

XÁC ĐỊNH ĐỒNG THỜI DƯ LƯỢNG KHÁNG SINH CHLORAMPHENICOL (CAP), FLORPHENICOL (FF), THIAMPHENICOL (TAP) TRONG MỘT SỐ SẢN PHẨM ĐỘNG VẬT BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG KHỐI PHỔ (LC-MS/MS)

Phạm Kim Đăng¹, Vũ Thị Ngân¹, Phạm Hồng Ngân²

¹*Khoa Chăn nuôi và Nuôi trồng thủy sản, Đại học Nông nghiệp Hà Nội*

²*Khoa Thú y, Đại học Nông nghiệp Hà Nội*

Email: pkdang@hua.edu.vn*

Ngày gửi bài: 23.02.2014

Ngày chấp nhận: 25.03.2014

TÓM TẮT

Phương pháp sắc ký lỏng khối phổ đã được nghiên cứu để phát hiện đồng thời tồn dư nhóm phenicol gồm chloramphenicol (CAP), thiamphenicol (TAP) and florfenicol (FF) trong một số sản phẩm có nguồn gốc động vật (thịt lợn, thịt gà, tôm và cá). Nghiên cứu đã tiến hành tối ưu hóa điều kiện tách chiết lỏng-lỏng và chiết pha rắn, tiếp theo các thông số thẩm định độ chính xác phương pháp cũng được xác định thông qua các mẫu cùng cố các chất chuẩn ở các nồng độ quan tâm. Kết quả cho thấy, độ thu hồi TAP, FF và CAP tương ứng dao động từ 83 đến 105%; từ 91,2 đến 103,1% và từ 83,0 đến 99,2% với độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của ba lần lặp lại bé hơn 4,3%. Giới hạn định lượng (LOQ) nằm trong khoảng 0,01 đến 0,3 ng/g, không chỉ đối với cả ba chất chuẩn được thử, cho phép phân tích các kháng sinh này trong sản phẩm động vật ở mức vết. Phương pháp này có thể được ứng dụng để phân tích các chất trong nhóm phenicol tồn dư trong một số loại thịt động vật có trên thị trường.

Từ khóa: Dư lượng kháng sinh phenicol, phương pháp sắc ký lỏng khối phổ, sản phẩm động vật

A Method for The Simultaneous Determination The Residues of Chloramphenicol (CAP), Florfenicol (FF) and Thiamphenicol (TAP) in Animals Products by Liquid Chromatography- Tandem Mass Spectrometry (LS-MS/MS)

ABSTRACT

High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Assay was employed for the determination of phenicol residues including chloramphenicol (CAP), thiamphenicol (TAP) and florfenicol (FF) in some animal products (pork, chicken meat, shrimp and fish). In this study, the liquid-liquid extraction and solid phase were optimized and then the method accuracy parameters were evaluated by analyzing the spiked samples at three different interest levels for each standard. The results showed that, the recoveries of TAP, FF and CAP ranged from 83 to 105% and 91.2 to 103.1% and 83.0 to 99.2%, respectively, with the relative standard deviation (RSD) of triplicates lower than 4.3%. The limits of quantification (LOQ) ranged from 0.01 ng/g to 0.3 ng/g not only for CAP but also for TAP and FF, allowing the analysis of trace levels of these antibiotics in animal products. The method can be applied to the phenicol residues analysis in several animal products available in the market.

Keywords: Phenicol residues, animal products, High Performance Liquid Chromatography - Mass Spectrometry method

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Kháng sinh đã và đang đóng vai trò quan trọng trong chăn nuôi và nuôi trồng thủy sản, không chỉ để phòng và trị bệnh mà còn được

dùng ở liều thấp nhằm kích thích sinh trưởng (McEvoy, 2002; Phạm Kim Đăng và cs., 2012, Dang et al., 2013). Tuy nhiên, việc lạm dụng, sử dụng bất hợp pháp hoặc sử dụng sai nguyên tắc thuốc thú y nói chung và kháng sinh nói riêng

Xác định đồng thời dư lượng kháng sinh chloramphenicol (CAP), florphenicol (FF), thiamphenicol (TAP) trong một số sản phẩm động vật bằng phương pháp sắc ký lỏng khối phổ (LC-MS/MS)

trong chăn nuôi và nuôi trồng thủy sản đã gây hiện tượng kháng thuốc hoặc tồn dư thuốc trong sản phẩm, ảnh hưởng xấu đến sức khỏe cộng đồng, môi trường cũng như hiệu quả điều trị bệnh (Alali, 2009; Bogaard and Stobberingh, 2000). Chính vì vậy, để tăng cường kiểm soát dư lượng thuốc, các nước phát triển đã có những qui định rất chặt chẽ và kiểm soát nghiêm ngặt. Chẳng hạn, EU đã ban hành quyết định số 2377/90 EC nay được thay bằng quyết định 37/2010 quy định giới hạn tồn dư thuốc thú y cho phép trong sản phẩm động vật (CE, 1990; 2010).

Do có phổ kháng khuẩn rộng và khả năng phân bố tốt vào các mô trong cơ thể nên nhóm phenicol được dùng phổ biến và rất hiệu quả trong thú y và nhân y (Wang et al, 2012; Phạm Khắc Hiếu và Lê Thị Ngọc Diệp, 1997). Tuy nhiên, từ khi phát hiện những độc tính của chloramphenicol (CAP) lên cơ quan tạo máu (có thể gây thiếu máu không tái tạo, không phục hồi do suy tủy, gây tử vong) nên từ năm 1990 Ủy ban Châu Âu đã cấm sử dụng CAP trong thú y (EU, 1990; Bộ NN&PTNT, 2009a). Trong khi đó, hai kháng sinh cùng nhóm còn lại là Thiamphenicol (TAP) và Florfenicol (FF) vẫn được phép sử dụng trong chăn nuôi và nuôi trồng thủy sản (Bộ NN&PTNT, 2009b) nhưng có qui định giới hạn tồn dư tối đa cho phép (Bộ Y tế, 2007; 2013, USDA, 2012).

Phân tích nhóm kháng sinh trong các nền mẫu sinh học (có nguồn gốc từ động vật) trước đây đã được nhiều tác giả nghiên cứu, có thể kể đến như: Xác định định tính theo phương pháp vi sinh vật (Phạm Kim Đăng và cs., 2007; Bogaerts and Wolf, 1980; Myllyniemi et al., 1999), bán định lượng bằng phương pháp ELISA, định lượng bằng phương pháp quang phổ hấp thụ phân tử (Chukwuenweniwe et al., 2003), phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (Nguyễn Minh Đức, 2006; Al-Rimawi and Maher, 2011; Robert and Fischer, 1978)... Trong những năm gần đây, kỹ thuật sắc ký khối phổ đang được nghiên cứu và áp dụng đối với nhóm kháng sinh phenicol, nhưng khi chloramphenicol đang dần được thay thế bằng những kháng sinh thế hệ mới như TAP và FF đã kéo theo xu hướng phát triển phương pháp

phân tích và định lượng, không chỉ dừng lại ở phân tích riêng CAP mà còn áp dụng với cả các kháng sinh cùng nhóm (Barbara et al., 2002; James et al., 2003; Zhao and Carol, 2004; Rebecca et al., 2006).

