

1. BEVEZETÉS

A mai kor emberének életében fontos szerepet töltenek be a gyógyszerek, ennek az egyre fokozódó igénynek próbál megfelelni a dinamikusan fejlődő gyógyszeripar. A gyógyszerek analitikája során célunk az, hogy elősegítsük a gyógyszerek biztonságos használatát és terápiás hatékonyságát. A gyógyszer-ellenőrző hatóságok folyamatosan emelik a gyógyszerek minőségével szemben támasztott követelményeket, melyek a gyógyszeranalitika számára nagy kihívást jelentenek.

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 kromatográfias 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. A kefalosporinok kapilláris elektroforézissel történő vizsgálata során a módszer több előnye is kihasználható:

- Nagy elválasztási hatékonyság: a vizsgált komponens a bomlástermékektől, szennyezőktől és a különböző mátrixanyagoktól nagy hatékonysággal ($>10^6$ tányérszám) elválasztható.
- Gyors: a meghatározások általában tíz percen belül elvégezhetők.
- Kis mintaigény: csupán néhány nl-nyi mintát kell a kapillárisba juttatni.

- Mátrixtűrés: nagy mátrixtartalmú minták közvetlenül, mintaelőkészítés nélkül is a kapillárisba vihetők.

Gyógyszerész hallgatóként már 2000-ben csatlakoztam a Szervetlen és Análitikai Kémiai Tanszéken folyó elektroforetikus és gyógyszeranalitikai kutatásokhoz, itt készítettem el TDK- és diplomamunkámat, 2005-től pedig PhD hallgatóként folytattam tovább a kutatómunkámat.

Munkánk során célunk az volt, hogy a kefalosporinokat tesztvegyületekként használva megvizsgáljuk a kapilláris és a csip elektroforézis különböző paramétereinek hatását az elválasztásra. A CE módszert nem csupán a kefalosporinok mennyiségi meghatározására, de a gyógyszervegyületek egyes sajátságainak (stabilitás, fizikai-kémiai paraméterek) tanulmányozására is alkalmazni kívántuk. A kifejlesztett módszer segítségével orvosdiagnosztikai célú vizsgálatokat is terveztünk.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Kefalosporinok és jelentőségük a gyógyászatban

A kefalosporinok félszintetikus antibiotikumok, melyek a *Cefalosporium acremonium* gombafaj által termelt kefalosporin C (1. táblázat) vegyületből származtathatók. Brotzu által 1948-ban izolált gomba többféle antibiotikus hatású anyagot termel. Ezek közül a kefalosporin C a legjelentősebb, melynek szerkezetét 1953-ban derítették fel. A kefalosporinok Gram-pozitív és Gram-negatív kórokozókra egyaránt ható, széles spektrumú, baktericid hatású, jó farmakokinetikájú, nem toxikus gyógyszerek [1]. A penicillinnél kevésbé allergizálnak.

A kefalosporin C ipari kinyerésére csapadékos, adszorpciós, ioncserélő kromatográfiás, valamint extrakciós módszereket dolgoztak ki. A kefalosporin C 7-es helyzetű oldalláncának kémiai úton történő eltávolítása a 7-amino-kefalosporánsavat (7-ACS) eredményezi. A félszintetikus kefalosporinok előállítása a 7-ACS, valamint a 7-amino-3-dezacetoxi-kefalosporánsav (7-ADCS) vegyületekből történik. A 7-ADCS-t a G-penicillin-szulfoxid gyűrűbővítési reakciójával nyerik. A kefalosporinok alapváza a kefem váz, melyben a β -laktám gyűrű egy dihidrotiazin gyűrűvel van kondenzálva. Az egyes kefalosporinok a dihidrotiazin gyűrű 3. és 7. szénatomjához kapcsolódó oldalláncokban különböznek egymástól (1. táblázat). A dihidrotiazin gyűrű harmadik szénatomjához kapcsolódó oldallánc a gyógyszer farmakokinetikai viselkedését határozza meg. A C-3 helyzetű acetoxi csoport helyettesítése előnyösnek bizonyult, mert in vivo acilészteráz enzimek nem képesek a molekulát hidrolizálni, kedvezőbb a gyógyszer farmakokinetikai tulajdonsága. A C-3 helyzetben lévő elektronegatív szubsztituens növeli a molekula savstabilitását (cefaklór). Több készítményben (cefamandol, cefoperazon) N-metil-tetrazolil-tiometil oldalláncot alakítottak ki, amelynek metabolitja alkohol-intoleranciát és véralvadási zavarokat okozhat. A gyűrű 7. szénatomjához kapcsolódó

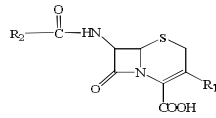
szubsztituens az antibiotikus hatásspektrumért, béta-laktamáz stabilitásért felelős. A C-7 helyzetben lévő D- α -amino-fenil-acetil-csoport (cefalexin, cefaklór), illetve ennek aromás gyűrűben módosított származéka (cefadroxil) antibakteriális spektrumszélesedést adott a molekulának, ugyanakkor béta-laktamázzal szemben érzékeny maradt. A C-7 helyzetben beépített mandulasav (cefamandol), és amino-tiazolil (cefotaxim, ceftriaxon) oldalláncok már béta-laktamáz stabilitást eredményeztek. A cefoxitin kiemelkedő béta-laktamáz stabilitása, és anaerob kórokozók által kiváltott fertőzésekkel szembeni hatékonysága a béta-laktám gyűrű C-7 atomján lévő α -térállású metoxi csoport jelenlétével magyarázható. A dihidrotiazin gyűrű negyedik szénatomján lévő karboxil csoport észterifikálásával farmakológiailag inaktív, prodrug molekulát állítottak elő, melynek oka a gyógyszer orális formában történő adagolhatóságának kialakítása [1].

A kefalosporinok a baktériumsejtfal felépítését akadályozzák a penicillinkötő fehérjéhez (PBP) való kötődésükkel és a sejtfal peptidoglikán transzpeptidációjának gátlásával. A kefalosporinokat meghatározó tulajdonságaik szerint generációkba sorolják. A generációs osztályozás a terápiás szempontból fontos mikrobiológiai (szűk vagy széles spektrumú, béta-laktamáz érzékeny vagy stabil), farmakokinetikai tulajdonságokra, valamint az adagolás módjára (orális, parenterális) utal. Az első generációs származékok (pl. cefazolin, cephalexin, cefadroxil) legerősebben a Staphylococcusok PBP-jeihez kötődnek. A második generációs antibiotikumok (pl. cefaklór, cefamandol, cefuroxim, cefoxitin) a Gram-negatív pálcák PBP-je iránti affinitással tűnnek ki. A harmadik generáció tagjai (pl. cefoperazon, cefotaxim, ceftriaxon, ceftazidim) injekciós formában alkalmazott készítmények, melyeknél tovább bővül a Gram-negatív baktériumokra a hatás. A negyedik generációs antibiotikumoknál (pl. ceftibuten) a hatás spektruma változatlan a harmadik generációsokhoz képest, de a velük való terápiát kórházon kívül lehet folytatni, mert szájon át adagolhatók [1].

A készítmények szöveti penetrációja generációról generációra fokozódik. A második generáció tagjaié megfelelő, a harmadik generációs készítmények pedig terápiás szintet érhetnek el beadásuk után a légutakban, a bőrben, a lágyrészekben, a csontban is. Az epében valamennyi parenterális szer szintje elegendő a terápiás hatás eléréséhez. A szájon át adható készítmények jól felszívódnak, a szérumban, a légutakban, a vizeletben terápiás szintet érnek el. A parenterális készítményeket általában intravénásan alkalmazzák, az általában szokásos 1 g beadása után elérhető szérumszint meghaladja az érzékeny kórokozók gátlásához szükséges szintet. A kefalosporinokat farmakokinetikai tulajdonságaik szerint adagoljuk. A kefalosporinok kiürülési félideje általában 1-3 óra között van, ami lehetővé teszi a 8-12 óránkénti adagolást. A ceftriaxonnak kivételesen hosszú a felezési ideje, 6-8 óra, ami 24 órás adagolást tesz lehetővé. A kefalosporinok többsége a vesén át, filtráció és szekréció útján ürül ki. A beadott ceftriaxon fele, a cefoperazon kétharmada az epén át választódik ki. Az egyes kefalosporinok különböző mértékben, reverzibilisen kötődnek a szérumfehérjékhez, ezért az aktív, szabadon keringő frakció mértéke is változó. A cefamandol, cefoxitin, ceftriaxon, cefoperazon erősen kötődnek (70-96 %) a szérumfehérjéhez, szérumszintjüknek 4-30 %-a aktív. A cefotaxim, ceftazidim gyengébben kötődnek (17-30 %) a szérumfehérjékhez, 70-80 %-uk kering szabadon a vérben. A kefalosporinok közül a cefotaxim részben metabolizálódik, a metabolit (dezacetil-cefotaxim) antimikrobiálisan aktív, ennek eredményeképpen meghosszabítja a cefotaxim hatását [1]. A kefalosporinok széles antimikrobiális hatásspektrumuk és atoxicitásuk következtében mind kórházi, mind a járóbeteg-ellátásban a legelterjedtebben használt antibiotikumok.

1. táblázat.

A kefalosporin antibiotikumok szerkezeti képletei és általunk használt rövidítései



| Vegyület | Rövidítések | R ₁ | R ₂ |
|-----------------|-------------|----------------|----------------|
| Cefoxitin | COX | | |
| Cefazolin | CZO | | |
| Cefamandol | CFM | | |
| Cefoperazon | CFP | | |
| Ceftriaxon | CTR | | |
| Cefuroxim | CFR | | |
| Cefaclor | CFC | | |
| Cefalexin | CFL | | |
| Cefadroxil | CFD | | |
| Ceftazidim | CZI | | |
| Cefotaxim | CTA | | |
| Cefixim | CIX | | |
| Ceftibuten | CFB | | |
| Cephalosporin C | CCC | | |

2.2. Kefalosporinok meghatározásának lehetőségei

2.2.1. Hagyományos analitikai módszerek

A kefalosporinok fehér, kristályos porok, sóik vízben jól oldódnak. Kémiai sajátásaik a penicillinekéhez hasonlóak. A négytagú β -laktám gyűrűben foglalt savamidkötés reakcióképes és nukleofil reagens (aminok, alkoholok, cukrok) hatására a penicillosavval analóg inaktív vegyületre bomlik. A kefalosporinok dihidrotiazin gyűrűjében lévő Λ^3 - helyzetű kettős kötés lúgos közegben Λ^2 - helyzetbe izomerizálódik, amely az antibiotikus hatás elvesztésével jár. Savval szemben (elektrofil reagens) stabilabbak mint a penicillinek (hiányzik a penicillinekre jellemző átrendeződés, nem keletkeznek a penicillénsavhoz, illetve penillsavhoz hasonló vegyületek). A laktám-gyűrű hasítását enzimek (β -laktamázok) és fémek (pl. réz, nikkel) katalizálják. A gyűrűn kívüli savamidkötés ehhez képest stabilnak mondható.

A kefalosporinok analitikájában a β -laktámok számos reakcióját hasznosítják [2]. A kefalosporinok hidroxil-amminnal a β -laktám-gyűrű nyitásával hidroxámsavvá alakulnak, melyek vas(III)-sókkal vörös színeződést adnak. A keletkező hidroxámsav-vas(III)-kefalosporin komplex fényelnyelését UV spektrofotometriásan 480 nm-nél végzik [3-7]. A Ni(II)-ionok bevitele a reakcióelegybe katalizálja a reakciót [8]. Az Amerikai Gyógyszerkönyv (USP XXII.) a hidroxilamonolízist kefalosporinok mérésére használja [9]. Sakaguchi [10] a cefalexint azon az alapon határozta meg, hogy a vegyület kénatomja csökkenti az o-hidroxihidrokinonftalein-Pd(II) komplex 630 nm-es maximumnál mért elnyelését. A kefalosporinok meghatározására leírtak imidazollal [11-13], ammóniás ezüst-szulfáttal [14], ammónium-vanadáttal [15], illetve dihidrolutidinnal [16] történő módszereket. Közöltek még molibdénkék képződésén alapuló különböző oxidálószereket felhasználó módszereket is [17-22]. A klasszikus módszerek alkalmazásai között megemlítendő még a nitroprusszid-nátriummal [23], nátrium-nitrittel [24, 25],

Ellman-reagenssel [26], és a higany(II)-klorid-molibdo-arzénsavval [27] lejátszódo reakciók, melyek kefalosporinok meghatározására alkalmasak.

2.2.2. Kromatográfias módszerek

A vékonyréteg kromatográfia (VRK, TLC) a legrégebbi kromatográfias technika, amelyet a kefalosporin C és félszintetikus kefalosporin vegyületek kimutatására, az egyes anyagok tisztaságának az ellenőrzésére alkalmaznak [28]. Az Európai Gyógyszerkönyv (Ph. Eur. 4) [29] és a VIII. Magyar Gyógyszerkönyv (Ph. Hg. VIII.) [30] a cefaklór, cefadroxil, cefixim, cefotaxim ceftazidim azonossági vizsgálatára előírja a TLC alkalmazását. Valamennyi felsorolt kefalosporin esetében az állófázis szilanizált szilikagél, és a detektálás UV fény alatt (254 nm-en) történik. Az eluensként használt oldószerelemek az egyes kefalosporinok esetében csak kissé különböznek (az eluens 154 g/l, ammónium-acetát (pH 6,2) oldatot tartalmaz metanolban, metil-acetátban, vagy acetonban 90:10 (V/V)). A mintaoldatok 1 µl-ét cseppentették fel és 15 cm magassáig futtatták az eluent [30].

Több kefalosporin VRK-val történő meghatározását leírták szilikagél rétegen, a detektálást ninhidrinnel történő előhívás és 105°C-on 15 percig való szárítást követően végezték [31]. Néhány kefalosporin elválasztását 0,1 % EDTA oldattal átitatott szilikagél rétegen végezték, az előhívás jódgőzben történt [32]. A cefaklór, cefalexin és a cefadroxil detektálását fluorescaminnal végezték, a kimutatási határ 2 ng volt [33]. Shabadi és munkatársai [34] a cefalexint és cefadroxilt egyszerre határozta meg gyógyszer-szintézis során keletkező közti-termékből szilikagél rétegen, a detektálás UV fény alkalmazásával 254 nm-en történt. Ugyanezt a módszert alkalmazták a félszintetikus kefalosporinok előállításához szükséges kefalosporin C meghatározásához [35]. A ceftriaxon, cefixim, cefotaxim, cefaklór, cefalexin meghatározását leírták nagyteljesítőképességű vékonyréteg kromatográfias módszer (HPTLC) alkalmazásával [36, 37].

A kefalosporinok kromatográfiai analízisét jelenleg elsősorban nagyteljesítőképességű folyadékkromatográfiával (HPLC) végzik. Mivel a kefalosporinok hidrofilek, meghatározásukra nem használnak normál fázisú folyadékkromatográfiai technikát. A kefalosporinokat legtöbb esetben C18 fordított fázisú oszlopon határozzák meg [38-43]. A kefalosporinok meghatározásához izokratikus módszer [40, 41] és gradiens elúció [42] alkalmazását is leírták. A kefalosporinok HPLC-vel történő különböző meghatározási módszereiről összefoglaló közlemény jelent meg [43]. A Brit Gyógyszerkönyv (BP), az Amerikai Gyógyszerkönyv (USP XXV.), az Európai Gyógyszerkönyv (Ph. Eur. 4.) és a VIII. Magyar Gyógyszerkönyv (Ph. Hg. VIII.) is HPLC-vel végezteti a kefalosporinok azonosítását, tisztasági vizsgálatát és tartalmi meghatározását. Az 2. táblázat összefoglalja a kefalosporinok Ph. Hg. VIII. és Ph. Eur. 4. szerinti HPLC-vel történő vizsgálati módszereit.

2. táblázat
Kefalosporinok HPLC-vel történő meghatározása [29, 30]

| Kefalosporinok | Állófázis | Mozgófázis | λ (nm) |
|--|---|---|----------------|
| Cefaclor tisztasági vizsgálat | 0,25 m x 4,6 mm oktadecilszililezett szilikagéllal (5 μ m) töltött oszlop | A: nátrium-dihidrogén-foszfát-dihidrát oldat (pH 4,0) B: 450 ml acetonitril 550 ml A-val elegyítünk B fázis 25 %V/V \rightarrow 100 %V/V gradiens elúció | 220 |
| Cefaclor tartalmi meghatározás | 0,25 m x 4,6 mm oktadecilszililezett szilikagéllal (5 μ m) töltött oszlop | 780 ml víz, 10 ml trietilamin és 1g nátrium pentaszulfonát keverékének pH-ját tömény foszforsavval 2,5-re állítjuk be, és az így nyert oldathoz 220 ml metanolt elegyítünk | 265 |
| Cefadroxil tisztasági vizsgálat | 0,25 m hosszú és 4,6 mm belső átmérőjű oktadecilszililezett szilikagéllal (5 μ m) töltött oszlop | A: foszfát-tompítóoldat pH 5,0 B: metanol, A fázis 98 %V/V \rightarrow 70 %V/V \rightarrow 98 %V/V gradiens elúció | 220 |
| Cefadroxil tartalmi meghatározás | 0,25 m hosszú és 4,6 mm belső átmérőjű oktadecilszililezett szilikagéllal (5 μ m) töltött oszlop | Acetonitril és kálium dihidrogén foszfát 2,72 g/l töménységű oldata (4+96 V/V) | 254 |
| Cefalexin tisztasági vizsgálat | 0,10 m hosszú és 4,6 mm belső átmérőjű oktadecilszililezett szilikagéllal (5 μ m) töltött oszlop | A: foszfát-tompítóoldat pH 5,0 B: metanol, A fázis 98 %V/V \rightarrow 70 %V/V \rightarrow 98 %V/V gradiens elúció | 220 |
| Cefalexin tartalmi meghatározás | 0,25 m hosszú és 4,6 mm belső átmérőjű oktadecilszililezett szilikagéllal (5 μ m) töltött oszlop | Metanol, acetonitril, kálium-dihidrogén-foszfát 13,6 g/l töménységű oldata és víz (2+5+10+83 V/V) | 254 |
| Cefamandol tisztasági vizsgálat | 0,25 m hosszú és 4,6 mm belső átmérőjű oktadecilszililezett szilikagéllal (5 μ m) töltött oszlop | trietil-amin-foszfát-oldat: 2,0 g nátrium-pentán szulfonátot 350 ml vízben oldunk. Az oldathoz 40 ml trietil-amin elegyítünk, a pH-t tömény foszforsavval 2,5 értékre állítjuk, majd az elegy térfogatát vízzel 770 ml-re egészítjük ki A: 1 térfogatrész trietil-amin-foszfát oldatot 2 térfogatrész vízzel elegyítünk B: trietil-amin-foszfát oldat, metanol és acetonitril egyenlő térfogatait elegyítjük, A fázis 100 %V/V \rightarrow 0 %V/V gradiens elúció | 254 |
| Cefamandol tartalmi meghatározás | 0,25 m hosszú és 4,6 mm belső átmérőjű oktadecilszililezett szilikagéllal (5 μ m) töltött oszlop | 25 térfogatrész acetonitrilt trietil-amin előzetesen tömény foszforsavval pH 2,5 értékre beállított 10 % V/V-os oldatának 75 térfogatrészevel elegyítünk | 254 |
| Cefazolin tisztasági vizsgálat | 0,125 m hosszú és 4,0 mm belső átmérőjű oktadecilszililezett szilikagéllal (3 μ m) töltött oszlop | A: 14,54 g/l dinátrium-hidrogén-foszfát-dodekahidrát és 3,53 g/l kálium-dihidrogén-foszfát B: acetonitril, A fázis 98 %V/V \rightarrow 35 %V/V \rightarrow 98 %V/V gradiens elúció | 210- 254 |
| Cefazolin tartalmi meghatározás | 0,25 m hosszú és 4,6 mm belső átmérőjű oktadecilszililezett szilikagéllal (5 μ m) töltött oszlop | 10 térfogatrész acetonitril és 90 térfogatrész 2,77 g/l dinátrium-hidrogén-foszfát-dodekahidrátot és 1,86 g/l citromsav-monohidrátot tartalmazó tompítóoldat elegye | 270 |
| Cefixim tisztasági vizsgálat és tartalmi meghatározás | 0,125 m hosszú és 4,0 mm belső átmérőjű oktadecilszililezett szilikagéllal (5 μ m) töltött oszlop | Acetonitril (250 térfogatrész) és tetrabutilammónium-hidroxid oldat (750 térfogatrész) elegye (Tetrabutilammónium-hidroxid oldat készítése: 8,2 g tetrabutilammónium-hidroxidot vízzel 800 ml-re oldunk. Az oldat pH-ját hígított foszforsavval 6,5-re állítjuk, majd térfogatát vízzel 1000 ml-re | 254 |

2.2.3. Kapilláris elektroforézis

A legnagyobb felbontóképességű elválasztási technikák az elektroforézis elvén alapulnak. Először Tiselius alkalmazta az elektroforézist elválasztási technikaként, különböző fehérjéket tartalmazó cső két végét pufferoldatokba merítette, majd elektromos feszültséget kapcsolt a csővégekre [44]. Munkájáért Tiselius 1948-ban Nobel-díjat kapott. 1967-ben Hjertén 1-3 mm belső átmérőjű kvarccsöveket használt, melyek metilcellulóz belső bevonattal rendelkeztek az elektrooszmózis kiküszöbölésére [45]. A hőtermelődés csökkentése érdekében az elkövetkezendő években egyre kisebb belső átmérőjű csöveket kezdtek alkalmazni az elválasztáshoz [46, 47]. Jorgenson és Lukacs használta ki először az elektrooszmotikus áramlás (electroosmotic flow: EOF) dugószerű áramlási profiljának előnyeit, ugyanis a nagyon kis belső átmérőjű kvarckapillárisokban kialakuló EOF a részecskéket minimális diffúzióval, diszperzióval szállítja a kapillárisban [48, 49]. Az EOF a CE működésének egyik fontos eleme, fontos jellemzője a lapos áramlási profil, ennek következtében a részecskék zónáinak diszperziója kis mértékű. Az EOF másik fontos jellemzője, hogy az összes részecskét, függetlenül azok töltésétől, azonos irányban tarthatja.

A kapilláris elektroforézis módszer a következő elválasztási technikákat foglalja magában: kapilláris zónaelektroforézis (CZE), micelláris elektrokinetikus kromatográfia (MEKC), kapilláris gélelektroforézis (CGE), kapilláris izoelektromos fókuszálás (CIEF), kapilláris elektrochromatográfia (CEC), és kapilláris izotachoforézis (CITP). E technikák közül a kapilláris zónaelektroforézis a legegyszerűbb és leggyakrabban alkalmazott módszer, mely a részecskék eltérő elektroforetikus mozgékonyágán alapszik.

A kapilláris alkalmazásának több előnye van, így például az, hogy a kapilláris nagy elektromos ellenállásánál fogva a rendkívül nagy térerő (100-500 V/cm) alkalmazását csekély hőfejlődés mellett teszi lehetővé. Ezen kívül a fejlődött hő (Joule-hő) a kapilláris nagy felület/térfogat aránya miatt jól eloszlik. A nagy elektromos térerő használata rövid mérési időt, valamint nagy elválasz-

tási hatékonyságot és felbontást biztosít. Az elméleti tényérszám a kapillárison belüli elektroosztatikus áramlás dugószerű profiljának köszönhetően sok esetben meghaladja a 10^6 értéket. A CE módszert leggyakrabban UV-látható spektrofotometriás, lézer indukált fluoreszcens (LIF), amperometriás, vagy vezetőképességi detektálással alkalmazzák. A CE gyors fejlődésének köszönhetően alkalmassá vált gyógyszeripari analitikai munkákhoz, mint például főkomponens, szennyezők elválasztása, azok kvalitatív és kvantitatív vizsgálata [50].

Mrestani és munkatársai alkalmazták először a CZE-t kefalosporinok meghatározásához 1997-ben [51]. Mivel a kefalosporinok hidrofílok, vízoldható vegyületek, ezért megvizsgálták a CZE technika alkalmazhatóságát kefalosporinok meghatározásához. Kísérleteikhez négy különböző kefalosporint (cefpirom, cefuroxim, cefotaxim, cefodizim) alkalmaztak. A detektálást UV spektrofotometriásan 200 és 270 nm-en végezték. Megvizsgálták a pH hatását a négy kefalosporin elválasztására, az injektálási paraméterek változtatásának hatását a csúcsmagasságra. Még ugyanebben az évben ez a szerző a kidolgozott CZE módszert alkalmazta kilenc különböző kefalosporin (cefalexin, cefadroxil, cefaklór, ceftazidim, cefsulodin, cefotaxim, cefamandol, cefuroxim, cefodizim) vizeletben és epében történő meghatározásához [52]. Lin és munkatársai kefalosporinok meghatározását három különböző típusú puffer (foszfát, citrát és 2-(N-morpholino-)etánszulfonát (MES)) alkalmazásával végezték [53]. Citrát (35-40 mM, pH 6) és MES (260-300 mM, pH 6) puffer alkalmazásával jobb elválasztást értek el tizenkét kefalosporin esetében, mint foszfát pufferrel. Pajchel és Tyski öt kefalosporint (ceftazidim, cefoperazon, cefotaxim, cefuroxim, cefazolin) tartalmazó oldatot foszfát-borát puffer (pH 6,5) felhasználásával elemezték [54]. Két komponens esetében (cefuroxim, cefazolin) nem értek el teljes elválasztást.

A kefalosporinok meghatározásához a MEKC technikát is alkalmazták [55-60]. A micelláris elektrokinetikus kromatográfia elsősorban a kis töltésű vagy töltéssel nem rendelkező részecskék elválasztására alkalmas módszer, ahol az

elválasztás alapja, hogy a részecskék hidrofób jellegüknek megfelelően oszlanak meg az elektrolit fázis és a kapillárisban képzett micellák hidrofób belső tere között. Abban az esetben, ha anionos felületaktív anyagokat (pl. nátrium-dodecil-szulfát (SDS)) a kritikus micella koncentráció fölötti mennyiségben adagolunk az elektrolithoz olyan micellák képződnek, melyek felülete negatív töltésű, míg belső terük hidrofób. Ezek akkor vándorolnak a katód felé, ha mozgékonyáguk kisebb, mint az EOF mozgékonyága. Amikor a részecske a micellában helyezkedik el, a micella mozgékonyágával, ha azon kívül van, saját effektív mozgékonyágával vándorol. Ezért a detektort a hidrofílebb jellegű anyagok érik el hamarabb, majd azokat az egyre hidrofób molekulák követik. A MEKC előnye, hogy egyszerre vizsgálhatók a töltés nélküli és töltéssel rendelkező molekulák.

Kilenc kefalosporin MEKC-el történő meghatározásához Terabe nemcsak SDS-t, hanem más felületaktív anyagot, N-lauril-N-metilaurátot (LMT) is használt, továbbá megvizsgálták ionpárhépző adalékanyag, pentánszulfonát (C_5) hatását az elválasztásra [55]. MEKC esetében az ionpárhépző reagens nagymértékben elősegítette az SDS-kefalosporin micellák képződését, mivel a C_5 elfedte a kefalosporinok töltését, ezzel magyarázható a kefalosporinok migrációs viselkedésének nagymértékű változása C_5 tartalmú SDS-es pufferben. Pajchel öt kefalosporint (ceftazidim, cefoperazon, cefotaxim, cefuroxim, cefazolin) tartalmazó oldatra nézve teljes felbontást akkor ért el, amikor az SDS tartalmú pufferhez (10 g/l, pH 6,5) pentánszulfonsavat (17,4 g/l) adagolt [54].

A kefalosporinok meghatározására a CE egy viszonylag új technikáját a mikroemulziós elektrokinetikus kromatográfiát (MEEKC) is leírták [61]. A MEEKC technikában alkalmazott puffer tulajdonképpen egy emulzió, melyben a szerves oldószercseppecskék (olajos fázis) a vizes közegben vannak diszpergálva, az emulzió stabilitását a felületi feszültséget csökkentő felületaktív anyag jelenléte biztosítja. A cefazolin, cefoperazon, cefalexin MEEKC-el történő elválasztását 0,81 % n-oktán, 6,61 % 1-butanol, 3,31 % SDS és

89,27 % vizes puffer összetételű emulziós rendszerben végezték. Vizes fázisként különböző típusú (foszfát, borát, Tris) és pH-jú puffereket használtak. A kefalosporinok CE-vel való meghatározásait egy nemrég megjelent összefoglaló közlemény tárgyalja részletesen [62].

A gyógyszerkutatás során a gyógyszerjelölt vegyületek fizikai-kémiai tulajdonságainak a jellemzése nagyon fontos, mivel ezek meghatározzák a gyógyszer szervezettel való kölcsönhatását (farmakokinetika), és előre jelezhetik várható biológiai hatását (farmakodinámia). Mivel egy originális készítmény kutatása során több százezer gyógyszerjelölt vegyületet kell fizikai-kémiai szempontból jellemezni, ezért előtérbe kerültek a gyors, kis anyagigényű, automatizált ún. nagy áteresztőképességű technikák [63]. A CE megfelel ezeknek a követelményeknek, és alkalmas fizikai-kémiai paraméterek (oldhatóság, savi disszociációs állandó (pK_a), megoszlási hányados ($\log P$), fehérje kötődési állandó, izoelektromos pont) meghatározására. A pK_a meghatározza, hogy a gyógyszer a különböző szöveti pH-kon milyen ionizáltsági állapotban van, ez pedig befolyásolja a gyógyszer szervezeten belüli sorsát. A felszívódás során a lipidmembránokon a töltés nélküli forma tud átjutni, míg a célmolekulához az ionos forma tud kötődni. Mivel a gyógyszer töltése pH függő, ezért CE mérés során az eltérő pH-jú pufferben számolt elektroforetikus mobilitási adatok felhasználásával megadható a vegyület pK_a -ja [64-68]. Mrestani és munkatársai [69] kilenc kefalosporin, Aleksic és munkatársai a cefotaxim és ceftriaxon [70] pK_a -ját határozták meg CZE-vel.

