cephalosporins by PDMS microchip electrophoresis
Biomed. Chromatogr. 2009, (IF₂₀₀₆: 1,6), közlésre beküldve

Az értekezés témakörében tartott előadások:

1. Sz. Kardos, A. Gáspár, M. Andrási, Á. Klekner
Kefalosporinok orvosdiagnosztikai célú vizsgálata kapilláris elektroforézissel, Laboratóriumi Diagnosztikai Társaság 51. Nagygyűlése, 2002. 08. 28-31., Gyula, Laboratóriumi Medicina, 2002, 21. o.
2. A. Gáspár, S. Kardos, M. Andrási, Á. Klekner
Application of capillary electrophoresis to the analysis of cephalosporins
4th International Symposium and Course, CEEPUS H-76 project, 22-29 June 2003, Cluj Napoca Abstract Book, L-20
3. Andrási M., Gáspár A.
Kefalosporinok meghatározása és orvosdiagnosztikai célú vizsgálata kapilláris elektroforézis módszerrel, Bioanalitika Szimpózium, 2004. június 30-július 2., Balatonföldvár, Konferencia összefoglaló, 59 o.
4. Andrási M.
A kapilláris elektroforézis módszer alkalmazása kefalosporinok meghatározásához
XXVI. Országos Tudományos Diákköri Konferencia Kémiai és Vegyipari Szekció (I. helyezés), 2003., Budapest
5. K. Bágyi, Á. Klekner, L. Bognár, A. Gáspár, M. Andrási, J. Szabó, I. Márton
Effectiveness of cefazolin in case of aspirating the oral flora
Árkövy National Congress of the Hungarian Society of Dentists, august 31-sept. 2, 2006., Debrecen
6. K. Bágyi, L. Bognár, J. Szabó, A. Gáspár, M. Andrási, I. Márton, Á. Klekner
Effectiveness of cephalosporin prophylaxis during spine surgery in older patients
International Congress on Psychosomatic, Preventive and Sport Medicine, October 14-21., 2006., St. Julian, Malta
7. K. Bágyi, Á. Klekner, L. Bognár, A. Gáspár, M. Andrási, J. Szabó, I. Márton
Effectiveness of cefazolin in case of aspirating the oral flora
Árkövy National Congress of the Hungarian Society of Dentists, August 31-Sept. 2., 2006., Debrecen

8. Andrási M., Gáspár A., Klekner Á.
Kefalosporinok meghatározása klinikai mintákban kapilláris elektroforézissel, XXXII. Kémiai Előadói Napok 2009. október 26-29., Szeged

Az értekezés témájához kapcsolódó poszterek:

1. Sz. Kardos, A. Gáspár, M. Andrási, Á. Klekner
Direct determination of cephalosporins in clinical samples using capillary electrophoresis
Balaton Symposium, 2-4. September, 2001., Siófok, Abstract book pp. 41.
2. M. Andrási, A. Gáspár, Sz. Kardos
Application of capillary electrophoresis in the analysis of cephalosporins,
Balaton Symposium, 2-4 September, 2001., Siófok, Abstract book pp. 83.
3. Sz. Kardos, A. Gáspár, M. Andrási, Á. Klekner
Direct determination of cephalosporins in clinical samples using capillary electrophoresis
3rd International Symposium and Course, CEEPUS H-76 project, 23-29. June, 2002, Warsaw, Abstract book, pp. 38.
4. M. Andrási, A. Gáspár, Sz. Kardos
Application of capillary electrophoresis in the analysis of cephalosporins
28th International Conference on Solution Chemistry, 23-28. August, 2003. Debrecen
5. M. Andrási, A. Gáspár
Application of capillary zone electrophoresis to the analysis and to a stability study of cephalosporins
4th International Symposium and Course, CEEPUS H-76 project, 22-29. June 2003, Cluj Napoca, Abstract Book, pp. 1.
6. M. Andrási, A. Gáspár
Determination of cephalosporins by capillary electrophoresis after on-line preconcentration
5. Balaton Symposium, 3-5 September, 2003, Siófok, Abstracts book, pp. 110.

