Phát triển kỹ thuật INCAT- GC-MS phân tích các chất chuyển hóa trong nước tiểu

- **Peter Podolec** [1]
- **Alexandra Hengerics Szabó** [1]
- **Viktória Ferenczy** [2]
- **Peter Kotora** [2]
- **Jaroslav Blaško** [2]
- **Róbert Kubinec** [2]
- **Stanislav Stuchlík** [3]
- **Martin Juriga** [4]
- **Radomír Čabala** [5,6]
- **Václav Bierhanzl** [5]
- **Ngô Mạnh Thắng** [7,✉]

[1]PríF UK, Šafárikovo námestie 6, 81499 Bratislava, Slovakia

[2]Chemický Ústav PríF UK, Mlynská dolina CH-2, 84215 Bratislava, Slovakia

[3]Katedra Molekulárnej Biologie PríF UK, Mlynská dolina CH-2, 84215 Bratislava, Slovakia

[4]Ústav Chemických a Hydraulických strojov a zariadení, SjF STU, Nám. Slobody 17, 81231 Bratislava, Slovakia

[5]Katedra Analytickej Chémie PríF UK, Albertov 6, 128 43 Praha 2, Czech Republic

[6]Ústav Súdnej Medicíny a Toxikologie, Univerzitná Nemocnica, U Nemocnice 2, 128 08 Praha 2, Czech Republic

[7]Khoa Kỹ thuật Hóa học, trường Đại Học Bách Khoa, ĐHQG-HCM

(Bản nhận ngày 10 tháng 08 năm 2015, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 18 tháng 01 năm 2016)

TÓM TẮT

Nghiên cứu nằm trong định hướng phát triển kỹ thuật vi chiết không dung môi sử dụng kim chứa chất hấp phụ mao quản INCAT (Inside Needle Capillary Adsorption Trap) để chiết các thành phần dễ bay hơi trong mẫu cho phân tích sắc ký khí. Báo cáo này trình bày kết quả phát triển INCAT với các lớp hấp phụ khác nhau để áp dụng với sắc ký khí phổ khối phân tích các sản phẩm chuyển hóa dễ bay hơi trong nước tiểu. Xác định INCAT với ba lớp hấp phụ Chromosorb W + 20% SE-54, Carbopack X + Carboxen 1000 (tỷ lệ 1:1:1) phù hợp cho phân tích các sản phẩm chuyển hóa dễ bay hơi trong mẫu nước tiểu bệnh nhân rối loạn chuyển hóa.

Từ khóa: *Vi chiết, INCAT, sản phẩm chuyển hóa dễ bay hơi, nước tiểu*

1. GIỚI THIỆU

Chuẩn bị và/hoặc tiền xử lý các mẫu sinh lý là giai đoạn quan trọng hàng đầu trong tiến trình phân tích các mẫu này. Yêu cầu chủ yếu là chiết các thành phần cần phân tích từ nền phức tạp của

mẫu, chuyển các thành phần này sang dạng phù hợp với kỹ thuật phân tích sử dụng, đồng thời loại bỏ các thành phần gây nhiễu của nền mẫu. Bên cạnh chiết tách, các thành phần cần phân tích trong mẫu thường cần làm giàu để có thể xác định bằng kỹ thuật lựa chọn. Trong lĩnh vực chuyển hóa, tất cả các phân tử nhỏ được coi là đối tượng cần chiết, chỉ có muối và các cao phân tử như protein hay các peptid lớn được coi là thành phần nền của mẫu. Vì vậy, giai đoạn tiền xử lý mẫu cần thật đơn giản và phổ quát. Bất chấp các nỗ lực, mỗi bước tiền xử lý mẫu ít nhiều đều làm mất thành phần cần phân tích. Đặc biệt, hiệu suất chiết các thành phần phân cực mạnh từ các nền mẫu nước thường rất thấp. Các phương pháp chuẩn bị và tiền xử lý các mẫu sinh lý phổ biến là: Nhập mẫu trực tiếp, trích ly lỏng-lỏng (LLE), trích ly pha rắn (SPE), trích ly siêu tới hạn, trích ly với hỗ trợ vi sóng, kết tủa peptid, các phương pháp màng như thẩm lọc hay siêu ly tâm. Kỹ thuật phân tích các thành phần dễ bay hơi trong mẫu là một thách thức lớn. Tiền xử lý mẫu với các phương pháp thông dụng như SPE thường không chiết được hết các chất cần phân tích và chúng còn bị mất thêm ở các giai đoạn làm giàu mẫu tiếp theo [1].

