

NGHIÊN CỨU PHÂN TÍCH CHẤT CHẸN BETA TRONG NƯỚC TIỂU SỬ DỤNG KỸ THUẬT LC/MS/MS

Đến tòa soạn 30 - 03 - 2016

Nguyễn Hồng Khánh, Phạm Tuấn Linh, Phan Tiến Hưng, Nguyễn Thành Đồng

Viện Công nghệ môi trường, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Nguyễn Thị Thảo, Từ Bình Minh

Khoa Hóa học, Trường ĐHKHTN - ĐHQGHN

SUMMARY

ANALYSIS OF BETA-BLOCKERS IN URINE SAMPLE USING LC/MS/MS TECHNIQUE

An analytical method has been developed for analysis of ten beta-blockers in urine sample. Extraction of ten beta-blockers was carried out based on the dispersive solid phase extraction sample preparation method. Determination was performed using liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC/ESI-MS/MS). Mother ion and two fragment ion transitions of each beta-blocker were identified by direct injection to MS mode and by multiple reactions monitoring (MRM) mode, respectively. Spiking experiments was carried out to determine the recovery, precision and limit of quantitation (LOQ) of the method. The overall recoveries of all beta-blockers were between 62% and 102% with relative standard deviation lower than 15%. The limit of quantitation (LOQ) for all studied compounds was acceptable in comparison with regulations of World Anti Doping Agency.

1. MỞ ĐẦU

Các chất chẹn beta (beta-blockers) thường được sử dụng trong phòng chống các bệnh về tim mạch, cao huyết áp và đột quỵ [1]. Cơ chế hoạt động của chất chẹn beta là có ảnh hưởng tới lượng adrenaline được sản sinh ra trong cơ thể và qua đó làm giảm sức hoạt động của hệ tim mạch, góp phần làm cho cơ thể sử dụng ít máu và lượng ô xy tiêu tốn ít hơn trong quá trình hoạt động của cơ thể [2]. Do có tác dụng như vậy nên một số vận động viên trong khi thi đấu thể thao đã sử dụng chất chẹn beta này nhằm mục đích ổn định tâm lý, chống run tay, giảm nhịp dồn dập, hồi hộp trước khi thi đấu. Các môn thể thao thường lạm dụng sử dụng chất chẹn beta thường là các môn đòi hỏi không quá

hiều sức mạnh như võ thuật, bắn súng [3]. Chính vì những lý do này, Tổ chức chống doping thể giới (World Anti Doping Agency - WADA) đã liệt nhóm chất chẹn beta vào danh mục chất cấm ở phần P2 là phần các chất cấm trong khi thi đấu [4].

Nhóm chất chẹn beta bao gồm Atenolol, Acebutolol, Levobunolol, Esmolol, Celiprolol, Labetolol, Metoprolol, Alprenolol, Propranolol và Betaxolol đều là các chất khó bay hơi, có độ phân cực cao. Trong công tác phân tích các chất chẹn beta, hiện nay chủ yếu tham khảo theo hướng dẫn của dược điển nghiêng về phân tích chất lượng thuốc, trong đó đó, các kỹ thuật sử dụng chủ yếu ở dược điển là kỹ thuật phổ phân tử và sắc ký bản mỏng. Với các kỹ thuật này, để đạt đến độ nhạy cỡ phần tỷ là một thách thức cực lớn. Kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao ghép nối với hệ thống đầu dò đa khối phổ (LC/MS/MS) đã được sử dụng trong một số các nghiên cứu cho phân tích chất chẹn beta trên thế giới [5, 6]. Do vậy, nhằm mục đích có thể phân tích chính xác và kéo giới hạn phát hiện xuống cỡ phần tỷ, trong nghiên cứu này kỹ thuật LC/MSMS đã được sử dụng.

2. THỰC NGHIỆM

1. Hóa chất

Atenolol, Acebutolol, Levobunolol, Esmolol, Celiprolol, Labetolol, Metoprolol, Alprenolol, Propranolol và Betaxolol được đặt mua từ các nhà cung cấp như Aldrich (WI, Mỹ), EP (Pháp). Độ tinh khiết của các chất chuẩn này là từ 98 – 99%.

Acetonitrile loại tinh khiết sắc ký được mua từ nhà cung cấp J.T. Baker (Philipsburg, NJ, Mỹ).

Formic acid loại tinh khiết sắc ký được mua từ nhà cung cấp Merck (Darmstadt, Đức).

Nước siêu sạch đạt giá trị 18MΩ được cấp bởi hệ thống lọc nước siêu sạch Ultra-pure water-Sinhan science tech, Hàn quốc.