2.3. Kefalosporinok meghatározása klinikai mintákban

A kefalosporinok klinikai mintákban kromatográfias technikával (HPLC) történő meghatározásához mintaelőkészítés szükséges. A hagyományos mintaelőkészítés három csoportra bontható: (i) hígítás megfelelő oldószerben vagy pufferben, (ii) fehérjementesítés (precipitációval, folyadék-folyadék extrakcióval), (iii) off-line szilárd fázisú extrakció (SPE) [71-74]. A kis fehér-

jetartalmú minták esetében (vizelet, epe, liquor) elegendő a minták hígítása [75]. Nagy fehérjetartalmú minták (plazma, vér, szervek, szövetek) elemzése esetén szükséges a fehérjék eltávolítása. A minták savas közegben történő fehérjementesítése (pl.: triklórecetsav vagy perklórsav-metanol vagy acetonitril) [76-78] előnyösebb, mert inaktíválja az enzimeket, míg a lúgos közeg a csúcs kiszélesedéséhez valamint a minta szerkezetének megváltozásához vezethet [77]. Plazmából való meghatározás során a fehérjementesítő rendszer cefotaxim esetén H_3PO_4 -MeOH [79], ceftazidim esetén CH_3COOH -MeOH [77], illetve SPE [80] volt. Kefalosporinok különböző klinikai mintákból történő meghatározásához szükséges mintaelőkészítési módszereket egy tanulmány foglalja össze [80].

A hagyományos mintaelőkészítési módszerek időigényes, több lépcsős folyamatok, melyek során általában számolnunk kell a minta veszteségével, kontaminációjával. Ezeket a hátrányokat küszöböli ki az előtétkolonna (extrakciós kolonna) használata [81]. Az ún. „column-switching” technikának az alkalmazásával nagyban csökkenthető, illetve teljesen elhagyható a manuális mintaelőkészítési eljárás, mivel lehetővé teszi a minta direkt injektálását követő on-line mintatisztítási eljárást [82]. Többen leírták kefalosporinok esetében az előtétkolonna használatát, mint on-line tisztítási módszert [83-85]. Bompadre és munkatársai tíz különböző kefalosporint tartalmazó szérumból mintát a vízzel való hígítást leszámítva direkt injektáltak alkilamino-töltetű tartalmú előtét kolonnára, ahol eltávolították a biológiai mátrix komponenseit, majd azt követően fordított fázisú C18 analitikai kolonnán elemezték [81].

A CE előnye a kromatográfiai technikákkal szemben, hogy általában nem igényel komolyabb mintaelőkészítési műveletet (pl. fehérjementesítést), gyors elemzést (1-5 perc) tesz lehetővé, kis mintamennyiséget (10-50 nl) igényel, az elválasztást elegendő a kérdéses csúcsig folytatni, ezután a biológiai mátrix komponensei poszt-kondicionálással eltávolíthatók a kapillárisból. Ezek az előnyök költséget takarítanak meg az elemzőnek. A CE alkalmazhatóságát

biológiai mintákban több összefoglaló közleményben is áttekintették [86, 87]. CE esetén a fehérjetartalmú minták direkt injektálása a kapillárisba, és azt követő elemzése lehetséges; de a nagyobb fehérjetartalmú minták CZE-vel történő elemzése esetén kisebb precizitás érhető el. A kis fehérjetartalmú minták esetében (vizelet, epe, liquor, nyál) a CZE [52], nagy fehérjetartalmú minták (plazma, vér, köpet, sebváladék, szervek, szövetek) elemzése esetében pedig a MEKC technika [88] használata előnyös. MEKC esetén a felületaktív anyag jelenléte csökkenti a mátrix zavaró hatásait, így lehetséges a mintaelőkészítés nélküli direkt injektálás alkalmazása. A cefuroxim koncentrációját humán szérumból direkt injektálás után MEKC-cel határozták meg [89]. A szérumminták direkt injektálása során azonban a csúcsok alakja torzulhat a gyógyszer és a szérumfehérjék közötti kölcsönhatás miatt [88, 90]. Néhány minta esetében nem a fehérjék, hanem a szervetlen ionok magas koncentrációban való jelenléte eredményez zavaró hatást (pl.: vizelet). A magas sótartalom a csúcs alakjának torzulását és a migrációs idők csúszását okozza. Ebben az esetben hígíthatjuk a mintát [91], vagy SPE-vel eltávolíthatjuk a sótartalmat (a sótartalom átfolyik a kolonnán, míg a gyógyszervegyület rajta marad, mely a megfelelő oldószerrel eluálható az SPE oszlopról) [92].

2.4. Mikrofluidikai csipek

Napjainkban a tudományos kutatások egyik legfontosabb iránya a különböző analitikai műszerek méretének csökkentése úgy, hogy ezzel együtt a hagyományos berendezésekhez képest nagyobb mintaátviteli sebesség, kevesebb felhasznált minta és vegyszer mennyiség, rövid elemzési idő legyen elérhető. A miniatürizáció eredményeként az elektroforetikus technikák csipen is végrehajthatók [93].

A csipeket általában néhány cm hosszúságú téglalap alakú lapkán alakítják ki úgy, hogy megfelelő mikromegmunkálási eljárással felületi mikrostruktúrákat (csatornákat) hoznak létre. A csipek többféle anyagból készülhetnek. Koráb-

ban üveget, és kvarcot használtak, melyek felületének megmunkálására jól alkalmazhatók a mikroelektronikában használt fotolitográfias, illetve száraz vagy nedves maratási eljárások. Az üveg felületén lévő szilanol csoportok könnyen ionizálhatók, ezért alkalmas elektroosztatikus áramlás létrehozására, továbbá jó fénytani tulajdonságai miatt összeegyeztethető különböző detektálási módszerekkel. Hátrányuk viszont, hogy viszonylag nehézkes és hosszadalmas az előállításuk. Emiatt az utóbbi években polimereket kezdtek alkalmazni a csipek kialakítására [94]. A polimer alapú csipek használatának előnye, hogy előállításuk gyorsabb, olcsóbb, mint az üvegből készülté, ezért akár egy mérésre szánt, eldobható csipek alkalmazása is lehetséges. A csipek készítéséhez többfajta polimer használható (polidimetilsziloxán (PDMS), poli-metil-metakrilát (PMMA), poli-tetrafluor-etilén). A polimerrel szemben támasztott követelmény, hogy jól megmunkálható legyen, jó fénytani tulajdonságokkal rendelkezzen, a mérés során maradjon inert (ne oldódjon szerves oldószerben), felületét lehessen módosítani. Erre azért van szükség, mert a polimerek csak kis elektroosztatikus áramlási sebességet képesek létrehozni. A csip felületén kialakított csatornák mintázata is változott az évek során, az első csipeken az analíziscsatornák egyenesek voltak, majd kanyarulatokat alakítottak ki benne, ugyanis a csatornahossz növelésével lehet a felbontást növelni.

Az analitikai csipeket legelterjedtebben biológiai minták, ezen belül DNS, és fehérjék elemzésére használják. Annak ellenére, hogy számos mikrofluidikai közleményt találunk, ezek közül viszonylag kevés cikk foglalkozik gyógyszervegyületek meghatározásával. A kefalosporinokat eddig még nem vizsgálták csipen. Ennek valószínűleg a detektálás nehézsége és kis érzékenysége az oka. A rendkívül kis térfogatú minták érzékeny elemzéséhez többnyire lézer indukált fluoreszcens (LIF) vagy elektrokémiai detektálást használnak. E módszerek korlátait jelentik, hogy a LIF csipen való alkalmazásához fluoreszkáló anyaggal (fluorescein, rodamin, FITC) megjelölt vegyület szükséges [95-97], míg az elektrokémiai detektor [98] nem alkalmazható univerzál-

lis jelleggel, ráadásul speciális kialakítású csipeket kívánnak meg. A PDMS alapú csipek legfőbb érdeme, hogy egyszerű, olcsó, eldobható, miniaturizált berendezések [99]. A LIF és elektrokémiai detektorral felszerelt csipek nagymértékben növelik a csip bonyolultságát és árát, mivel a komplett rendszer olcsósága, vagy a csip eldobható, egyszer használatos jellege elvész. Az UV spektrofotometriás detektálás egyszerűen megoldható a PDMS csip felszínén, továbbá számos miniaturizált spektrofotométer van kereskedelmi forgalomban. Az egyedüli hátránya, hogy a kimutatási határ a csatorna keresztmetszetén áthaladó rövid optikai úthossz miatt nem elég kicsi.

3. KÍSÉRLETI KÖRÜLMÉNYEK

3.1. Felhasznált vegyszerek és minták

Az analitikai tisztaságú vegyszerek különböző gyártóktól származnak. Az egyes antibiotikumokat (kefalosporin C (Fluka), cefoxitin (MSD, Hollandia), cefazolin, cefadroxil (Bristol-Myers, Olaszország), cefoperazon (Pfizer, Olaszország), cefamandol (Human, Magyarország), cefaklór (Lilly, Olaszország), cefalexin (Chinoin, Magyarország), cefixim (Richter Gedeon, Magyarország) ceftibuten (SIFI, Olaszország), cefuroxim, ceftazidim (Glaxo, Egyesült Királyság), cefotaxim (Lek, Szlovénia) és ceftriaxon (Roche, Svájc)) különböző gyártóktól szereztük be. A 0,15 mg/ml koncentrációjú törzsoldatokat közvetlenül az elemzés előtt az egyes antibiotikumok szilárd sóinak vízben való feloldásával készítettük el. Az 1. táblázatban a vizsgált kefalosporinok szerkezeti képleteit és az általunk alkalmazott rövidítéseiket foglaltuk össze.

Az EOF migrációs idejének meghatározására benzil-alkoholt (Spektrum-3D Kft.) használtuk, melynek koncentrációja a minta oldatban 0,01 % volt. A kefalosporinok elválasztásához használt puffereket H_3PO_4 , NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 és NaOH (Reanal) felhasználásával készítettük el. Biológiai minták elemzéséhez 9,1-es pH-jú, 25 mM borát-50 mM SDS (Spektrum-3D Kft.) tartalmú puffert alkalmaztunk. A CE-MS mérések pH 9,8, 50 mM koncentrációjú ammónium-acetát (Spektrum-3D Kft.) puffer alkalmazása mellett történtek. Az elektroforézis megkezdése előtt a kapilláris felületét puffer oldattal prekondicionáltuk (5 perc) a megfelelő fali töltés kialakítása végett. A sputum (tracheobronchiális váladék) elfolyósításához sputolysint (Calbiochem, La Jolla) használtunk. A liofilizált köpet feloldását metanol (Spektrum-3D Kft.)-víz oldószerkelegyen végeztük. A jó mérési reprodukálhatóság elérése érdekében az egyes mérések végén, a biológiai minták elemzésekor a kapillárist 1 M NaOH-oldattal (5 perc), 0,1 M SDS oldattal (5 perc), és pufferrel (5 perc) mostuk.

A pK_a meghatározásokhoz a 2,0-9,7 pH érték közötti, de azonos, 50 mM ionerősségű puffereket H_3PO_4 , NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , CH_3COOH , CH_3COONa , H_3BO_3 , $HCOOH$, $HCOONa$, $NaOH$ (Spektrum-3D Kft, Magyarország) vegyszerek felhasználásával készítettük el [68]. A puffer oldatokhoz $NaCl$ -ot (Spektrum-3D Kft., Magyarország) adtunk az állandó ionerősség biztosításához, a szükséges mennyiségeket PeakMaster 5.1 program [100] segítségével számoltuk ki. Az elkészített puffereket, kondicionáló oldatokat hűtőben tároltuk, az elemzés előtt 0,45 μ m-es fecskendőszűrőn átszűrtük.

A pH-metriás titrálásokat állandó ionerősségű 0,2 M KCl (Merck) oldatban $25 \pm 0,1$ °C-on végeztük 0,20 M koncentrációjú KOH (Merck) oldattal. A mintákba a titrálás megkezdése előtt 20 percig, és a titrálás során argon gázt (Spektrum-3D Kft.) vezetünk, hogy a CO_2 gáz beoldódását megakadályozzuk. A mintába vezetett argon gáz biztosította az oldat homogenitását, ezáltal segítve az egyensúly beállítását. A mérés során felhasznált 0,2 M HCl oldatot hígítással tömény HCl (Merck) felhasználásával készítettük, melynek pontos koncentrációját Gran módszer szerint [101] számoltuk ki. Az elektród pufferelesét 0,05 M koncentrációjú (pH 4,005) kálium-hidrogén-ftalát oldattal (Merck) 20 percen át 25 °C-on végeztük.

3.2. Alkalmazott berendezések

3.2.1. Kapilláris elektroforézis

Kísérleteinkhez egy HP 3DCE (Agilent) 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 μ m belső átmérőjű poliidid külső bevonatú kvarckapillárist (Polymicro Technology) használtunk. A kapillárison lévő optikai ablak (detektor ablak) 4-5 mm hosszú szakaszának kialakításához eltávolítottuk a kvarckapilláris külső poliidid borítását. Minden új kapillárist

az első használatba vételkor 1 M koncentrációjú nátrium-hidroxid oldattal (10 perc), majd 0,1 M koncentrációjú nátrium-hidroxid oldattal (10 perc), végül pedig desztillált vízzel (5 perc) mostunk. Ily módon eltávolítottuk a felületre adszorbeált anyagokat, és a szilanolcsoportokat is deprotonáltuk. A napi mérések befejeztével a kapillárist desztillált vízzel mostuk át, majd levegővel fűvattuk át, mert a pufferoldat oldószerének elpárolgásakor keletkező kristályok eltömhetik a kapillárist. Az alkalmazott feszültség +25 kV volt, a kapilláristartó kazettát 25 °C-on termosztáltuk. A detektálás 270 nm-en 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.

3.2.2. Tömegspektrométer

A CE-MS méréseket CE^{3D}-MSD-TRAP-XCT készüléken (Agilent Technologies, USA) végeztük, amely elektropray ionforrással (ESI) és ioncsapdás tömeganalizátorral van felszerelve. A CE készülék és az ionforrás között egy speciális, három koaxiális kapillárisból álló CE-ESI-MS interfész helyezkedik el, melyben a vizsgálandó oldat, a segédfolyadék (sheat flow, mely az ESI által megkívánt optimális áramlási sebesség megtartásához szükséges), és a porlasztó gáz (N₂) áramlik. A segédfolyadék CH₃OH:H₂O (1:1) áramlási sebessége 10 µl/perc volt (1100 Series Isocratic Pump, Agilent). A nitrogén gáz hőmérséklete 300 °C, áramlási sebessége 5,00 l/perc volt, a porlasztás 0,7 bar nyomás alkalmazásával történt. Az ionizáció 3 kV feszültség felhasználásával negatív módban történt (-MS). A CE-MS mérés során a kapilláris hossza 76 cm volt, az alkalmazott feszültség 30 kV, az injektálás 100 mbar·sec-mal történt. A tömegspektrumokat ChemStation LC/MSD Trap Software 5.3 (Agilent) programmal értékeltük ki.

3.2.3. Potenciometriás titráló berendezés

A potenciometriás titrálásokat egy Radiometer pHM 93 készülékkel végeztük, melyhez egy Metrohm kombinált üvegelektrod (típus: 6.0234.100) és egy Metrohm 715 Dosimat buretta tartozik. A titrálások megkezdése előtt az elektródot 20 percen át 0,05 M kálium-hidrogén-ftalát oldattal puffereltük 25 °C-on. Az elektródot Irving szerint kalibráltuk, pH-metriás mérések eredményeit korrigáltuk az Irving faktorról [102]. A víz ionizációs konstansa $pK_w = 13,76 \pm 0,01$ volt.

3.2.4. Egyéb berendezések

Az elkészített puffer oldatokat ultrahangos készülék (Branson 2510) segítségével gázmentesítettük (15 perc). A sputum mintákat (tracheobronchiális váladék) CE-vel történő elemzés előtt liofilizáltuk, mert nagy viszkozitásuk nem tette lehetővé a direkt injektálást követő reprodukálható elemzésüket. A sputum minták liofilizálása -18°C-on vákuumban 12 órán keresztül tartott (Lyovac GT2, Leybold). A liofilizálást követően visszamaradt porózus anyagot üvegbot segítségével összetörtük, és annyi metanol:víz (1:1) oldószer-elegyenben oldottuk fel, amennyiben még éppen feloldódott a minta. 0,01 g liofilizátum feloldásához 300 µl oldószer-elegy volt szükséges. A minta feloldásához poláros oldószert használtunk, mert a kefalosporinok hidrofil karakterűek. A liofilizátum feloldását vortex (Stuart SA 7) segítségével öt percig végeztük. A kapott oldatot 20 percen át 9000 fordulatszámmal +4 °C-on centrifugáltuk (Digicen-R, Orto Alresa), és a felülúszót elemeztük.

A mikrofluidikai csipeken a kromatográfias töltet kialakítását, és a hidrodinamikusan mintainjektálást perisztaltikus pumpa (IPC, Ismatec) segítségével végeztük. A csipen való elektroforézishez nagyfeszültségű tápegységet (0,5-2,5 kV, Microply-30, Cetox Kft.) használtunk. A platinaelektrodokat a megfelelő portokhoz közel a PDMS-be szúrtuk (azért nem helyeztük közvetlenül a

portba, hogy a képződő buborékok ne jussanak a csatornába, és ne zavarják az elektroforézist).

A csipen a detektálást UV spektrofotometriásan 270 nm-en, a csatorna falán keresztül két száloptika segítségével végeztük, melyek egy miniatürizált spektrofotométerhez kapcsolódtak (Avaspec-2048-2, Avantes, Hollandia) (1.B ábra). A két optikai szálat a csip elvékonyított részén alulról és felülről a csatorna falára merőlegesen pozicionáltuk két állvány segítségével. Mivel a detektálás külsőleg történt a csip felszínén, így az elvékonyított régióban több helyen lehetséges volt a detektálás. A mért jeleket Avasoft szoftver rögzítette (Avantes, Eerbeek, Hollandia).

3.3. Klinikai mintavételezés és tárolás

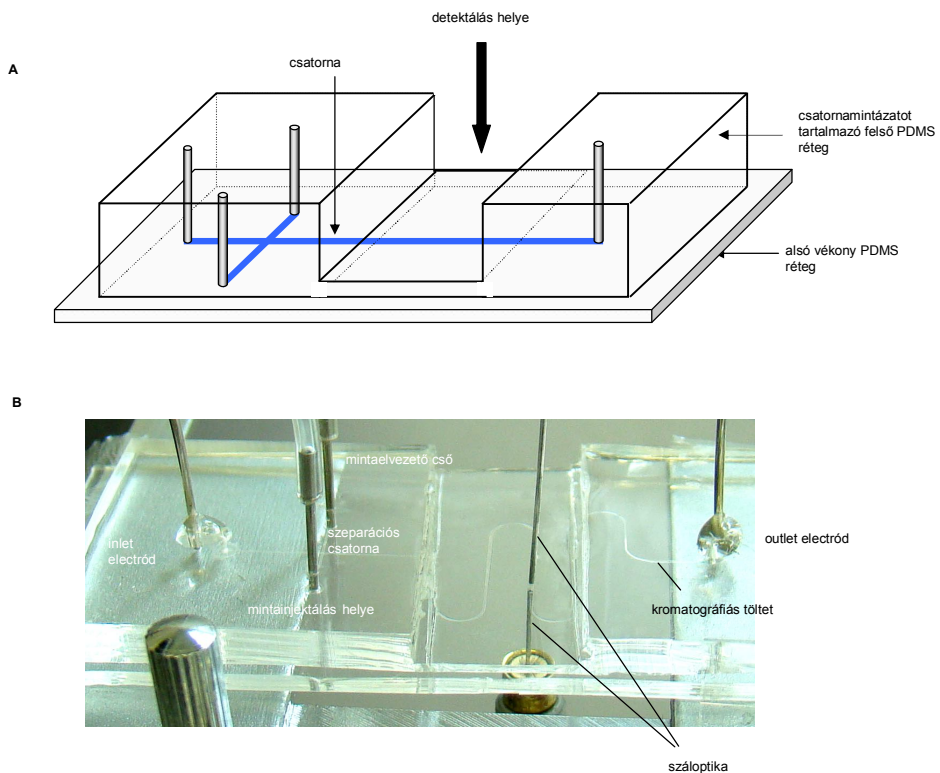
A szérum, vizelet, sebváladék, liquor mintákat a Debreceni Egyetem-Orvos és Egészségtudományi Centrum (DE-OEC) Idegsebészeti Klinikájáról szereztük be az egyetem orvos etikai előírásainak megfelelően. A mintaoldatokat előzetes mintakezelés nélkül elemeztük. A sputummal való kísérleteinkbe különböző generációkba tartozó, hat kefalosporin antibiotikumot vontunk be. A szérum és köpetmintákat a DE-OEC Idegsebészeti Klinika Intenzív Osztályán fekvő 38 (27 nő, 11 férfi) intubált, bronchopneumoniában szenvedő, kefalosporinokkal kezelt betegekből vettük. A betegek 44-68 év közötti, 53-82 kg súlyúak voltak. Öt beteg cefuroximot (65 mg/kg/24h), hat beteg ceftriaxont (60 mg/kg/24h), négy beteg ceftazidimet (60 mg/kg/24h), öt beteg cefepimet (85 mg/kg/24h), 14 beteg cefazolint (65 mg/kg/24h), és négy beteg cefamandolt (45 mg/kg/24h) kapott intravénásan három egyenlő dózisban naponta. A szérum és a köpet minták a kezelés második napján az utolsó antibiotikum dózis beadását követően hat órával később lettek levéve. A köpet mintákat az endotracheális tubus leszívásával nyerték. A klinikai minták az elemzésig -18°C-on voltak tárolva, közvetlenül elemzés előtt kerültek felolvasztásra.

3.4. Mikrofluidikai csipek készítése

A PDMS csip készítéséhez lágy litográfiás technikát [99] használtunk. A csip 100 μm széles csatornamintázatát AutoCAD szoftver segítségével rajzoltuk meg. A csatorna hossza és alakja többféle volt (kereszt alakú egyenes, illetve szerpentines szeparációs csatornával). A csatornamintázatot nagyfelbontással (10000 dpi) egy átlátszó fóliára (fotográfiás maszk) nyomtattuk. A szilícium lapkára (Silicon Quest, Santa Clara, CA) 35 mm vastag fényérzékeny réteget (SU-8 2025 negatív-típusú fotoreziszt, Microchem, Newton, MA) vittünk fel spincoater segítségével (3000 fordulat/perc), ezt követően 15 percre 95°C-os kemencébe (Membert) tettük. A fotográfiás maszkot ezután a szilíciumlapon megszilárdult bevonatra helyeztük, majd a réteget UV fényel 1 percen át besugároztuk a maszkon keresztül. A besugárzott lapot 5 percre a 95°C-os kemencébe helyeztük, ezután SU-8 előhívószerral (Microchem, Newton, MA) a nem besugárzott területeket eltávolítottuk, így megkaptuk a kész öntőformát. A PDMS oligomert és a térhálósítót (Sylgard 184, Dow Corning, Midland, MI) 10:1 arányban összekevertük, és vákuum segítségével gázmentesítettük. Ezt a keveréket az öntőformára öntöttük, majd egy órára 65°C-os kemencébe tettük, ahol megkeményedett. A csip középső részére a még meg nem kötött PDMS keverékbe egy 2 mm vastagságú műanyag lapot süllyesztünk azzal a céllal, hogy az UV detektálás helyén a csip vastagságát csökkentjük, minimalizálva ezáltal a detektálás során fellépő zavaró hatásokat (1.A ábra). A kész PDMS réteget óvatosan lehúztuk a szilícium lapról, megkapva az öntőforma lenyomatát a PDMS felületén. Ezt a műanyagot megfelelő méretre vágtuk, és a csatornák végeinél lyukasztással kialakítottuk a 300 μm átmérőjű portokat. A csip alja nagyon vékony, 1 mm vastagságú PDMS lap volt, mely PDMS oligomer és a térhálósító 5:1 arányú keverékéből készült. A nagyobb arányú térhálósítónak köszönhetően a csip alja keményebb volt, mint a felső része. A csip alsó és felső részének megfelelő felületeit 2 percig levegő plazmában (PDC-32G, Harrick) történő aktiválás után egymásra helyeztük, melyek így pillanatokon belül irreverzibilisen egymáshoz kötődtek.

A PDMS csipeknek számos előnyös tulajdonságuk van. Mivel átlátszó, ezért lehetséges a benne áramoltatott folyadék szabad szemmel, vagy mikroszkóppal történő követése, és UV spektrofotometriás detektálása. A PDMS oligomer és térhálósító arányának változtatásával a műanyag flexibilitása változtatható. Irreverzibilisen ragasztható üveghez, kvarchoz, műanyaghoz.

A kész csip analíziscsatornájának a végébe kb. 1 cm hosszúságban, 5 μm szemcseátmérőjű C18-as kromatográfiás részecskékből (Microsorb 100-5 Varian) egy tömör töltetet alakítottunk ki, hogy hidrodinamikus injektálást tudjunk végezni (1.B ábra). A töltési eljárást és a töltet állandóságának magyarázatát nemrégiben részletesen leírták [103]. A csip csatornáját először metanollal mostuk át, hogy letisztítsuk a falról a szennyeződések, és eltávolítsuk a víznyomokat. A C18-as töltet metanollal elkészített szuszpenzióját használat előtt alaposan homogenizáltuk vortex segítségével, ebből a szuszpenzióból kis nyomás alkalmazásával a szükséges mennyiséget (kb. 0,5 μl) az outlet porton keresztül a szeparációs csatornába vezettük perisztaltikus pumpa alkalmazásával úgy, hogy a csatorna magasságát külső nyomás alkalmazásával lecsökkentettük, ahol a töltet elejét szerettük volna kialakítani. Ezután pár másodpercig 2 bar nyomással tömörítettük a töltetet, ezalatt a csatorna fala elasztikusságának köszönhetően kiszélesedett, és a töltet részecskéi a csatornának ezt a kitágult részét kitöltötték. A nyomás megszüntetésével a csatorna fala visszahúzódva beszorította a töltetet a csatornába (clamping hatás [103]). A töltet ennek az ún. clamping hatásnak és a horgony-hatásnak [103] köszönhetően marad stabilan a PDMS csatornában. A töltet hosszúságát a csatornába vezetett részecskék mennyisége (a szuszpenzió térfogata) szabja meg. A töltet kialakítása után a csipet megfelelő pufferral átmostuk, és az elektródok, a perisztaltikus pumpacső csatlakoztatásával, valamint az optikai szálak pozícionálásával elkészült a mikrofluidikai csip az analitikai munkához.



1. ábra

PDMS alapú mikrofluidikai csip vázlatos és fényképes illusztrációja. A mintát nyomással juttattuk az inlet porton keresztül a szeparációs csatornába, a két elektród az inlet és az outlet portokhoz közel volt elhelyezve, az UV spektrofotometriás detektáláshoz szükséges optikai szálak a szeparációs csatorna falára merőlegesen a csip elvékonyított részében (alul és felül) vannak rögzítve. Az outlet porthoz közel rövid C18-as kromatográfias töltet van kialakítva, mely lehetővé teszi kis térfogatú (< 1 nl) minta szeparációs csatornába való juttatását.

4. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK

4.1. CZE módszer kifejlesztése kefalosporinok meghatározásához

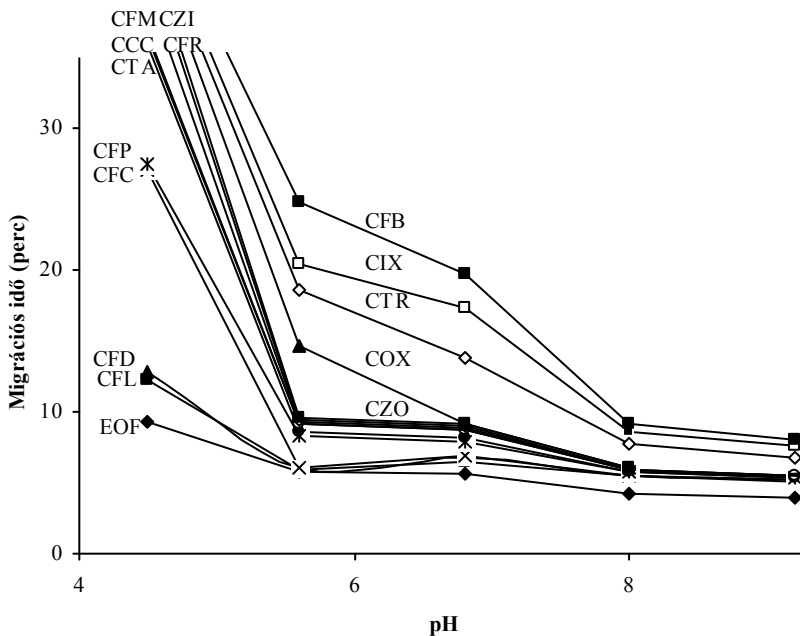
A kapilláris elektroforézis módszerei közül a legegyszerűbb a kapilláris zónaelektroforézis (CZE). A pufferelektrolittal töltött kapillárisban a minta különböző tömeg/töltés aránnyal rendelkező részecskéi elektromos erőter hatására elmozdulnak, zónákat alkotnak, melyek egymástól elkülönülve érik el a detektort. Munkánk során a CZE elemzés kísérleti paramétereinek kiválasztásához megvizsgáltuk, hogy a mérési körülmények változtatása, hogyan befolyásolja a kefalosporinok elemezhetőségét. Amellett, hogy nagyszámú (14) kefalosporin egyidejű elemzésére alkalmas módszert akartunk kidolgozni, bizonyítva ezzel a kidolgozott módszer kefalosporinokra történő általános alkalmazhatóságát; a kefalosporinokat testvegyületként használva megvizsgáltuk az egyes mérési paraméterek hatását a CZE meghatározásra. A vizsgált paraméterek a pufferelektrolit pH-ja, koncentrációja, felületaktív anyag alkalmazhatósága, kapilláris hossza, injektált minta mennyisége és az elválasztás során alkalmazott feszültség voltak.

4.1.1. A puffer pH-jának hatása

A vizsgált paraméterek közül a puffer hatásának kiemelkedő szerepe van a zónaelektroforetikus elválasztásra. A háttélektrolit nem csupán a szükséges áramvezetést biztosítja, de pH-ja, koncentrációja megszabja az EOF nagyságát, illetve a meghatározandó részecske töltését (elektroforetikus mozgékony-ságát), vándorlásának irányát. Reprodukálható mérésekhez az EOF nagymértékű pH függése miatt nagy pufferkapacitású, állandó pH értékű puffereket kell alkalmazni.

Munkánk során nagy pufferkapacitású foszfát- és borát puffereket használtunk, melyeknek a detektálás hullámhosszán gyakorlatilag nincs elnyelésük, és kis áramerősséget eredményeznek. Elektromos vezetőségük nem tér el szá-

mottevéően a kefalosporinok elektromos vezetésétől, ezért az elválasztás során a csúcsok alakja nem torzul. A kefalosporinok elektromos töltését a protonálható, illetve deprotonálható funkciós csoportok adott pH-n lejátszódó disszociációja szabja meg. A kefalosporinok pH 5 fölött anionos karakterűek, abszolút elektroforetikus mozgékonyaságuk kisebb, mint az ellentétes irányú, EOF mozgékonyasága, ezért elérik a kapilláris katódos végénél elhelyezkedő detektort. Először megvizsgáltuk a pH hatását a kefalosporinok migrációs idejére pH 2,5-10 tartományban (2. ábra).