Hiện tại các kỹ thuật phân tích được nỗ lực phát triển theo hướng giảm tới hoàn toàn không sử dụng dung môi cũng như các giai đoạn tiền xử lý mẫu riêng biệt như tạo dẫn xuất. Nỗ lực này không chỉ giảm nguồn sai số mà còn giảm thời gian và chi phí phân tích [2]. Các kỹ thuật làm giàu mẫu không sử dụng dung môi có thể kể là: Headspace (HS), Purge-and-Trap (P&T), bơm trực tiếp (DAI), các kỹ thuật trích ly pha rắn như SPME, INCAT, discs, tubes,….

Các bẫy kim (needle trap devices – NTD) được coi là thiết bị tiền xử lý mẫu tiềm năng do kết hợp đồng thời các ưu thế của kỹ thuật SPE và SPME [3]. Thiết bị này chỉ cần bộ bơm mẫu GC được sấy nóng [4], mức độ đồng bộ với GC cao hơn so với SPME. Sử dụng bẫy kim với một chất hấp phụ như Carboxen hay divinylbenzen thể hiện ưu thế trong lĩnh vực quan trắc môi trường (ví dụ như phân tích BTEX và các alkan) [5-8]. Tuy nhiên, bẫy kim chỉ chứa một chất hấp phụ không đáp ứng được nhu cầu phân tích các mẫu chứa nhiều thành phần có độ phân cực và mức độ bay hơi trong vùng rộng. INCAT là một loại NTD phát triển bởi Kubinec và cộng sự [6,9,10]. Thiết bị này ổn định hơn hầu hết các NTD hay sợi SPME mà vẫn cung cấp các kết quả tương đương [10].

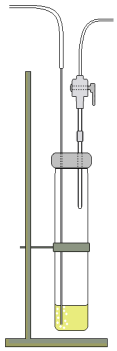
Theo y học hiện đại, phân tích các mẫu sinh lý như máu, nước tiểu, mô, dịch, khí từ cơ thể sẽ cung cấp đủ thông tin cần thiết cho chẩn đoán và theo dõi quá trình phát triển, điều trị bệnh [11]. Các công trình đã công bố tập trung phân tích sản phẩm chuyển hóa với hỗ trợ của các chất chuẩn hoặc cơ sở dữ liệu sản phẩm chuyển hóa. Tuy nhiên, cơ sở dữ liệu các sản phẩm chuyển hóa mới chỉ bao gồm một phần rất nhỏ trong số các sản phẩm chuyển hóa sinh lý từ người. Ước tính không tới 1% số sản phẩm chuyển hóa sinh lý được phân tích trong thực tế xét nghiệm hiện nay. Vì vậy nghiên cứu phát triển kỹ thuật hữu hiệu để phát hiện, định danh các chất chuyển hóa chưa xác định là một trong các trọng tâm của kỹ thuật phân tích các hợp chất dễ bay hơi. Sắc ký khí kết nối đầu dò FID hay MS là thiết bị cơ bản cho mục tiêu này. Đầu dò MS/MS còn ít được sử dụng do cần xác định nhiều thông số vận hành và chưa phổ biến các thư viện phổ MS/MS.

Báo cáo này trình bày kết quả phát triển và thử nghiệm thiết bị INCAT phù hợp chiết và làm giàu các sản phẩm chuyển hóa dễ bay hơi trong nước tiểu để phát hiện với GC-MS. Kết quả phân tích định lượng và đánh giá xác xuất thống kê sẽ được trình bày ở báo cáo sau.