Az értekezés témájához nem kapcsolódó közlemény:

1. M. Andrási, R. Bustos, A. Gáspár, F.A. Gomez, Á. Klekner
Analysis and stability study of temozolomide using capillary electrophoresis, Electrophoresis, 2009 (IF₂₀₀₈:3,509), közlésre beküldve

1. Introduction and objectives

Nowadays cephalosporins can be considered as one of the most frequently used group of antibiotics due to their broad antibacterial spectra and atoxicity. The researches focus on the development newer and newer cephalosporins antibiotics because of the increase of the antibiotics resistance.

Resently the theoretically most efficient separation techniques are based on electrophoresis. Capillary electrophoresis (CE) now is one of the most important alternative analytical technique besides high performance chromatographic techniques. CE can be used universally because it is capable to separate wide choice of compounds ranged from inorganic ion to nucleic acids, especially useful to separate pharmaceutical compounds, which have medical importance.

The aim of our work were:

1. Development of capillary electrophoretic method for cephalosporins, studying the instrumental parameters and determination of analitical performance data.
2. Determination of antibiotic content of clinical samples for medical diagnostic necessity.
3. Determination of physicochemical parameters of cephalosoporins.
4. Preparation and the study of electrophoresis in microfluidic chips.

2. Applied methods and equipments

Capillary electrophoresis. The CE instrument was a 3DCE model (Hewlett Packard). In all measurements hydrodynamic sample introduction was used for injecting samples. The sample solution were introduced at the anodic end of the capillary. Separations were performed using a polyimide-coated fused silica capillaries of 64,5 cm (effective length: 56 cm)x 50 μm i.d. (Polymicro Technology). The applied voltage was +25 kV. The temperature of the capillary holder was kept at 25 °C. The background electrolyte was 25 mM phosphate, pH 6.8, which contained sodium-dodecil-sulfate (SDS) in case of analysis of biological samples. The photometric detection was carried out at 270 nm. The diode array detection system also made it possible to record the UV spectra between 190-600 nm. The electropherograms were recorded and processed by chemstation computer program of 7.01 version. The sample tray was kept at +10°C during the analysis of clinical samples (Julabo F12).

Capillary electrophoresis-mass spectrometry. The CE-MS measurements were performed using a CE^{3D}-MSD-TRAP-XCT instrument (Agilent Technologies, USA) equipped with electrospray ionization (ESI) and iontrap mass analyzer. The background electrolyte was 50 mM ammonium-acetate (pH 9,8). The ionization was carried out in negative mode with use of 3 kV.

pH-potentiometry. A Radiometer pHM 93 instrument equipped with a Metrohm combined electrode (type 6.0234.100) and Metrohm 715 Dosimat burette were used for the pH-metric measurements. Before the potentiometric titration the electrode was conditioned with 0,005 M potassium-hydrogen-phthalate during 20 minutes at 25 °C. The electrode

system was calibrated according to Irving et al, the pH-metric readings could therefore be converted into hydrogen ion concentration.

Microfluidic chip. The PDMS chips were prepared by using a mold created by soft lithography. The PDMS chip was fabricated by cast molding of 10:1 mixture of PDMS oligomer and cross-linking agent (Sylgard 184, Dow Corning, Midland, MI). The PDMS mixture was degassed and baked for 1 hour in an oven at 65°C. After reticulation the plastic plate was carefully removed and PDMS replicas were peeled off from the mold. Holes (300 μm diameter) for the liquid connections were punched through the PDMS chip. The chip was irreversibly sealed onto a PDMS layer using air plasma (PDC-32G, Harrick). 1 cm length of packing of reversed-phase chromatographic packing material consisted of porous, C18-modified, 5 μm particles (Microsorb 100-5 Varian) was created in the end of the separation channel in order to perform hydrodynamically injection. The chip was conditioned with buffer electrolyte, the Pt electrodes, the tube of peristaltic pump were jointed, the UV optic fibers were positioned and the chip was completed for analytical works.

3. Results

3.1. We developed capillary zone electrophoresis (CZE) method for the determination of cephalosporins. We established that the contain of SDS of the background electrolyte did not alter the mechanism of the separation, but in case of high protein content the SDS minimalized the disturbing effect.