2. ábra

A puffer pH-jának hatása a kefalosporinok migrációs idejére
 (Körülmények: 64,5 cm (56 cm a detektorig) x 50 µm-es kapilláris, 25 mM foszfát puffer, +25 kV, 100 mbar·sec, λ= 270 nm.)

pH 6 alatt a pH csökkentésével a migrációs idők nagymértékben nőnek, nagy felbontású az elválasztás, de igen hosszú a mérési idő (pH 5-nél az egyes komponensek migrációs ideje több, mint 50 perc). Ugyanakkor pH 8 felett rövid volt az elemzési idő, de nem értünk el megfelelő elválasztást több kom-

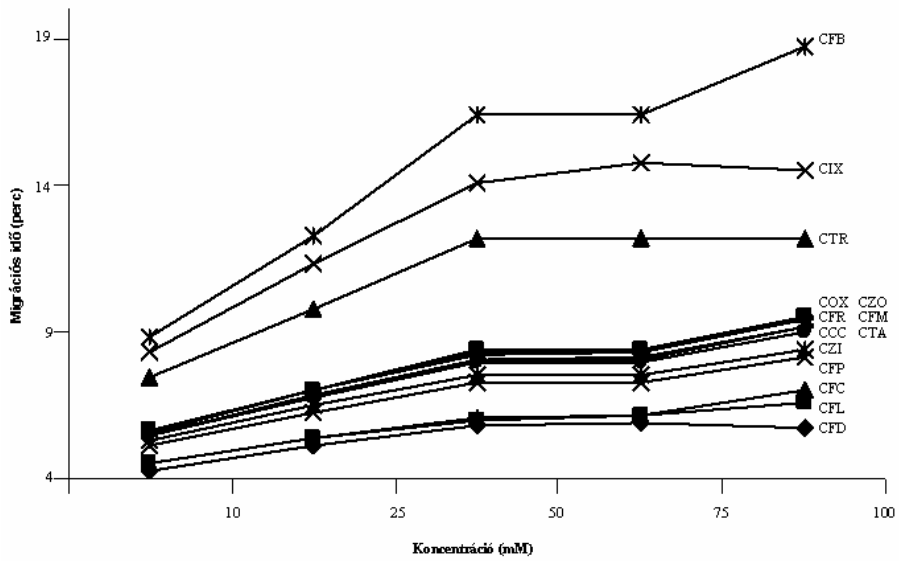
ponens esetében (pl. CFP és CFD, vagy CFL és CFC). Optimális pH-nak a $7 \pm 0,5$ körüli értéket találtuk mind felbontás, mind mérési idő tekintetében. Ezen a pH-n a vizsgált kefalosporinok közül tizenegynek az elektroforetikus mozgékonyági értékei kis mértékben különböznek egymástól, de ez elegendőnek bizonyult a megfelelő elválasztás eléréséhez. Három antibiotikum, a ceftriaxon, cefixim, és a ceftibuten nagyobb negatív elektroforetikus mozgékonyással rendelkezik, ezért nagyobb migrációs időknél jelennek meg az elektroferogramon.

4.1.2. A puffer koncentrációjának hatása

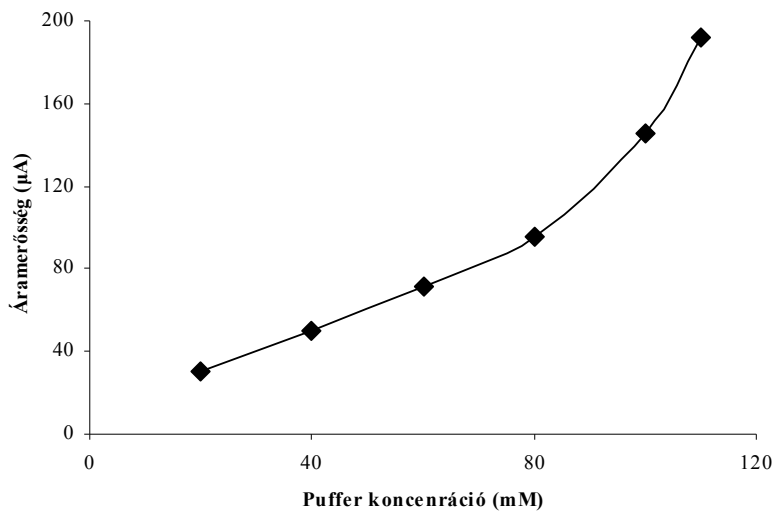
A puffer koncentrációját úgy kell megválasztani, hogy biztosítsa a puffer pH-jának állandóságát, ugyanakkor kicsi áramerősséget eredményezzen ($<100 \mu\text{A}$), és így ne alakuljon ki túlzott Joule-hő termelődés.

Megvizsgáltuk a foszfát puffer koncentráció változtatásának hatását 20-100 mM koncentrációtartományban az antibiotikumok migrációs idejére. A foszfát koncentráció növekedésével növekedtek a migrációs idők, aminek az az oka, hogy a pufferelektrolit koncentráció növekedésével nőtt a közeg ionerőssége, s így módon csökkent az elektroosmotikus áramlás sebessége. A nagyobb migrációs időknél megjelenő komponensek szélesebb csúcsot adnak, mert a lassabb komponensek hosszabb időt töltenek a detektáló ablakban (3. ábra).

A foszfát puffer koncentrációjának növekedésével az áramerősség körülbelül 80 mM koncentrációig egyenes arányban növekedett, nagyobb koncentrációknál pedig még fokozottabb az áramerősség növekedése, mivel magasabb hőmérsékletű oldatban nő az elektromos vezetés (4.ábra). Mindezek miatt 25 mM koncentrációjú foszfát puffer használatát tartottuk előnyösnek, ami a mi rendszerünkben általában $39 \mu\text{A}$ körüli áramerősséget eredményezett.



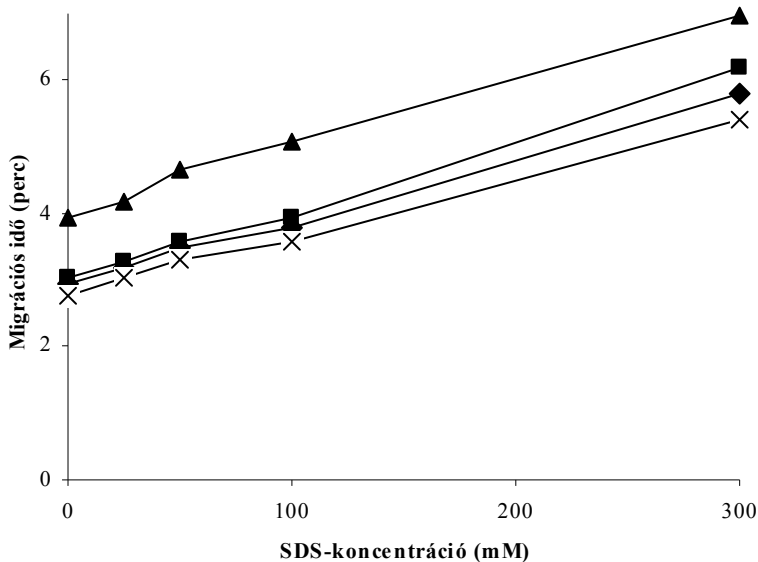
3. ábra
A puffer koncentrációjának hatása a kefalosporinok migrációs idejére
(Körülmények: ugyanaz, mint a 2. ábránál)



4. ábra
A puffer koncentrációjának hatása az áramerősségre
(Körülmények: ugyanaz, mint a 2. ábránál)

4.1.3. A pufferhez adott felületaktív anyag hatása

Kapilláris elektroforetikus elválasztásnál a pufferhez adott felületaktív anyag megváltoztathatja az elválasztás hatékonyságát, mechanizmusát. A puffer SDS tartalma ugyanis különböző, az elválasztás szempontjából fontos tényezőkre lehet hatással. Az SDS, illetve az ebből felépülő micellák hidrofób része másodlagos kötőerők révén kölcsönhatást alakítanak ki apoláros molekuláriszerekkel, így megváltoztatva azok elektroforetikus mozgékonyosságát, és így akár az elválasztás mechanizmusa is teljesen megváltozhat (CZE→MEKC). Megvizsgáltuk, hogy a foszfát pufferhez adalékolt SDS koncentrációjának (0-300 mM SDS), milyen hatása van a vizsgált kefalosporinok migrációs idejére (5. ábra).



5. ábra

Az SDS koncentrációjának hatása a kefalosporinok migrációs idejére
(Körülmények: ugyanaz, mint a 2. ábránál)

Azt tapasztaltuk, hogy a kefalosporinok migrációs idői kis mértékben növekedtek az SDS koncentráció növelésével, ugyanakkor a komponensek migrá-

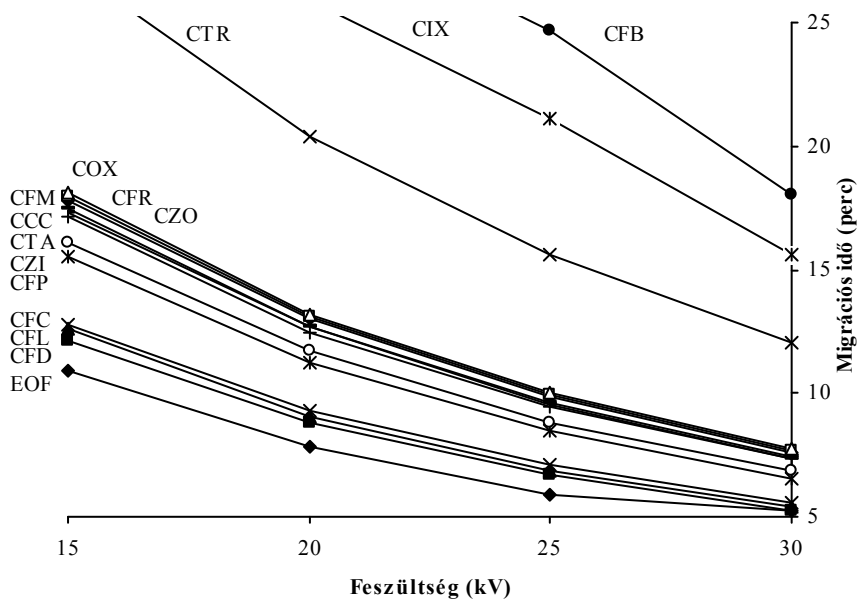
ciós sorrendjében változást nem tapasztaltunk, nem változott az elválasztás mechanizmusa. Az SDS tartalom jelenléte gyakorlatilag azonos hatással volt az összes komponens migrációs sebességére, azaz az SDS tartalom csupán az ionerősség megváltoztatásán keresztül volt hatással a komponensek migrációs idejére. Ennek egyik oka az lehet, hogy a kefalosporinok hidrofíl tulajdonságúak, ezért a micellák belső hidrofób terével csak jelentéktelen kölcsönhatások alakulhatnak ki. Másfelől mivel a kefalosporinok anionosak, az ugyancsak negatív töltésű SDS micellákkal nem lépnek kölcsönhatásba.

Bár az SDS pufferelektrolithoz adása nem eredményezett nagyobb felbontóképességet, az SDS tartalmú elektrolit vizsgálata azért is volt fontos, mert fehérjetartalmú minták közvetlen elemezhetőségét segíti a felületaktív anyag jelenléte az elektrolit oldatban.

4.1.4. A feszültség hatása

Feszültség hatására a kapillárisban lévő háttélektroliton keresztül elektromos áram folyik az elektródok között, ennek nagyságát az alkalmazott térerőn túl többek között a puffer koncentrációja, fajlagos vezetőképessége, illetve a kapilláris hossza és átmérője is meghatározza (6. ábra).

Megvizsgáltuk az alkalmazott feszültség nagyságának (10-30 kV) hatását az egyes komponensek migrációs idejére. Azt tapasztaltuk, hogy 25 kV feszültséget alkalmazva gyors elválasztást érhetünk el és még a csúcsalakok sem torzulnak számottevően. 30 kV alkalmazásakor a csúcsalakok torzulása már megfigyelhető a kapillárisban kialakuló fokozottabb hőmérsékletgradiens miatt.



6. ábra

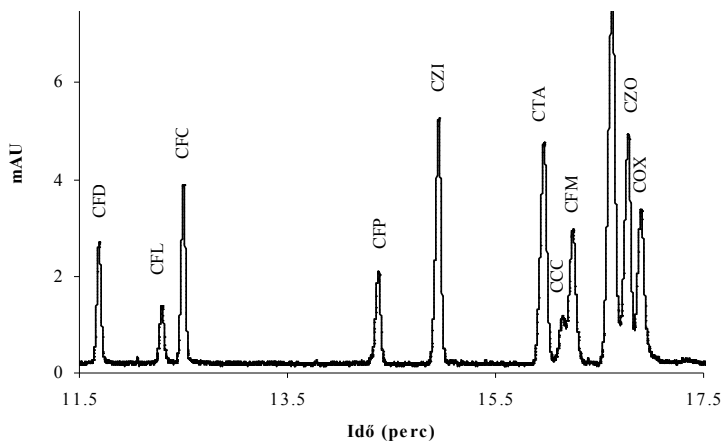
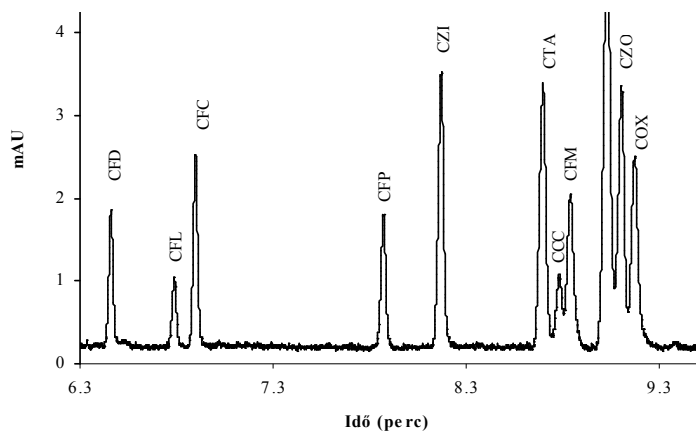
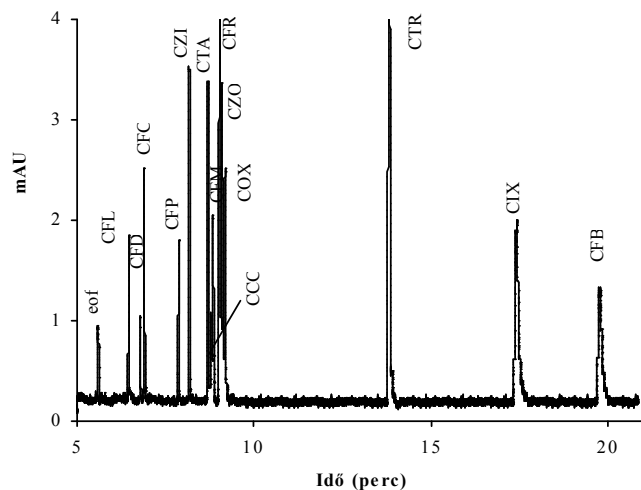
Az alkalmazott feszültség hatása a kefalosporinok migrációs idejére (Körülmények: ugyanaz, mint a 2. ábránál)

4.1.5. A kapilláris hosszúsága

Megvizsgáltuk, hogy a kapilláris hosszának változtatása milyen hatással van az elválasztás hatékonyságára. A 7. ábrán az általunk optimált körülmények alkalmazásával, 56 cm effektív hosszúságú kapillárist használva a tizennégy kefalosporin CZE elválasztására kapott elektroferogramot mutatjuk be, a jobb áttekinthetőség érdekében két különböző időskálán.

Valamennyi kefalosporin 20 percen belül meghatározható volt. Mivel az első tizenegy antibiotikumnak hasonló az elektroforetikus mozgékonysága, így ennél az időskálánál nehezen szemléltethető, hogy az elválasztás megfelelő volt valamennyi komponens esetén, ezért az ábrán az első tizenegy antibiotikumnak egy szűkebb időskálán (6,3-9,5 perc) felvett elektroferogramja is látható. Hat komponens esetében (CTA, CCC, CFM, CFR, CZO és COX) nem tudunk alapvonal szerinti elválasztást elérni, de ezek a csúcsok is mind

kvalitatívan és kvantitatívan még kiértékelhetők. A hosszabb, 112 cm hosszúságú kapilláris alkalmazása (7/C ábra) nem eredményezett jobb felbontást a hat komponens esetében. Mivel a hosszabb kapilláris alkalmazása esetén a migrációs idők jelentősen nőttek, ezért a rövidebb, 56 cm-es kapillárist használtuk későbbi munkánk során.



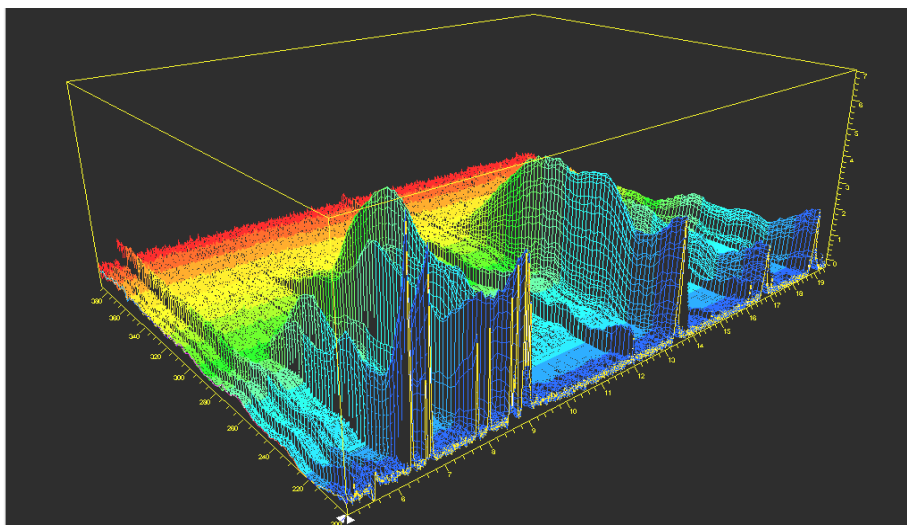
7. ábra

A vizsgált 14 kefalosporin elválasztása

A és B: kapillaris hossza: 64,5 cm, C: 112 cm hosszú kapillaris, (Körülmények: ugyanaz, mint a 2. ábránál, a kefalosporinok koncentrációja a keverékben 30 µg/ml)

4.2. Analitikai teljesítőképességi adatok

Az 4.1 fejezetben optimált CZE módszernek meghatároztuk az analitikai teljesítőképességi adatait a vizsgált 14 kefalosporinra. A kefalosporinoknak jellemző UV spektrumuk van, ami megkönnyíti azonosításukat a mérések során. A komponensek 200 nm-nél tapasztalt erős elnyelése mellett, mindegyiknek van még egy elnyelési maximuma 240-280 nm között (8. ábra). Modelloldatokban és egyszerű mátrixú mintáknál a 200 nm-en, az összetettebb mátrixú mintákban a 270 nm-en történő detektálást tekintettük optimálisnak.

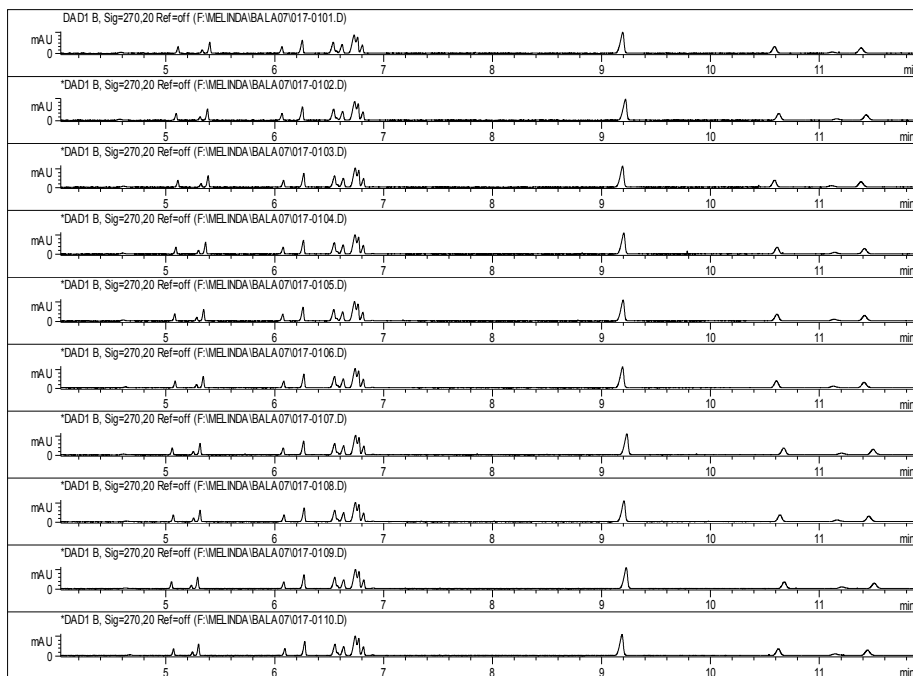


8. ábra

A kefalosporinok háromdimenziós adatanalízise diódasoros detektorral
(Körülmények: ugyanaz, mint a 2. ábránál)

Ugyanazt a mintaoldatot tízszer injektálva azonos mérési paramétereket alkalmazva meghatároztuk a migrációs idők és a jelterületek szórását (9. ábra, 3. táblázat). A migrációs idők szórása az antibiotikumok többségénél 1 RSD% alatti volt. A jelterületek szórása nagyobbak mutatkoztak, 1,31 és 2,86 RSD% között volt, ami a kapilláris elektroforézisnél általában elérhető mérési reprodukálhatóságnak felel meg (9. ábra). A kidolgozott CZE módszer precizitása hasonló, mint a más nagyteljesítményű elválasztástechnikai módszerrel

(pl. HPLC, GC) elérhető megfelelő paraméterek. A jelterületek migrációs időikkel való korrekciója esetünkben nem eredményezett jobb precizitást. A csúcsterületek szórásának egyik forrása (a mérőrendszer működésének reprodukálhatósága mellett) lehet a kefalosporinok vizes közegben történő bomlása is (lásd 4.4.3. fejezet).



9.ábra,

A módszer reprodukálhatóságának vizsgálata

(Körülmények: 49 cm (41,5 cm a detektorig) x 50 µm-es kapilláris, a többi körülmény ugyanaz, mint a 2. ábránál, a kefalosporinok koncentrációja a keverékben 100 µg/ml)

Az optimált elválasztási módszernél 270 nm-es detektálási hullámhosszt alkalmazva a kimutatási határok (jel/zaj viszony, S/N=3) 0,42 és 1,62 µg/ml között alakultak (3. táblázat). Ezek a kimutatási határ értékek megfelelő érzékenységet biztosítanak gyógyszeripari minták (fermentlevek, gyártási termékek), és a gyakoribb klinikai minták (szérum, vizelet) kefalosporin tartalmának meghatározásához.

3. táblázat

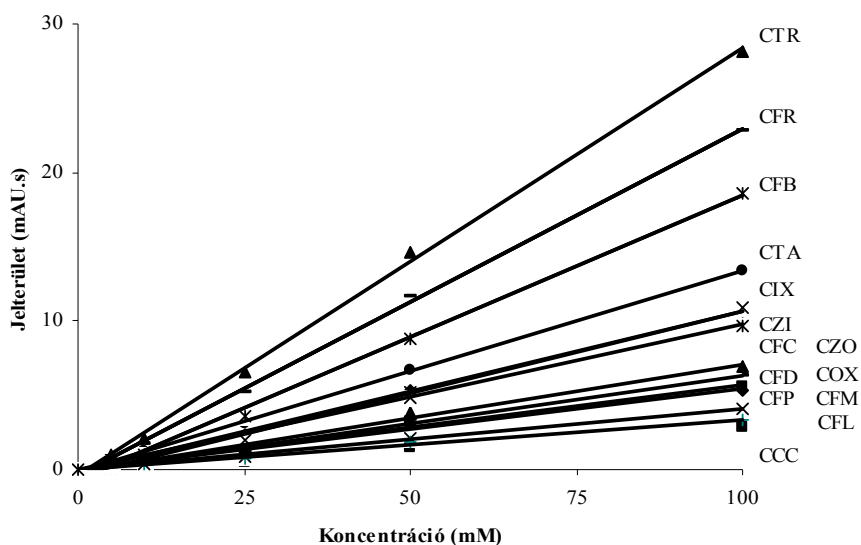
A kefalosporinok meghatározásának analitikai teljesítőképességi adatai vizes oldatban
(Körülmények: ugyanaz, mint a 2.ábránál)

| | Migrációs idő (min) | LOD* (µg/ml) | RSD, %** jelterület | RSD, %** migr.idő |
|------------|------------------------------------|-------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| CFD | 6,465 | 0,99 | 1,51 | 0,51 |
| CFL | 6,791 | 1,62 | 1,50 | 0,30 |
| CFC | 6,901 | 0,70 | 1,31 | 0,37 |
| CFP | 7,876 | 0,98 | 2,13 | 0,85 |
| CTA | 8,174 | 0,50 | 1,86 | 0,87 |
| CCC | 8,701 | 0,53 | 1,72 | 0,89 |
| CFM | 8,787 | 1,61 | 2,86 | 0,98 |
| CZI | 8,844 | 0,84 | 1,67 | 0,90 |
| CFR | 9,041 | 0,42 | 1,26 | 0,90 |
| CZO | 9,107 | 0,53 | 2,08 | 0,91 |
| COX | 9,178 | 0,71 | 1,93 | 0,92 |
| CTR | 13,844 | 0,42 | 1,56 | 0,98 |
| CIX | 17,441 | 0,89 | 1,72 | 1,16 |
| CFB | 19,893 | 1,36 | 1,63 | 1,26 |

*3s

**c=100 µg/ml, n=10

A mennyiségi elemzés lineáris meghatározási tartományának megadásához a tizennégy kefalosporin esetében elkészítettük az összehasonlító kalibrációs görbéket (10. ábra). Megállapítottuk, hogy a jelterületek és a megfelelő koncentrációk között 2-200 µg/ml tartományban lineáris volt a kapcsolat ($R^2 > 0,994$) (4.táblázat).



10. ábra
A vizsgált 14 kefalosporin kalibrációs görbéi
(Körülmények: ugyanaz, mint a 2. ábránál)

Megvizsgáltuk belső standard használatának hatását a mennyiségi meghatározások pontosságára, mivel így kompenzálható a készülék injektáló rendszerében esetleg jelentkező változás. Belső standardként fahéjsavat használtunk, mert könnyen elválasztható a vizsgált kefalosporinoktól és jó elnyelése van a kefalosporinok detektálásának hullámhosszán. Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a kvantitatív elemzésekkor belső standard használata nem hozott pontosabb eredményeket.

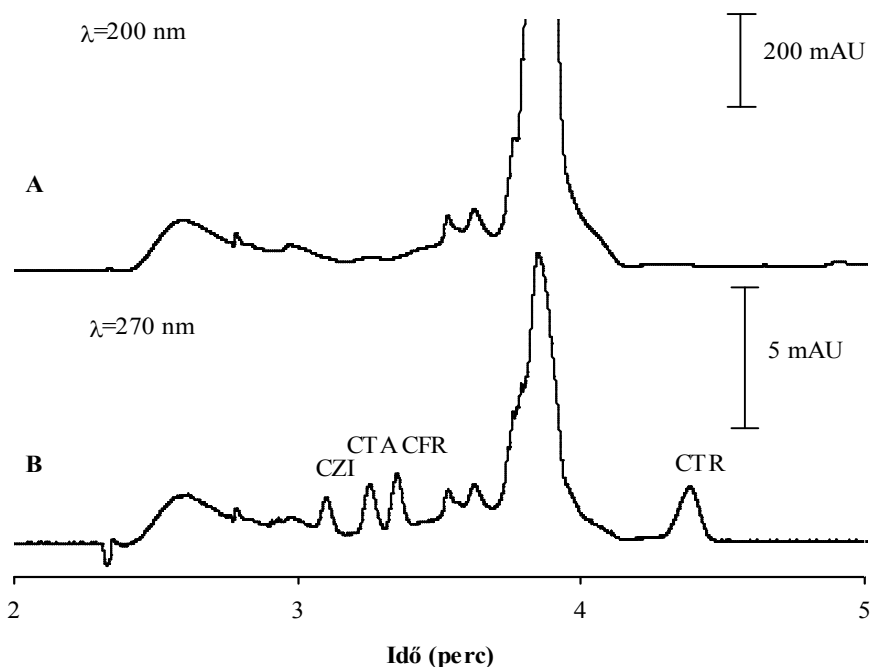
A kefalosporinok klinikai mintákban történő meghatározásakor megvizsgáltuk e minták mátrixanyagának hatását az elemzések analitikai teljesítőképességére. A biológiai minták fő összetevői (fehérjék, sók) rendszerint csak 240 nm alatt nyelnek el, ezen a hullámhosszon végezve a detektálást a nagy mennyiségben jelenlevő fehérjék nagy abszorbanciájú jeleket eredményeznek a kefalosporinok jeléhez képest, 270 nm-en detektálva azonban, a kefalosporinok csúcsai sokkal intenzívebbek, és a fehérjék elnyelése itt elhanyagolható (11. ábra).