2. THỰC NGHIỆM

Kim bằng vật liệu thép không gỉ, dài 80 mm, đường kính ngoài / đường kính trong 1,3/1,1 mm và 1,1/0,9 mm được dùng để chế tạo INCAT với

các chất hấp phụ. Chromosorb W với 20% SE-54 (80-100 mesh), Carbopack X (40-60 mesh) và Carboxen 1000 (80-100 mesh) của Sigma-Aldrich. Các n-alkan C_6-C_{16} là sản phẩm thương mại của Supelco. Các mẫu nước tiểu bệnh nhân mắc rối loạn chuyển hóa và người bình thường thu nhận tại Bệnh viện Trường Đại học Praha, bảo quản trong ống chứa sẵm màu trong tủ lạnh trước khi phân tích.



Hình 1. Dụng cụ thu nhận thành phần dễ bay hơi trong mẫu lỏng vào INCAT

Hình 1 mô tả dụng cụ thu nhận các thành phần dễ bay hơi từ mẫu nước vào INCAT. 10 ml mẫu nước được cho vào ống nghiệm thể tích 60 ml, đậy kín bằng septum. Tỷ lệ $V_{ống\ nghiệm}$ / $V_{mẫu}$ như vậy đảm bảo an toàn cho INCAT ngay cả khi có bọt hình thành trong quá trình lấy mẫu. INCAT được đâm xuyên qua septum để thu nhận mẫu khí. Các INCAT thử nghiệm được nhồi một hoặc nhiều lớp chất hấp phụ với các tỷ lệ thể tích khác nhau.

Để đánh giá hiệu năng của các sản phẩm INCAT trước khi thử nghiệm với mẫu nước tiểu thực, hỗn hợp hơi C_6-C_{16} n-alkan được bơm qua ống mao quản xuyên tới đáy ống nghiệm chứa 10 ml nước tinh khiết (khử ion), sử dụng bơm màng loại N86KT.18 (Neuberger Laboport).

10 ml mẫu nước tiểu được sục khí 500 ml khí N_2 tinh khiết qua ống mao quản xuyên tới đáy ống nghiệm tương tự như trên. Cần dùng N_2 tinh khiết để đảm bảo không làm mẫu nhiễm tạp chất trong quá trình.

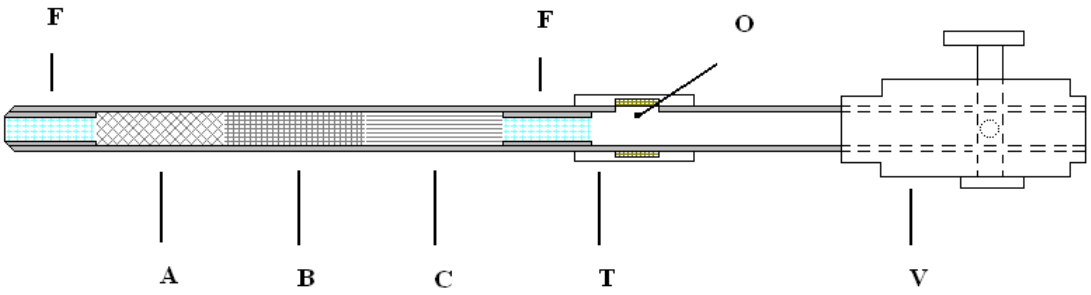
Khi kết nối INCAT với hệ thống GC, sử dụng liner kim loại chế tạo đặc biệt [6] hỗ trợ giải hấp các chất phân tích từ INCAT. Cấp mẫu ở chế độ không chia dòng (splitless), nhiệt độ buồng cấp mẫu (injector) 280°C, thời gian giải hấp mẫu từ INCAT 3 phút.