Các chất hấp thụ khác như Primary secondary amine (PSA) được mua từ nhà cung cấp Varian (Varian, Harbor City, Úc). MgSO₄ và NaCl được đặt mua từ các nhà cung cấp Wako (Osaka, Nhật bản).

Chuẩn gốc của từng chất chẹn beta (1,00 mg/mL) được chuẩn bị trong acetonitrile và được lưu giữ ở âm 20 °C. Dung dịch chuẩn làm việc của hỗn hợp các chất chẹn beta được chuẩn bị trong acetonitrile.

2. Thiết bị

Thiết bị LC/ESI-MS/MS: hệ thống sắc ký lỏng khối phổ 1200 của hãng Agilent (Palo alto, CA, Mỹ) bao gồm hệ thống bơm, bơm mẫu tự động và detector 6410 triple Quad MS/MS (Palo alto, CA, Mỹ).

Việc xác định được thực hiện với detector Agilent 6410 triple Quad MS/MS hoạt động ở chế độ ion hoá dương. Thế của mao quản đặt ở 4.0 kV và áp suất của buồng phun là 10 psi. Dòng khí nitơ đặt ở 6L/phút và nhiệt độ buồng va đập đặt ở 350 °C.

Dụng cụ chuẩn bị mẫu: Máy lắc Glas-Col Multi Pulse Votexer (Glas-Col, Terre

Haute, Mỹ) và máy li tâm lạnh Hanil Refrigerated Centrifuge (Hanil Science Industrial, Hàn quốc) được sử dụng cho công tác chuẩn bị mẫu.

3. Chuẩn bị mẫu

Lấy mẫu: Mẫu nước tiểu được lấy từ các tình nguyện viên khoẻ mạnh.

Chiết mẫu: 10 mL mẫu được chuyển vào ống ly tâm Teflon dung tích 50 mL, thêm hỗn hợp nội chuẩn và 10 mL dung môi acetonitrile vào ống ly tâm và lắc mạnh trong thời gian 1 phút bằng máy lắc vortex mixer. Sau đó, ống ly tâm chứa mẫu được đặt vào trong tủ lạnh khoảng 30 phút rồi lấy ra, thêm 4 gam MgSO_4 và 1 gam NaCl vào ống ly tâm và tiếp tục lắc mạnh trong thời gian 1 phút bằng máy lắc vortex mixer. Ly tâm hỗn hợp này bằng hệ thống ly tâm lạnh ở 4°C , tốc độ ly tâm là 3500 vòng/phút. Lấy 2 mL dung dịch ở phía trên trong ống ly tâm và chuyển vào ống ly tâm nhỏ có thể tích 5 mL. Trong ống ly tâm nhỏ này có sẵn 50 mg PSA và 300 mg MgSO_4 . Lắc mạnh trong thời gian 1 phút bằng máy lắc vortex mixer, sau đó ly tâm hỗn hợp này bằng hệ thống ly tâm lạnh ở 4°C , tốc độ ly tâm là 3500 vòng/phút. Lấy 1.0 mL dung dịch ở phía trên chuyển sang lọ bơm mẫu tự động để đưa vào phân tích trên hệ thống sắc ký lỏng khối phổ (LC-MS/MS).

Chuẩn bị mẫu cho nghiên cứu độ thu hồi: Để thực hiện công việc nghiên cứu độ thu hồi, 10 mL mẫu (mẫu thu được từ các tình nguyện viên không chứa chất chẹn beta) được thêm chuẩn bằng cách thêm hỗn hợp dung dịch chuẩn của các chất chẹn beta sao cho nồng độ cuối cùng đạt là 50,0; 100,0 và 200,0 ng/mL. Sau đó, các mẫu thêm chuẩn này được tiến hành chuẩn bị và phân tích theo quy trình đưa ra ở trên.

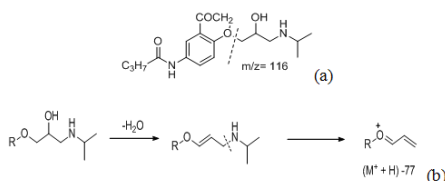
III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Xác định ion chính và các ion chuyển hóa

Các chất chẹn beta được xác định bằng kỹ thuật Electro Spray Ionization ở chế độ ion dương. Ban đầu, từng chất được xác định ở chế độ quét phổ để xác định ion chính (Mother ion) và sau đó tiếp tục được xác định ở chế độ MRM để xác định các ion chuyển hoá cho từng chất nghiên cứu.