The effects of the different parameters of the analysis (pH, concentration and SDS content of the running electrolyte, applied voltage, length of the capillary, the amount of the injected sample) on the separation were studied. We could achieve an appropriate resolution for fourteen cephalosporins with the developed CZE methods. The detergent had no influence on the mechanism of the separation, only effected the migration times due to the increasing of the ionic strength of the buffer electrolyte. The limit of detection ranged between 0,42 and 1,62 $\mu\text{g/ml}$ (the levels of cephalosporins of clinical samples are usually above these values). The precision of migration times and peak areas were 1,0 RSD% and 1,8 RSD% respectively. The detergent decreased the disturbing effect of the protein during the electrophoresis improving the selectivity and reproducibility of the measurement. The SDS links on the surface of the proteins, giving them net negative charge, so the proteins and cephalosporins separated well, proteins migrated after cephalosporins. Negative proteins did not able to adsorbe on the wall of the capillary. In the case of biological samples the detection wavelength of 270 nm is more advantageous.

3.2. We established that 20-40 % of the cephalosporins degraded after ten hours of dissolution in water later. We proved that the degradation products of the cefuroxime were formed by hydrolysis and decarboxylation.

The degradation of cephalosporins depends on the temperature of the medium and on the time. The amount of the most antibiotics decreased under their limit of detection after 260 hours of dissolution in water.

We examined the structures and the concentrations of degradation products of cefuroxime. We used CE-MS technique to identify the degradation products.

At +4°C and -18°C the degradation of the compounds is considerably decreased. The decomposition of cephalosporins kept at -18°C did not occur up to 50 hours.

3.3. We concluded that high matrices containing samples (serum, wound secretion, cerebrospinal fluid, urine) can be injected directly without any sample pretreatment into the capillary, and the quantity of cephalosporins can be determined. We proved the efficiency and accuracy of the sample pretreatment of highly viscous, non-homogenous sputum samples.

We proved that the analysis of urine, wound secretion, cerebrospinal fluid and liquor was possible with CZE method. We added SDS to the buffer electrolyte in case of highly proteinaceous samples (serum, wound secretion). The direct injection of sputum was only slightly reproducible because of its high viscosity and inhomogeneity. The lyophilization was found to be an effective pretreatment of these samples.

During the analysis of biofluid samples the capillary was post-conditioned by flushing with NaOH, SDS and buffer after each run.

3.4. We proved that CZE method is capable of determining the pK values of several compounds at the same time. The determinations can achieve not only pure solutions, but also in different matrices (0,9 % NaCl solution, fermentation matrix, serum).

With the help of the high separation resolving ability of CZE the pK values of five cephalosporins (cefactor, cefadroxil, cefoperazone, cefotaxime, cefoxitine) could be determined.

We determined pK values from the electrophoretic mobility data obtained in different pH. The determined pK values by CZE and by pH-potentiometry are close to each others, and similar to the literature data.

The electrophoretic mobility curves of cefalexin in different matrices were practically invariable, the calculated pK values did not differ from each other.

3.5. We concluded that the charge of the wall of the PDMS therefore the rate of electroosmotic flow (EOF) altered after each injection in microfluidic chips. We established that injection of anionic detergent into the separation channel producing constant EOF. The CZE and MEKC separation of antibiotics carried out in microfluidic chip and conventional fused silica capillary were very similar.

The surface of the capillary/separation channel has great affect on the separation, because the charge of the surfaces are significantly different, so it would be expected that the separation also are different.

In case of four antibiotics the obtained electropherograms are similar with chip and conventional capillary electrophoretic techniques. We assume similar EOF in PDMS chip and in fused silica capillary.

During our analysis we proved the complexity and importance of adsorption on the PDMS channel wall through the separation of cephalosporins. Since the complex samples always contain components, which more or less tend to adsorb to the PDMS, until the surface is able to adsorb any material the strength of the EOF will be changed. Injecting anionic detergent (SDS) can cover the inner surface of chip producing strong, constant EOF.

3.6. We proved that among six cephalosporins only ceftriaxone reached the therapeutical level in tracheobronchial secretion. We established the need for additional dose of cefazoline in long term operation to assure the therapeutical concentration in serum, in cerebrospinal fluid, in wound secretion.