Sắc ký khí Network GC System 6890N kết nối đầu dò phổ khối 5973N MSD của hãng Agilent Technologies vận hành ở chế độ scan, sử dụng cột mao quản DB-1 dài 60 m, đường kính trong 0,32 mm với 5 µm pha tĩnh. Khí mang là Heli, cố định áp suất 121 kPa và nhiệt độ 280°C trong buồng cấp mẫu. Nhiệt độ cột ban đầu giữ nguyên 20°C trong 3 phút rồi tăng với tốc độ 10°C/phút lên tới 280°C rồi giữ cố định nhiệt độ này thêm 13 phút. Thu nhận và xử lý dữ liệu đo với phần mềm MSD ChemStation.

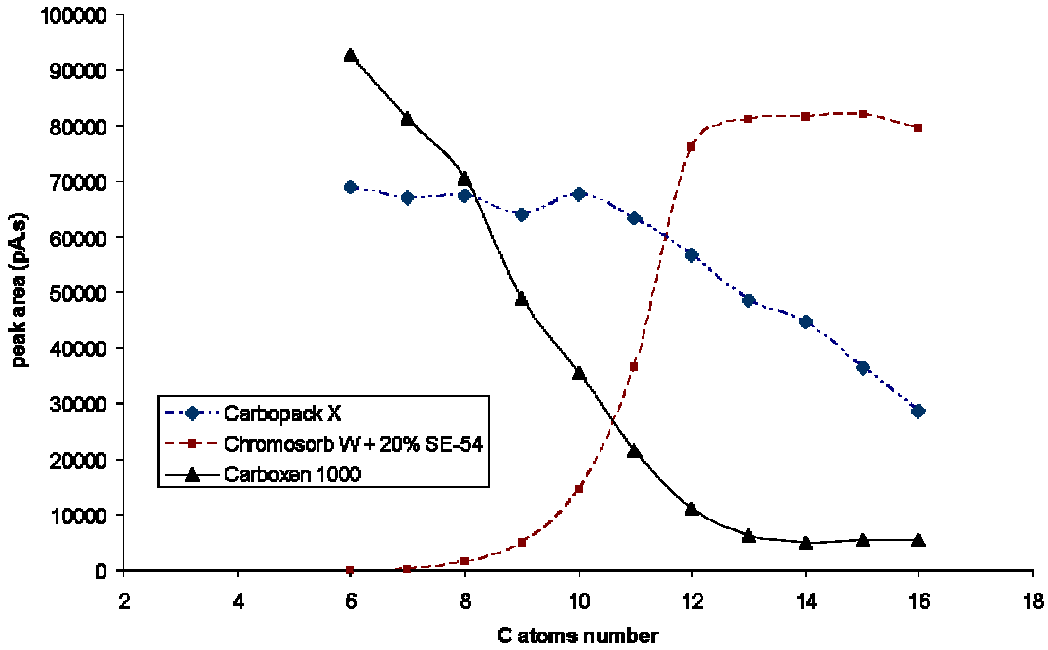
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Cấu trúc sản phẩm INCAT

INCAT được chế tạo từ kim thép không gỉ có chiều dài 80 mm, đường kính ngoài 1,3 mm, đường kính trong 1,1 mm. Cấu trúc sản phẩm INCAT thể hiện trên Hình 2: Một đầu kim được mài nhẵn để không cắt đứt septum gây tắc kim khi sử dụng, đầu còn lại đặt van đóng. Ở khoảng cách 30 mm từ đầu có van đóng, khoan một lỗ đường kính 0,6 mm (đánh dấu O) để đưa khí mang vào giải hấp phụ các chất phân tich từ INCAT. Hai đoạn kim thép không gỉ đường kính ngoài 1,1 mm, đường kính trong 0,9 mm, nhồi các hạt thủy tinh kích thước 0,125-0,200 mm, mỗi đoạn dài 5 mm (đánh dấu F) để giữ chất hấp phụ (đánh dấu A, B, C) bên trong INCAT. Khi nhập mẫu vào INCAT, lỗ O được bít lại bởi các ống Teflon (đảm bảo tính trơ hóa học) và silicon (đảm bảo kín).