Để kiểm soát tồn dư kháng sinh nói chung và kháng sinh nhóm phenicol nói riêng, đã có nhiều phương pháp phân tích được khuyến cáo sử dụng. Nhưng với tính ưu việt và chính xác nên chỉ các phương pháp phân tích sắc ký khối phổ mới được coi là phương pháp phân tích khẳng định, có giá trị pháp lý để phát hiện và định lượng, đặc biệt đối với nhóm chất cấm hoặc các chất cần được kiểm soát ở lượng vết hay siêu vết như chloramphenicol (CAP) (EC, 2002). Tuy nhiên, do tích chất phức tạp, tính đặc hiệu của phương pháp nên việc ứng dụng, vận hành ổn định và giá thành phân tích luôn là thách thức đối với người làm công tác phân tích. Để giảm thiểu chi phí phân tích xu hướng chung của các nước là phát triển và chuẩn hóa các phương pháp phân tích, có khả năng phát hiện và định lượng đồng thời nhiều chất trong một lần phân tích. Hiện nay, đã có rất nhiều công bố và qui trình phân tích CAP trong sản phẩm động vật bằng phương pháp LC/MS-MS nhưng rất ít công bố về việc ứng dụng phân tích này để phân tích đồng thời các kháng sinh nhóm phenicol, đặc biệt đồng thời trên các loại mẫu khác nhau.

Vì vậy, để góp phần nâng cao năng lực phân tích vào chiến lược kiểm soát dư lượng kháng sinh ở nước ta, việc nghiên cứu tối ưu và chuẩn hóa các phương pháp phân tích nói chung và phương pháp khẳng định lý hóa nói riêng như phương pháp sắc ký lỏng khối phổ là rất cần thiết. Nghiên cứu này thực hiện nhằm tối ưu hóa phương pháp sắc ký lỏng khối phổ LC/MS/MS có khả năng xác định đồng thời các kháng sinh chính trong nhóm phenicol tồn dư trong một số thực phẩm tươi sống chính được bán trên thị trường Hà Nội.

2. VẬT LIỆU, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nội dung nghiên cứu

- Tối ưu hóa điều kiện phân tích CAP, FF, TAP trên máy LC-MS/MS,

- Tối ưu hoá điều kiện xử lý mẫu,
- Thẩm định phương pháp phân tích thông qua việc phân tích mẫu củng cố chất chuẩn và thử nghiệm phân tích mẫu thực tế.

2.2. Nguyên vật liệu và hóa chất

Kháng sinh chuẩn thuộc nhóm phenicol gồm có: CAP; FF và TAP do hãng Sigma cung cấp. Etylaxetat, amoniaxetat, n-hexan, hetanol, axit axetic, axeton và axetonitril do Merk cung cấp.

Nước cất hai lần được làm sạch và loại ion qua hệ thống Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). Toàn bộ các dung dịch chuẩn bị cho chạy sắc ký đều được lọc qua màng lọc nylon 0,45µm trước khi đưa vào cột.

2.3. Thiết bị

Hệ thống sắc ký lỏng khối phổ khối phổ LC/MS/MS bao gồm: HPLC 20 AXL Shimadzu và khối phổ ABI 5500 QQQ Applied Biosystem. Cột sắc ký C₁₈ của Water (150mm × 4,6mm × 5µm).

Hai loại cột chiết pha rắn dùng cho khảo sát gồm C18 và Floresil

2.4. Các dung dịch chuẩn và dung dịch nghiên cứu

Các chất chuẩn CAP, TAP và FF được pha trong methanol ở nồng độ 1µg/ml và bảo quản trong tủ lạnh ở 0 - 4°C. Dung dịch nghiên cứu pha loãng từ dung dịch gốc (1µg/ml) bằng nước cất.

2.5. Phương pháp lựa chọn nền mẫu cho khảo sát phương pháp

Các đối tượng nghiên cứu: thịt gà, thịt lợn, cá (gồm cơ và da) và tôm. Các đối tượng này sẽ được phân tích những thành phần chính để lựa chọn ra nền mẫu đại diện cho khảo sát phương pháp, sau đó dùng phương pháp đó kiểm tra lại trên những nền mẫu còn lại.

2.6. Tách chiết, làm giàu và tinh sạch mẫu

Sau khi mẫu đã được đồng nhất và lựa chọn các dung môi khảo sát, tiến hành cân 10g mẫu cho vào ống ly tâm 50ml, chất chuẩn, sau đó thêm 20ml dung môi, vortex và lắc trong khoảng 5 phút. Tiếp theo đem ly tâm ở 6.000

v/phút trong 5 phút, gạn thu dịch chiết sang một ống ly tâm khác. Chiết lặp lại một lần nữa với 10ml dung môi. Gộp dịch chiết hai lần cho vào bình cô quay 100ml, cô quay tới cạn ở 40°C. Sau đó hòa tan lại bằng dung dịch NH₄OOCCH₃ 4%.

Do dịch chiết từ nền mẫu sinh học thường chứa nhiều tạp chất như lipid, các axit béo, amin, rượu... nên nghiên cứu này lựa chọn chiết pha rắn để loại bỏ các tạp chất này cũng như để làm sạch dịch chiết. Tuy nhiên, do các đối tượng mẫu khảo sát thường có hàm lượng lipid sau bước làm giàu sơ bộ khá cao nên trước khi nạp mẫu qua cột chiết pha rắn, 10ml n-hexan đã được dùng để loại chất béo chiết, lặp lại hai lần với dung dịch thu được ở trên.

Quá trình chiết pha rắn, nghiên cứu khảo sát trên hai loại cột chiết C18 và cột Floresil với dung môi hoạt hóa và rửa giải là H₂O và methanol. Để tối ưu hóa thể tích rửa giải, nghiên cứu này sử dụng methanol làm dung môi rửa giải và khảo sát ở bốn mức thể tích là 1, 2, 3 và 4ml.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tối ưu hóa điều kiện phân tích CAP, FF, TAP trên máy LC-MS/MS

Trên cơ sở hiểu biết nhóm phenicol có khối lượng phân tử và độ phân cực trung bình, cùng với các thông tin của các nghiên cứu khác (Nguyễn Minh Đức, 2006; Nguyễn Văn Ri, 2009; Zhao and Carol, 2004), nghiên cứu đã tiến hành khảo sát xác định nhóm chất này trên hệ thống MS của phòng thí nghiệm bằng kỹ thuật ion hóa phun điện tử ESI với chế độ bắn phá ion âm. Để

Bảng 1. Điều kiện chạy nguồn ion hóa ESI

Thế phun điện từ 4,0 kV
Nhiệt độ đầu phun (IS) 300°C
Khí màn (CUR) 30
Khí va chạm (CAD) 7
Nguồn khí ion 1 (GS1) 20
Nguồn khí ion 2 (GS1) 10
Thế phân nhóm (DP) -100
Thế đầu vào (Entrance Potential) (EP) -10

Xác định đồng thời dư lượng kháng sinh chloramphenicol (CAP), florphenicol (FF), thiamphenicol (TAP) trong một số sản phẩm động vật bằng phương pháp sắc ký lỏng khối phổ (LC-MS/MS)

tối ưu hóa điều kiện khối phổ, dùng xi lanh 500µl bơm từng chuẩn CAP và FF, TAP 10 ng/ml vào detector để khảo sát. Chọn chế độ khảo sát tự động đối với từng chất, tối ưu hóa từng ion mẹ, kết quả nghiên cứu đã cho thấy điều kiện chạy nguồn ion hóa ESI tối ưu nhất như sau:

Khảo sát điều kiện bắn phá và phân mảnh tạo các ion con cho kết quả ở bảng 2.