In spite of the targeted treatment the therapy seemed to be often ineffective and mortality increased among patients who suffered from nosocomial pneumonia. This problem led to an investigation of the penetration of cephalosporins antibiotics into the sputum.

The concentrations of cefazoline, cefamandole, cefuroxime, ceftazidime and cefepime were 0,4-0,8 µg/ml, which did not reach the minimal inhibitor concentration, (MIC) for destruction of bacteria. Ceftriaxone was the only one of the investigated six cephalosporins that had a measurable concentration in the sputum (1,9±1,3 µg/ml). The low penetration of other five antibiotics in the tracheobronchial secretion can be one of the reasons for ineffective therapy of pneumonia.

Applying only single dose of 1 g cefazoline it's concentration in serum, cerebrospinal fluid, wound secretion remained under MIC value after 4-12 hours, therefore was not effective against bacterial infections during long term (6-8) operation.

4. The expected practical application of our results

In our work we focused on the development of analytical procedures which involve the application possibilities (pharmaceutical industry, , food industry, medical diagnostic).

The advantages of determination of pK values by CZE (simultaneous determination, sample quality, solubility, purity) can be utilized. The direct analysis from real samples has great importance because it is not necessary to extract and purify the analyzed compound so accurate pK values are easy to obtain during drug discovery in pharmaceutical industry.

The lyophilization was found to be an effective pretreatment of highly viscous samples. Capillary electrophoresis can be applied for monitoring of cephalosporins in clinical samples to assist in the checking of the effectiveness of the applied antibiotic.

Nowadays the one of the important field of the scientific research is miniaturization of the analytical instruments in order to achieve even bigger high throughput with smaller amount of sample and reagent consumption. Although numerous paper can be found on the field of microfluidic, there are only relatively few publications which deal the determination of pharmaceutical compounds because further research is needed to improve reproducibility of the measurements and to achieve even better detection sensitivity for the minute volume.

5. Publications

Publications connected to this thesis:

1. A. Gáspár, M. Andrási, Sz. Kardos
Application of capillary zone electrophoresis in analysis and stability study of cephalosporins
J. Chromatogr. B, 2002, 775, 239-246. (IF₂₀₀₂: 1,913)
2. A. Gáspár, Sz. Kardos, M. Andrási, Á. Klekner
Direct determination of cephalosporins in clinical samples using capillary electrophoresis
Chromatographia, 2002, 54, 109-115. (IF₂₀₀₂: 1,230)
3. Á. Klekner, K. Bágyi, L. Bognár, A. Gáspár, M. Andrási, J. Szabó
Effectiveness of cephalosporins in the sputum of patients with nosocomial bronchopneumonia
J. Clinical Microbiology, 2006, 44, (9): 3418-3421. (IF₂₀₀₆: 3,537)
4. M. Andrási, A. Gáspár, Á. Klekner
Determination of cephalosporins in sputum samples using capillary electrophoresis
J. Chromatogr. B, 2007, 846, 355-358. (IF₂₀₀₇: 2,935)
5. M. Andrási, P. Buglyó, L. Zékány, A. Gáspár
Comparative study of determination of dissociation constants of cephalosporins using capillary electrophoresis and potentiometry
J. Pharm. Biomed. Analysis, 2007, 44, 1040-1047. (IF₂₀₀₇: 2,761)
6. K. Bágyi, I. Márton, J. Szabó, M. Andrási, A. Gáspár, I. Varga, L. Bognár, Á. Klekner
Efficacy of pre-operative cephalosporin prophylaxis in controlling pathogenic oral bacterial growth in comatose patients
J. Med. Microbiol., 2008, 29, 66-79. (IF₂₀₀₈: 2,190)
7. K. Bágyi, A. Haczku, I. Márton, J. Szabó, A. Gáspár, M. Andrási, I. Varga, J. Tóth, Á. Klekner
Role of pathogenic oral flora in postoperative pneumonia following brain surgery: effects of preoperative cefazolin treatment,
BMC Infectious Diseases, 2009, 9, 104. (IF₂₀₀₈: 2.536)
8. A. Gáspár, M. Andrási
Separation of cephalosporins by PDMS microchip electrophoresis
Biomed. Chromatogr. 2009, submitted