4. táblázat

A lineáris elemzési tartományok adatai (Körülmények: ugyanaz, mint a 2. ábránál)

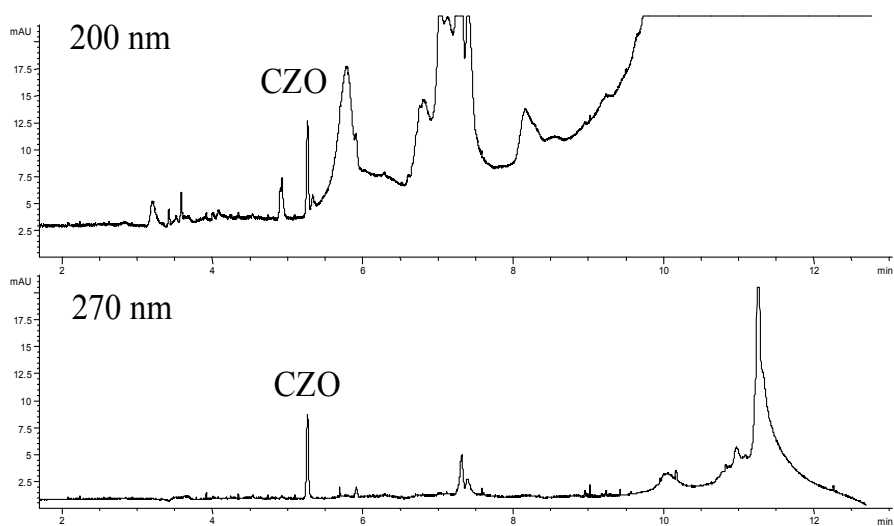
| Kefalo- sporinok | Regressziós egyenlet | Regressziós együttható | Lin. tarto- mány ($\mu\text{g/ml}$) |
|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|---|
| CFD | $y=0,054x - 0,011$ | 0,9989 | 2-150 |
| CFL | $y=0,041x - 0,061$ | 0,9955 | 5-200 |
| CFC | $y=0,072x - 0,0466$ | 0,9979 | 2-150 |
| CFP | $y=0,041x + 0,028$ | 0,9987 | 5-200 |
| CTA | $y=0,097x + 0,043$ | 0,9979 | 2-150 |
| CCC | $y=0,036x - 0,052$ | 0,9992 | 5-200 |
| CFM | $y=0,0514x - 0,0106$ | 0,9944 | 5-200 |
| CZI | $y=0,0647x - 0,022$ | 0,9974 | 2-150 |
| CFR | $y=0,347x - 0,115$ | 0,9989 | 1-100 |
| CZO | $y=0,170x - 0,143$ | 0,9986 | 2-150 |
| COX | $y=0,056x - 0,010$ | 0,9995 | 2-150 |
| CTR | $y=0,289x - 0,012$ | 0,9990 | 1-100 |
| CIX | $y=0,187x - 0,462$ | 0,9971 | 5-200 |
| CFB | $y=0,101x - 0,205$ | 0,9972 | 5-200 |

Klinikai minták elemzése esetén a kefalosporinok 270 nm-en történő meghatározását jelentősen javítja az SDS-t tartalmazó puffer használata. Az SDS fehérjék felületére történő adszorpciójának köszönhetően a fehérjék nettó negatív töltésre tesznek szert, így kisebb sebességgel vándorolnak a detektor (katód) felé, mint a kefalosporinok. Mivel így a kefalosporin a fehérjéktől jól elkülönülő jelet ad, az elválasztási módszerünk szelektivitása jobb lett (12. ábra).



11. ábra

Humán szérum minta elemzése 200 nm (A) és 270 nm (B) hullámhosszon detektálva (Körülmények: 48,5 cm (41 cm a detektorig) x 50 μ m-es kapilláris, 25mM borát puffer, pH= 9,2, +25 kV, 100mbar·sec, kefalosporinok koncentrációja: 30 μ g/ml.)



12. ábra

Humán szérum minta elemzése SDS tartalmú pufferben két különböző hullámhosszon (Körülmények: ugyanaz, mint a 11. ábránál, de a puffer 100 mM SDS-t is tartalmazott, a cefazolin koncentrációja 45 μ g/ml.)

Négy kefalosporin (ceftazidim, cefotaxim, cefuroxim, ceftriaxon) biológiai mintában mért kimutatási határa (S/N = 3) 0,42-0,84 µg/ml koncentrációtartományba esik, ez nem mutat számottevő eltérést a vizes oldatban mért értékekhez képest. A ceftriaxont tartalmazó szérum és sputum minták elemzéseinek precizitás vizsgálatakor a migrációs idők, és a csúcsterületek szórása a klinikai mintákban kissé nagyobbak adódtak mint vizes oldatban való elemzések esetén (5. táblázat).

5. táblázat

A kefalosporinok meghatározásának analitikai teljesítőképességi adatai biológiai mintákban, egy napon belüli reprodukálhatósági vizsgálatok, vízben, szérumban, köpetben, (N=10, c= 40µg/ml)

| | RSD (%) | | Visszanyerés (%) |
|----------------|---------------|------------|------------------|
| | Migrációs idő | Jelterület | |
| Víz | 0,38 | 0,81 | |
| Szérum | 0,77 | 1,41 | 103,1 |
| Sputum | 0,52 | 0,84 | 99,6 |
| Sputum* | 0,76 | 1,78 | 97,8 |

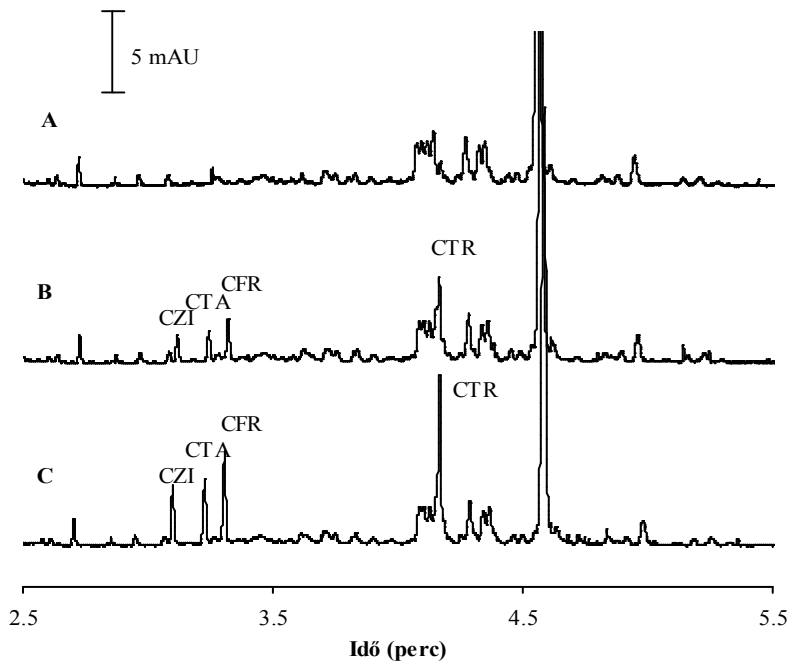
*2 g sputumhoz 100 µl 1,2 mg/ml ceftriaxon standard oldatot tettünk, homogenizáltuk, majd 10 részre osztottuk, liofilizáltuk. Mindegyik liofilizátumot (9-10 mg) 300 µl metanol:víz (1:1) oldószerkeletben oldottuk fel.

4.3. Kefalosporinok meghatározása biológiai mintákban

4.3.1. Direkt injektálás alkalmazhatóságának vizsgálata

Biológiai minták CE-vel történő elemzése során néhány olyan speciális probléma merül fel, mellyel nem találkozunk a tiszta, vizes oldatokkal való analitikai munka során. A reálmintákban való elemzés során figyelembe kell venni a tárolás körülményeit, a mintaelőkészítési műveleteket, a bomlást, és a biológiai minták mátrixanyagainak zavaró hatásait. A biológiai mátrix magas fehérje- és sótartalmának, valamint nagy viszkozitásának van jelentősebb hatása az elválasztásra. Munkánk során az egyes kefalosporinok elemezhetőségét szérum, vizelet, liquor, sebváladék, és köpet mintákban vizsgáltuk meg. Az volt a cél, hogy egy olyan CE módszert dolgozzunk ki biológiai mintákra, mellyel egyszerűen, hosszadalmas mintaelőkészítés nélkül tudunk elemezni.

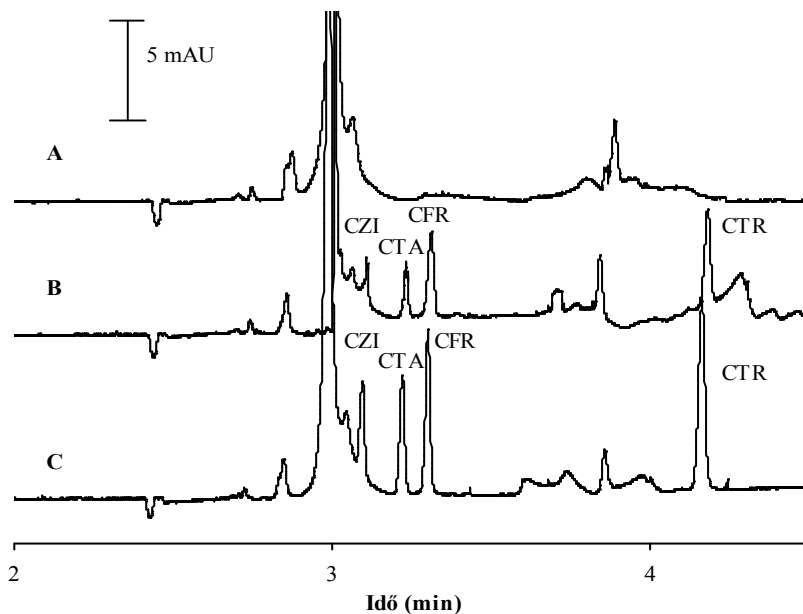
A biológiai minták vizsgálatának sorát egyszerűbb összetételű, fehérjementes mintákkal kezdtük, mivel fehérjék CZE elemzésénél speciális problémákat kell megoldani. A vizelet normál esetben fehérjementes, vagy bizonyos esetekben (pl. gyulladás) csak kevés, elhanyagolható mennyiségű fehérjét tartalmazhat. A vizeletminták elemzése esetén a magas sótartalom a csúcsok alakjának deformációját, és a migrációs idők kismértékű változását okozza, mivel a minta és a puffer elektromos vezetése között nagy a különbség. Mindezek a hatások a vizelet hígításával mérséklődtek (13. ábra). Egy másik megoldást jelenthetne a puffer ionerősségének növelése, de ennek a Joule hő temelődése szab gátat.



13. ábra

Ötszörösére hígított humán vizeletminta elemzése, A: vizelet, B: vizelet kefalosporinok hozzáadása után, $c=10\mu\text{g/ml}$, C: vizelet kefalosporinok hozzáadása után, $c=25\mu\text{g/ml}$ (Körülmények: ugyanaz, mint a 11. ábránál.)

Sebváladék és liquor minták elemzése CZE-vel hígítás, mintakezelés nélkül is lehetséges, továbbá a pufferhez sem szükséges semmilyen adalékot tenni, mivel a sebváladék, és a liquor viszonylag kevés fehérjét, valamint sót tartalmaz (14. és 15. ábra). Fehérjetartalmú biológiai minták elemzésekor a kapillárist 1 M NaOH-dal öt percig, majd 0,1 M SDS oldattal öt percig, végül pufferrel öt percig poszt kondicionáltuk. A poszt kondicionálási lépésekkel a mérések során a kapilláris falára erősen adszorbeálódott anyagokat (fehérjéket, sókat) lehet eltávolítani, és így a mérések reprodukálhatóságát javítani. A 15. ábrán hosszabb migrációs időknél megjelenő nagy csúcsok a vérből származó fehérjéktől erednek, mivel a sebváladék gyakran tartalmazhat vért is.

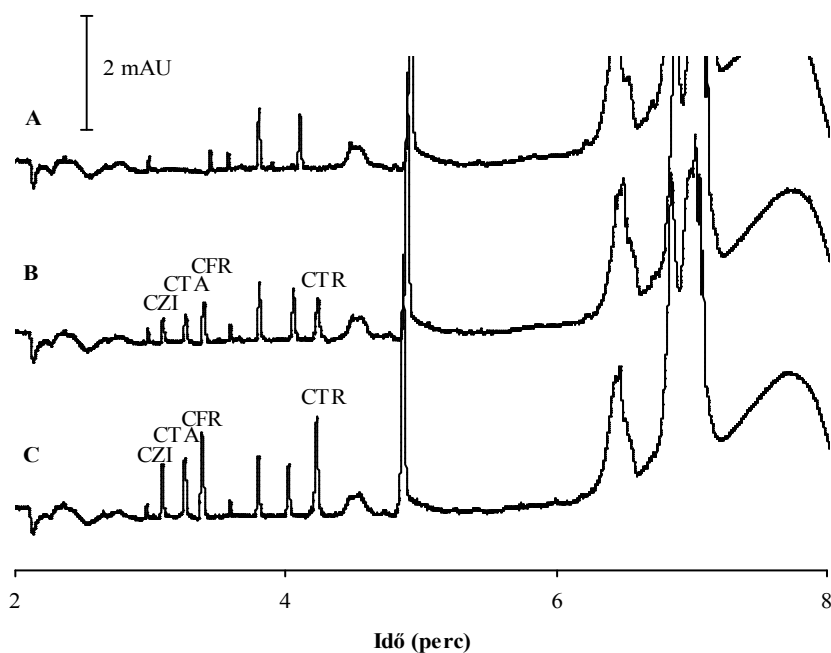


14. ábra

Humán liquor elemzése, A: liquor, B: liquor kefalosporinok hozzáadása után, $c = 25 \mu\text{g/ml}$, C: liquor kefalosporinok hozzáadása után, $c = 50 \mu\text{g/ml}$, (Körülmények: ugyanaz, mint a 11. ábránál.)

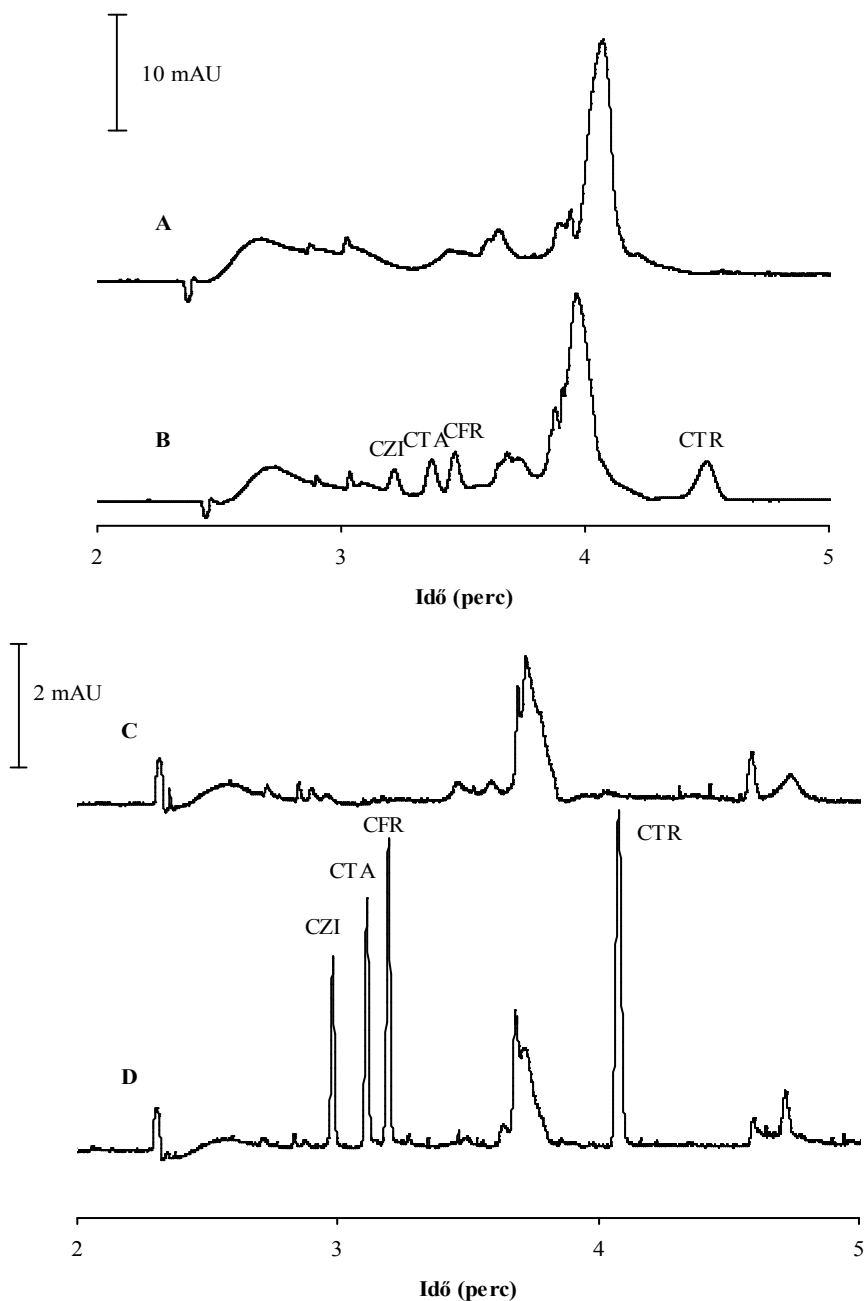
A szérumban, mint nagy mennyiségű fehérjét tartalmazó minta kromatográfiás (HPLC, GC) elemzésekor elengedhetetlen a minták előzetes fehérjementesítése. Négy antibiotikumot (ceftazidim, ceftriaxon, cefotaxim, cefuroxim) tartalmazó szérumban elemzése esetén, a ceftriaxon a szérumban legnagyobb csúcsa, az albumint követően jelenik meg az elektroferogramon, míg a többi három kefalosporin a különböző szérumbanfehérjék (γ , β , α_1 , α_2), széles zónájában eluálódik (16. ábra). A négy különböző kefalosporin jól azonosítható az elektroferogramon, de a jelek kiszélesedtek, a csúcsok magassága alul maradt az ugyanilyen koncentrációjú desztillált vízes oldatokhoz képest. A szérumban hígítása desztillált vízzel (1:5) javított mind a csúcsok alakját és a módszer érzékenységét. A hígított szérumban a kefalosporinok kisebb migrációs idővel jelennek meg az elektroferogramon, mivel a kefalosporinok és fehérjék közötti kölcsönhatások mérséklődtek, másrészt a kisebb fehérjetartalmú min-

tákból kevesebb fehérje adszorbeálódik a kapilláris falra, és ezért az EOF-et módosító hatás is csekélyebb.



15. ábra

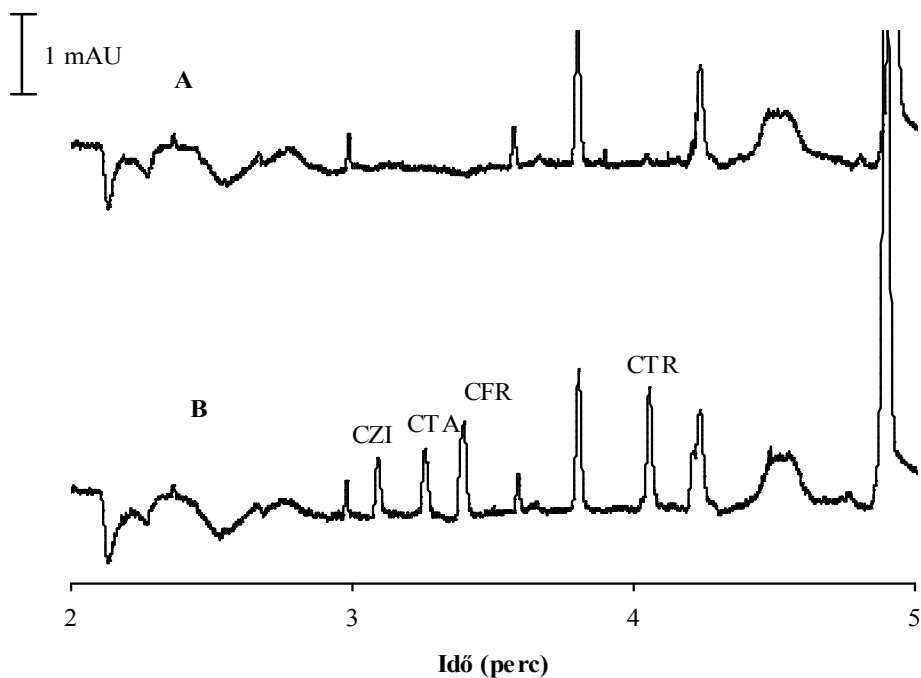
Humán sebváladék elemzése, A: sebváladék, B: sebváladék kefalosporinok hozzáadása után, $c=10\ \mu\text{g/ml}$, C: sebváladék kefalosporinok hozzáadása után, $c=25\ \mu\text{g/ml}$, (Körülmények: ugyanaz, mint a 11. ábránál.)



16. ábra

Humán szérum minták elemzése, A: nem hígított szérum, B: nem hígított szérum kefalosporinok hozzáadása után, C: ötszörösére hígított szérum, D: ötszörösére hígított szérum kefalosporinok hozzáadása után, kefalosporinok koncentrációi B, D esetben: 50 µg/ml (Körülmények: ugyanaz, mint a 11. ábránál.)

Klinikai minták elemzésekor a hígítás többnyire nem célravezető megoldás, mert a meghatározandó gyógyszer koncentrációja a kimutathatósági határ alá csökkenhet. Amennyiben azonban anionos felületaktív anyagot, SDS-t adalékoltunk a puffer elektrolithoz, az SDS a fehérjék felületére történő adszorpciójának köszönhetően a fehérjék nettó negatív töltésre tesznek szert, így később, az antibiotikumoktól elkülönülten jelennek meg az elektroferogramon, és nem zavarják az antibiotikumok meghatározását (17. ábra). Az SDS használatának további előnye, hogy a fehérje-SDS asszociátum nem adszorbeálódik a kapilláris falára.



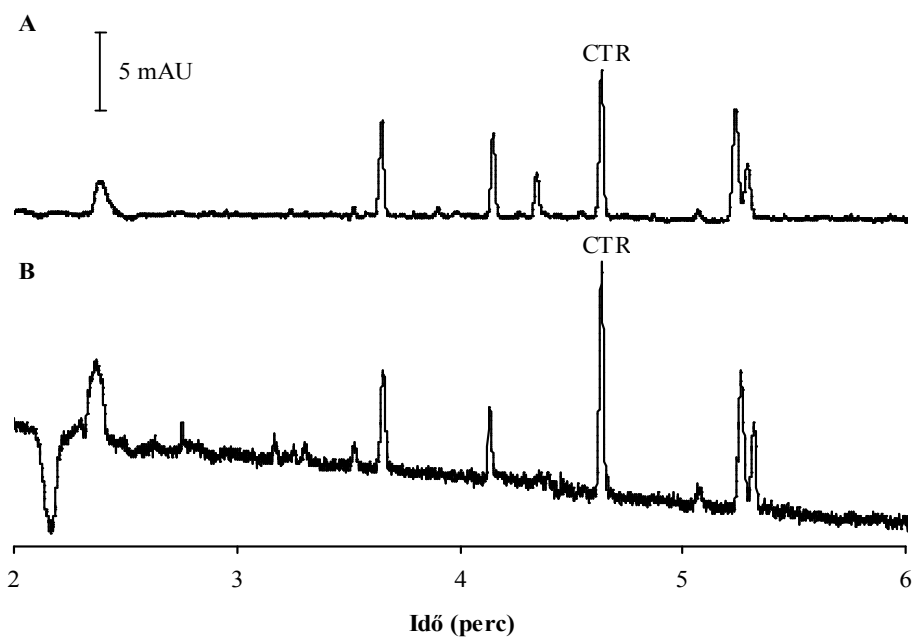
17. ábra

Humán szérum minták elemzése SDS tartalmú pufferben, A: nem hígított szérum, B: nem hígított szérum kefalosporinok hozzáadása után, $c = 10 \mu\text{g/ml}$, (Körülmények: ugyanaz, mint a 12. ábránál.)

4.3.2. Nagy viszkozitású klinikai minták injektálása

Míg a szérum-, liquor-, sebváladék- és vizeletminták mintaelőkészítés nélkül a kapillárisba injektálhatók és elemezhetők, addig a sputum és más nagy sűrűségű klinikai minta direkt injektálása nem eredményezett reprodukálható méréseket nagy viszkozitása és inhomogenitása miatt (migrációs idők csúsztak, kapilláris eltömődött). A hidrodinamikus injektálás (100 mbar·sec) mellett kipróbáltuk az elektrokinetikus (20 kV·s) injektálást is, de mindkét mintainjektálási módszer esetén gyakran eldugult a kapilláris. A direkt injektálások nehézségei miatt ezért ezen mintáknál előzetes mintaelőkészítést kellett alkalmaznunk.

A sputum minták metanolban és vízben nem oldódtak fel, inhomogének maradtak. A sputum viszkozitását csökkentő oldószerként a sputolysint (1,4-bisz-szulfanilbután-2,3-diol) [104] próbáltuk ki. Az oldás során a sputum: sputolysin arány 1:1 volt, vortex segítségével 3 percig kevertettük. Bár az így kapott homogén minták injektálása reprodukálható volt, a sputolysin a kefalosporinok detektálási hullámhosszán erős elnyelést mutatott, zavarva azok meghatározását. A viszkozitást csökkentő próbálkozások sikertelensége vezetett el a liofilizálás alkalmazásához, mely egyszerű, hatékony, reprodukálható módja annak, hogy viszkózus mintát CZE-vel elemezzünk. A liofilizált és a nem liofilizált minta elektroferogramjai között nem volt lényeges különbség (18. ábra).



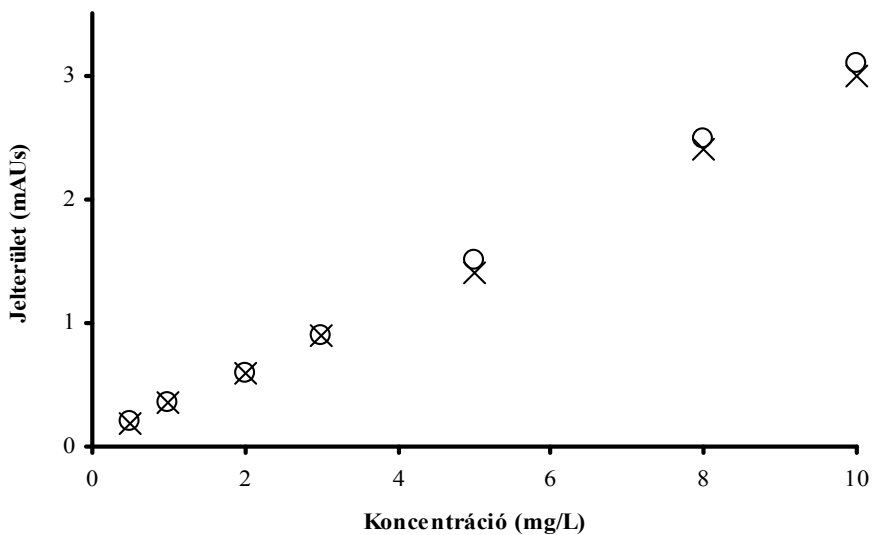
18. ábra

Sputum elemzése, A: direkt injektálást követően, B: liofilizálást követően, (Körülmények: 48,5 cm (41 cm a detektorig) x 50 μ m-es kapilláris, 25 mM foszfát, 50 mM SDS puffer, pH= 9,1, +20 kV, 100 mbar·sec, λ = 270 nm ceftriaxon koncentrációja: 40 μ g/ml.)

A kidolgozott mintakezelési módszerünk helyességéről a nagyviszkozitású mintákban visszanyerési vizsgálattal győződünk meg. Az egyik mintacsoport esetében a ceftriaxont liofilizálás előtt tettük a sputumhoz, míg a másik mintacsoportnál a liofilizálást követően adalékoltuk a ceftriaxont a sputum felül-úszójához. A liofilizálás előtt 2 g sputumhoz tettünk 100 μ l, 1,2 mg/ml koncentrációjú ceftriaxon oldatot, vortexszel történő összekeverés után tíz részre osztottuk, egyenként liofilizáltuk. A kétféleképpen adalékolt sputum mintákat egymás után elemeztük meghatározva a mintaelőkészítés és a mérés precizitását. A migrációs idők és a csúcsterületek szórása is nagyobb volt sputumban, mint vizes oldatban való elemzés esetén. A liofilizálás előtt és után adalékolt sputum minták elemzése során kapott precizitási értékek alig különböztek (5. táblázat). Ez a tény és a jó visszanyerési adatok igazolják, hogy a sputum

minta liofilizálása, majd azt követő feloldása lehetővé teszi kefalosporinok meghatározását sputumban és valószínűleg más nagy viszkozitású folyadék, vagy szilárd klinikai mintában is.

Összehasonlítva az oldatban, valamint, a sputumban meghatározott kalibrációs egyeneseket (19. ábra), azok menete alig különbözött egymástól ($y = 0,307x+0,011$ vizes oldatra, illetve $y = 0,296x+0,016$ sputum mátrixra). A liofilizált sputum elemzése esetén a csúcsterület és a koncentráció közötti kapcsolat ugyanolyan, mint vizes oldatban, ezért a sputum minták antibiotikum tartalmának meghatározása a vizes közegben felvett kalibrációs egyenes alapján is lehetséges.



19. ábra
Ceftriaxon kalibrációs mérési pontjai vízben (o), sputumban (x)
Körülmények ugyanaz, mint a 18. ábránál

4.3.3. Mintainjektálás mikrofluidikai csipen

A csipen való elemzés legkritikusabb lépése a minta bejuttatása a szeparációs csatornába. Az injektálási technikával megbízhatón, ismételhetően kell 100-500 pikoliternyi mintát injektálni. A hidrodinamikus injektálást azért használják ritkán, mert a nyomásszabályozó egységek, mikrosapok kialakítása a csip felületén nehézségekbe ütközik. A legelterjedtebb mintainjektálási módszer az elektrokinetikus injektálás.

A csipeknél imeretes injektálási problémákat [105] a szeparációs csatorna végébe elhelyezett kromatográfias töltettel próbáltuk megoldani [103, 106]. Munkánk során a hidrodinamikus injektálás végrehajtásához perisztaltikus pumpát használtunk. A perisztaltikus pumpacső végébe (belső átmérő: 0,3 mm) kb. 0,1-2 μl mintát szívunk fel, majd ezt a mintamennyiséget az egyik porthoz csatlakoztatva beinjektáltuk. Innen a minta az egyes csatornák hidrodinamikus ellenállásának a függvényében különböző mértékben áramlott a másik három port felé. A szeparációs csatornában lévő töltet nagy ellenállása miatt a szeparációs csatorna felé csak nagyon kicsi mintamennyiség, kevesebb mint 1 nl áramlott. A szeparációs csatorna ellenállása kb. 1000-szer nagyobb, mint a másik két csatornáé, ezért a perisztaltikus pumpába felszívott 1 μl mintából csak kb. 1 nl tud a szeparációs csatorna felé áramolni, a minta nagyobb része a kereszt másik két portja felé folyt. Miután a minta elhagyta a rövid, kis hidrodinamikai ellenállású csatornarészeket, és kialakult a megfelelő térfogatú mintadugó (0,1-2 nl) a szeparációs csatorna legelején, leállítottuk a pumpát, és elindítottuk az elektroforézist. Az injektálási folyamat nyomon követésére, valamint a megfelelő mintadugó kialakításához zöld színű ételfestéket (E 133) használtunk.

4.4. Kefalosporinok fizikai-kémiai paramétereinek meghatározása

A gyógyszerek fizikai-kémiai tulajdonságainak jellemzése hasznos információval szolgál a várható biológiai hatás és a farmakokinetikai paraméterek előrejelzésére. A leggyakrabban használt fizikai-kémiai paraméterek az ionizáció, oldhatóság, lipofilitás, de a gyógyszerészeti jellemzéshez már a vegyületek azonosságának és tisztaságának, valamint metabolikus és kémiai stabilitásának a jellemzése is hozzátartozik.