Hình 2. Sơ đồ sản phẩm INCAT. F- Kim nhỏ nhồi hạt thủy tinh, A,B,C- chất hấp phụ (1 chất hoặc nhiều chất tỷ lệ khác nhau, trên hình thể hiện 3 chất với tỷ lệ thể tích 1:1:1), T- Ống Teflon và Silicon nút lỗ khoan, O- Lỗ khoan ngang, V-van đóng.



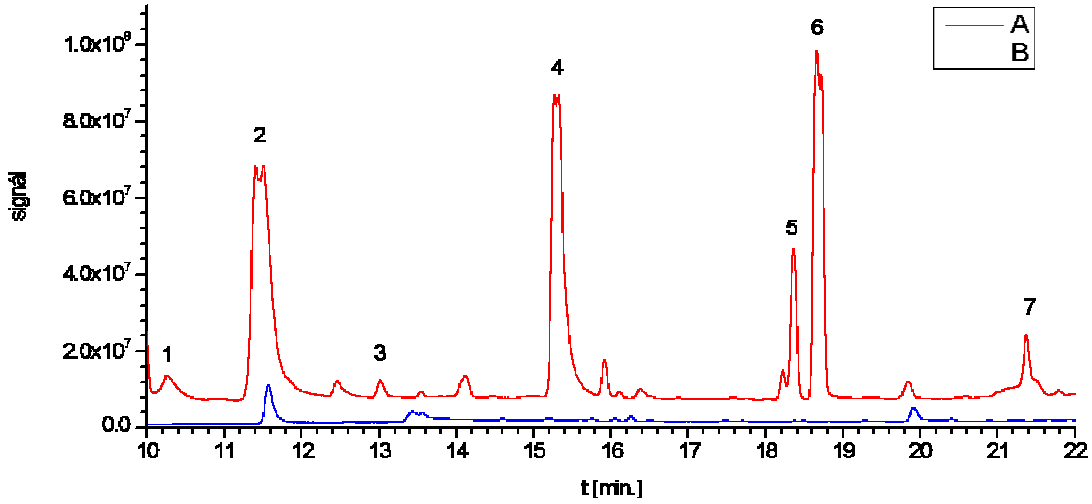
Hình 3. Diện tích các pik mẫu n-alkan C_6-C_{16} thu được với INCAT chứa một chất hấp phụ

3.2 Lựa chọn tổ hợp chất hấp phụ phù hợp

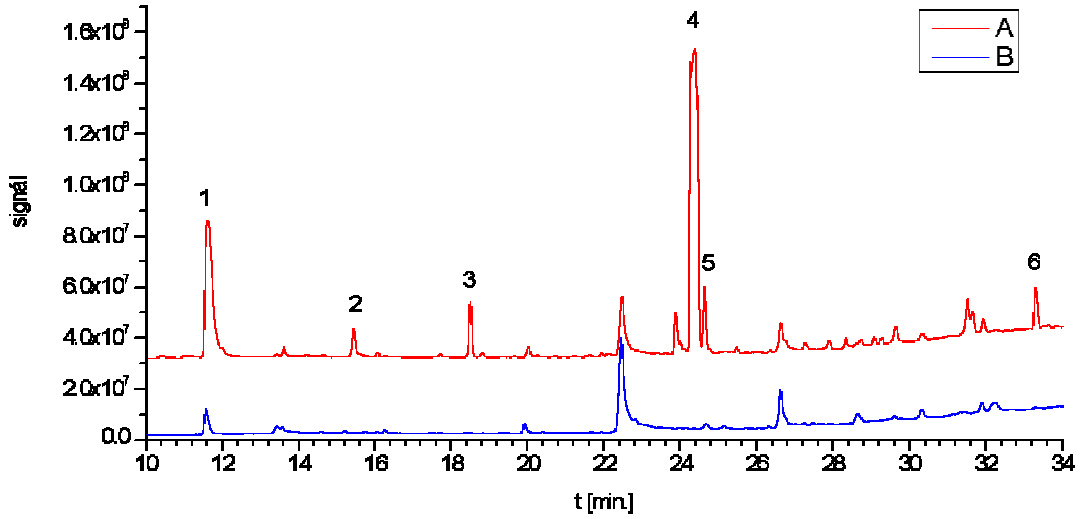
Trong quá trình nghiên cứu phát triển INCAT, nhiều loại chất hấp phụ đã được thử nghiệm nhồi riêng, nhồi kết hợp chung thành nhiều lớp vào INCAT. Với mẫu các khí không phân cực có mức độ bay hơi trong vùng rộng như hỗn hợp n-alkan C_6-C_{16}, các chất hấp phụ gốc than trong INCAT đã cho kết quả rất tốt. Tuy nhiên, chúng lại hấp phụ kém đối với các thành phần phân cực như rượu, aldehyd, ceton, … trong nước tiểu. Các thành phần phân cực này hấp phụ khá tốt lên Chromosorb W + 20% SE-54, Carbopack X và Carboxen 1000. Do đó khả năng 3 chất này hấp phụ các thành phần của hỗn hợp n-alkan được khảo sát.