Lectures connected to this thesis:

1. Sz. Kardos, A. Gáspár, M. Andrási, Á. Klekner
Kefalosporinok orvosdiagnosztikai célú vizsgálata kapilláris elektroforézissel, Laboratóriumi Diagnosztikai Társaság 51. Nagygyűlése, 2002. 08. 28-31. Gyula, Laboratóriumi Medicina, 21. o.
2. A. Gáspár, Sz. Kardos, M. Andrási, Á. Klekner
Application of capillary electrophoresis to the analysis of cephalosporins
4th International Symposium and Course, CEEPUS H-76 project, 22-29. June 2003., Cluj Napoca Abstract Book, L-20.
3. Andrási M., Gáspár A.
Kefalosporinok meghatározása és orvosdiagnosztikai célú vizsgálata kapilláris elektroforézis módszerrel, Bioanalitika Szimpózium, 2004. június 30-július 2., Balatonföldvár, Konferencia összefoglaló, 59. o.
4. Andrási M.
A kapilláris elektroforézis módszer alkalmazása kefalosporinok meghatározásához
XXVI. Országos Tudományos Diákköri Konferencia Kémiai és Vegyipari Szekció (I. helyezés) Budapest, 2003.
5. K. Bágyi, Á. Klekner, L. Bognár, A. Gáspár, M. Andrási, J. Szabó, I. Márton
Effectiveness of cefazolin in case of aspirating the oral flora
Árkövy National Congress of the Hungarian Society of Dentists, august 31-sept. 2., 2006., Debrecen
6. K. Bágyi, L. Bognár, J. Szabó, A. Gáspár, M. Andrási, I. Márton, Á. Klekner
Effectiveness of cephalosporin prophylaxis during spine surgery in older patients
International Congress on Psychosomatic, Preventive and Sport Medicine, October 14-21., 2006., St. Julian, Malta
7. K. Bágyi, Á. Klekner, L. Bognár, A. Gáspár, M. Andrási, J. Szabó, I. Márton
Effectiveness of cefazolin in case of aspirating the oral flora
Árkövy National Congress of the Hungarian Society of Dentists, August 31-Sept. 2., 2006., Debrecen

8. Andrási M., Gáspár A., Klekner Á.
Kefalosporinok meghatározása klinikai mintákban kapilláris elektroforézissel, XXXII. Kémiai Előadói Napok 2009. október 26-29., Szeged

Posters connected to this thesis:

1. Sz. Kardos, A. Gáspár, M. Andrási, Á. Klekner
Direct determination of cephalosporins in clinical samples using capillary electrophoresis
Balaton Symposium, 2-4 September, 2001, Siófok, Abstract book, pp. 41.
2. M. Andrási, A. Gáspár, Sz. Kardos
Application of capillary electrophoresis in the analysis of cephalosporins,
Balaton Symposium, 2-4. September, 2001., Siófok, Abstract book, pp. 83.
3. Sz. Kardos, A. Gáspár, M. Andrási, Á. Klekner
Direct determination of cephalosporins in clinical samples using capillary electrophoresis
3rd International Symposium and Course, CEEPUS H-76 project, 23-29 June 2002, Warsaw, Abstract book, pp. 38.
4. M. Andrási, A. Gáspár, Sz. Kardos
Application of capillary electrophoresis in the analysis of cephalosporins
28th International Conference on Solution Chemistry, Debrecen, 23-28. August, 2003.
5. M. Andrási, A. Gáspár
Application of capillary zone electrophoresis to the analysis and to a stability study of cephalosporins
4th International Symposium and Course, CEEPUS H-76 project, 22-29 June 2003, Cluj Napoca, Abstract Book, pp. 1
6. M. Andrási, A. Gáspár
Determination of cephalosporins by capillary electrophoresis after on-line preconcentration
5. Balaton Symposium, 3-5 September, 2003, Siófok, Book of Abstracts, P-110.

Publication not connected to this thesis:

1. M. Andrási, R. Bustos, A. Gáspár, F.A. Gomez, Á. Klekner
Analysis and stability study of temozolomide using capillary electrophoresis,
Electrophoresis, 2009, submitted