4.4.1. Elektroforetikus mozgékonyosság

Elektromos térben az ionok vándorlásának sebessége arányos az alkalmazott feszültséggel, ez az arányossági tényező az adott ion abszolút elektroforetikus mozgékonyága (μ^0).

$$\mu^0 = \frac{v^0}{E} = \frac{z \cdot e}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r} \quad (1)$$

v^0 = az ion vándorlási sebessége végtelen híg oldatban [cm/s]

E = az elektromos térerősség [V/cm]

z = az ion töltésszáma

e = elemi töltés [$1,602 \cdot 10^{19}$ C]

η = az oldat viszkozitása [Pa·s]

r = az ion hidrodinamikai sugara [cm]

A gyakorlatban nem dolgozunk végtelen híg oldatokkal, az elektrolitban többfajta ion van, melyek hatással vannak a mozgékonyagra. A különböző kölcsönhatások mozgékonyagra gyakorolt hatása miatt vezették be az effektív elektroforetikus mozgékonyág (μ_e) fogalmát, melyben vizsgált ion hidrodinamikai sugara helyett az ion szolvatált, ellenionjaival együtt kialakított alakjának a sugarát értjük, és az elméleti töltés helyett az effektív töltés szerepel.

$$\mu_e = \frac{Q_e}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot R} \quad (2)$$

Q_e = az ion effektív töltése [C]

R = az ion teljes sugara [cm]

Kísérletileg egy komponens effektív elektroforetikus mozgékonyágát a következő egyenlet alapján lehet meghatározni [107].

$$\mu_e = \frac{L_t L_{eff}}{U} \left(\frac{1}{t_m} - \frac{1}{t_0} \right) \quad (3)$$

L_t : kapilláris teljes hossza [cm]

L_{eff} : kapilláris effektív hossza [cm]

U : alkalmazott feszültség [V]

t_m : komponens migrációs ideje [s]

t_0 : töltés nélküli molekula (EOF marker) migrációs ideje [s]

A vizsgált kefalosporinok effektív elektroforetikus mozgékonyági értékeit a 7. ábra elektroferogramja alapján a 3. egyenlet segítségével számoltuk ki (6. táblázat). Az EOF jelzésére benzil alkoholt használtunk. Mivel a kefalosporinok migrációs idői nagyobbak, mint EOF migrációs ideje, ezért a számolt effektív elektroforetikus mozgékonyág értékek negatív előjelűek. Az előjel is mutatja, hogy a kefalosporinok anionosak a vizsgált pH-n.

6. táblázat
A vizsgált 14 kefalosporin elektroforetikus mozgékonyági adatai

| Kefalo- sporinok | Mozgékonyság (cm²/kV perc) |
|-----------------------------|--|
| CFD | - 3,49 |
| CFL | - 4,56 |
| CFC | - 4,90 |
| CFP | - 7,49 |
| CTA | - 8,16 |
| CCC | - 9,23 |
| CFM | - 9,39 |
| CZI | - 9,50 |
| CFR | - 9,85 |
| CZO | - 9,97 |
| COX | - 10,09 |
| CTR | - 15,40 |
| CIX | - 17,55 |
| CFB | - 18,57 |

4.4.2. Protonálódási állandók meghatározása

Az ionizációra képes vegyületeknél a pK_a érték (savi disszociációs állandó, ionizációs állandó) meghatározása a gyógyszerkutatásban alapvető, a LADMER paraméterek (hatóanyag felszabadulása, abszorpciója, szövetek közötti megoszlása, metabolizációja, kiürülése) mindegyike függ a molekula pK értékétől. Ez a fizikai-kémiai paraméter határozza meg, hogy a molekula milyen ionizáltsági állapotban van különböző szöveti pH értéken. A protonálódási állandók meghatározására olyan módszerek alkalmazhatók, amelyekben a mért paraméter pH függő változása a molekula

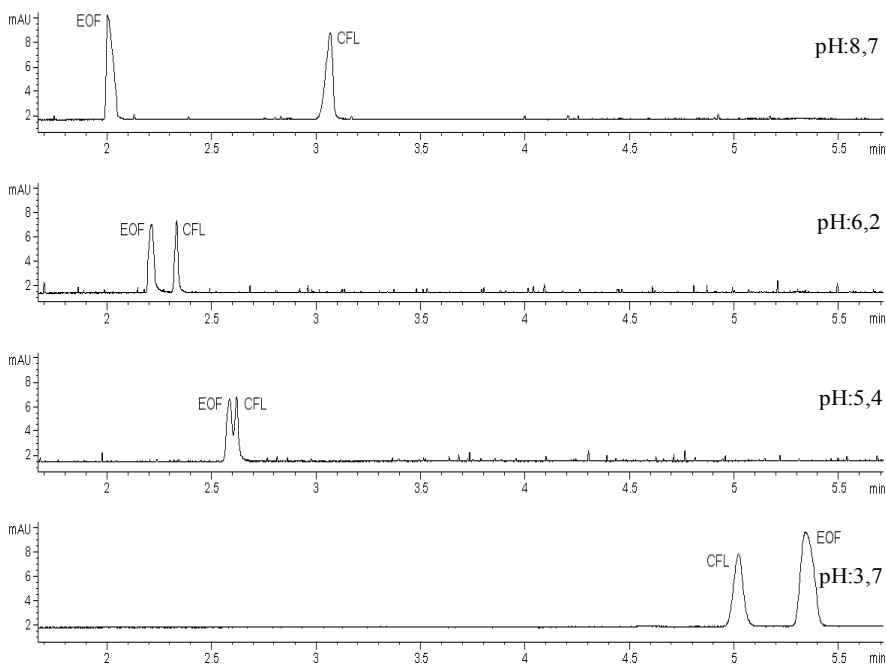
protonálódásával, illetve deprotonálódásával kapcsolatba hozható. A leggyakoribb eljárás pK_a meghatározására a pH-metria, további alternatív módszerek az UV spektrofotometriás titrálás, NMR titrálás, és újabb lehetőség a kapilláris elektroforézis. Hat kefalosporin, cefalexin, cefaclor, cefadroxil, cefotaxim, cefoperazon és cefoxitin pK_a értékeit határoztuk meg pH-metriásan és CZE-vel. Összehasonlítottuk a két különböző módszerrel meghatározott értékeket, valamint az általunk mért értékeket az irodalomban lévőkkel.

4.4.2.1. pK_a meghatározása pH-metriával

A pH-metriás titrálások során a titrált minta pH változását követjük a titráló oldat térfogatának függvényében. A potenciometriás titrálás feltétele, hogy a vizsgálandó anyag tiszta legyen, és legalább 0,5 mM koncentrációban oldódjon a titrálás teljes tartományában. (A pH-metriás titrálásokat állandó ionerős-ségű 0,2 M KCl oldatban végeztük 0,20 M koncentrációjú KOH oldattal. A mintákba a titrálás megkezdése előtt 20 percig, és a titrálás során argon gázt vezettünk, hogy a CO_2 gáz beoldódását megakadályozzuk.) A ligandumok (kefalosporinok) koncentrációja 0,002-0,004 M közötti tartományba esett, mindegyik mintához pontosan ismert koncentrációjú, a kefalosporinok ekvimoláris mennyiségéhez képest 20 %-kal több HCl oldatot adtunk, hogy a karboxilát csoportok protonálódjanak. A minták kezdeti térfogata 10,00 ml volt. A titrálásokat pH 2.0-11.0 közötti tartományban végeztük. A cefoperazon esetében savas közegben csapadékkiválást tapasztaltunk, így a titrálást pH 11,0-ről indulva 0,2 M HCl oldattal a csapadék megjelenéséig folytattuk. A titrálási görbékből a savi disszociációs konstans értékeket SUPERQUAD program [108] segítségével számoltuk ki (7. táblázat). Az egyes komponensek pH-potenciometriás titrálási görbéit az elektroforetikus mobilitási görbék megadásakor tárgyaljuk részletesen (4.4.2.2 fejezet).

4.4.2.2. pK_a meghatározása CZE-vel

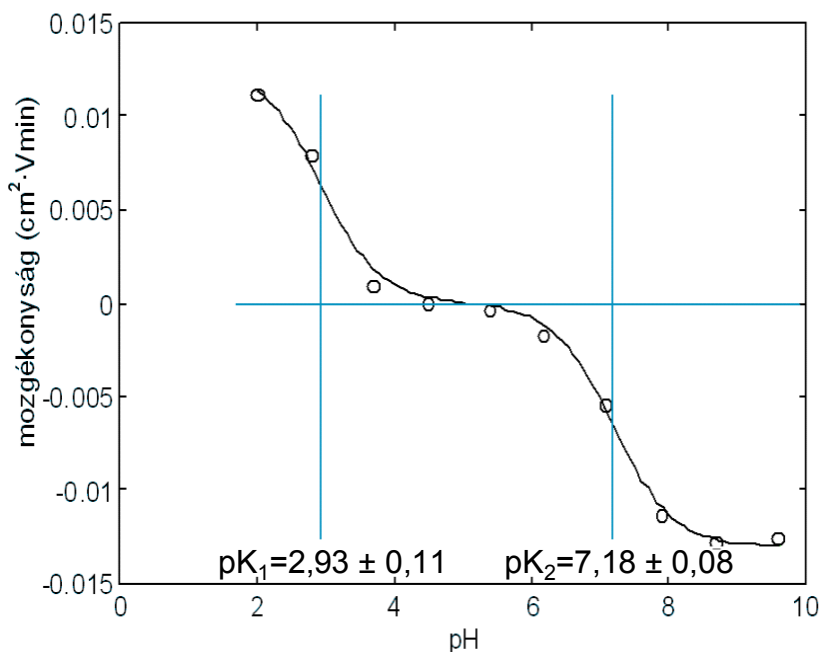
A kapilláris elektroforézis módszer használatának alapja pK_a meghatározásánál az, hogy az elektroforetikus mobilitás függ a komponens ionizáltsági állapotától. A CE használatának pH-potenciometriával szembeni előnye, hogy a minta kis anyagmennyisége elegendő és nem szükséges koncentrációjának pontos ismerete. CZE-vel történő pK_a meghatározáshoz két faktor állandó értéken való tartása fontos, az ionerősség, és a hőmérséklet, mivel mindkettő befolyásolja az effektív elektroforetikus mozgékonytságot. Az EOF, és a komponens migrációs idejéből a 3. egyenlet felhasználásával számoltuk ki az elektroforetikus mozgékonytsági értékeket. A pK érték megadja, hogy a komponensnek az adott pH értéken milyen lesz a töltése. Egy amfolit a pK értékénél magasabb pH-n negatív töltésű, ezért az EOF után jelenik meg az elektroferogramon, míg a pK értékénél alacsonyabb pH-n pozitívan töltött lesz, és így az EOF előtt vándorol az elektroforézis során. Például lúgos pH-n a cefalexin karboxil csoportja deprotonálódik, és anionos karakterének köszönhetően a töltés nélküli marker, az EOF után jelenik meg az elektroferogramon. A pH csökkentésével a cefalexin effektív mozgékonytsága nő, 4,5-ös pH-n ikerionos lesz, a töltés nélküli markerrel együtt egy csúcsként eluálódik. A pH további csökkentésével a cefalexin aminocsoportja protonálódik, pozitív értékű lesz effektív mozgékonytsága, és az EOF előtt jelenik meg az elektroferogramon (20. ábra).



20. ábra

A cefalexin elektroforetikus mozgékonyága, a puffer pH változtatásának hatása a cefalexin migrációs idejére (Körülmények: 48,5 cm (41 cm a detektorig) x 50 μ m-es kapilláris, 50 mM foszfát puffer, +25 kV, 100mbar-sec, 25 °C, λ = 270 nm, cefalexin koncentrációja: 0,1 mg/ml, EOF marker: benzil alkohol)

A számolt effektív mozgékonyági adatokat ábrázolva a pH függvényében megkaptuk a cefalexin mozgékonyági görbét, melyből Matlab program segítségével kiszámoltuk a pK_a értékeket (21. ábra). Az első pK_a érték (2,93) a karboxil csoport, a második pK_a érték (7,18) az amino csoport deprotonálódásához tartozik. Ezek az értékek megfelelnek a vegyület szerkezetéből adódó sav-bázis tulajdonságnak, valamint egyezést mutatnak korábbi irodalmi adatokkal [69].

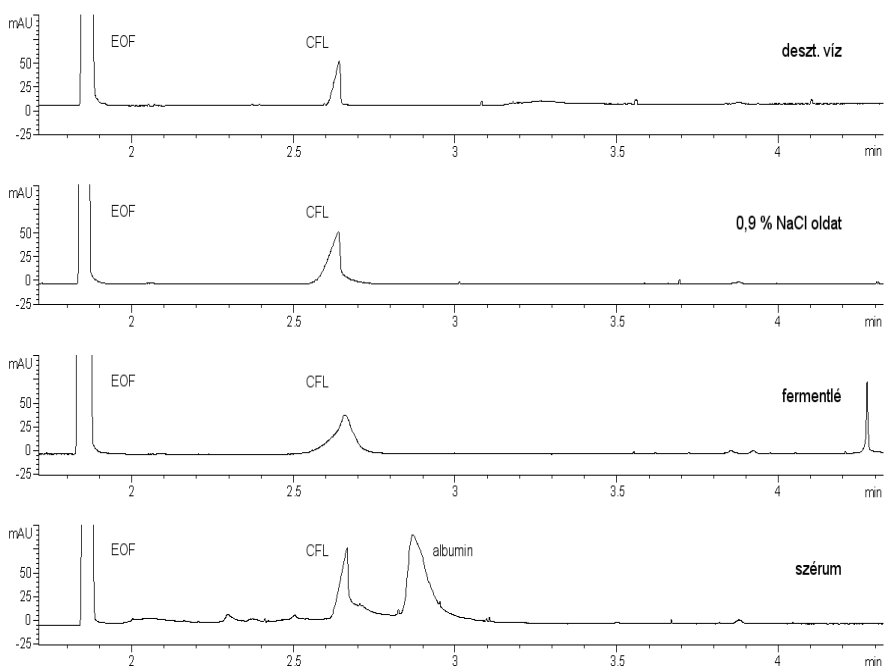


21. ábra

A cefalexin effektív elektroforetikus mobilitása a pH függvényében (Matlab)

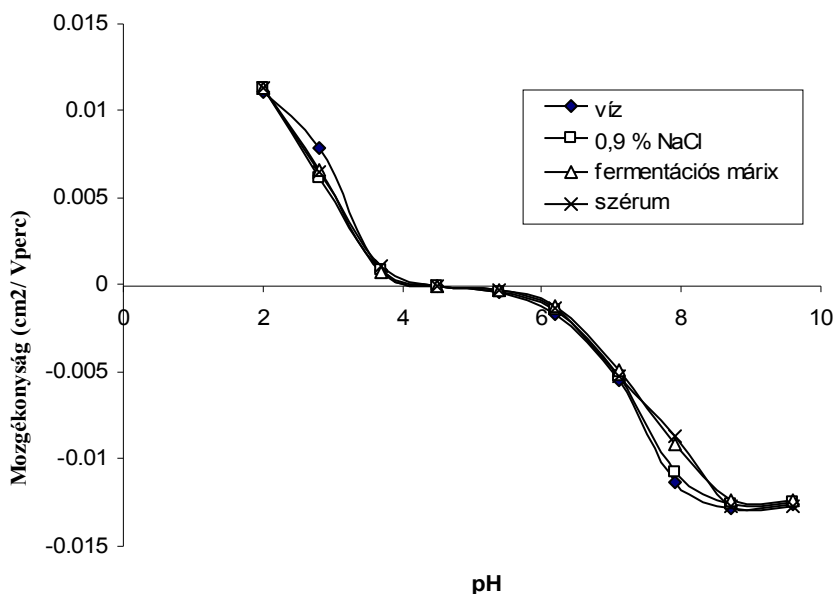
A CE alkalmazásának további előnye, hogy nemcsak tiszta, vizes oldatban, hanem több komponensű biológiai mintákban, gyógyszeripari termékekben, és szerves oldószerben is lehetséges a pK_a meghatározása. Mindezek mellett bomlékony, szennyezett anyagok pK_a -ja is meghatározható. Különböző mátrixokban való vizsgálatok azért lehetnek fontosak, mert gyógyszerészeti kutatások, farmakokinetikai vizsgálatok során gyakran nem tiszta vizes oldatokat használunk. A pK_a -nak CE-vel történő meghatározásakor nem szükséges a vizsgálandó komponens extrakciója és tisztítása. A cefalexin elektroforetikus vándorlását összehasonlítottuk 0,9 %-os NaCl-oldatban, fermentlében és szérumban (22. ábra). Azt tapasztaltuk, hogy a mátrix különféle komponenseinek nincs jelentős hatása a cefalexin migrációs idejére, csak a csúcs alakja torzult. A sóoldat esetében a klorid ion nagy elektroforetikus mobilitása miatt torzult a cefalexin csúcsának alakja (leading). A szérum és fermentlé esetén a fehér-

jék és egyéb szerves komponensek kapilláris falára való adszorpciója okozta a cefalexin csúcs alakjának változását. A cefalexin különböző mátrixokban felvett elektroforetikus mobilitási görbéi hasonlóak a tiszta vizes oldatban meghatározott mobilitási görbéhez, tehát a számolt pK_a értékek sem különböznek számottevően (23. ábra).



22. ábra

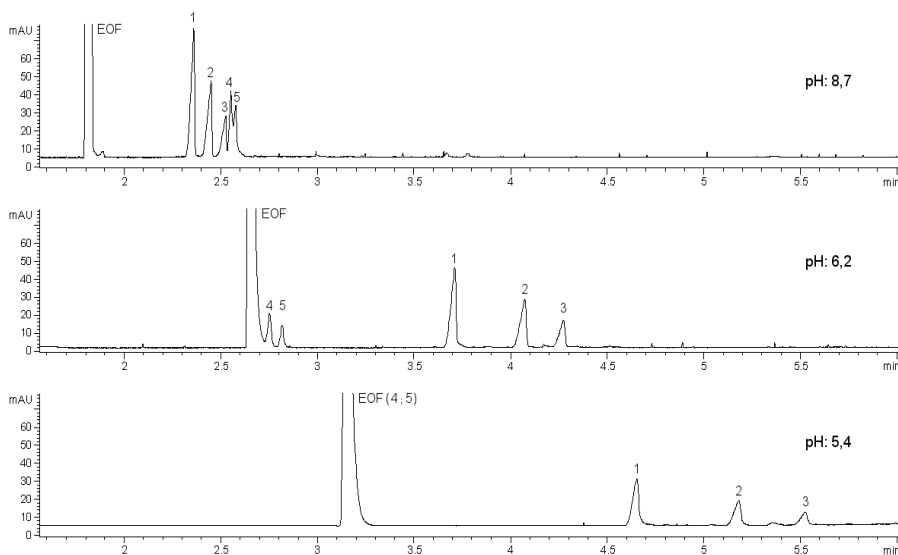
A cefalexin elektroforetikus meghatározása különböző mátrixokban, (Körülmények: ugyanaz, mint a 20. ábránál.)



23. ábra

A cefalexin effektív elektroforetikus mobilitása a pH függvényében különböző mátrixokban (Körülmények: ugyanaz, mint a 20. ábránál.)

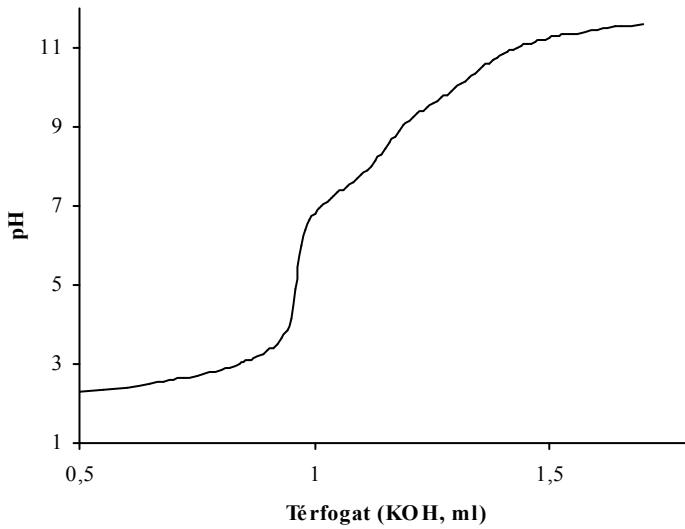
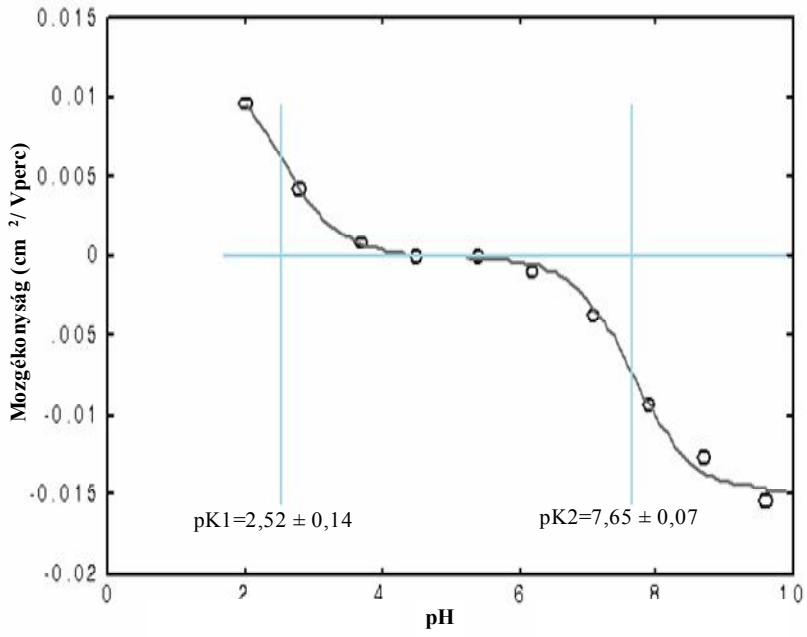
A CE nagy hatékonyságú elválasztási képességét kihasználva öt különböző kefalosporin (cefaklóor, cefadroxil, cefoperazon, cefotaxim, cefoxitin) pK_a -ját egyszerre határoztuk meg. (24. ábra). A pH változtatása különböző hatással van az ötféle kefalosporin mozgékonyására, a migrációs sorrend is változott, hiszen a pK_a értékek különböznek. Az egyes kefalosporinok azonosításában a különböző UV spektrumok segítettek. A puffer pH-ját növelve a felbontás még éppen elegendő ahhoz, hogy megkapjuk az egyes komponensek migrációs idejét. A pH-t csökkentve javul az elválasztás, de megnövekedett az elektroforézis időtartama. pH 2-n a cefoperazon és cefoxitin az EOF után jelenik meg az elektroferogramon. A cefalexin, cefaklor, cefadroxil egyaránt 4,5 körüli pH-n töltés nélküliek, ez alatt kationosak, míg a cefotaxim csak 2,8 körüli pH-n válik pozitív töltésűvé.



24. ábra

A pH változtatásának hatása öt kefalosporin elektroforetikus elválasztására, 1: cefoperazon, 2: cefotaxim, 3: cefoxitin, 4: cefadroxil, 5: cefaclor, (Körülmények: ugyanaz, mint a 20. ábránál.)

Az ötféle kefalosporint tartalmazó oldat különböző pH-n készült elektroferogramjai alapján számolt effektív mozgékonyági adatokat felhasználva számoltuk ki a pK_a értékeket, és összevetettük a pH-potenciometriával meghatározott értékekkel, valamint az irodalmi adatokkal (7. táblázat). A cefadroxil elektroforetikus mobilitási görbéjén kettő, míg pH-potenciometriás titrálási görbéjén három lépcső található (25. ábra). Savas tartományban meghatározott pK_a a karboxil csoporthoz tartozik. pH 7 felett két deprotonálódás játszódik le, az egyik disszociációs állandó az aminocsoporthoz ($pK_a = 7,37$), a másik a fenolos OH csoporthoz ($pK_a = 9,64$) kapcsolható. A cefadroxil lúgos tartományban jelentkező második disszociációs állandójáról korábbi közlemények [69] nem tesznek említést. A fenolos hidroxilcsoportoz tartozó pK_a értéket csak pH-potenciometriákkal tudtuk meghatározni: a pH-potenciometriás görbe sokkal több adatpárból készül el, mint a mobilitási görbe, így az egymáshoz közellévő deprotonálódási folyamatokat CZE-vel nem lehet meghatározni.



25. ábra
A cefadroxil elektroforetikus mobilitási és pH potenciometrikus görbéjének összehasonlítása

A cefalexin és cefaklór molekulák oldalláncaiban kicsi a különbség. A cefalexin és a cefaklór esetében két pK_a értéket határoztunk meg mindkét módszerrel. Az alacsonyabb pK_a érték a karboxil, a magasabb az aminocsoporthoz tartozó pK_a érték. A cefaklór esetében a klór szubsztituens elektronszívó hatása megnöveli a karboxil csoport savasságát, ezért pK_a -ja kisebb, mint 1,5, amit pH-potenciometriával pontosan nem lehet meghatározni.

A cefotaximnak savas tartományban a karboxil- és aminotiazol csoportjának pK_a -ja egymáshoz közel van, ezért CZE-vel egy deprotonálódási értéket tudunk megadni. pH-potenciometriával a karboxilcsoport pK_a értéke (2,30) mellett, az aminotiazol csoport pK_a -ját (3,37) is meg tudtuk határozni. A titrálási görbén lúgos tartományban nincs pH-lépcső, mely további deprotonálódási folyamathoz lenne rendelhető. Az irodalomban talált adattal ellentétben [70], megítélésünk szerint az amidcsoporthoz nem rendelhető pK_a érték, mert az amid csoport nem tud deprotonálódni a mérés 2,0-11,0 pH-tartományában. Az amid csoport pK_a -ja kb. 15 körüli érték [109], tehát pH-potenciometriával nem mérhető.

A cefoperazon és cefoxitin esetében nem találtunk az irodalomban pK_a adatokat. A cefoperazonnak CZE-vel két pK_a értékét határoztuk meg, melyek a karboxil csoporthoz és fenolos hidroxil csoporthoz rendelhetők. Mivel a cefoperazon nátrium sóként volt jelen, hogy protonált formára hozzuk savat kellett hozzáadni, de mivel sav hatására csapadékkiválás történt, a karboxil csoport pK_a -ját csak CZE-vel tudtuk meghatározni. A pH-potenciometriás mérésnél 4-12 pH-tartományában (ahol megfelelő a komponens oldékonysága) egy deprotonálódás játszódik le, ez a fenolos hidroxid deprotonálódása, melyhez 9,15-ös pK_a érték rendelhető.

Cefoxitin esetében CZE-vel és pH-potenciometriával is egy pK_a értéket határoztunk meg, mely a karboxil csoporthoz rendelhető.

7. táblázat
Kefalosporinok CZE-vel és pH-potenciometrikan meghatározott pK_a értékeinek összehasonlítása

| | Irodalmi adatok | | Saját mérések | |
|-------------|--------------------------|--|---------------|----------------|
| | CZE ^a | potenciometria ^a | CZE | potenciometria |
| cefalexin | 3,11 ± 0,16 ^b | 2,34 ± 0,09 | 2,93 ± 0,11 | 2,53 ± 0,01 |
| | 6,79 ± 0,27 ^b | 7,08 ± 0,06 | 7,18 ± 0,07 | 7,13 ± 0,01 |
| cefaklór | 2,69 ± 0,09 ^b | - | 1,74 ± 0,38 | < 1,5 |
| | 7,38 ± 0,66 ^b | 7,19 ± 0,06 | 7,19 ± 0,03 | 7,07 ± 0,02 |
| cefadroxil | 2,86 ± 0,18 ^b | 2,65 ± 0,05 | 2,52 ± 0,14 | 2,48 ± 0,03 |
| | 7,14 ± 0,20 ^b | 7,59 ± 0,18 | 7,65 ± 0,07 | 7,37 ± 0,02 |
| | | - | - | 9,64 ± 0,01 |
| cefotaxim | 2,09 ± 0,21 | 2,09 ± 0,21 ^a , 2,93 ^c | - | 2,30 ± 0,01 |
| | | 3,07 ^c | 3,20 ± 0,19 | 3,37 ± 0,03 |
| | | 10,87 ^c | - | - |
| cefoperazon | - | - | 3,13 ± 0,27 | - |
| | - | - | 8,99 ± 0,44 | 9,15 ± 0,02 |
| cefoxitin | - | - | 3,15 ± 0,24 | 2,75 ± 0,04 |

^aY, Mrestani et al, [69]

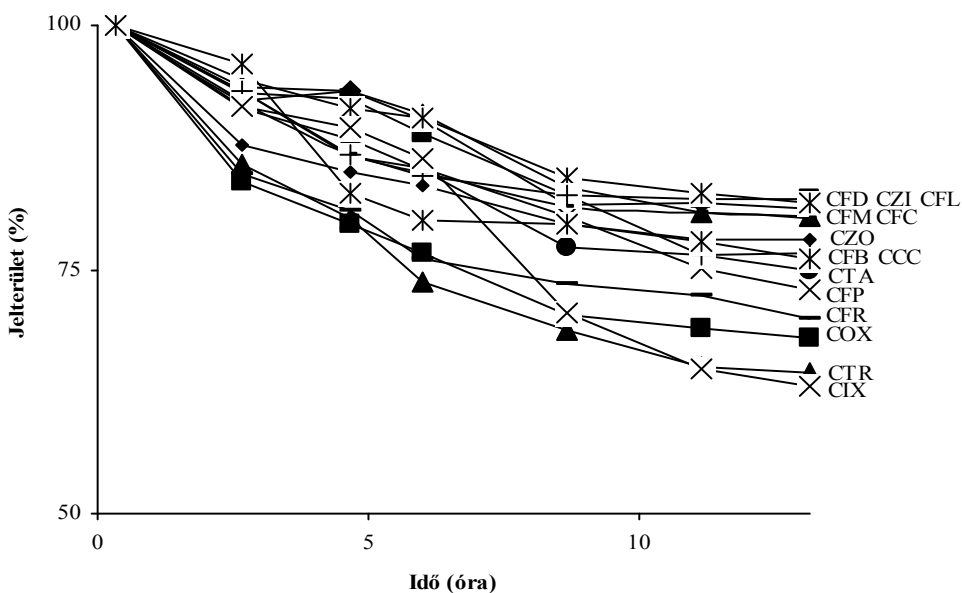
^bY, Ishihama et al, [65]

^cM, Aleksic et al, [70]

Eredményeink azt mutatják, hogy a CZE jól alkalmazható pK_a meghatározásához. A CZE használatának legfontosabb előnye a módszer nagy szelektivitása, ami lehetővé teszi több komponens pK_a-jának egyidejű meghatározását, reál mintákban történő elemzését, bomlékony, vagy szennyezett anyagok vizsgálatát. Mindezek mellett a CE ismert előnyei (pl. kis térfogatú, viszonylag kis koncentrációjú minták, automatizált elemzések) is kihasználhatók.