1.1 Acebutolol

Ion chính của Acebutolol có số khối là 337, hai ion chuyển hoá được lựa chọn cho Acebutolol là các mảnh có số khối 116 và 260. Ion chuyển hóa $m/z = 116$ là ion hay gặp của các chất chẹn beta. Phân mảnh ở liên kết C-O của nhóm phenol ete sẽ cho mảnh $m/z = 116$.



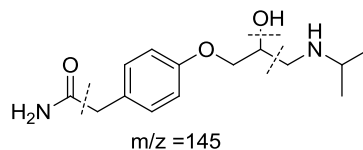
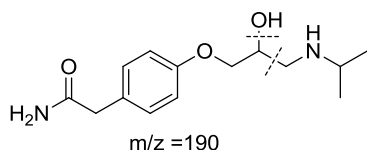
Píc ion chuyển hóa 260 ứng với $(\text{M}^+ + \text{H}) - 77$ là ion thường gặp. Việc mất một phân tử H_2O và đứt mạch ở liên kết C-N và việc loại bỏ phân tử $\text{C}_3\text{H}_7\text{NH}_2$ cho ion $(\text{M}^+ + \text{H}) - \text{H}_2\text{O} - \text{C}_3\text{H}_7\text{NH}_2$ tương ứng với mảnh $m/z = 260$.

1.2 Alprenolol

Ion chính của Alprenolol có số khối là 250, hai ion chuyển hoá được lựa chọn cho Alprenolol là các mảnh có số khối 116 và 173. Các ion chuyển hóa 116 và 173 ứng với $(M^+ + H) - 77$ là các pic thông thường và được hình thành tương tự như hợp chất Acebutolol.

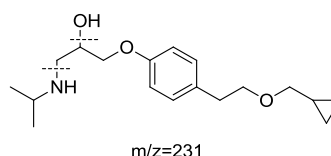
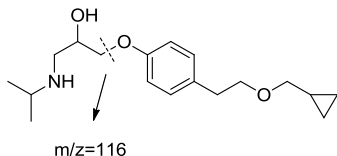
1.3 Atenolol

Ion chính của Atenolol có số khối là 267, hai ion chuyển hoá được lựa chọn cho Atenolol là các mảnh có số khối 145 và 190. Peak 190 là pic ứng với $(M^+ + H) - 77$, pic ion 145 là pic riêng biệt của Atenolol khi mất thêm nhóm amide $CO-NH_3$ từ ion chuyển hóa với mảnh có $m/z = 190$.



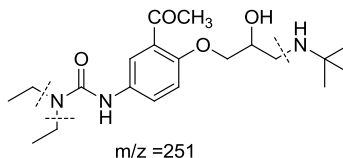
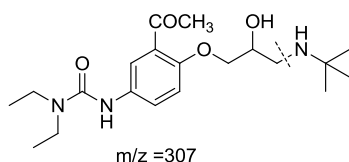
1.4 Betaxolol

Ion chính của Betaxolol có số khối là 308, hai ion chuyển hoá được lựa chọn cho Betaxolol là các mảnh có số khối 116 và 231. Các pic ion $m/z = 116$ và 231 là các ion thường gặp trong các hợp chất chẹn beta, ứng với nhóm $C_6H_{14}NO$ và $(M^+ + H) - 77$, tương tự như trường hợp của Acebutolol và Alprenolol.



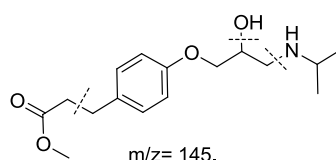
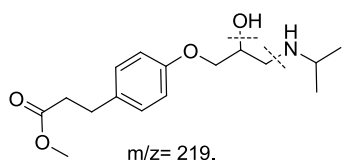
1.5 Celiprolol

Ion chính của Celiprolol có số khối là 380, hai ion chuyển hoá được lựa chọn cho Celiprolol là các mảnh có số khối 251 và 307. Pic ion $m/z = 307$ được tạo thành do đứt liên kết C - N để loại phân tử $C_4H_9NH_2$. Pic $m/z = 251$ là do ion 307 - 56 được tạo thành do mất thêm 4 nhóm CH_2 từ ion $m/z = 307$.



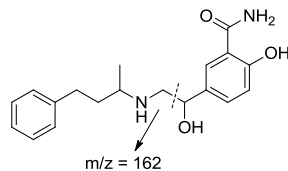
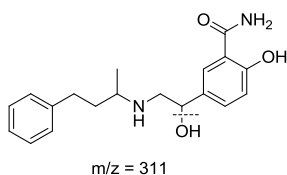
1.6 Esmolol

Ion chính của Esmolol có số khối là 296, hai ion chuyển hoá được lựa chọn cho Esmolol là các mảnh có số khối 145 và 219. Pic ion $m/z = 219 = (M^+ + H) - 77$ là pic thường gặp đối với nhóm chẹn beta. Tiếp đó, sự gãy liên kết ở vị trí C - C loại nhóm CH_2COOCH_3 để tạo phân mảnh ion với m/z là 145.