Trên cơ sở kết quả tối ưu tự động trên máy (kết quả trung bình của 5 lần lặp lại), nghiên cứu đã chọn được các điều kiện tối ưu chạy khối phổ và lựa chọn ion con của chất phân tích để định tính và định lượng (Bảng 3).

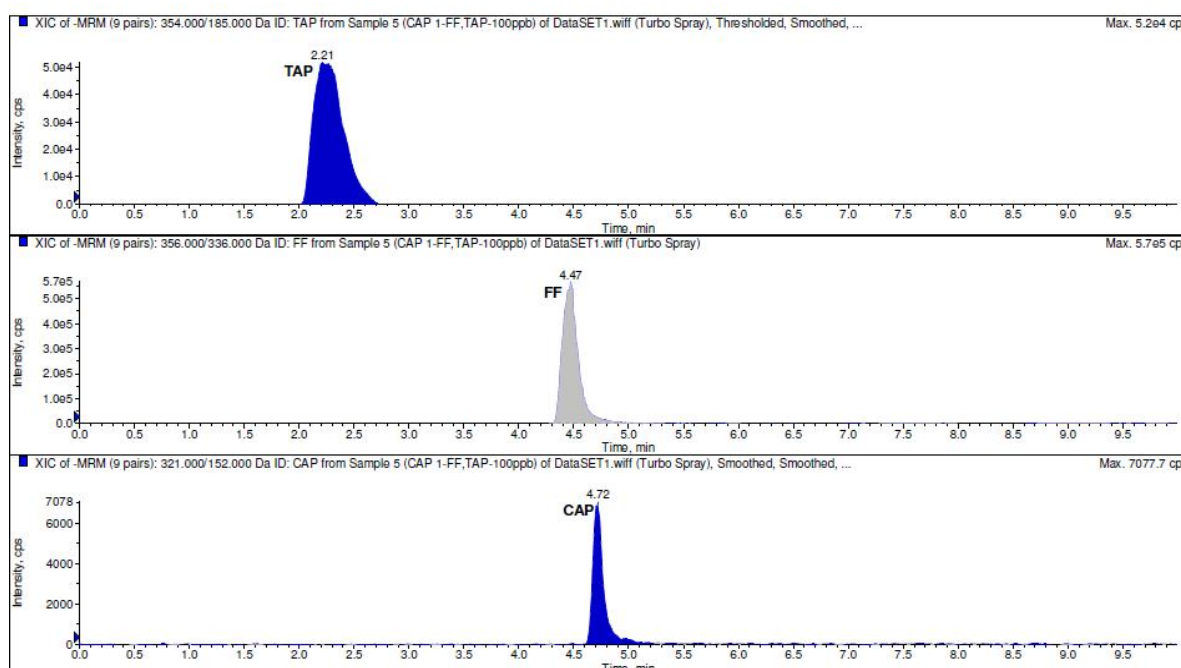
Bảng 2. Điều kiện bắn phá và phân mảnh tạo các ion con

Thông số khảo sát	Khoảng khảo sát	Bước quét (step)
Số mảnh quét với mỗi chất	5 mảnh cho tín hiệu cao nhất	-
Thế phân nhóm (DP)	Từ -150 đến -1 (V)	5 (V)
Năng lượng va chạm (CE)	Từ -130 đến -5 (V)	2 (V)
Năng lượng CXP	Từ -55 đến 0 (V)	2 (V)

Bảng 3. Các thông số tối ưu cho chạy khối phổ đối với nhóm phenicol

Chất phân tích	Ion mẹ	Mảnh khẳng định	Mảnh định lượng	DP (V)	CE (V)	CXP (V)
CAP (323,13)	320,972	257,192	152,221	-100	-22	-11
TAP (356,20)	354,200	290,000	184,900	-100	-24	-12
FF (358,21)	355,926	185,100	336,000	-100	-12	-25

Chú thích: DP: Thế phân nhóm (Declustering Potential), CE: Năng lượng va chạm (Collision Energy) và CXP: Năng lượng CXP (Collision Cell Exit Potential)



Hình 1. Phổ khối của ba chất nhóm phenicol trên hệ LC/MS nghiên cứu

3.2. Tối ưu các điều kiện sắc ký

3.2.1. Lựa chọn cột phân tách

Các chất nhóm phenicol có độ phân cực trung bình, đồng thời theo khuyến cáo của nhà sản xuất thiết bị khối phổ thì hệ pha động sử dụng an toàn với thiết bị là các dung môi phân cực và phân cực vừa như methanol, axetonitril, nước, axit formic (0 đến 1%), amoniacetat (0 tới 1%)... Hơn nữa, hệ dung môi phân cực thường có tính kinh tế cao, phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm. Do đó, nghiên cứu này đã lựa chọn cột tách pha đảo. Hai cột được sử dụng trong nghiên cứu gồm: cột Symestry Shield C18 của Water (150mm x 4,6mm x 5mm) và tiền cột Symestry C18 của Water (20mm x 3,9mm x 5mm).

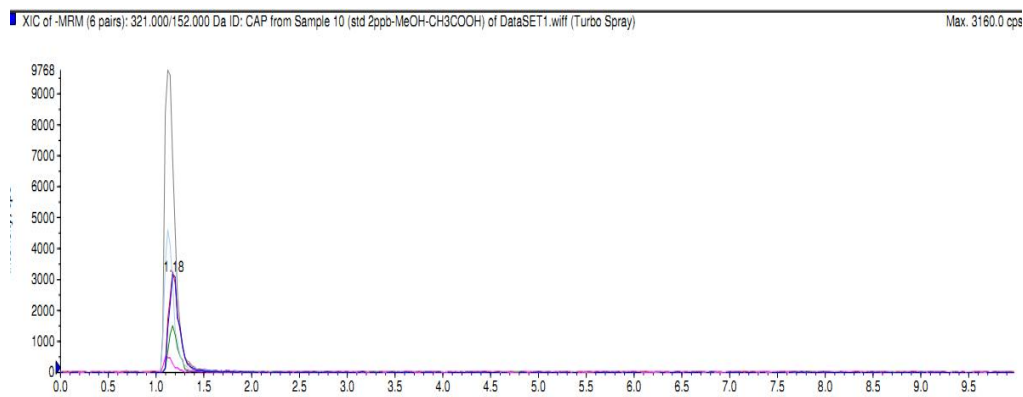
3.2.2. Hệ pha động và chương trình gradient

Trong phương pháp sắc ký lỏng khối phổ, pha động không chỉ ảnh hưởng tới quá trình tách các chất mà nó còn ảnh hưởng tới quá trình