Hình 3 thể hiện kết quả thu được với INCAT chỉ chứa 1 trong 3 chất hấp phụ nêu trên. Ở điều kiện thử nghiệm đã tiến hành, INCAT chỉ chứa Carboxen 1000 hấp phụ được hết các thành phần trong mẫu n-alkan nhưng không giải hấp được các n-alkan mạch dài. INCAT chỉ chứa Chromosorb W + 20% SE-54 giải hấp tốt các n-

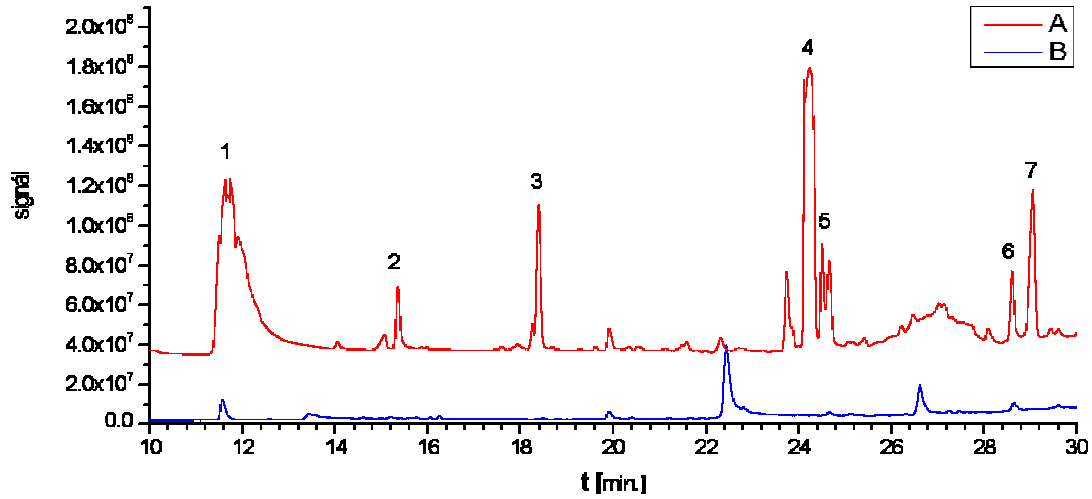
alkan mạch dài nhưng không hấp phụ được các n-alkan thấp hơn C_{12}. INCAT chỉ chứa Carbopack cho kết quả ở mức trung gian so với 2 loại trước. INCAT nhồi 3 lớp chất hấp phụ này với tỷ lệ thể tích 1 : 1 : 1 cho kết quả tốt nhất.



Hình 4. Sắc ký đồ các mẫu nước tiểu bệnh nhân rối loạn chuyển hóa (A) và mẫu so sánh (B); 1 – metanol, 2 – axeton, 3 – metylester axit axetic, 4 – butan-2-on, 5 – pentan-2-on, 6 – pentan-3-on, 7 – hexan-3-on.