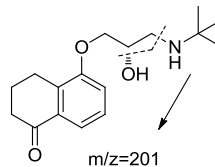
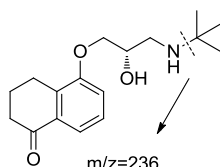
1.7 Labetolol

Ion chính của Labetolol có số khối là 329, hai ion chuyển hoá được lựa chọn cho Labetolol là các mảnh có số khối 162 và 311. Mất phân tử nước từ Labetolol sẽ cho pic ion với $m/z = 311$ là peak của $(M^+ + H) - 18$. Việc gãy liên kết C - C cho ion có mảnh 162.



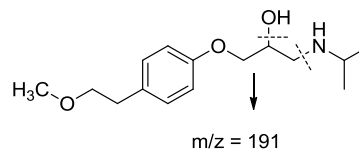
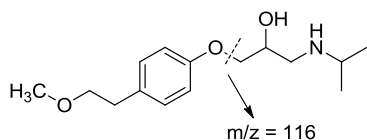
1.8 Levobunolol

Ion chính của Levobunolol có số khối là 292, hai ion chuyển hoá được lựa chọn cho Levobunolol là các mảnh có số khối 201 và 236. Với phân tử có nhóm tert-butyl, gãy liên kết C - N loại bỏ một phân tử isobutene sẽ cho pic ion chuyển hóa $(M^+ + H) - 56$. Mất phân tử nước ($H_2O = 18$) và nhóm tert-butyl amin ($C_4H_9NH_2 = 63$) sẽ cho pic ion với $m/z = 201$ là pic của $(M^+ + H) - 91$.



1.9 Metoprolol

Ion chính của Metoprolol có số khối là 268, hai ion chuyển hoá được lựa chọn cho Metoprolol là các mảnh có số khối 116 và 191. Các pic ion $m/z = 116$ và 133 là các ion thường gặp trong các hợp chất chẹn beta, ứng với nhóm $C_6H_{14}NO$ và $(M^+ + H) - 77$, tương tự như trường hợp của Acebunolol và Alprenolol.



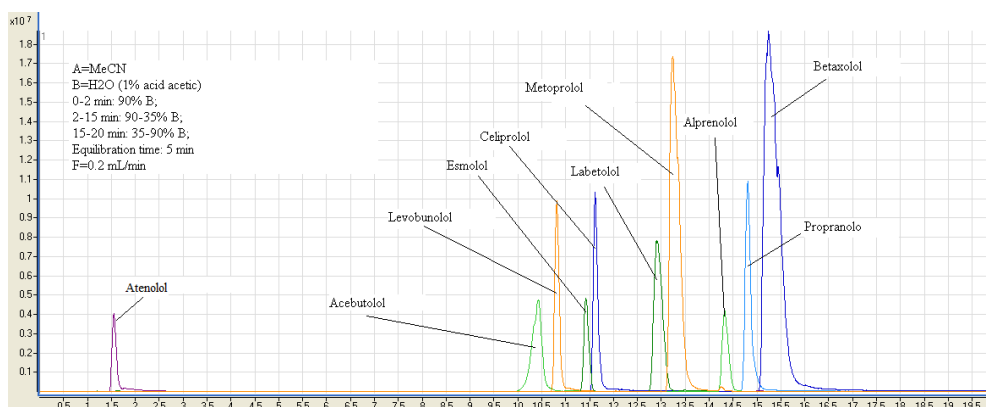
1.10 Propranolol

Ion chính của Propranolol có số khối là 260, hai ion chuyển hoá được lựa chọn cho Propranolol là các mảnh có số khối 116 và 183. Các pic ion $m/z = 116$ và 183 là các ion thường gặp trong các hợp chất chẹn beta, ứng với nhóm $C_6H_{14}NO$ và $(M^+ + H) - 77$, tương tự như trường hợp của Acebunolol và Alprenolol.