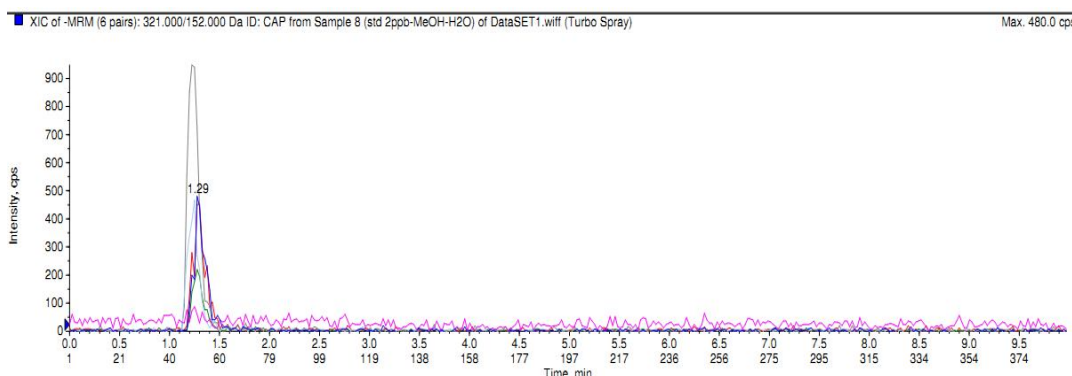
ion hóa và tín hiệu của chất phân tích. Với kỹ thuật ion hóa phun điện tử bắn phá ở chế độ ion âm, quá trình ion hóa sẽ tốt hơn khi có thêm các chất như axit axetic, axit formic... Trong nghiên cứu này đã dùng dung dịch chuẩn hỗn hợp CAP, TAP và FF nồng độ 2 ng/ml, cố định một số điều kiện chạy máy: Cột Symestry Shield Water C18 và tiền cột; Detector khối phổ (MS/MS) với các thông số tối ưu như đã mô tả ở bảng 1 và 2; tốc độ dòng (sau khi khảo sát các giá trị từ 0,1 đến 0,5 ml/phút) cho áp suất phù hợp trên cột được cố định ở 0,4 ml/phút. Đồng thời, trên cơ sở căn cứ lựa chọn dung môi đã nói tới ở trên, nghiên cứu tiến hành khảo sát:

- Hệ pha động kênh A lần lượt là axit axetic 0,1%, $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 0,1% trong nước, nước; kênh B lần lượt là methanol và axetonitril.

- Tỷ lệ pha động khảo sát theo hai chế độ: cố định tỷ lệ hai kênh của pha động và chế độ gradient quét từ 10% đến 100% kênh A về thể tích theo thời gian.



Hình 2. Hệ pha động khảo sát MeOH – CH_3COOH 0,1%



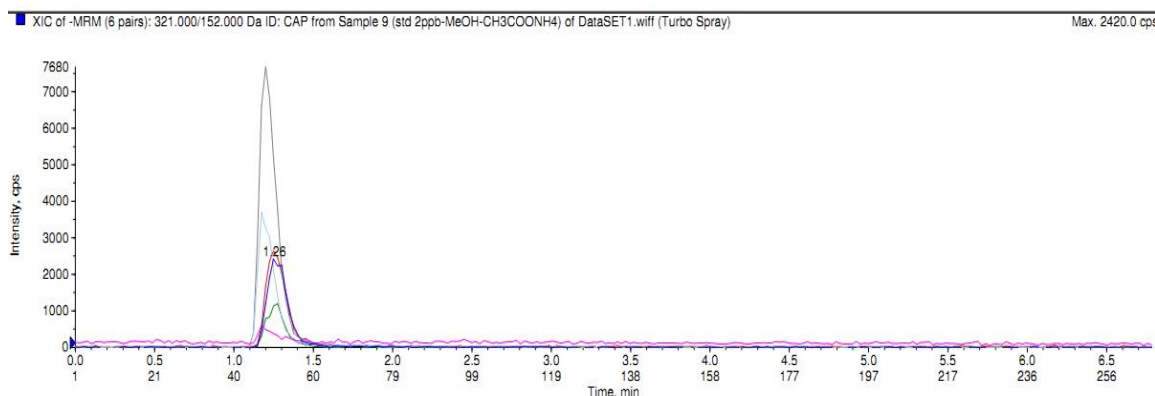
Hình 3. Hệ pha động khảo sát MeOH – H_2O

Xác định đồng thời dư lượng kháng sinh chloramphenicol (CAP), florphenicol (FF), thiamphenicol (TAP) trong một số sản phẩm động vật bằng phương pháp sắc ký lỏng khối phổ (LC-MS/MS)

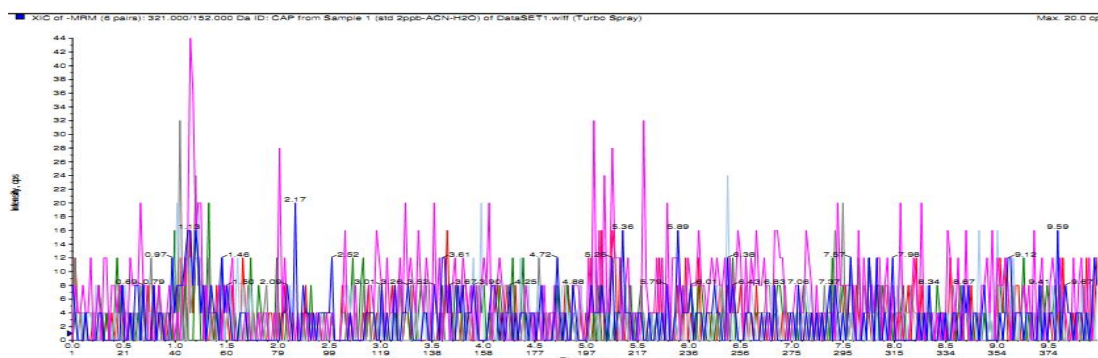
Hình ảnh sắc đồ (6 mảnh ion cho 3 chất – 2 mảnh ion con định lượng và định tính với mỗi chất) khảo sát với các hệ pha động như sau (Quá trình khảo sát ban đầu cố định tỉ lệ pha động kênh A: kênh B = 10:90 (v/v)).

Kết quả khảo sát hệ pha động cho thấy hệ MeOH – CH₃COOH 0,1% cho tín hiệu pic cao và

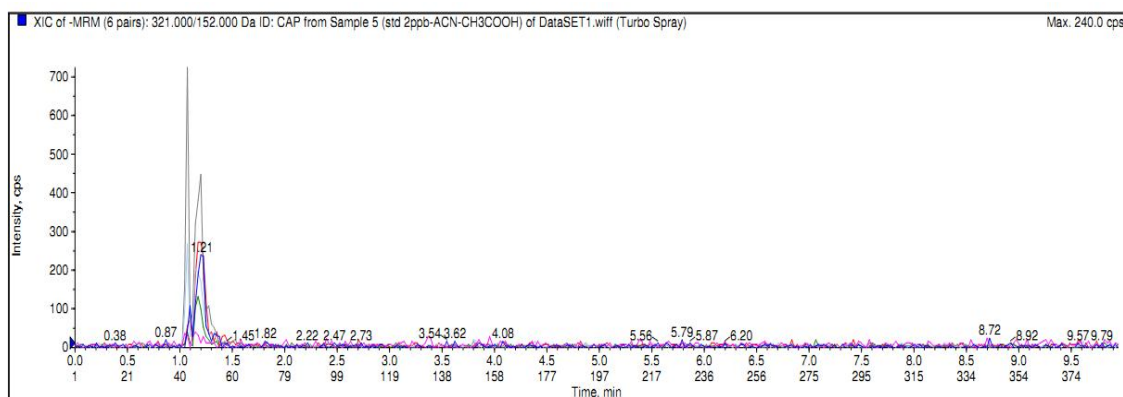
sắc nét nhất. Tuy nhiên ở tỉ lệ pha động này tất cả các pic đều chưa tách được khỏi nhau. Do đó nghiên cứu tiếp tục tiến hành khảo sát pha động ở các tỉ lệ khác, quét tỉ lệ kênh A từ 10 đến 90% về thể tích và khảo sát theo chương trình gradient để phát hiện điều kiện pha động cho hình ảnh sắc đồ và thời gian lưu phù hợp nhất.