Hình 5. Sắc ký đồ các mẫu nước tiểu bệnh nhân rối loạn chuyển hóa (A) và mẫu so sánh (B); 1 – axeton, 2 – butan-2-on, 3 – pentan-2-on, 4 - heptan-3-on, 5 – heptan-3-ol, 6 – cyclooctan



Hình 6. Sắc ký đồ các mẫu nước tiểu bệnh nhân rối loạn chuyển hóa (A) và mẫu so sánh (B); 1 – aceton, 2 – butan-2-on, 3 – pentan-2-on, 4 – heptan-3-on, 5 – heptan-3-ol, 6 – 4-metylphenol, 7 – axit valproic

Các hình 4, 5, 6 so sánh sắc ký đồ của các mẫu nước tiểu bệnh nhân mắc rối loạn chuyển hóa với của mẫu chuẩn (nước tiểu người không mắc rối loạn), thu được với INCAT nhồi 3 lớp chất hấp phụ Chromosorb W + 20% SE-54, Carbopack X và Carboxen 1000, thể tích 1 : 1 : 1. Sản phẩm INCAT nhồi 3 lớp chất hấp phụ nêu trên đã giúp chỉ ra trong các mẫu nước tiểu của bệnh nhân mắc rối loạn chuyển hóa có mức độ tăng đáng kể nồng độ nhiều ceton khác nhau tới hàng nghìn lần, thậm chí vượt quá giới hạn ghi nhận của đầu dò MS. Ngoài ra, mẫu nước tiểu của bệnh nhân ghi nhận trên Hình 4 còn có methanol và của bệnh nhân ghi nhận trên Hình 6 còn có cả axit valproic là hoạt chất thuốc thường dùng làm giảm các cơn động kinh.

4. KẾT LUẬN

Đã nghiên cứu phát triển và thử nghiệm thành công sản phẩm INCAT phục vụ mục đích phân tích các sản phẩm chuyển hóa dễ bay hơi trong nước tiểu. Tuy kỹ thuật INCAT phân tích các chất dễ bay hơi đã được mô tả trong một số công bố trước, bài báo này lần đầu tiên công bố kết quả phát triển kỹ thuật INCAT để phân tích các sản phẩm chuyển hóa dễ bay hơi trong nước tiểu, cho phép phân biệt rõ ràng mẫu nước tiểu của người bệnh với của người khỏe mạnh, xác định trực tiếp nhóm sản phẩm chuyển hóa dễ bay hơi mà không cần tạo dẫn xuất. Tối ưu hóa cấu trúc INCAT, thành phần các chất hấp phụ, qui trình lấy mẫu vào INCAT và cấp mẫu vào GC-MS đã cung cấp được một kỹ thuật hữu hiệu phân tích các sản phẩm chuyển hóa dễ bay hơi trong nền mẫu sinh lý phức tạp như nước tiểu.

Lời cảm ơn: *Nghiên cứu này thực hiện trong phạm vi dự án Nghiên cứu và phát triển hướng tới nhu cầu: Công viên Khoa học Đại học Komensky tại Bratislava ITMS 26240220086 đồng tài trợ bởi Quĩ Châu Âu Phát triển Vùng. Viện Hỗ trợ Nghiên cứu và Phát triển đồng tài trợ với các mã số dự án APVV-0416-10 và APVV-0061-11.*

Development of INCAT-GC-MS for analysis of metabolites in urine

- **Peter Podolec** [1]
- **Alexandra Hengerics Szabó** [1]
- **Viktória Ferenczy** [2]
- **Peter Kotora** [2]
- **Jaroslav Blaško** [2]
- **Róbert Kubinec** [2]
- **Stanislav Stuchlík** [3]
- **Martin Juriga** [4]
- **Radomír Čabala** [5,6]
- **Václav Bierhanzl** [5]
- **Ngo Manh Thang** [7,✉]

[1] *PríF UK, Šafárikovo námestie 6, 81499 Bratislava, Slovakia*

[2] *Chemický Ústav PríF UK, Mlynská dolina CH-2, 84215 Bratislava, Slovakia*

[3] *Katedra Molekulárnej Biologie PríF UK, Mlynská dolina CH-2, 84215 Bratislava, Slovakia*