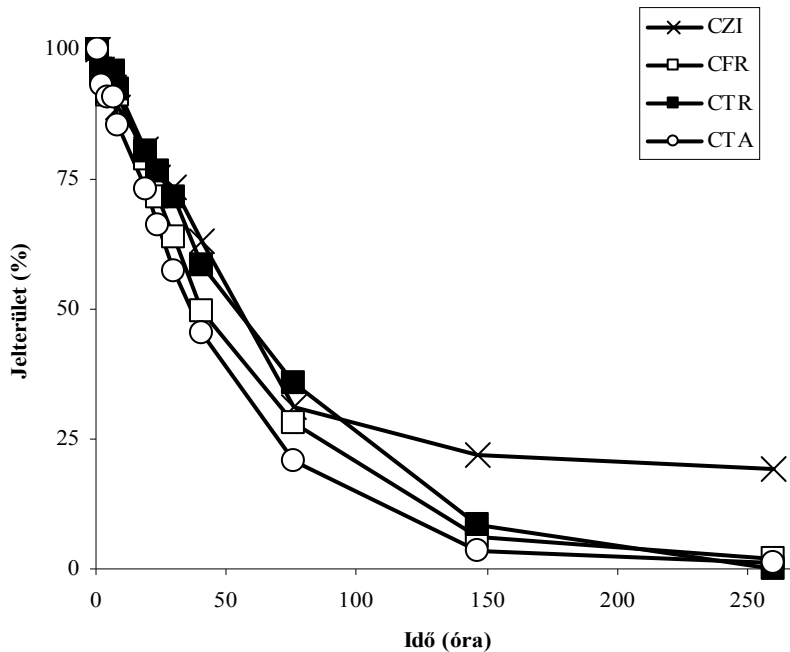
4.4.3. Oldatstabilitási vizsgálatok

A kefalosporinok szilárd sók formájában stabilak, de vizes oldatban különböző mértékben bomlanak, ezért megvizsgáltuk stabilitásukat vizes oldatban. Minden egyes kefalosporinból 100 µg/ml koncentrációjú oldatot készítettünk. Az egyes antibiotikumok oldatait vízben való feloldásukat követően CZE módszerrel többször analizáltuk, hogy kövessük az egyes kefalosporinok mennyiségének változását. A kefalosporinok bomlását először szobahőmérsékleten (25 °C) vizsgáltuk meg. Az egyes kefalosporinok koncentrációja az idő függvényében csökkent (26. ábra). A legtöbb vizsgált antibiotikum esetében 5 órával a feloldást követően a vegyületek 8-15 %-a alakult át. Az elemzési időtartamot négy kefalosporin esetében (cefuroxim, ceftriaxon, cefotaxim, ceftazidim) meghosszabbítottuk 260 óráig, ekkorra a mennyiségük a kimutathatóság alá csökkent (27. ábra).



26. ábra

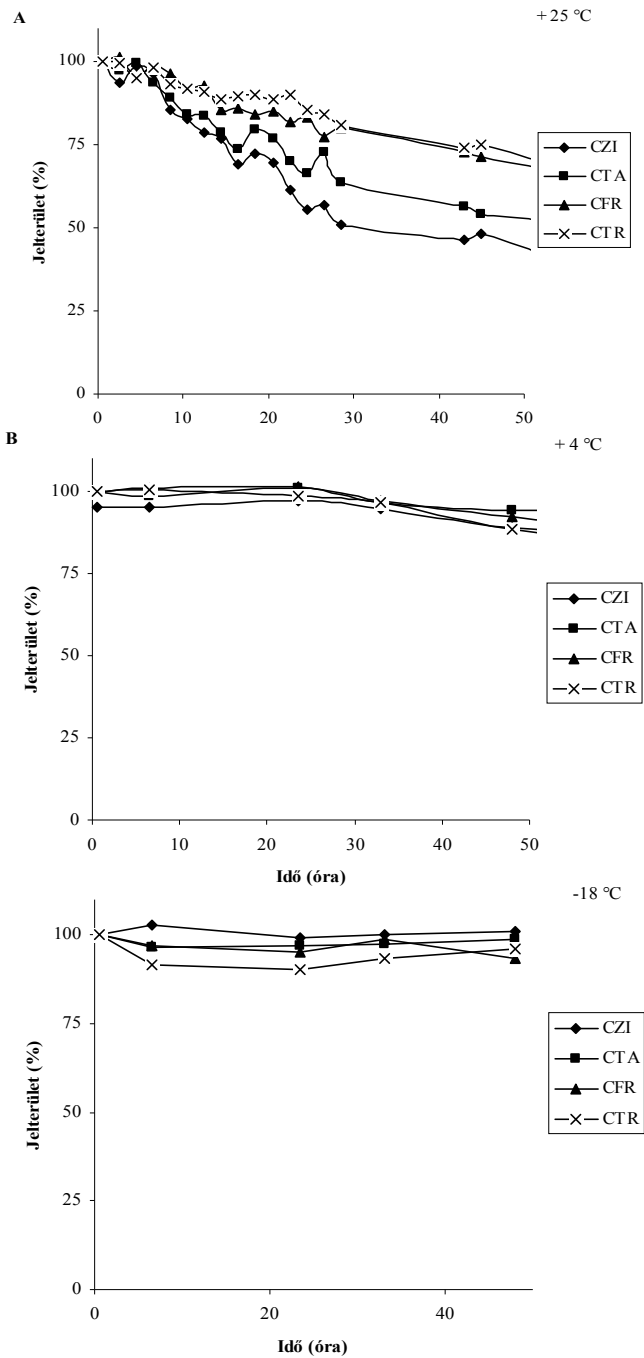
Kefalosporinok oldatstabilitásának vizsgálata vízben való feloldásukat követő 15 óráig (Az első injektálás az oldatkészítést követő 20 percen belül megtörténtek, az így kapott jel terület nagyságát vettük 100 %-nak.) (Körülmények: ugyanaz, mint a 2. ábránál.)



27. ábra

Négy kefalosporin oldatstabilitásának vizsgálata vízben való feloldásukat követő 260 óráig (Az első injektálások az oldatkészítést követő 20 percen belül megtörténtek, az így kapott jelterület nagyságát vettük 100 %-nak.) (Körülmények: ugyanaz, mint a 2. ábránál.)

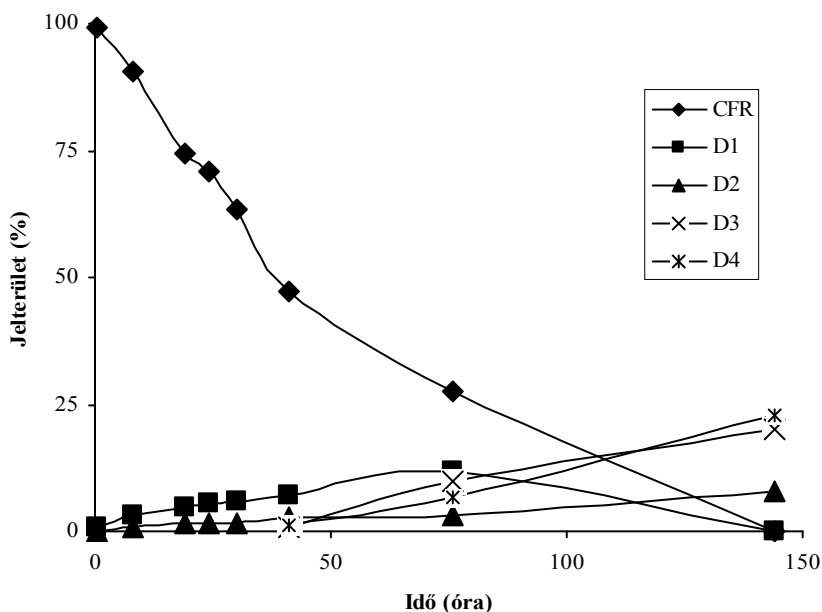
Az egyes komponensek bomlása függ a közeg hőmérsékletétől is. Nyilvánvaló, hogy magasabb hőmérsékleten sokkal intenzívebb a kefalosporinok bomlása, mint alacsonyabb hőfokon. Vizsgálataink során a fent említett négy antibiotikum 100 µg/ml koncentrációjú oldatait különböző hőmérsékleten tároltuk (+25 °C-on szobahőmérsékleten, +4 °C-on hűtőszekrényben, -18 °C-on fagyasztóban) és csak közvetlenül injektálás előtt helyeztük be a CE készülékbe. A +4 °C-on tárolt mintákban jelentősen csökkent a bomlás sebessége (a szobahőmérsékleten tárolt oldattal összehasonlítva) és a komponensek stabilitása hasonló a fagyasztóban (-18 °C-on) tárolt minták stabilitásához (28. ábra). Fagyasztással ugyan nem lehet nagyobb antibiotikum stabilitást elérni, de biológiai minták -18 °C-on való tárolása fontos az állandó mátrixösszetétel megtartása miatt.



28. ábra

A kefalosporinok stabilitási diagramjai különböző hőmérsékleten, A: +25°C, B: +4°C, C: -18°C (Az első injektálások az oldatkészítést követő 20 percen belül történtek, az így kapott jel nagyságát vettük 100 %-nak, körülmények: ugyanaz, mint a 2. ábránál.)

Az antibiotikumok a vizes oldatokban különböző bomlástermékekkel alakulnak át. Cefuroxim esetében az oldatkészítést követően 150 óráig követtük a főkomponens és a bomlástermékek koncentrációjának változását szobahőmérsékleten. A cefuroxim bomlása során négy ismeretlen bomlástermék keletkezett (D1, D2, D3 és D4). Míg az eredeti antibiotikum mennyisége csökkent, addig a bomlástermékek mennyisége növekedett. Amikor az eredeti komponens teljesen elbomlik a D1 (9,209 perc) bomlástermék is eltűnik az oldatból. A D2 (14,916 perc) bomlástermék az antibiotikum feloldását követően tíz óra múlva jelenik meg, a D3 (11,949 perc) és D4 (10,665 perc) bomlástermékek egyszerre, a feloldást követően ötven óra múlva képződnek (29. ábra). A bomlástermékek azonosítása az alkalmazott spektrofotometriás detektálással nem volt lehetséges.



29. ábra

A cefuroxim bomlása szobahőmérsékleten, D1, D2, D3, D4: bomlástermékek (Az első injektálások az oldatkészítést követő 20 percn belül megtörténtek, az így kapott jelterület nagyságát vettük 100 %-nak.) (Körülmények: ugyanaz, mint a 2. ábránál.)

A CE kombinálható tömegspektrometriás detektorral, melynek előnye, hogy szerkezeti információt nyújt a vizsgált komponensről. Munkánk során nem hidrolizált (közvetlenül az elemzés előtt készített), és bomlott (az elemzés előtt 168 órával készített) cefuroxim oldatokat elemeztünk CE-MS technikával. A cefuroxim koncentrációja 1 mg/ml volt. Az elektroforézis folyamán korábbi munkánkkal ellentétben 50 mM koncentrációjú (pH 9,8) ammóniumacetát puffert használtunk, mivel a tömegspektrometriás mérésekhez csak illékony puffert használhatunk.

A friss oldat totálion (TIC, total ion current) elektroferogramján két jel jelenik meg (30/A ábra). A 2,4 percnél jelentkező jel a háttértől származik. A cefuroxim 5,7 percnél egy nagy intenzitású csúcsként jelentkezik az elektroferogramon. Ennek a csúcsnak a fragmentációját elvégeztük, és a tömegspektrumon hat különböző m/z értékű csúcs jelent meg (30/B ábra). A tömegspektrumon a legnagyobb tömegszámú (423) jel a cefuroxim molekula-csúcsa (molekulatömege nátrium nélkül). A cefuroxim fragmentálásakor a 362, 318 és 209 tömegszámú csúcsok intenzitása nagy, míg a 380 és 336 tömegszámú jelek intenzitása kicsi, tehát a 380-as és 336-os csúcsok nagyobb valószínűséggel keletkeznek a fragmentáció során. (30/B ábra).

A bomlott minta elemzése esetén a totálion elektroferogramon négy csúcs jelenik meg (a háttér 2,4 percnél jelentkező csúcsán kívül) (30/A ábra). Ezek közül egy a főtermék (a nem hidrolizált cefuroxim), a többi három jel (4,2 perc, 5,8 perc, 8,1 perc) a cefuroxim D1, D3, illetve D2 bomlástermékeitől származik, mivel ezek nincsenek jelen a bomlatlan cefuroxim elemzésére kapott totálion elektroferogramon. Mind a négy csúcs fragmentációját elvégeztük, a bomlástermékek molekulatömegei így 209 (D1), 380 (D3), 336 (D2) g/mol (30/C, D, E ábra) értéknek adódtak. E molekulatömegek ismeretében, illetve a friss és a bomlott cefuroxim oldat CE-MS elemzésére kapott tömegspektrum alapján a bomlástermékek feltételezett szerkezeti képleteit a tömegspektrumon tüntettük fel.

A friss oldatban a cefuroxim fragmentálásakor keletkező 380 és 336 g/mol tömegű molekularészek a cefuroxim vizes oldatban történő bomlásakor is keletkeznek. A 380 g/mol tömegű bomlástermék az eredeti molekula hidrolízise, vagy dekarboxileződése révén jön létre. A 336 g/mol tömegű bomlástermék esetén a hidrolízis és a dekarboxileződés is lejátszódik. A 209 g/mol tömegű fragmens viszont olyan bomlástermék, melyet csak a bomlott cefuroxim oldatának elemzésekor kaptunk, ennek a molekulának a szerkezeti képletét nem sikerült meghatározzuk. A CE-MS elemzések lehetővé tették ismeretlen komponensek (bomlástermékek) többségének szerkezeti azonosítását, a tömegspektrometriás detektálással kapott kimutatási határaink ugyanakkor nem voltak jobbak, mint az UV- spektrofotometriás detektálással kapott hasonló értékek.

Eredményeink azt igazolták, hogy a kefalosporinok bomlásának sebessége nagymértékben függ attól, hogy milyen körülmények között és mennyi ideig tároljuk az antibiotikum oldatokat. Megállapítottuk, hogy 48 órán belül +4 °C-on csak kismértékű volt a kefalosporinok bomlása, ezért a mintavétel után a mintákat hűtőszekrényben kell tárolni és 48 órán belül a kefalosporin koncentrációját meg kell határozni.

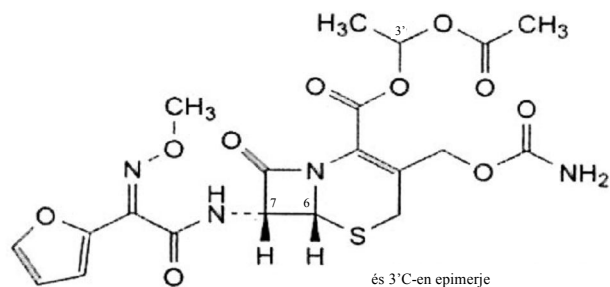
4.5. Diasztereomerek vizsgálata

A disztereomerek olyan sztereoizomerek, melyek nem enantiomerek, nem tükörcsképei egymásnak. A több kiralitáscentrummal rendelkező molekulák akkor diasztereomerek, ha legalább egy kiralitáscentrum konfigurációja megegyező, ugyanakkor legalább egy kiralitáscentrum konfigurációja különböző. A diasztereomerek fizikai és kémiai tulajdonságai különböznek egymástól. A cefuroxim dihidrotiazin gyűrűjén lévő karboxil-csoporton módosításokat végeztek, ezzel egy új vegyületet a cefuroxim-axetilt állították elő, ennek gyakorlati jelentősége, hogy a cefuroxim csak parenterálisan, injekció formá-

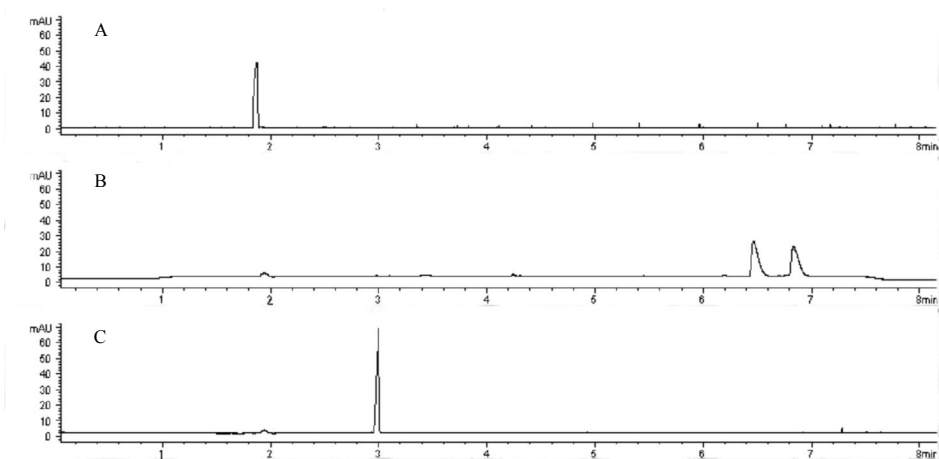
jában adható, míg cefuroxim-axetil *per os* tablettában, szuszpenzióban is. (A cefuroxim-axetil egyébként egy farmakológiailag inaktív vegyület, ún. prodrog, amelyet az anyagcsere enzimek alakítanak át aktív hatóanyaggá.) Gyógyszerként a (Z)-cefuroxim-axetil-t (Zinnat) alkalmazzák, mert csak ennek van gyógyászati hatása. A (Z)-cefuroxim-axetil két diasztereomer vegyületből áll. A cefuroxim axetilnek három kiralitáscentruma van (C6, C7, C3'), a két diasztereomer a 3' szénatom konfigurációjában különbözik egymástól, a hatodik és hetedik szénatom konfigurációjában pedig megegyeznek (31 ábra). A cefuroxim-axetil diasztereomer párok elválasztását korábban leírták kapilláris elektrokromatográfia (CEC) [110], és mikroemulziós elektrokinetikus kromatográfia MEEKC [111] alkalmazásával.

A (Z)-cefuroxim-axetil zónaelektroforetikus elemzésénél (25 mM foszfát pufferben) egy csúcsot kaptunk (32/A ábra), mivel a diasztereomerek töltés/méret arányában nincs különbség. Micelláris elektrokromatográfias elválasztást (100 mM SDS-t is tartalmazó foszfátpuffert) alkalmazva azonban a diasztereomer párok [(3'R,6R,7R) és (3'S,6R,7R)] elváltak egymástól (32/B ábra). Ezek a diasztereomerek az SDS-ből felépülő micellák és a diasztereomerek közötti különböző mértékű hidrofób kölcsönhatás eredményeképpen elválaszthatók egymástól. A hidrofób diasztereomer később jelenik meg az elektroferogramon, mert nagyobb a tartózkodási ideje a negatív töltésű micellákban.

A cefuroxim egy csúcsként jelentkezett SDS tartalmazó pufferben, mivel cefuroxim esetében nem lép fel diasztereoméria. A cefuroxim migrációs ideje nagyban különbözött a cefuroxim-axetilétől (32/C ábra), mivel a cefuroxim karboxilát-csoportjának módosításával a molekula töltése jelentősen csökkent.



31. ábra
A (Z)-cefuroxim-axetil szerkezeti képlete



32. ábra

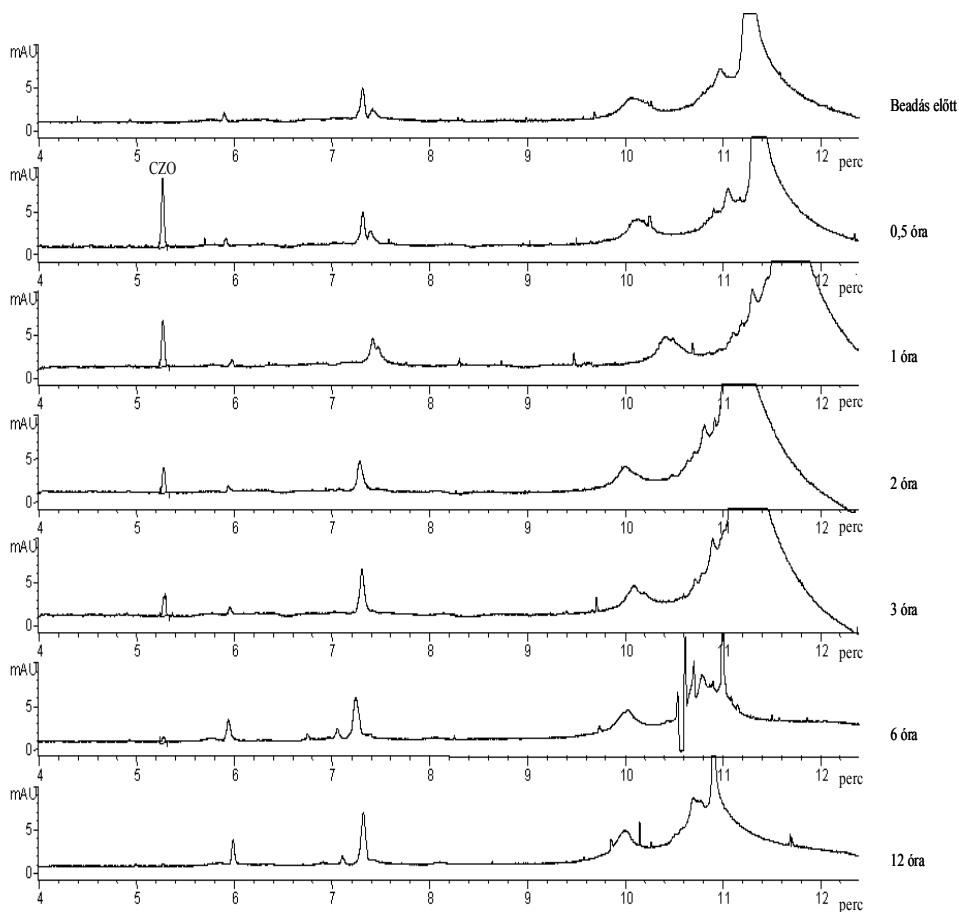
A: cefuroxim-axetil elemzése CZE-vel, (Körülmények: 48,5 cm (40 cm a detektorig) x 50 μ m-es kapilláris, 25 mM foszfát puffer, pH= 6,8, +25 kV, 100 mbar·sec, λ = 270 nm.), B: cefuroxim-axetil elemzése MEKC technikával, (Körülmények: ugyanaz, mint az 32/A elektroferogram esetében, de a puffer tartalmazott még 100 mM SDS-t.)

C: cefuroxim elemzése SDS tartalmú pufferben, (Körülmények: Ugyanaz, mint a 32/B ábra esetében.)

A cefuroxim-axetil diasztereomerjeinek CE meghatározásával jól demonstrálhatjuk a CE univerzális alkalmazhatóságát, egyszerűen SDS pufferhez való adalékolásával teljesen megváltoztathatjuk az elválasztás mechanizmusát, olyan változást tudunk egyszerűen, olcsón, gyorsan elérni, mintha kromatográfias technikáknál a normál fázisú elválasztásról fordított fázisú elválasztásra váltanánk.

4.6. A kidolgozott módszerek orvosdiagnosztikai alkalmazásai

A CE alkalmas kefalosporinok kvalitatív és kvantitatív meghatározására klinikai mintákban, mely az orvosi gyakorlatban segítséget nyújthat a racionális gyógyszerterápia megtervezésében. Az idegsebészeti gyakorlatban profilaktikusan adott antibiotikum terápiával a posztoperatív fertőzéseket kívánják megelőzni. Munkánk során profilaktikusan cefazolinnal kezelt, gerinc- és agyműtéten átesett beteg szérumban, kivetett sebváladékban, és agyvizében (liquor) határoztuk meg a cefazolin koncentrációját, hogy meggyőződjünk arról, az egyes testfolyadékokban az antibiotikum szintje elérte-e az eredményes terápiához szükséges MIC (baktérium pusztulásához szükséges legkisebb antibiotikum mennyiség, minimális gátló koncentráció) értéket. A cefazolinnal kezelt beteg szérumban mintáit a beadást megelőzően, és a beadást követő fél, egy, kettő, három, hat és tizenkét órával később elemeztük. A különböző időpontokban levett vérben a cefazolin koncentrációja csökkent, tizenkét órával a beadás után nem volt kimutatható (33. ábra). A cefazolin csúcsa melletti komponens a cefazolin bomlása során keletkezhet. Ez a csúcs az antibiotikum beadását megelőzően levett szérumban is látható, ami a korábban adott cefazolin terápiából származik. A cefazolin koncentrációjának csökkenésével párhuzamosan a bomlástermék koncentrációja fokozatosan emelkedik.



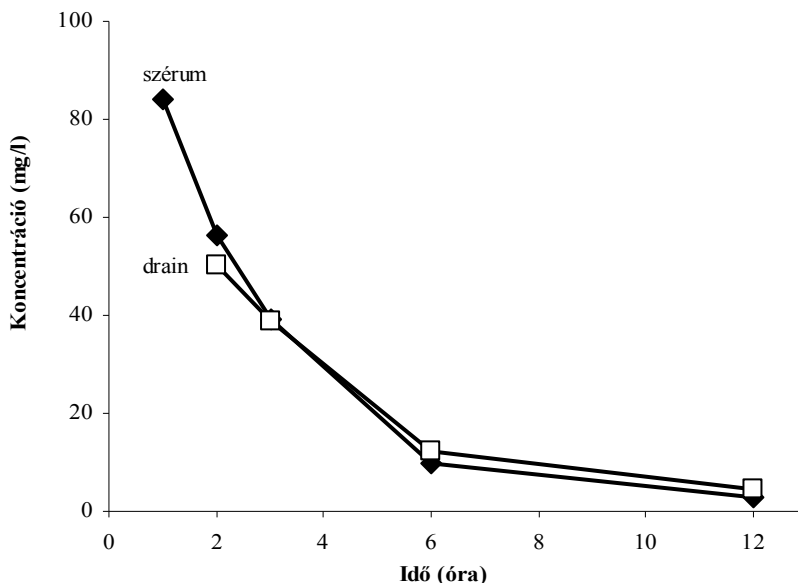
33. ábra

A cefazolin koncentrációjának változása a szérumban, (Körülmények: ugyanaz, mint a 12. ábránál.)

Idegsebészeti műtétek során gyakran van szükség különböző kivezető csövek (seb-drain, agykamra-drain) behelyezésére, melyek több nap múlva kerülnek eltávolításra, így a műtét során sérült szövetek átmenetileg csökkent mikrocirkulációjú közegében a behelyezett idegen anyag felszínén a kórokozók fertőzési forrást jelentenek, ezért a szérumszint monitorozásához hasonlóan szükséges az antibiotikum koncentrációjának meghatározása a fertőzésnek kitett területeken.

Gerincműtét előtt beadott 1 g cefazolin koncentrációjának a változását követjük szérumban és drainben. Különböző kórokozókra nézve a cefazolin kon-

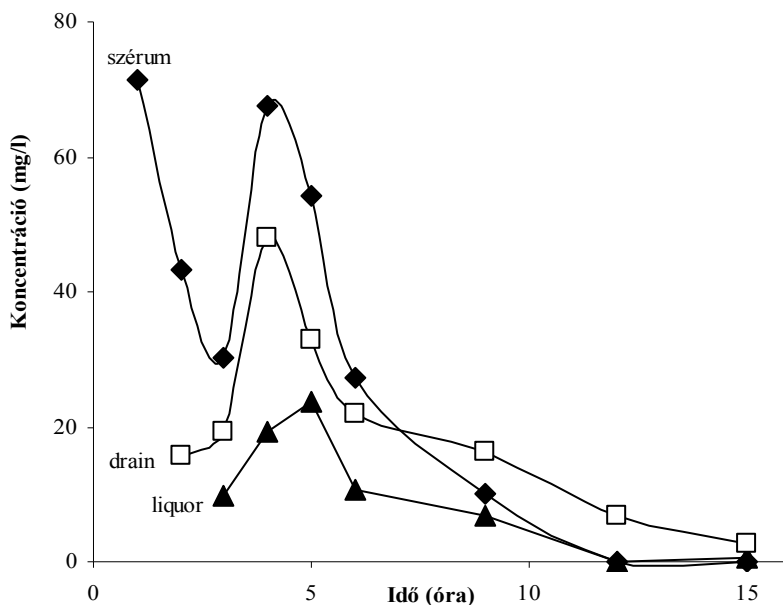
centrációja a beadást követően 4-12 óra elteltével csökken a MIC érték (0,25-16 µg/ml) alá [112] (34. ábra).



34. ábra

A cefazolin koncentrációjának változása a szérumban és a sebváladékban idegsebészeti műtét alatt, egyszeri 1 g cefazolin beadását követően

Az agyműtét hosszabb időt vesz igénybe, mint a gerincműtét, ezért agyműtét során egyszer adott antibiotikum nem biztosít védelmet a baktérium kolonizáció kialakulása ellen. Közvetlenül a műtét kezdetén, és a műtét harmadik órájában adott 1 g intravénás cefazolin viszont kiküszöböli a fertőzésvesélyt, mert antibiotikum szintje nem csökken MIC érték alá a szérumban, liquorban, drainben (35. ábra) a műtét kb. 8-10 órányi időtartalma alatt. Ezen mintákban a meghatározott kefalosporin koncentráció a klinikai gyakorlatban segít a hatékony gyógyszeres terápia kialakításához, mert mint azt eredményeink alátámasztják, a megfelelő szérumszint elérése nem feltétlenül biztosít a központi idegrendszerbe kerülő baktériumok ellen is védelmet.