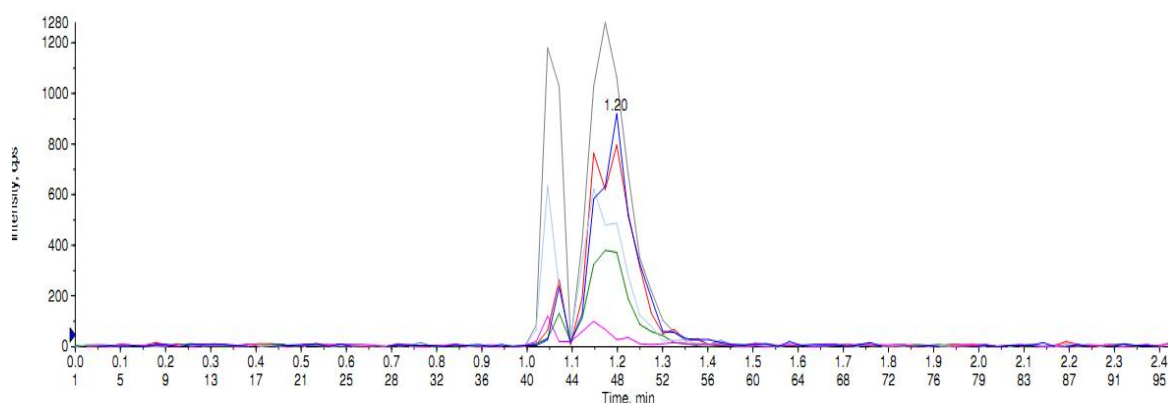
Hình 4. Hệ pha động khảo sát MeOH – CH₃COONH₄ 0,1%



Hình 5. Hệ pha động khảo sát ACN – H₂O



Hình 6. Hệ pha động khảo sát ACN – CH₃COOH 0,1%



Hình 7. Hệ pha động khảo sát ACN – CH₃COONH₄ 0,1%

Bảng 4. Hệ pha động và chương trình gradient tối ưu cho phân tích

Thời gian (phút)	Kênh B: Methanol	Kênh A: CH ₃ COOH 1%
0,01	20	80
4	100	0
6	100	0
6,01	20	80
10	20	80

Kết quả khảo sát cho hình ảnh các pic trên sắc đồ ổn định, tách khỏi nhau rõ ràng, pic nhọn và cho tín hiệu tốt nhất với hệ pha động và chương trình gradient như mô tả ở bảng 4.

3.3. Lựa chọn nền mẫu đại diện và phương pháp chiết mẫu

Để có cơ sở cho việc lựa chọn mẫu nền đại diện, các mẫu có bản chất khác nhau đã được phân tích xác định các thành phần cơ bản có ảnh hưởng chính đến hiệu quả tách chiết và kết quả phân tích. Bốn loại thực phẩm tươi sống có nguy cơ chứa dư lượng kháng sinh cao gồm thịt lợn, thịt gà, tôm và cá đã được lựa chọn để khảo sát bản chất nền. Trong nhóm đối tượng mẫu khảo sát, mẫu cá có độ dao động các chỉ tiêu thành phần cao hơn nhất (đặc biệt là hàm lượng lipid) (Bảng 5). Do đó, để có tính đại diện tốt, nghiên cứu này đã quyết định chọn nền mẫu cá cho các khảo sát về xử lý mẫu và đánh giá phương pháp. Sau đó có kiểm chứng lại trên các nền mẫu khác.

Qua tham khảo và tìm hiểu các đặc điểm của một số loại cá phổ biến, nghiên cứu này đã quyết định sử dụng cá mè được nuôi hoàn toàn bằng thức ăn tự nhiên, không sử dụng kháng sinh và hóa chất trong thời gian nuôi. Mẫu sau khi đã đồng nhất được lưu giữ trong điều kiện -20°C trong thời gian khảo sát.

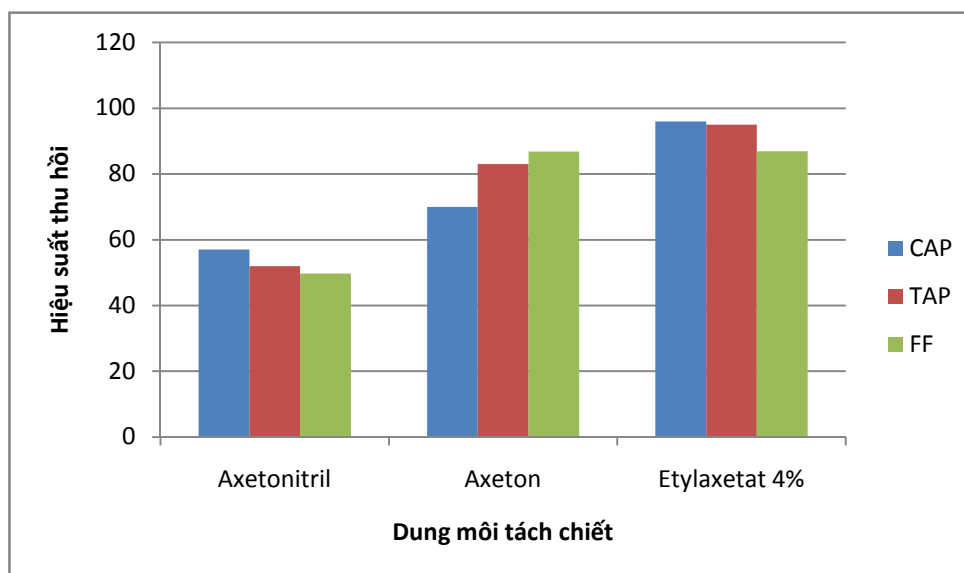
Căn cứ theo độ phân cực và một số đặc điểm hóa học của nhóm phenicol, 3 hợp chất được lựa chọn làm dung môi chiết ban đầu là etylaxetat, axeton và axetonitril. Kết quả đánh giá hiệu quả của các dung môi tách chiết được đánh giá thông qua hiệu suất thu hồi. Kết quả đánh giá cho thấy etylaxetat cho độ thu hồi đối với cả 3 chất là cao nhất (Hình 8). Điều này có thể giải thích là do dung môi này có độ phân cực trung bình và thấp nhất trong 3 dung môi khảo sát. Với dung môi này thì các thành phần cơ bản của nền mẫu là protein và khoáng, một phần nước và một phần lipid đã bị loại. Đồng thời độ chọn lọc của dung môi này với hợp chất tan trong nó cao hơn axeton và axetonitril.