[4] *Ústav Chemických a Hydraulických strojov a zariadení, SjF STU, Nám. Slobody 17, 81231 Bratislava, Slovakia*

[5] *Katedra Analytickej Chémie PríF UK, Albertov 6, 128 43 Praha 2, Czech Republic*

[6] *Ústav Súdnej Medicíny a Toxikologie, Univerzitná Nemocnica, U Nemocnice 2, 128 08 Praha 2, Czech Republic*

[7] *Ho Chi Minh city University of Technology, VNU-HCM, Vietnam*

ABSTRACT

This paper aims to develop a non-solvent microextraction technique using INCAT (Inside Needle Capillary Adsorption Trap) for GC-MS analysis of volatile metabolites in urine. INCATs with different sorbents were tested, resulting in an INCAT with 3 sorbent layers Chromosorb W+ 20% SE-54, Carbopack X and Carboxen 1000 (1 : 1 : 1), which proved to be the most suitable for differentiating and identifying volatile metabolites in urine samples of patients from those of healthy people.

Keywords: *Micro-extraction, INCAT, volatile organic traces, volatile organic metabolites in urine*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. K. Dettmer, P.A. Aronov, B.D. Hammock: Mass spectrometry-based metabolomics. Mass Spectrometry Reviews **26** (2007) 51-78.

[2]. H. Kataoka, A. Ishizaki, Y. Nonaka, K. Saito: Developments and applications of capillary microextraction techniques: A review. Analytica Chimica Acta **655** (2009) 8-29.

[3]. H.L. Lord, W. Zhan, J. Pawliszyn: Fundamentals and applications of needle trap devices: a critical review. Analytica Chimica Acta **677** (2010) 3-18.

[4]. I.Y. Eom, J. Pawliszyn: Simple sample transfer technique by internally expanded desorptive flow for needle trap devices. Journal of Separation Science **31** (2008) 2283-2287.

[5]. I.Y. Eom, V.H. Niri, J. Pawliszyn: Development of a syringe pump assisted dynamic headspace sampling technique for needle trap device. J. Chrom. A., **1196–1197** (2008) 10-14.

[6]. H. Jurdáková, R. Kubinec, M. Jurčišinová, Ž. Krkošová, J. Blaško, I. Ostrovský, L. Soják, V.G. Berezkin: Gas chromatography analysis of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes using newly designed NTD in aqueous samples. J. Chrom. A **1194** (2008) 161-164.

[7]. V.H. Niri, I.Y. Eom, F.R. Kermani, J. Pawliszyn: Sampling free and particle-bound chemicals using SPME and NTD simultaneously. J. Sep. Sci. **32** (2009) 1075-1080.

[8]. J.A. Koziel, M. Odziemkowski, J. Pawliszyn: Sampling and analysis of airborne particulate matter and aerosols using in-needle trap and SPME fiber devices. Analytical Chemistry **73** (2001) 47-54.

[9]. R. Kubinec, V.G. Berezkin, R. Górová, G. Addová, H. Mračnová, L. Soják: Needle concentrator for gas chromatographic determination of BTEX in aqueous samples. Journal of Chromatography B **800** (2004) 295-301.

[10]. P. Přikryl, R. Kubinec, H. Jurdáková, J. Ševčík, I. Ostrovský, L. Soják, V. Berezkin: Comparison of needle concentrator with SPME for GC determination of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes in aqueous samples. Chromatographia **64** (2006) 65-70.

[11]. T.H. Risby: Current Status Of Clinical Breath Analysis. In Anton Amann, David Smith: Breath Analysis for Clinical Diagnosis and Therapeutic Monitoring. Singapore: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd, 2005. ISBN: 981-256-284-2, 251-265.

[12]. K.J. Kewal The Handbook of Biomarkers. 1st ed. New York; Dordrecht, Heidelberg, London: Springer, 2010, ISBN 978-1-60761-684-9, 11.