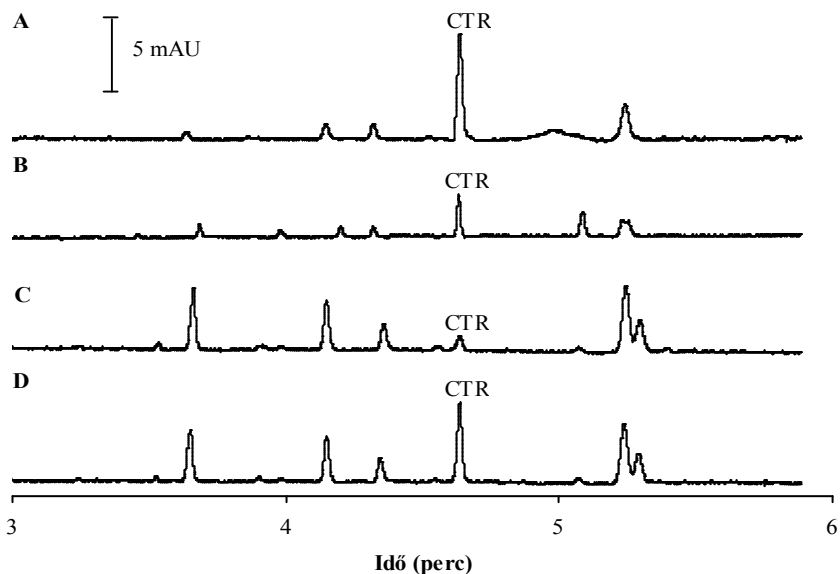
35. ábra

A cefazolin koncentrációjának változása a szérumban, drainben, liquorban idegsebészeti műtét kezdetén és a műtét harmadik órájában adott 1 g cefazolin beadását követően

Az idegsebészeti kórkép (agydaganat, aneurizma, stb.) műtéti ellátása több órát (2-10 óra) vesz igénybe. Ez alatt az időszak alatt az intratrachealis narkózisban lévő, hanyattfekvő beteg garatváladéka (sputum) a tubus mandzsettája fölött összegyűlik, amit az ébredező beteg renyhe garatreflexei miatt aspirál.* Egy agyműtéten átesett, posztoperatív lábadozása során tüdőgyulladást kapott,

* Az aspirációs pneumónia elsődleges kóroktani tényezője a nyál- és garatváladék főhörgőkbe, majd a tüdőbe jutása. A pangó aspirátum táptalajául szolgál pathogén kórokozónak, mely bronchopneumonia kialakulásához vezethet. A hosszabb, kényesebb lokalizációjú műtétek után a betegeket sokszor másnapig altatják, mely megnöveli az intubáció időtartalmát. Mivel a légsőben helyet foglaló tubusnak kifejezett nyálkahártyát irritáló hatása van, a nyálkahártyaszekréció is fokozódik, tehát az intubáció idejével az aspirálható váladék mennyisége is nő. Az agydaganat lokalizációjától függően (agytrzs közeli daganat) gyakran alakul ki köhögési reflexrenyheség, tehát a pangó váladék nagyobb mennyiségben juthat a hörgőkbe. A posztoperatív időszakban a műtött betegek ágynyugalomra szorulnak, a tartós immobilizáció kedvez a pneumónia kialakulásának, progrediálásának.

intravénásan ceftriaxonnal (60 mg/kg/24 h) kezelt beteg szérum-, liquor- és sputum mintájában meghatároztuk a ceftriaxon jelenlétét (36. ábra). A ceftriaxon jelenlétét a mintákhoz adott ceftriaxon standard is megerősítette. A ceftriaxon mennyisége a szérumban a legnagyobb, ettől kisebb a liquorban, és a sputumban a legkisebb, ami jó egyezést mutat a gyógyszer különböző mátrixokban való penetrációjának és disztribúciójának várható mértékével (36. ábra).



36. ábra

Ceftriaxonnal kezelt (60 mg/kg/24h) betegből származó klinikai minták direkt injekciót követő elemzése, A: szérum, B: liquor, C: sputum, D: sputumhoz hozzáadott ceftriaxon standard (Körülmények: ugyanaz, mint a 18. ábránál.)

Az antibiotikum kezelés ellenére a várt terápiás hatás sokszor elmaradt, és a mortalitási adatok nőttek a tüdőgyulladásban szenvedő betegek körében. Ez a probléma felvetette a gyógyszeres terápia során adott kefalosporinok sputumba való penetrációjának vizsgálatát. A 8. táblázat adatai foglalják össze az antibiotikum intravénás beadását követően hat órával levett szérum és köpet mintákban az egyes kefalosporinok koncentrációit. A cefazolin, cefamandol, cefuroxim, ceftazidim, és a cefepim koncentrációja a köpetben

0,4-0,8 µg/ml alatt maradt, amit már nem tudtunk detektálni. A ceftriaxon koncentrációja 1,3-1,9 µg/ml között alakult. A ceftriaxon azért volt kimutatható a legnagyobb mennyiségben a sputumban, mert ezt az antibiotikumot hosszú ideig kapta a beteg, akkumulálódott, továbbá a ceftriaxonnak a legnagyobb a felezési ideje (8 óra), szemben a többi vizsgált antibiotikummal, melyeknél ez az érték jelentősen kisebb (1-3 óra). A baktériumok pusztulásához szükséges minimális gátló koncentráció (MIC) a vizsgált kefalosporinok esetében nagyobb, mint 2 µg/ml [113, 114]. A méréseink azt mutatják, hogy a pneumóniában szenvedő betegek bronchusváladékában az egyes antibiotikumok szintje elmarad a szérumban mért érték, azaz a baktériumok pusztulásához szükséges MIC érték mögött. Az antibiotikum kis mértékű penetrációja a tracheobronchialis váladékba az oka annak, hogy a terápia nem mindig hozott javulást a betegek állapotában.

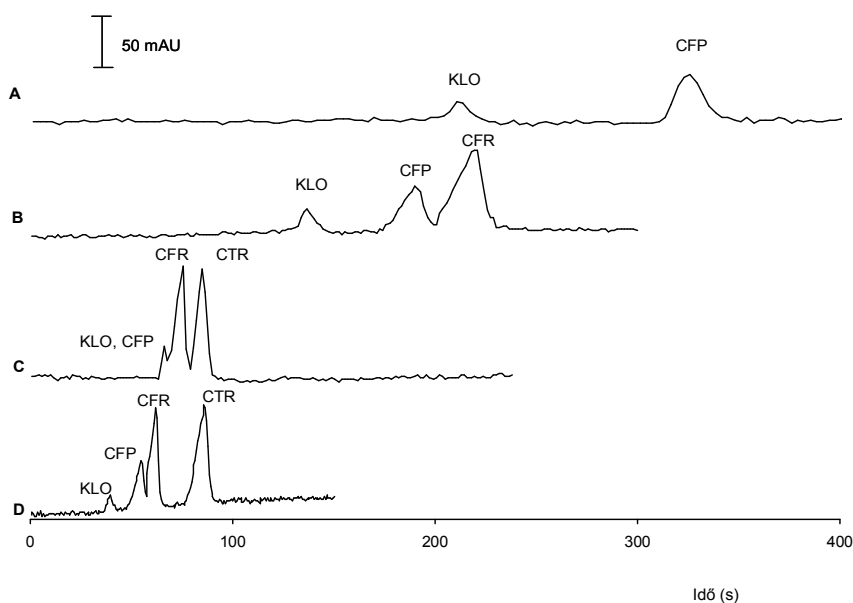
8. táblázat
Kefalosporinok koncentrációja szérumban és sputumban

| | Mintaszám | Koncentráció (µg/ml) | |
|------------|-----------|----------------------|----------|
| | | Szérum | Sputum |
| cefazolin | 14 | 79,5 ±13,8 | <0,5 |
| cefamandol | 4 | 41,5 ±10,6 | <0,6 |
| cefuroxim | 5 | 26,9 ±4,9 | <0,4 |
| ceftazidim | 4 | 9,5 ±3,4 | <0,8 |
| ceftriaxon | 6 | 64,9 ±28,9 | 1,9 ±1,3 |
| cefepim | 5 | 20,7 ±4,1 | <0,5 |

4.7. Kefalosporinok elválasztása mikrofluidikai csipen

A PDMS csipben és a hagyományos kapillárisban történő elemzések eltérései a PDMS és a kvarc tulajdonságainak a különbözőségéből eredhetnek. A PDMS hidrofób, és csak rövid időre tehető hidrofíllé a levegő plazmában történő oxidációt követően. A PDMS felülete bár gyorsan hidrofíllé alakítható, az előidézett hidrofilitás idővel fokozatosan csökken, kivéve, ha a csipet vizes oldatban tároljuk [115]. A PDMS hidrofóbbá alakulásának következtében a fal töltése csökken, mely nagyban csökkenti az EOF nagyságát. A PDMS képes biopolimer molekulákat, és kisebb, főleg hidrofób vegyületeket adszorbeálni, amely nem reprodukálható EOF kialakulásához vezet. Egy összetett minta általában tartalmaz fali adszorpcióra hajlamos vegyületeket. Amíg a PDMS képes adszorpcióra, addig az EOF erőssége az egymást követő elemzések folyamán változik. Elemzéseink során a fali adszorpció összetett voltát és jelentőségének fontosságát a kefalosporinok elválasztásán keresztül vizsgáltuk (37. ábra). Az elemzés során három kefalosporin (15 mg/ml) és kloramfenikol (15 mg/ml) keverékét tartalmazó oldatot elemeztünk. A kloramfenikolt EOF markerként használtuk. Az elválasztás során a csipen a detektorig terjedő csatornahosszúság 4 cm volt, 25 mM, 7-es pH-jú foszfát puffert használtunk, az elektroforézis 850 V alkalmazásával történt, a pozitív feszültség az injektálási oldalra volt kapcsolva. A csatornát ez első injektálást megelőzően etanol:hexán (1:1) arányú keverékével 5 percen át mostuk, majd hidrodinamikusan injektáltuk a mintát. Az első három elektroforézis során nem kaptunk jelet, mivel a szerves oldószeres mosásnak köszönhetően a PDMS falnak nem volt töltése, ennek következtében nem tudott EOF kialakulni. A mintainjektálások során azonban néhány komponens, főleg a hidrofób kloramfenikol, és a kevésbé hidrofil cefoperazon a csatorna falára adszorbeálódott, így kissé negatív töltésűvé alakítva át a PDMS felületét. A létrehozott kis mértékű EOF a legkevésbé anionos tulajdonságú molekulákat képes volt a detektorig elvinni (51/A ábra). Az injektálások során, az EOF egyre

erősebb lett, és a 15. injektálást követően pedig állandó erősségű maradt, jelezve, hogy a csatorna fal töltésének változása teljes mértékben lejátszódott (37/A-D ábra). A mintakomponensek nemcsak a PDMS-re, hanem a C18-as töltetre is rákötődtek, amely egyfajta „EOF-pumpa”-ként [116] működve szerepet játszik az EOF kialakításában, és fenntartásában. A PDMS fal töltésének fokozatos növekedését az észlelt áramerősség emelkedése is bizonyította, melyek az egymást követő, 5., 7., 11., és 14. injektálások során 10 μ A, 24 μ A, 35 μ A, és 46 μ A volt.



37. ábra

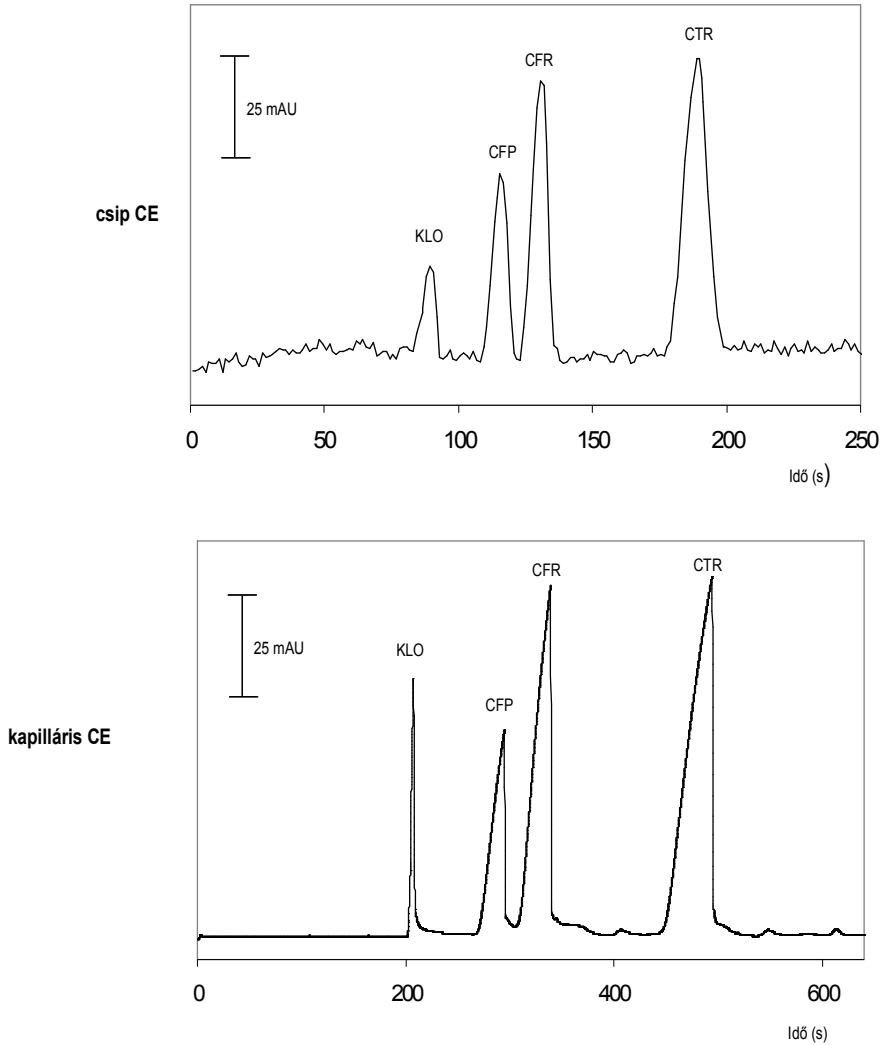
Kefalosporinok ismételt injektálása PDMS csipen, A: 5., B: 7., C: 11., D: 14. injektálás, minta: KLO: kloramfenikolt (EOF marker, $c = 7$ mg/ml), cefoperazont, cefuroximot, ceftriaxont ($c = 15$ mg/ml) tartalmazó oldat. (A csatornát a mérés megkezdése előtt etanol:hexán (1:1) oldószerkeleggyel 5 percig mostuk. Körülmények: 850 V, pozitív feszültség a csatorna injektálási végére lett kapcsolva, $L_{\text{eff}} = 4$ cm egyenes csatorna, 1 cm hosszúságú C18-as töltet a szeparációs csatorna végében, injektálás: 100 mbar x 3 sec, 25 mM foszfát puffer, pH= 6,8, $\lambda = 270$ nm)

Anionos felületaktív anyag, SDS injektálását követően rögtön kialakult egy stabil, erős EOF. A legtöbb felületaktív anyagnak a PDMS csipben az EOF-et alapvetően meghatározó szerepe van [117, 118]. SDS használata esetén nega-

tív töltésűvé vált PDMS csatorna fala hasonló a hagyományos kvarc kapilláris deprotonált szilanol csoportjai által létrehozott negatív felületéhez. A csip falára adszorbeálódott SDS eltávolítása csak szerves oldószerrel (etanol:hexán) lehetséges. Munkánk során a kefalosporinok elválasztását megelőzően a csipet 1 percre mostuk 50 mM koncentrációjú SDS oldattal, mellyel egy stabil, katód irányú EOF-et tudtunk létrehozni. 25 mM koncentrációjú, 7-es pH-jú foszfát puffert használva, ugyanazt a mintaoldatot csipen és hagyományos kapilláris elektroforézis készülékkel elemezve a kapott elektroferogramok gyakorlatilag megegyeznek (38. ábra), mivel a két rendszerben az EOF mértéke hasonló. A kloramfenikol csúcsa a csipen szélesebb jelet ad a kloramfenikol és a PDMS közötti erősebb kölcsönhatás eredményeként.

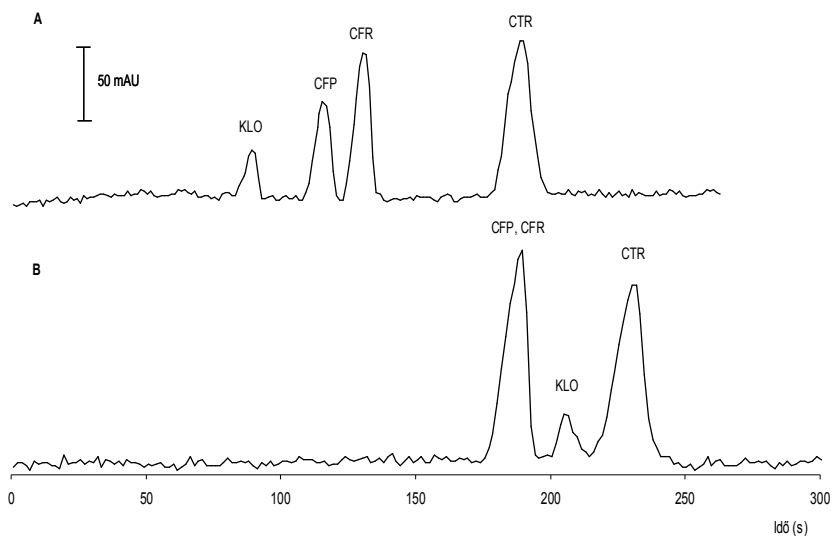
A kapilláris elektroforézis során a kapilláris detektorhoz közeli végén injektálunk (short end injection), hogy a lehető legrövidebb elválasztási hosszúságot használhassuk, az alkalmazott feszültség 25 kV volt, míg csipen a detektorig terjedő csatornahosszúság 6,5 cm, az elválasztás 1 kV feszültség alkalmazása mellett történt. Chipen az elválasztáshoz rendelkezésre álló távolságot csökkentve az analízis időtartalma még tovább csökkenthető. Az abszorbancia értékek a két elektroforetikus technika esetében hasonlóak voltak, mivel a kapilláris belső átmérőjének a nagysága (50 μm) nem tér el számottevően a csip csatornájának átmérőjétől (35 μm), viszont az alapvonal zaja nagyobb a csipen történő elemzéskor, ami a PDMS kismértékű UV fény adszorpciójától, és az optikai szálak illesztésének a pontatlanságától, a PDMS-en áthaladó fény szóródásától származik. A mintát SDS tartalmú puffert (25 mM foszfát-50 mM SDS, pH=7) alkalmazása mellett is elemeztük csipen. Korábban bemutattuk, hogy az SDS-nek nincs jelentékeny hatása a kefalosporinok elválasztására (4.1.3. fejezet), viszont a kloramfenikol hidrofób karakterének köszönhetően kölcsönhatásba lép az SDS-ből felépülő micellákkal, ezért megváltozott elektroforetikus mobilitása, megváltozott a migrációs sorrend. SDS-t

tartalmazó puffer használata esetén a csipen két kefalosporinra (cefoperazon, cefuroxim) nézve nem értünk el elválasztást (39. ábra).



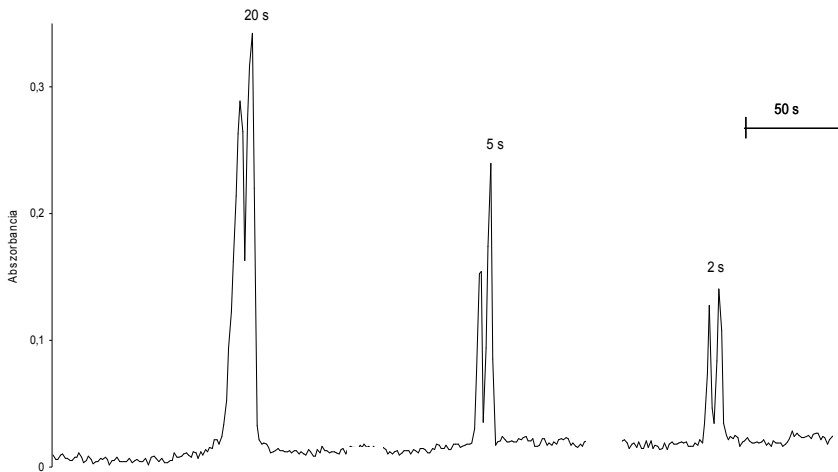
38. ábra

Kefalosporinok elválasztása PDMS csipen és hagyományos kapilláris elektroforézis készüléssel (^3D CE, Agilent). A minta ugyanaz, mint a 37. ábránál. (Körülmények: PDMS csip: 1250 V, $L_{\text{eff}}=6,5$ cm kanyarulatós csatorna, 1 cm C18-as töltet a szeparációs csatorna végében, injektálás: 100 mbar x 3 sec. Kapilláris elektroforézis: U: -10 kV, L_{eff} : 32 cm, short end injektálás: -50 mbar x 1 sec. Mindkét esetben 25 mM foszfát puffer, pH= 6.8, $\lambda=270$ nm, pozitív feszültség az injektálási végen).



39. ábra

Kefalosporinok elválasztása PDMS csipen, A: CZE, puffer: 25 mM foszfát, pH= 6,8, B: MEKC, puffer: 25 mM foszfát, 50 mM SDS, pH=6,8. (Körülmények: ugyanaz, mint a 38. ábránál.)

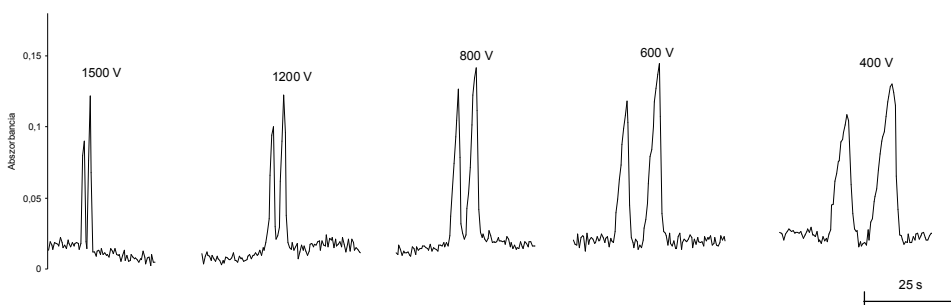


40. ábra

Az injektált mintamennyiség változtatásának hatása két kefalosporin elválasztására PDMS csipen. Az első csúcs a cefuroxim, a második a ceftriaxon, $c=15$ mg/ml. (Körülmények: 850V (49 mA), pozitív feszültség a csatorna injektálási végén, $L_{\text{eff}}=1.8$ cm egyenes csatorna, 0,5 cm hosszúságú C18-as töltet a szeparációs csatorna végében, injektálás: 100 mbar nyomással, 25 mM foszfát, pH= 6,8, $\lambda=270$ nm.)

Csipen történő elektroforéziskor az injektált mennyiség nagysága kritikus hatással van az elválasztás hatékonyságára. Az általános alapelv ugyanaz, mint a hagyományos kapilláris elektroforézis esetén, miszerint a mintadugó hossza ne legyen nagyobb az elválasztáshoz rendelkezésre álló úthossz 1 %-ánál. Két kefalosporin keverékéből (cefuroxim, ceftriaxon) álló mintát injektáltunk úgy, hogy változtattuk a nyomás-idő paraméterek nagyságát (40. ábra). A kisebb injektált mintamennyiség jobb felbontást, de kisebb érzékenységet eredményezett: 0,1 bar·2 sec injektálás esetén a kimutatási határ 1,8 mg/ml, míg ugyanilyen nyomással 20 sec-ig történő injektálás esetén a kimutatási határ tízszer jobb lett (0,2 mg/ml).

Az elválasztás során alkalmazott feszültség nagy hatással van az analízis időtartalmára. A feszültséget 400 V és 1500 V között változtattuk (41. ábra). 800-1000 V feszültség alkalmazása tűnt optimálisnak, mivel magasabb elektromos térerő esetén termelődött Joule-hő buborékok képződéséhez (és így az elektromos vezetés, az elektroforézis megszűnéséhez) vezetett.



41. ábra

Az alkalmazott feszültség hatása két kefalosporin migrációs idejére PDMS csipen. (Az első csúcs a cefuroxim, a második a ceftriaxon, $c = 15 \text{ mg/ml}$.) (Körülmények: ugyanaz, mint a 40. ábránál, injektálás: 100 mbar x 3 sec.)

A csipen történő elválasztás során az elválasztás hatékonyságát az elméleti tányérmagassággal (H) jellemezhetjük, melyet a következő egyenlettel lehet megadni [119]:

$$H = H_{diff} + H_{inj} + H_{det} = \frac{2D_m}{u} + \frac{l_{inj}^2}{12L_{eff}} + \frac{l_{det}^2}{12L_{eff}} \quad (4)$$

H_{diff} , H_{inj} , H_{det} : hosszirányú diffúzió, injektálási hossz, detektálási távolság által meghatározott elméleti tányérmagasságok

D_m : diffúziós koefficiens

u : minta lineáris sebessége

l_{inj} : mintadugó hossza

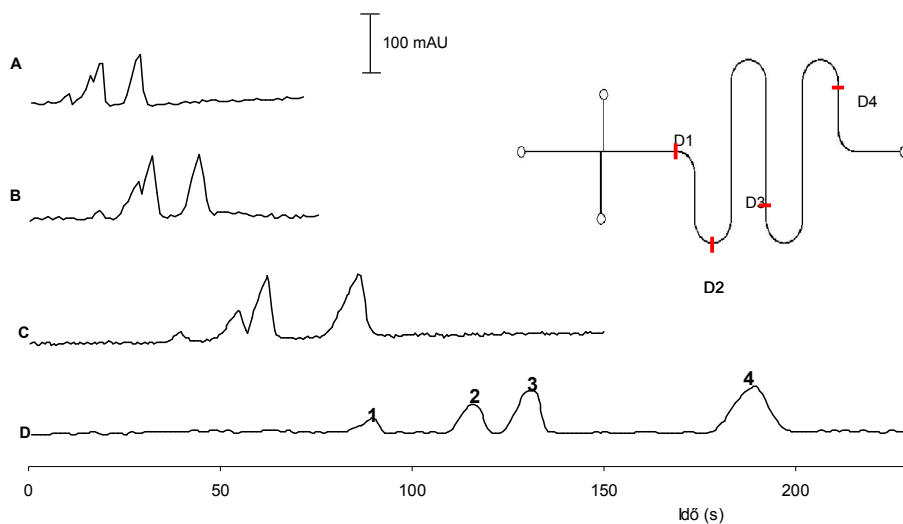
l_{det} : detektálási hely szélessége

L_{eff} : effektív elválasztási úthossz

A felírt egyenlet értelmében a L_{eff} -et növelve a H értéke kisebb lesz, azaz nagyobb hatékonyságú elválasztást tudunk elérni. Ez az elméleti ismeret érvényesül az általunk kapott elektroferogramok esetében is, amikor a detektálást a csatorna különböző pontjain hajtottuk végre (L_{eff} : 5-65 mm) (42. ábra). Alapvonalig történő elválasztást $L_{eff} = 4$ cm esetén tudtunk elérni. Rövidebb effektív hosszúság alkalmazása mellett csak akkor érhetünk el nagy hatékonyságú elválasztást, ha vagy az injektált mintadugó hosszát (l_{inj}), vagy a detektálási hely szélességét (l_{det}) csökkentjük. Az előbbinek a detektálás érzékenysége szab gátat, az utóbbinak pedig az, hogy a száloptika sugarának átmérője (200 μm) nagy volt a részecskék zónaszélességéhez képest.

Munkánk során úgy találtuk, hogy PDMS alapú csipen lehetséges gyógyszervegyületek (kefalosporinok, kloramfenikol) elválasztása. A kapott eredményeink összeegyeztethetőek, és az elválasztás adott körülmények között igen hasonlóak a hagyományos kapilláris elektroforézissel kapott eredményekkel. Nagy hatékonyságú elválasztást igen rövid idő alatt el lehet érni. Ugyanakkor

számos probléma még megoldásra vár, így elsősorban a parányi elválasztott mintazonak (< 100 pl) érzékeny detektálása, az elemzések reprodukálhatóságának javítása. A jövőben ezen a területen részletes kutatást tervezünk.



42. ábra

A detektálási hely változtatásának hatása PDMS csipen a kefalosporinok elválasztására, A: $L_{\text{eff}} = 5$ mm, B: $L_{\text{eff}} = 15$ mm, C: $L_{\text{eff}} = 40$ mm, D: $L_{\text{eff}} = 65$ mm. (Körülmények: ugyanaz, mint a 38. ábránál.)

5. ÖSSZEFOGLALÁS

A munkánkban különböző elektroforetikus technikák alkalmazhatóságát tanulmányoztuk nagyszámú, hazánkban gyakrabban használt kefalosporinok komplex vizsgálatán keresztül. A kidolgozott CZE módszerrel 14 különböző kefalosporin esetén megfelelő elválasztást lehetett elérni. Megvizsgáltuk az elválasztás különböző körülményeinek (puffer pH-ja, koncentrációja és SDS tartalma, feszültség, kapilláris hossza) hatását az elválasztásra. A felületaktív anyag jelenléte nem volt befolyással az elválasztásra, ezért a MEKC a hidrofíl kefalosporinokhoz nem volt jól alkalmazható.

Meghatároztuk a kidolgozott módszer analitikai teljesítőképességi adatait. A kefalosporinok detektálását UV spektrofotometriásan 200 és 270 nm-en végeztük. Nagy mátrixtartalmú mintákban (klinikai minták, fermentlevek, stb.) a 270 nm-en való detektálás az előnyösebb, ekkor a kimutatási határok (jel/zaj viszony, S/N=3) 0,42 és 1,62 µg/ml között alakultak (a klinikai minták antibiotikumtartalma általában ezen értékek felett van). A kidolgozott módszer precizitása megfelel a modern analitikai módszerektől elvárt értékeknek (migrációs idők szórása 1,0 RSD%, jelterületek szórása pedig 1,8 RSD%-nál kisebb).

A kidolgozott módszert alkalmaztuk biológiai mintákban (vizelet, sebváladék, liquor, szérum, sputum) kefalosporinok meghatározására. A fehérjementes, illetve kis fehérjetartalmú mintákat (vizelet, liquor, sebváladék) direkt injektálást követően CZE-vel analizáltuk. Az elektroforézis után háromlépcsős poszt kondicionálást (NaOH, SDS, puffer) alkalmaztunk. A magas fehérjetartalmú minták (szérum) elemzését direkt injektálásukat követően SDS-t tartalmazó pufferben végeztük. Az SDS csökkenti a fehérjék elválasztásra gyakorolt zavaró hatását, javítva ezzel a mérés szelektivitását és reprodukálhatóságát. A nagy viszkozitású sputum minták hatékony mintaelőkészítésére liofilizálási eljárást dolgoztunk ki.

A gyógyszeriparban alapvető követelmény a fizikai-kémiai tulajdonságok jellemzése. Meghatároztuk CZE-vel a kefalosporinok néhány fizikai-kémiai paraméterét (pl. elektroforetikus mobilitás, protonálódási állandó). A kiválasztott kefalosporinok pK_a értékét pH-potenciometriкусan és CZE-vel is meghatároztuk. A CZE méréseket állandó hőmérséklet és ionerősség mellett pH 2,0-11,0 közötti tartományban végeztük. A mozgékonyág - pH diagramok görbéiből Matlab program segítségével számoltuk ki a pK_a értékeket. A kapott adatok szerint a CZE-vel és pH-potenciometriкусan meghatározott értékeink jó egyezést mutattak. A CE előnye, hogy a meghatározáshoz kis mennyiségű minta elegendő és nem szükséges a meghatározandó komponens koncentrációjának pontos ismerete. Emellett nem tiszta, több komponensű, és akár nem vizes oldatokban is lehetséges pK_a meghatározása. A különböző mátrixokban (NaCl-oldat, fermentlé, szérum) mért elektroforetikus mobilitási adatok nem különböztek lényegesen a vizes oldatban mért értékektől. Mindezek mellett a CE nagy hatékonyságú elválasztási képességének köszönhetően több kefalosporin (cefalexin, cefaklor, cefadroxil, cefoperazon, cefotaxim, cefoxitin) pK_a -ját tudtuk egyszerűen meghatározni.