Tuy nhiên, do các chất có độ phân cực tương đương như các chất màu, lipid... cũng bị chiết ly cùng. Do đó, sau khi làm bay hơi dung môi etylaxetat, nghiên cứu đã sử dụng CH₃COONH₄ 4% để hoàn tan phần cặn, đồng thời loại chất béo bằng n-hexan. Để đáp ứng yêu cầu nghiêm ngặt của quá trình sắc ký và detector khối phổ ở bước tiếp theo, nghiên cứu này đã sử dụng phương pháp tách chiết pha rắn để làm giàu và làm sạch các chất cần phân tích.

Xác định đồng thời dư lượng kháng sinh chloramphenicol (CAP), florphenicol (FF), thiamphenicol (TAP) trong một số sản phẩm động vật bằng phương pháp sắc ký lỏng khối phổ (LC-MS/MS)

Bảng 5. Một số thành phần chính của đối tượng mẫu phân tích (%)

Thành phần	Thịt gà	Thịt lợn	Tôm	Cá
Nước	69 - 75	70 - 75	50 - 80	48 - 85,1
Protein tổng số	20 - 24	19 - 25	19 - 23	10,3 - 24,4
Khoáng tổng số	2,3-3	1,8 - 2,5	1,3 - 1,8	1,5 - 8,6
Lipit tổng số	1- 9	5 - 8	0,3 - 1,4	5,1 - 15,4



Hình 8. Tương quan giữa hiệu suất thu hồi và dung môi tách chiết mẫu

3.4. Tối ưu quy trình tách và làm giàu trên cột chiết pha rắn

Cột chiết lựa chọn cho nghiên cứu là cột C18 (không phân cực) và cột Floresil (độ phân cực thấp). Qua tham khảo một số nghiên cứu trước đó về chloramphenicol, methanol và nước đã được chọn làm dung môi cho quá trình hoạt hóa và rửa giải trên cột chiết pha rắn. Kết quả cho thấy cột C18 tỏ ra hiệu quả vượt trội trong bước tinh khiết và làm giàu nhóm chất cần phân tích so với cột Floresil và thể tích methanol dùng cho bước rửa giải tối ưu là 3ml (Bảng 6).

Bảng 6. Kết quả khảo sát cột chiết pha rắn

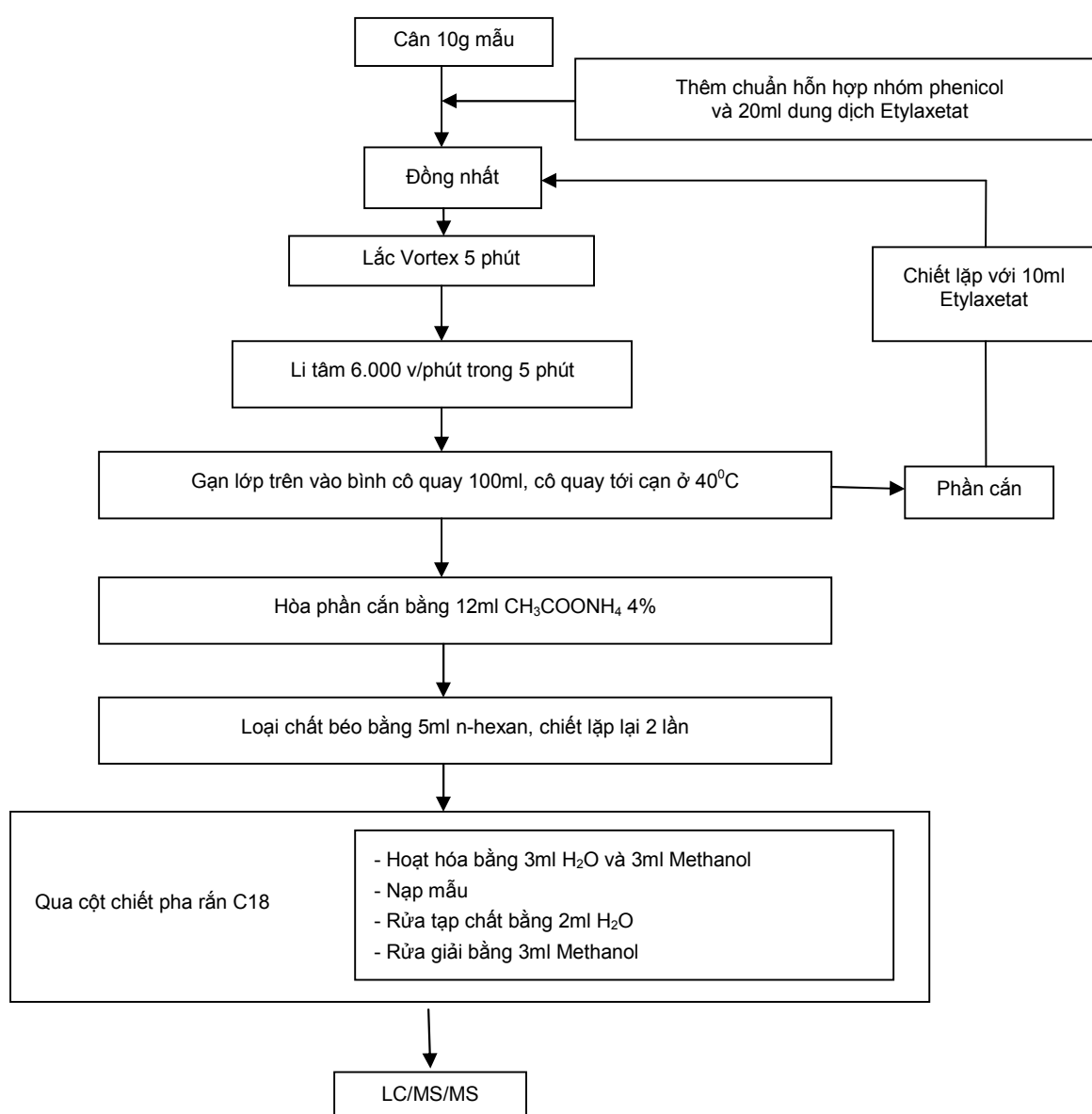
Hợp chất	Độ thu hồi (%)	
	Cột SPE C18	Cột SPE Floresil
CAP	91,0	4,0
TAP	96,2	3,8
FF	84,9	7,2

Trên cơ sở kết quả khảo sát, qui trình xử lý mẫu đã được tối ưu hóa và tóm tắt như mô tả ở hình 9.

3.5. Đường chuẩn và hiệu suất của phương pháp

3.5.1. Khoảng tuyến tính và khả năng phát hiện của phương pháp

Đường chuẩn sáu điểm được xây dựng bằng cách pha các chất chuẩn của nhóm phenicol trong nền mẫu trắng (mẫu cá) đã được chiết tách qua các dung môi và cột chiết pha rắn được lựa chọn sau quá trình khảo sát. Ở đây, do quy định về MRLs của các chất này khác nhau tương đối lớn nên vùng khảo sát khoảng tuyến tính của các chất sẽ có sự khác nhau để phù hợp với việc phát hiện chất này trên thực tế. Các giá trị này đều thấp hơn giá trị MRL quy định bởi Mỹ và EU đối với TAP và FF và thấp hơn yêu cầu khả năng phát hiện tối thiểu của phương pháp đối với CAP (MRPL).