2. Quá trình tách sắc ký

Các chất chẹn beta được tách qua cột C18 (5 cm x 2,1 mm; 1,8 μ m) của hãng Agilent (Palo alto, CA, Mỹ). Tốc độ pha động được khống chế ở 0,2 mL/phút. Thể tích bơm mẫu là 5 μ L cho cả chất chuẩn và các mẫu phân tích. Pha động chạy ở chế độ gradient với hai pha dung môi A và B, trong đó A là nước có pha 1% formic acid và B là acetonitrile. Chế độ gradient được khống chế và thiết lập dựa trên hệ bơm binary của hệ thống sắc ký lỏng như sau: Chạy isocratic trong 2 phút với 100 % dung môi B, sau đó chạy gradient từ phút 2,1 đến phút thứ 5 để đạt 85% dung môi B. Giữ nguyên chế độ 85% dung môi B đến 10 phút. Tiếp tục chạy gradient từ phút thứ 10 đến phút thứ 20 để đạt 35% dung môi B và giữ nguyên 35% dung môi B không đổi từ phút thứ 20 đến phút thứ 22. Theo hình 1, độ phân giải của các chất chẹn beta nói chung là tốt và toàn bộ đã được tách trong thời gian khoảng 20 phút.



Hình 1. Sắc đồ phân tách 10 chất chẹn beta

3. Xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp

3.1 Khoảng tuyến tính

Các chất chẹn beta có khoảng tuyến tính trong nồng độ đánh giá là 25, 50, 100, 200 và 400 ng/mL với hệ số xác định (determination coefficients) của các chất đều ≥ 0.99 .

3.2 Giới hạn định lượng (LOQ)

Giới hạn định lượng của phương pháp được tính toán dựa trên giá trị 10 lần của tín hiệu nhiễu của từng chất chẹn beta. Với hầu hết các chất, giá trị giới hạn định lượng đều nhỏ hơn 5 ng/mL.

3.3 Độ thu hồi

Độ thu hồi đạt được của các chất chẹn beta nằm trong khoảng từ 77 đến 112 %. Độ chính xác của phương pháp, thể hiện với giá trị độ lệch chuẩn tương đối (RSD) nhỏ hơn 15% như thể hiện trong bảng 1 là đáp ứng được với yêu cầu phân tích lượng vết.

Bảng 1. Độ thu hồi của các mẫu thêm chuẩn

Tên chất	Giá trị thu hồi trung bình $\pm$ RSD (n=4)		
	50 ng/mL	100 ng/mL	200 ng/mL
Atenolol	75 $\pm$ 8	80 $\pm$ 3	89 $\pm$ 5
Acebutolol	77 $\pm$ 4	88 $\pm$ 6	87 $\pm$ 10
Levobunolol	72 $\pm$ 8	82 $\pm$ 13	86 $\pm$ 8
Esmolol	75 $\pm$ 14	81 $\pm$ 6	87 $\pm$ 6
Celiprolol	72 $\pm$ 15	90 $\pm$ 15	94 $\pm$ 12
Labetolol	74 $\pm$ 11	83 $\pm$ 12	89 $\pm$ 10
Metoprolol	62 $\pm$ 9	75 $\pm$ 12	79 $\pm$ 11
Alprenolol	75 $\pm$ 11	88 $\pm$ 9	90 $\pm$ 7
Propranolol	86 $\pm$ 6	84 $\pm$ 10	86 $\pm$ 7
Betaxolol	78 $\pm$ 9	81 $\pm$ 6	102 $\pm$ 6

4. KẾT LUẬN

Ion chính và các ion chuyển hóa đã được xác định cho công tác phân tích các chất chẹn beta trong mẫu nước tiểu. Độ lặp lại và giới hạn định lượng của phương pháp là phù hợp cho việc phân tích các chất chẹn beta trong mẫu nước tiểu đối với công tác kiểm tra doping trong thể thao.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Stoschizly K., Zernig G., Lindner W. (1998) *Racemic beta blockers fixed combinations of different drugs*; J. Clin. Bas. Cardiol., 1: 14-18.
- [2] Bristow M. R. (2000) *Beta Adrenergic Receptor Blockade in Chronic Heart Failure*; Circulation, 101: 558-569.
- [3] <http://www.wada-ama.org/>
- [4] WADA_Prohibite_List_2015.
- [5] Alnouti, Y., Srinivasan, K., Waddell, D., Bi, H., Kavetskaia, O., Gusev, A.I. (2005) *Development and application of a new on-line SPE system combined with LC-MS/MS detection for high throughput direct analysis of pharmaceutical compounds in plasma*; J. Chromatogr. A, 1080: 99–106.
- [6] Josefsson M., Sabanovic A. (2006) *Sample preparation on polymeric solid phase extraction sorbents for liquid chromatographic–tandem mass spectrometric analysis of human whole blood – a study on a number of beta-agonists and beta-antagonists*; J. Chromatogr. A, 1120: 1–12.