A kefalosporinok oldatbeli stabilitásának tanulmányozása során kefalosporinok koncentrációját vízben való feloldásukat követően különböző hőmérsékleteken (+25°C, +4°C, -18°C) követtük. A kefalosporinok vízben feloldva bomlékony vegyületek, az oldatok stabilitása nagymértékben függ a tárolás hőmérsékletétől. A szobahőmérsékleten tárolt minták esetében némely antibiotikum a feloldást követően tíz nappal teljesen elbomlott. +4°C-on a mintákban jelentősen csökkent a bomlás sebessége, ehhez képest a -18°C-on való tárolás csak kis mértékű javulást eredményezett a minták stabilitásában. A tömegspektrometriás detektálással összekapcsolt kapilláris elektroforézis lehetőséget nyújtott a cefuroxim több bomlástermékének szerkezeti azonosítására.

A (Z)-cefuroxim-axetil két diasztereomerjét CZE-vel nem, viszont MEKC technikával sikerült elválasztani. A két diasztereomer és az SDS micellák

közötti eltérő kölcsönhatás a disztereomer pár elválását eredményezi, mivel a hidrofóbb belső terű SDS micellákkal erősebb kölcsönhatást kialakító disztereomer később jelenik meg az elektroforézis során.

A klinikai mintákban az antibiotikumszint meghatározása segítséget nyújt a megfelelő gyógyszerterápia kialakításához. A kefalosporin beadása után követtük az antibiotikum koncentrációjának változását a különböző testfolyadékokban, hogy igazoljuk a beadott antibiotikum mennyisége megfelelő terápiás szintet biztosít-e. Méréseink szerint az idegsebészeti műtét kezdetén, és harmadik órában adott 1 g intravénás cefazolin szintje nem csökkent a MIC érték alá a különböző testfolyadékokban a műtét 10 órányi időtartalma alatt, így megfelelő védelmet biztosíthat a fertőzésekkel szemben.

A tüdőgyulladásban szenvedő, kefalosporinnal kezelt betegek sputumában meghatároztuk az antibiotikumok koncentrációját. A vizsgált hat antibiotikum közül csak a ceftriaxont (1,3-1,9 mg/l) tudtuk kimutatni a sputumban, a többi antibiotikum szintje a kimutathatósági határunk alatt volt, mely nem éri el a legtöbb baktérium elpusztításához szükséges MIC értéket (> 2 mg/l).

A kefalosporinok elektroforetikus elválasztását mikrofluidikai csipen is vizsgáltuk. Munkánkhoz különböző csatornamintázatú PDMS alapú csipeket készítettünk. A kis térfogatú (< 1 nl) mintákat hidrodinamikusan injektáltuk a szeparációs csatornába. A detektálást UV spektrofotometriásan a csip elvékonyított részén száloptika segítségével végeztük. A csipen és a kapillárisban való elektroforéziskor hasonló elektroferogramokat kaptunk, de az analízis időtartalma csipen lényegesen rövidebb volt.

6. SUMMARY

The applicability of different electrophoretic techniques were studied through studying the most frequently used cephalosporins. We could achieve an appropriate resolution for fourteen cefalosporins with the developed CZE methods. The effects of the different parameters of the analysis (pH, concentration and SDS content of the running electrolyte, applied voltage, length of the capillary) on the separation have been studied. The detergent had no influence on the mechanism of the separation, so the MEKC could not be applied for the hydrophil cephalosporins. The analytical parameters of the CZE methods were determined. The detection was carried out by on-column photometric measurement at 200 and 270 nm. In the case of biological samples the wavelength of 270 nm is more advantageous, in this case the values of limit of detection (S/N=3) ranged between 0,42 and 4,62 µg/ml (the levels of cephalosporins of clinical samples are usually above these values). The precision of the developed CZE method has matched to the values of the modern analytical methods (precision of migration times and peak areas were 1,0 RSD% and 1,8 RSD% respectively).

The developed CZE method were applied for the determination of the concentration of the antibiotics in biological samples (human urine, wound drainage, cerebrospinal fluid, serum, sputum). The protein free and the poorly proteinaceous samples were analyzed after direct sample injection by CZE. During the analysis of biofluid samples the capillary were post-conditioned by flushing with NaOH, SDS and buffer after each run. In the case of high protein content (serum) the presence of the SDS in the running buffer was necessary. The detergent has decreased the disturbing effect of the protein during the electrophoresis improving the selectivity and reproducibility of the measurement. Liophilization was found to be an effective pretreatment for highly viscous sputum samples.

The determination of physicochemical parameters is required in the pharmaceutical industry. Some physicochemical parameters of cephalosporins (i.e. electrophoretic mobility, acidity constants) were determined by CZE: The pK values of the cephalosporins were determined using by CZE and by pH-potentiometric titrations as well. The ionic strength of the background electrolyte and temperature were constant during the CZE measurements between pH 2,0-11,0. The obtained electrophoretic data were plotted in function of pH and the pK_a values were calculated with the aid of Matlab program. The pK_a values determined by CZE and by potentiometry are close to each other. Using CZE it is not necessary to have high purity samples and to know the concentration of them. Additionally the pK_a values of several compounds could be determined at the same time in biological solution. The electrophoretic mobilities in different matrices hardly differ from ones determined in pure water. Due to the high separation ability of CZE the pK_a values of many cephalosporins (cefalexin, cefaklor, cefadroxil, cefoperazon, cefotaxim, cefoxitin) could be determined at the same time.

The stability of cephalosporins dissolved in water was followed in different temperatures (+25°C, +4°C, -18°C). The dissolved cephalosporins are degradable, the stability of the solution depends on temperature. Some cephalosporins kept in room temperature decomposed completely in ten days after dissolution. At +4°C the decomposition largely decreased, at -18°C the stability of the solutions was little better. The CE combined with MS detection provided opportunity to identify the structure of some degradation products of cefuroxim.

The two diastereomers of (Z)-cefuroxim-axetil could be separated with MEKC, while using CZE resolution could not be achieved. Due to the interaction among the two diastereomers and SDS micells, the diastereomer pair separated, because one diastereomer which had the strongest interaction with the SDS, appeared later during the electrophoresis.

The determination of the level of antibiotics in clinical sample can provide a support to carry out a suitable therapy. According the measurements the prophylactic use of antibiotics reduced the rate of postoperative infection, since the level of the antibiotics exceeded the MIC value (necessary concentration of antibiotic for destruction of bacteria).

The concentration of antibiotics in bronchial secretion of patients suffering from pneumonia and treated with cephalosporins was determined. Among the six cephalosporins only the ceftriaxon was detectable in sputum (1,3-1,9 mg/l), the level of the others was under limit of detection, which did not reach the MIC value (> 2 mg/l).

The electrophoretic separation of cephalosporins has been also studied in microfluidic chip. PDMS based chips with different pattern were prepared for the separation. Subnanoliter volumes of samples were hidrodinamically injected into the separation channel. The detection was carried out on the thin part of the chip with UV fiber optics. Similar electropherograms were obtained by chip and CE electrophoresis, but the time of the analysis was substantially shorter for chips.

7. IRODALOMJEGYZÉK

- [1] S.F. Quenner, J.A. Webber, S.W. Quenner, *Clinical Pharmacology/4*, Beta-lactam antibiotics for clinical use, Marcel Dekker, New York, 1986
- [2] Görög S. *Spektrofotometriás gyógyszeranalízis*, Akadémia Könyvkiadó, Budapest, 1993.
- [3] D. Marini, E. Pascucci, *Boll. Chim. Farm.* 119 (1980) 52.
- [4] S.A. Said, T.El Bayoumy, *J. Drug. Res.* 17 (1987) 147.
- [5] F.I. Sengun, K. Ulas, *Talanta* 33 (1986) 363.
- [6] K. Ulas, F.I. Sengun, *Chim. Acta Turc.* 13 (1985) 491.
- [7] B. Borowiecka, G. Pajchel, W. Chojnowski, *Acta Pol. Pharm.* 46 (1989) 463.
- [8] D.L. Mays, F.K. Bangert, W.C. Cantrell, W.G. Evans, *Anal. Chem.* 47 (1975) 2229.
- [9] The United States Pharmacopoeia XXII. USP Convention Inc. Rockville, Md. (1990). a. 521, b. 1227, c. 972, d. 86, e. 998, f. 480, g. 646, h. 1474, i. 240, j. 371, k. 271, l. 277, m. 616.
- [10] J.K. Agrawal, S.G. Halmarkar, R. Vijayavargiya, *Microchem. J.* 21 (1976) 202.
- [11] J.E. Bodnar, V.G. Evans, D.L. Mays, *J. Pharm. Sci.* 66 (1977) 1108.
- [12] F.I. Sengun, I. Fedai, *Chim. Acta Turc.* 13 (1985) 205.
- [13] K. Ulas, F.I. Sengun, *Arch. Pharm. Chem. Sci. Ed.* 15 (1987) 91.
- [14] O. Matousova, M. Peterkova, *Cesk. Farm.* 28 (1979) 382.
- [15] F.M. Abdel-Gawad, N.M. El-Guindi, M.M. Ibrahim, *Egypt J. Pharm.* 29 (1988) 63.
- [16] A. Csiba, I. Czéhné, *Acta Pharm. Hung.* 49 (1979) 68.
- [17] M.M. Abdel-Khalek, M.S. Mahrous, *Talanta* 31 (1984) 635.
- [18] B. Morelli, P. Peluso, *Anal. Lett.* 18 (1985) 1113.
- [19] P.B. Issopoulos, *Analyst* 113 (1988) 1083.
- [20] P.B. Issopoulos, *Analyst* 114 (1989) 237.
- [21] P.B. Issopoulos, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 6 (1988) 97.
- [22] P.B. Issopoulos, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 7 (1989) 619.
- [23] A.G. Fogg, M.A. Abdalla, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 3 (1985) 315.
- [24] J.V. Uri, T.C. Jain, *J. Antibiot.* 39 (1986) 669.
- [25] J.V. Uri, *Acta Chim. Hung.* 128 (1991) 89.
- [26] F.I. Sengun, I. Fedai, *Talanta* 33 (1986) 366.
- [27] C. Luebbe, Y. Shem, A.L. Demain, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 12 (1986) 31.
- [28] Colin F. Poole, *The essence of chromatography*, Elsevier, 2003.
- [29] *European Pharmacopoeia Fourth Edition*, 2. Supplement. 2676-2682., 3. Supplement 2975-2984., 4. Supplement 3395-3401., 6. Supplement 3959-3962., Council of Europe, Strasbourg, 2002.
- [30] *Magyar Gyógyszerkönyv VIII. kiadás, II. kötet, 1460-1492.*, Országos Gyógyszerészeti Intézet Medicina Könyvkiadó Rt., Budapest, 2004.
- [31] I. Quintens, J. Eykens, E. Roets, J. Hoogmartens, *J. Planar Chromatogr. Mod.* 6 (1993) 181.
- [32] R. Bhushan, V. Parshad, *Biomed Chromatogr.* 10 (1996) 258.
- [33] H. Fabre, M.D. Blanchin, D. Lerner, B. Mandrou, *Analyst* 110 (1985) 775.
- [34] C.V. Shabadi, B.A. Shelar, A.R. Shelar, *Indian Drugs* 35 (1998) 766.
- [35] W. Jost, H.E. Hauck, F. Eisenbeiss, *J. Chromatogr. A* 256 (1983) 182.

- [36] S.E. Jovanovic, D. Agbaba, D.Z. Stakic, S.Vladimirov, J. Pharm. Biomed. Anal. 18 (1998) 893.
- [37] D. Agbaba, S. Eric, D.Z. Stakic, S. Vladimirov, Biomed. Chromatogr. 12 (1998) 133.
- [38] L.G. Martinez, P.C. Falcó, A.S. Cabeza, J. Pharm. Biomed. Anal. 29 (2002) 405.
- [39] S. Bompadre, L. Ferrante, F.P. Aló, L. Leone J. Chromatogr. B 669 (1995) 265.
- [40] G. Nygard, S.K. Wahba Khalil, J. Liquid Chromatogr. 7 (1984) 1461-1475.
- [41] C.Y. Chan, K. Chan, G.L. French, J. Antimicrobial Chemotherapy 18 (1986) 537-545.
- [42] E.K. Yun, A.J. Prince, J.E. Mcmillin, L.E. Welch, J. Chromatogr. B 712 (1998) 145-152.
- [43] R.El-Shabourry Salwa, A. Salei Gamal, A. Fardous, H. Rageh Mohamed and Azza, J. Pharm. Biomed. Anal. 45 (2007) 1-19.
- [44] A. Tiselius Biochem J. 31 (1937) 313.
- [45] S. Hjertén, Chromatogr. Rev. 9 (1967) 122.
- [46] F.E.P. Mikkers, F.M. Everaerts, E.M. Verheggen, J.Chromatogr. 169 (1979) 11.
- [47] J.W. Jorgenson, K.D. Lukacs, J.Chromatogr. 218 (1981) 209.
- [48] J.W. Jorgenson, K.D. Lukacs, Science 219 (1983) 1281.
- [49] J.W.Jorgenson, K.D. Lukacs, Anal. Chem. 53 (1981) 1298-1302.
- [50] K. D. Atria, Analysis of Pharmaceuticals by Capillary Electrophoresis, Vieweg, Braunschweig, 1998.
- [51] Y. Mrestani, R. Neubert, J. Schiewe, A. Hartl, J. Chromatogr. B 690 (1997) 321.
- [52] Y. Mrestani, H. Reinhard, R. Neubert, A.Hartl, J. Wohlrab, Anal. Chim. Acta 349 (1997) 207-213.
- [53] Ching-Erh Lin, Hung-Wen Chen, Eric C.Lin, Kuo-Shen Lin, Hui-Chun Huang, J.Chromatogr. A 879 (2000) 197-210.
- [54] G.Pajchel, S.Tyski, J.Chromatogr.A 895 (2000) 27-31.
- [55] H. Nishi, N. Tsumagari, T. Kakimoto, S.J. Terabe, J. Chromatogr.477 (1989) 259.
- [56] P. Emaldi, S. Fapanni, A. Baldini. J. Chromatogr. A. 711 (1995) 339.
- [57] P.G. Penalvo, E. Julien, H. Fabre, Chromatographia 42 (1996) 159.
- [58] J. Snopek, H. Soini, M. Novotny, E. Smolkova-Keulemansova, I. Jellinek, J.Chromatogr. 559 (1991) 215.
- [59] A. D'Hulst, N.Verbeke, J.Chromatogr. 608 (1992) 275.
- [60] H. Nishi, N.Tsumagari, Anal. Chem. 61 (1989) 2434.
- [61] P. Puig, F. Borrul, M. Calull, C. Aguilar, Chromatographia 62 (2005) 603-610.
- [62] M.Castro-Puyana, A.L. Crego, M.L. Marina, Electrophoresis 29 (2008) 274-293.
- [63] Takácsné Novák Krisztina, Völgyi Gergely, Magyar Kémiai Folyóirat, 111. évf. 4. szám (2005)
- [64] J.A. Cleveland, M.H. Benkö, J.Chromatogr. A 652 (1993)301-308.
- [65] Y. Ishihama, Y.Oda, N. Asakawa, J. Pharm. Scien. 83 (1994) 1500-1507.
- [66] S.J. Gluck, K.P. Steele, M.H. Benkö, J. Chromatogr. A 745 (1996) 117-125.
- [67] E.Örnskov, A. Linusson, S. Folestad, J. Pharm. Biomed. Anal. 33 (2003) 379-391.

- [68] S.K. Poole, S. Patel, K. Dehring, H. Workman, C.F. Poole, *J. Chromatogr. A* 1037 (2004) 445-454.
- [69] Y. Mrestani, R. Neubert, A. Munk, M. Wiese, *J. Chromatogr. A* 803 (1998) 273-278.
- [70] M. Alkesic, V. Savic, G. Popovic, N. Buric, V. Kapetanovic, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 39 (2005) 752-756.
- [71] F.M. Demotes-Mainard, G.A. Vincon, C.H. Jarry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 6 (1988) 407-413.
- [72] F. Péhourcq, C. Jarry, *J. Chromatogr. A* 812 (1998) 159-178.
- [73] S.S.N. Ling, K.H. Yuen, S.A. Barker, *J. Chromatogr. B* 783 (2003) 297-301.
- [74] P.M. Kovach, R.J. Lantz, *J. Chromatogr.* 567 (1991) 129.
- [75] R. Wyss, F. Bucheli, *J. Chromatogr.* 430 (1988) 81-84.
- [76] J.R. Sharman, A. Howarth, *J. Chromatogr.* 381 (1986) 447-451.
- [77] I.L. Smith, D.J. Swanson, L.S. Welage et al., *Anal. Lett.* 18 (1985) 1077-1080.
- [78] Z. Deyl, K. Macek, Y. Yanak, *Liquid Column Chromatogr.* Elsevier, Amsterdam (1975)
- [79] A.M. Brisson, *J. Chromatogr.* 233 (1982) 386-389.
- [80] L.I. Sokolova, A.P. Chernyaev, *Pharm. Chem. J.* 36 (2002) 263-269.
- [81] S. Bompadre, L. Ferrante, L. Leone, *J. Chromatogr. A* 812 (1998) 191-196.
- [82] K.A. Ramsteiner, *J. Chromatogr.* 456 (1988) 3.
- [83] Y.J. Lee, H.S. Lee, *Chromatographia* 30 (1990) 80.
- [84] S. Bompadre, L. Ferrante, L. Leone, M. De Martinis, L. Ginaldi, D. Quaglino, *J. Liq. Chromatogr.* 18 (1995) 2895.
- [85] H.T. Pan, P. Kumari, J. Lim, C.C. Lin, *J. Pharm. Sci.* 81 (1992) 663.
- [86] W. Thormann, S. Molteni, J. Caslavka, Schmutz, *Electrophoresis*, 15 (1994) 3-12.
- [87] Z. Deyl, F. Tagliaro, I. Miksik, *J. Chromatogr.* 656 (1994) 3-27.
- [88] P. Penalvo, M. Kelly, H. Maillols, H. Fabre, *Anal. Chem.* 69 (1997) 1364-1369.
- [89] O-K. Choi, Y-S. Song, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 15 (1997) 1265-1270.
- [90] A. Schmutz, W. Thormann, *Electrophoresis* 15 (1994) 1295-1303.
- [91] C. Bory, C. Chantin, R. Boulieu, *J. Chromatogr. A* 730 (1996) 329-331.
- [92] ZY. Zhang, MJ. Fasco, LS. Kaminsky, *J. Chromatogr. B* 665 (1995) 201-208.
- [93] P. Tabeling, *Introduction to Microfluidics*, Oxford University Press, Oxford 2005.
- [94] P.C. Simpson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95 (1998) 2256.
- [95] S.C. Jacobson, R. Hergenroder, L.B. Koutny, J.M. Ramsey, *Anal. Chem.* 66 (1994) 1114.
- [96] D. Wu, J. Qin, B. Lin, *J. Chromatogr. A* 1184 (2008) 542.
- [97] C.T. Culbertson, S.C. Jacobson, J.M. Ramsey, *Anal. Chem.* 72 (2000) 5814.
- [98] C.J. Evenhuis, R.M. Guijt, M. Macka, P.R. Haddad, *Electrophoresis* 25 (2004) 3602.
- [99] D.C. Duffy, J.C. McDonald, O.J.A. Schueller, G.M. Whitesides, *Anal. Chem.* 70 (1998) 4974.
- [100] M. Stedry, G. Bohuslav, M. Jaros, H. Vlastimil, I. Zuskova, *LC-GC Europe* 18 (2005) 282-288.
- [101] G. Gran, *Acta Chem. Scand.* 4 (1950) 559-577.
- [102] H.M. Irving, M.G. Miles, L.D. Pettit, *Anal. Chim. Acta* 38 (1967) 475-488.
- [103] A. Gáspár, M.E. Piyasena, F.A. Gomez, *Anal. Chem.* 79 (2007) 7906.

- [104] W. Cleland, *Biochemistry* 3 (1963), 480–482.
- [105] J.M. Karlinsey, J. Monahan, D.J. Marchiarullo, J.P. Ferrance, J.P. Landers, *Anal. Chem.* 77 (2005) 3637.
- [106] A. Gáspár, L. Hernandez, S. Stevens, F.A. Gomez, *Electrophoresis* 29 (2008) 1638.
- [107] R. Weinberger, *Practical Capillary Electrophoresis*, Academic Press, New York, 1993
- [108] P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* (1985) 1195-1200.
- [109] H. Sigel, R.B. Martin, *Chem. Rev.* 82 (1982) 385-426.
- [110] N. W. Smith, M.B. Evans, *Chromatographia* 38. (1994)
- [111] K.D. Altria, *J. Chromatogr. A.* 844 (1999) 371-386.
- [112] Á. Klekner, A. Gáspár, Sz. Kardos, J. Szabó, Gy. Csécsei, *J. Neurosurgical Anesthesiology*, 15 (2003). 249-254.
- [113] Á. Klekner, K. Bágyi, L. Bognár, A. Gáspár, M. Andrási, J. Szabo, *J. Clinical Microbiol.* 44 (2006) 3418-3421.
- [114] M. Andrási, A. Gáspár, Á. Klekner, *J. Chromatogr. B* 846 (2007) 355-358.
- [115] I.J. Chen and E.Linder, *Langmuir* 23 (2007) 3118.
- [116] J.F. Borowsky, B.C.Giordano, Q. Lu, A.Terray, G.E. Collins, *Anal. Chem.* 80 (2008) 8287.
- [117] B.F. Liu, M. Ozaki, H. Hisamoto, Q.M. Luo, Y. Utsumi, T. Hattori, S. Terabe, *Anal. Chem.* 77 (2005) 573.
- [118] G.T. Roman, K. McDaniel, C.T. Culbertson, *Analyst* 131 (2006) 194.
- [119] J.C. Giddings, *Dynamics of Chromatography, Part I: Principles and Theory*, Marcel Dekker, New York, 1965

8. PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A dolgozat témakörében referált, nemzetközi folyóiratban megjelent tudományos közlemények adatai:

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

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)

A dolgozat témakörében referált, nemzetközi folyóirathoz beküldött tudományos közlemény adatai:

1. A. Gáspár M. Andrási
Separation of cephalosporins by PDMS microchip electrophoresis
Biomed. Chromatogr. 2009

Nem a dolgozat témaköréből készült referált, nemzetközi folyóirathoz beküldött tudományos közlemény adatai:

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

Konferenciákon tartott előadások:

1. Sz. Kardos A. Gáspár M. Andrási Á. Klekner
Laboratóriumi Diagnosztikai Társaság 51. Nagygyűlése, Gyula, 2002.08. 28-31. 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 orvosi diagnosztikai 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 Effectiveness of cefazolin in case of aspirating the oral flora
 Á. Klekner Árkövy National Congress of the Hungarian Society of Dentists,
 L. Bognár august 31-sept. 2, 2006, Debrecen
 A Gáspár
 M. Andrási
 J. Szabó
 I. Márton

6. K. Bágyi Effectiveness of cephalosporin prophylaxis during spine surgery in
 L. Bognár older patients
 J. Szabó International Congress on Psychosomatic, Preventive and Sport
 A.Gáspár Medicine, October 14-21, 2006, St. Julian, Malta
 M. Andrási
 I. Márton
 Á. Klekner

7. K. Bágyi Effectiveness of cefazolin in case of aspirating the oral flora
 Á. Klekner Árkövy National Congress of the Hungarian Society of Dentists,
 L. Bognár August 31-Sept. 2, 2006, Debrecen
 A Gáspár
 M. Andrási
 J. Szabó
 I. Márton

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

Konferenciákon bemutatott poszterek:

1. Sz. Kardos Direct determination of cephalosporins in clinical samples using
 A. Gáspár capillary electrophoresis
 M. Andrási Balaton Symposium, 2-4 September, 2001, Siófok, Book of
 Á. Klekner Abstracts, pp. 41.

2. M. Andrási Application of capillary electrophoresis in the analysis of
 A. Gáspár cephalosporins, Balaton Symposium, 2-4 September, 2001,
 Sz. Kardos Siófok, Book of Abstracts, pp. 83.

3. Sz. Kardos Direct determination of cephalosporins in clinical samples using
 A. Gáspár capillary electrophoresis
 M. Andrási 3rd International Symposium and Course, CEEPUS H-76 project,
 Á. Klekner 23-29 June 2002, Warsaw, Abstract Book, pp. 38.

4. M. Andrási Application of capillary electrophoresis in the analysis of
 A. Gáspár cephalosporins
 Sz. Kardos 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. P-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

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm Dr. Fábián István tanszékvezető egyetemi tanárnak, a Környezeti és műszeres analitikai kémia doktori program vezetőjének, hogy lehetővé tette a dolgozat megírását a Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszéken.

Hálás köszönet illeti témavezetőmet, Dr. Gáspár Attila egyetemi docent, a munkám során nyújtott segítségével, megértéséért és sok türelméért.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Klekner Álmos egyetemi adjunktusnak (DE-OEC Idegsebészeti Klinika), hogy lehetővé tette klinikai minták elemzését.

Továbbá megköszönöm Dr. Posta József egyetemi tanárnak, hogy megszerettette velem az analitika világát; illetve Dr. Buglyó Péter egyetemi docensnek és Zékány Lászlónak a pH-potenciometriás mérésekhez, pK számításokhoz nyújtott segítségüket. Dr. Vasas Gábor egyetemi docensnek (DE-TEK Növénytan tanszék) a mintaelőkészítési eljárásokban adott tanácsait köszönöm. Hálás vagyok Huguette Fabre professzorasszonynak (University of Montpellier Faculty of Pharmacy), amiért lehetővé tette, hogy az Erasmus ösztöndíjam keretében a laboratóriumában dolgozhassak. Köszönettel tartozom a munkám során adott tanácsaikért és tapasztalataik megosztásáért Dr. Bácsi Istvánnak, Dr. Várnagy Katalinnak, Dr. Kurtán Tibornak, Dr. Kilár Ferencnek, Dr. Szabó Pálnak, Dr. Gyémánt Gyöngyinek, illetve Barcsa Gáborné és Hüse Ilona vegyésztechnikusoknak, Kardos Szilvia, Páger Csilla, Rezeli Melinda, Juhász Péter hallgatótársaimnak.

Végül külön hálával tartozom férjemnek, kisfiamnak és szüleimnek türelmükért, biztatásukért.



Kefalosporinok vizsgálata elektroforetikus technikákkal

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

a szerző neve: András Melinda
témavezető neve: Dr. Gáspár Attila

DEBRECENI EGYETEM
Természettudományi Doktori Tanács
Kémia Doktori Iskola
Debrecen, 2009.

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi Doktori Tanács Kémia Doktori Iskola Környezeti és műszeres analitikai kémia programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.

Debrecen,

jelölt

Tanúsítom, hogy András Melinda doktorjelölt 2005-2009 között a fent megnevezett Doktori Iskola Környezeti és műszeres analitikai kémia programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javaslom.

Debrecen,

témavezető

TARTALOMJEGYZÉK

| | |
|--|----|
| 1. BEVEZETÉS | 1 |
| 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS..... | 3 |
| 2.1. Kefalosporinok és jelentőségük a gyógyászatban | 3 |
| 2.2. Kefalosporinok meghatározásának lehetőségei..... | 7 |
| 2.2.1. Hagyományos analitikai módszerek..... | 7 |
| 2.2.2. Kromatográfiás módszerek..... | 8 |
| 2.2.3. Kapilláris elektroforézis..... | 11 |
| 2.3. Kefalosporinok meghatározása klinikai mintákban..... | 14 |
| 2.4. Mikrofluidikai csipek | 16 |
| 3. KÍSÉRLETI KÖRÜLMÉNYEK | 19 |
| 3.1. Felhasznált vegyszerek és minták | 19 |
| 3.2. Alkalmazott berendezések | 20 |
| 3.2.1. Kapilláris elektroforézis | 20 |
| 3.2.2. Tömegspektrométer | 21 |
| 3.2.3. Potenciometriás titráló berendezés..... | 22 |
| 3.2.4. Egyéb berendezések..... | 22 |
| 3.3. Klinikai mintavételezés és tárolás | 23 |
| 3.4. Mikrofluidikai csipek készítése..... | 24 |
| 4. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK | 27 |
| 4.1. CZE módszer kifejlesztése kefalosporinok meghatározásához | 27 |
| 4.1.1. A puffer pH-jának hatása | 27 |
| 4.1.2. A puffer koncentrációjának hatása..... | 29 |
| 4.1.3. A pufferhez adott felületaktív anyag hatása..... | 31 |
| 4.1.4. A feszültség hatása..... | 32 |
| 4.1.5. A kapilláris hosszúsága..... | 33 |
| 4.2. Analitikai teljesítőképességi adatok | 36 |
| 4.3. Kefalosporinok meghatározása biológiai mintákban..... | 43 |
| 4.3.1. Direkt injektálás alkalmazhatóságának vizsgálata | 43 |
| 4.3.2. Nagy viszkozitású klinikai minták injektálása..... | 49 |
| 4.3.3. Mintainjektálás mikrofluidikai csipen..... | 52 |
| 4.4. Kefalosporinok fizikai-kémiai paramétereinek meghatározása..... | 53 |
| 4.4.1. Elektroforetikus mozgékonyág..... | 53 |
| 4.4.2. Protonálódási állandók meghatározása..... | 55 |
| 4.4.3. Oldatstabilitási vizsgálatok..... | 66 |
| 4.5. Diasztereomerek vizsgálata | 72 |
| 4.6. A kidolgozott módszerek orvosdiagnosztikai alkalmazásai..... | 75 |
| 4.7. Kefalosporinok elválasztása mikrofluidikai csipen | 81 |
| 5. ÖSSZEFOGLALÁS | 89 |
| 6. SUMMARY | 92 |
| 7. IRODALOMJEGYZÉK..... | 95 |
| 8. PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE..... | 99 |

Kefalosporinok vizsgálata elektroforetikus technikákkal

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
a Kémia tudományágban

Írta: András Melinda okleveles gyógyszerész

Készült a Debreceni Egyetem Kémia doktori iskolája
(Környezeti és műszeres analitikai kémia programja) keretében

Témavezető: Dr. Gáspár Attila

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Dr.
tagok: Dr.
Dr.

A doktori szigorlat időpontja: 200... ..

Az értekezés bírálói:

Dr.
Dr.
Dr.

A bírálóbizottság:

elnök: Dr.
tagok: Dr.
Dr.
Dr.
Dr.

Az értekezés védésének időpontja: 2010... ..