Hình 9. Sơ đồ quy trình xử lý mẫu

Kết quả cho thấy phương pháp có khoảng tuyến tính rõ rệt (tất cả hệ số hồi qui tuyến tính đều dao động trong khoảng từ 0,99 đến dưới 1), cụ thể đối với CAP khoảng tuyến tính từ 0,5 đến 3 ng/g với hệ số hồi qui tuyến tính là 0,9994; TAP tương ứng là từ 2 đến 200 ng/g với 0,9953 và FF là từ 5 đến 300 ng/g với 0,9973 (Bảng 7).

Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của phương pháp tương ứng đối với CAP là 0,009 ng/g và 0,03 ng/g; đối với TAP là 0,1 ng/g và 0,3 ng/g và đối với FF tương ứng là 0,003 ng/g và 0,1 ng/g.

3.5.2. Độ lặp lại và hiệu suất thu hồi của phương pháp

Để đánh giá hiệu quả của phương pháp, nghiên cứu đã xác định độ thu hồi, độ lặp lại của phương pháp với các mẫu trắng và các mẫu trắng được củng cố các kháng sinh chuẩn ở ba mức nồng độ quan tâm (xung quanh nồng độ thấp nhất của khoảng tuyến tính). Kết quả cho thấy, phương pháp đáp ứng tốt với đồng thời cả ba chất nghiên cứu, độ thu hồi đều đạt trên 83% và độ lặp lại ổn định, giá trị RSD đều thấp hơn 5% (Bảng 8).

Xác định đồng thời dư lượng kháng sinh chloramphenicol (CAP), florphenicol (FF), thiamphenicol (TAP) trong một số sản phẩm động vật bằng phương pháp sắc ký lỏng khối phổ (LC-MS/MS)

Bảng 7. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính, đường chuẩn và khả năng phát hiện của phương pháp đối với kháng sinh nhóm phenicol

Hợp chất	Khoảng tuyến tính khảo sát (ng/g)	Phương trình đường chuẩn	R ²	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)
CAP	0.05 - 3	$y = 6 \times 10^{-5}x - 0,0256$	0,9994	0,009	0,03
TAP	2 - 200	$y = 3,8 \times 10^{-5}x - 3.2658$	0,9953	0,100	0,3
FF	5 - 300	$y = 4 \times 10^{-5}x - 4,1512$	0,9973	0,003	0,01

Chú thích: y là nồng độ chất phân tích, x là diện tích pic của chất đó trên sắc đồ; tại mỗi điểm chuẩn số phép đo được lặp lại 3 lần (n=3)

Bảng 8. Độ lặp lại và độ thu hồi của phương pháp

Chất phân tích	Các mức Spike (ng/g)	Độ thu hồi (%)	RSD (%) (n=6)
CAP	0,15	99,2	1,75
	0,30	92,2	4,18
	0,60	83,0	2,96
TAP	1,5	110,0	4,29
	3,0	83,1	2,84
	6,0	100,0	2,55
FF	3,0	91,2	4,31
	33	103,1	1,73
	66	102,1	1,78

Chú thích: RSD: độ lệch chuẩn tương đối

Sau khi nghiên cứu tối ưu phương pháp phân tích, phương pháp tách chiết mẫu nền đại diện, nghiên cứu đã thử áp dụng điều kiện tối ưu đó để thử với các nền mẫu khác (tôm, thịt gà, thịt lợn). Kết quả tiến hành khảo sát trên các nền mẫu trắng (tôm, thịt lợn, gà được nuôi bằng thức ăn tự nhiên và không sử dụng kháng sinh trong thời gian nuôi), phân tích lặp 3 lần và thu được độ thu hồi trên các nền mẫu này đều đảm bảo khả năng định lượng của phương pháp với độ thu hồi trung bình trên nền mẫu trắng (thịt lợn, gà, tôm) ở 3 mức nồng độ 0,5; 1 và 5 ng/g đều cao hơn 80%.

3.6. Kết quả phân tích một số mẫu thực tế

Kết quả phân tích 22 mẫu thịt (6 mẫu thịt lợn, 6 mẫu thịt gà, 5 mẫu tôm và 5 mẫu cá) lấy tại các chợ trên địa bàn các quận huyện Long Biên, Gia Lâm, Hoàng Mai, Đông Anh theo phương pháp đã được tối ưu phát hiện thấy 3/22 mẫu chứa chloramphenicol ở nồng độ dao động từ 0,02 đến 0,46 ng/g (một mẫu thịt lợn, một

mẫu thịt gà và 1 mẫu cá chứa dư lượng tương ứng là 0,46 ng/g; 0,19 ng/g và 0,02 ng/g) và 3/22 mẫu chứa FF (đặc biệt mẫu thịt lợn DAL6 có hàm lượng FF rất cao, vượt giới hạn tồn dư cho phép của EU).

Đặc biệt quan trọng trên các nền mẫu khác nhau, khi thêm chất chuẩn ở mức 1 ng/ml đều có độ thu hồi lớn hơn 80% và giá trị hồi qui tuyến tính đường chuẩn đều đạt yêu cầu (dao động trong khoảng từ 0,99 đến dưới 1).

Kết quả nghiên cứu này cho thấy phương pháp có độ lặp lại và độ tin cậy cao để phân tích đồng thời tồn dư kháng sinh nhóm phenicol trong một số loại thịt, tôm, cá. Nghiên cứu đã lựa chọn được các hóa chất cho quá trình xử lý mẫu là những loại có tính kinh tế cao, quy trình làm tinh khiết chất phân tích đảm bảo được tuổi thọ hoạt động của cột sắc ký, đồng thời cho giới hạn định lượng rất tốt (có giá trị tương đương hoặc thấp hơn các nghiên cứu gần đây cùng trên hệ LC/MS (Barbara et al., 2002; James et al., 2003; Zhao and Carol, 2004).

4. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu ban đầu về kỹ thuật sắc ký lỏng gắn khối phổ để phát hiện đồng thời tồn dư các kháng sinh thuộc nhóm phenicol bao gồm chloramphenicol, thiamphenicol và florfenicol trong một số sản phẩm động vật (thịt lợn, thịt gà, tôm và cá) đã cho thấy với các điều kiện tối ưu có thể đáp ứng một phương pháp khẳng định đáp ứng yêu cầu theo quyết định 2002/657/CE của ủy ban Châu Âu. Độ thu hồi đạt được với bản chất mẫu khác nhau (thịt, tôm và cá) tương đối cao, đối với hai kháng sinh TAP và FF được phép sử dụng trong chăn nuôi ở nồng độ gần giá trị tồn dư tối đa cho phép (MRL), độ thu hồi dao động trong khoảng từ 91,2 - 103,1% MRL (đối với FF) và từ 83 - 105% MRL (đối với TAP). Còn đối với CAP là kháng sinh cấm ở ba mức nồng độ cũng cố đều có độ thu hồi dao động từ 83,0 - 99,2% giá trị nồng độ yêu cầu khả năng phát hiện tối thiểu của phương pháp đối với CAP (MRPL). Đặc biệt, ở tất cả các nồng độ thử trong điều kiện tối ưu đều cho kết quả với độ lặp lại tốt (độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của các lần đo đều nhỏ hơn 5%). Phương pháp này có thể ứng dụng để phân tích các chất trong nhóm phenicol tồn dư trong một số thực phẩm tươi sống như thịt các loại, tôm, cá làm thức ăn cho con người.

Nghiên cứu có thể tiếp tục mở rộng trên các nền mẫu khác (gan, thận, tim...và một số loài thủy sản khác).

LỜI CẢM ƠN

Các tác giả xin chân thành cảm ơn sự phối hợp và tư vấn của Phòng thí nghiệm Phân tích thực phẩm, bộ môn Khoa học thực phẩm, khoa Thú y, Đại học Liège, Vương Quốc Bỉ. Một phần kinh phí của nghiên cứu được sử dụng từ Quỹ nghiên cứu khoa học trọng điểm cấp trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Alali, W. Q., Scott, H. M., Christian, K. L., Fajt, V. R., Harvey, R. B., Lawhorn, D. B. (2009). Relationship between level of antibiotic use and resistance among *Escherichia coli* isolates from integrated multi-site cohorts of humans and swine. *Prev Vet Med*, 90: 160-167.

- Al-Rimawi F. and Maher K. (2011). "Analysis of chloramphenicol and its related Compound 2-Amino-1-(4-nitrophenyl)propane-1,3-diol by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography with UV-Detection". *Chromatography Research International*, Vol 2011, Article ID 482308.
- Barbara K. N, Jeffrey A. H and Walter H. (2002). "LC/MS/MS Analysis of Chloramphenicol in Shrimp". FDA/ORA/DFS, No 4290.
- Bogaerts, R. and Wolf, F (1980). "A standardized method for the detection of residues of antibacterial substances in fresh meat – A report of the working group of the Scientific Veterinary Commission of the European Communities concerning a proposal for a common microbiological method, the so-called EEC four-plate method". *Fleischwirtschaft*, 60: 667-669.
- Bogaard van den A.E., and Stobberingh E.E. (2000). Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. *International journal of antimicrobial agents*. 14, 4(75): 327-335
- Bộ NN & PTNT (2009a). Quyết định số 15/2009/TT-BNN ngày 17 tháng 3 năm 2009, Danh mục một số hóa chất, kháng sinh cấm trong nhập khẩu, sản xuất, kinh doanh và sử dụng thuốc thú y.
- Bộ NN & PTNT (2009b). Thông tư 69/2010/TT-BNNPTNT ngày 03 tháng 12 năm 2010. Danh mục thuốc thú y, chế phẩm sinh học, vi sinh vật, hóa chất dùng trong thú y thủy sản được phép lưu hành tại Việt Nam.
- Bộ Y tế (2007). Quyết định 46/2007/QĐ-BYT ngày 19 tháng 12 năm 2007 của Bộ Y tế về việc ban hành "Quy định giới hạn tối đa ô nhiễm sinh học và hoá học trong thực phẩm".
- Bộ Y tế (2013). Thông tư số 24/2013/TT-BYT Ngày 14/8/2013 của Bộ y tế về việc "Quy định mức giới hạn tối đa dư lượng thuốc thú y trong thực phẩm".
- CE (Communauté Européenne) (1990). Règlement (CEE) N°2377/90 du Conseil du 26 juin 1990 établissant une procédure communautaire pour la fixation des limites maximales de résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments d'origine animale. *J. Off. Comm. Eur.*, L 224: 1.
- CE (Communauté Européenne) (2010). Commission Regulation No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. *Official Journal*, 15: 1-72.
- CE (Communauté Européenne) (2002). Décision N° 2002/657/CE du 12 août 2002 portant modalités d'application de la directive 96/23/CE du Conseil en ce qui concerne les performances des méthodes d'analyse et l'interprétation des résultats. *J. Off. Comm. Eur.*, 221: 8-36.

Xác định đồng thời dư lượng kháng sinh chloramphenicol (CAP), florphenicol (FF), thiamphenicol (TAP) trong một số sản phẩm động vật bằng phương pháp sắc ký lỏng khối phổ (LC-MS/MS)

- Chukwuenweniwe J E., Johnson S. and Sunday A A. (2003). "An alternative colorimetric method for the determination of chloramphenicol", *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2(2): 215-221.
- Dang Pham Kim, Claude Saegerman, Caroline Douny, Ton Vu Dinh, Bo Ha Xuan, Binh Dang Vu, Ngan Pham Hong, Marie-Louise Scippo (2013). First Survey on the Use of Antibiotics in Pig and Poultry Production in the Red River Delta Region of Vietnam. *Food and Public Health*. 3(5): 247-256
- Phạm Kim Đăng, Nguyễn Tú Nam, Bùi Thị Tho, Phạm Hồng Ngân (2012). Điều tra tình hình sử dụng kháng sinh trong chăn nuôi gà tại Hải Phòng. *Tạp chí khoa học và Kỹ thuật thú y, Hội thú y Việt Nam*. 19(5): 92-98.
- Phạm Kim Đăng, Marie-Louise Sippo, Guy Degand, Caroline Douny, Guy Maghuin-Rogister (2007). "Chuẩn hóa phương pháp sàng lọc định tính kiểm soát tồn dư kháng sinh trong thực phẩm có nguồn gốc động vật theo quy định số 2002/657/EC (bài tổng hợp)", *Tạp chí KHKT Nông nghiệp, ĐHN I*, 5(1): 24-30.
- Nguyễn Minh Đức (2006). *Sắc ký lỏng hiệu năng cao và một số ứng dụng vào nghiên cứu, kiểm nghiệm dược phẩm, dược liệu và hợp chất tự nhiên*, NXB Y học, Thành phố Hồ Chí Minh.
- Phạm Khắc Hiếu, Lê Thị Ngọc Diệp (1997). *Giáo trình dược lý học*, NXB Nông Nghiệp, Hà Nội.
- James S. S., Heidi S. R. and Jeffery A. H. (2003). "LC/MS/MS Analysis of Chloramphenicol in Crawfish Meat", FDA/ORA/DFS, No 4303.
- MCEVOY, J. D. G. (2002). Contamination of animal feedingstuffs as a cause of residues in food: a review of regulatory aspects, incidence and control. *Anal. Chim. Acta.*, 473: 3-26.
- Myllyniemi, A.L., Rintala, R., Backman, C., Niemi, A. (1999). "Microbiological and chemical identification of antimicrobial drugs in kidney and muscle samples of bovine cattle and pigs". *Food additives & Contaminants*, 16: 339-351.
- Rebecca S. N., Eduardo W-B, Marlice A. S. M (2006). "Food safety evaluation: Detection and confirmation of chloramphenicol in milk by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry", *Analytica Chimica Acta*, 565: 97-102.
- Robert L. T. and Fischer L.J. (1978). "High Performance Liquid-Chromatographic Assay for Chloramphenicol in Biological Fluids", *Clinical Chemistry*, 24(5): 778-781.
- USDA, FASonline. Maximum Residue Limit. Truy cập tại <http://www.mrlatabase.com>. ngày 12/02/2012.
- Wang, J. MacNeil J.D., Kay J.F. (2012). *Chemical Analysis of Antibiotic Residues in Food*, United States of America.
- Zhao L., Carol H. B. (2004). Determination of Chloramphenicol, Florfenicol, and Thiamphenicol in Honey Using Agilent SampliQ OPT Solid-Phase Extraction Cartridges and Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry, Application note, Agilent Technologies, USA.