

Phân tích đồng thời các kháng sinh quinolone trong thịt, tôm, cá bằng phương pháp sắc kí lỏng ghép khối phổ

• Trần Thanh Trú

• Trần Thị Như Trang

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 20 tháng 03 năm 2013, nhận đăng ngày 03 tháng 7 năm 2013)

TÓM TẮT

Quinolone là một nhóm thuốc kháng khuẩn được dùng rộng rãi trong việc điều trị nhiễm trùng ở người và động vật đặc biệt trong chăn nuôi và thủy sản. Một phương pháp phân tích đơn giản và hiệu quả bao gồm quá trình chiết lỏng – lỏng, tách trên cột pha đảo C18 và phân tích bằng hệ khối phổ microQTOF đã được phát triển nhằm khảo sát và xác định đồng thời 8 quilonone (norfloxacin, ciprofloxacin, lomefloxacin, danofloxacin, enrofloxacin, acid oxolinic,

acid nalidixic và flumequine) trong thịt gà, thịt heo, tôm và cá diều hồng. Hiệu suất thu hồi thu được từ 81,1 đến 94,8 % cho thịt gà, từ 73,2 đến 96,5 % cho tôm (ngoại trừ flumequine có hiệu suất thu hồi 50,6 %) và từ 89,6 đến 113,2 % cho cá diều hồng. Giới hạn phát hiện ước lượng từ 0,1 đến 1,3 ng g⁻¹ và giới hạn định lượng từ 0,4 đến 4,3 ng g⁻¹. Quy trình phân tích đã được áp dụng để xác định các quilonone trong mẫu thịt gà, thịt heo, tôm, cá diều hồng trên thị trường.

Từ khóa: Quinolone, LC-MS/MS, SPE, LLE

MỞ ĐẦU

Quinolone là một trong những nhóm kháng sinh tổng hợp hóa học có khả năng khuếch tán tốt trong mô bào, nhanh chóng ức chế và tiêu diệt vi khuẩn thông qua sự ức chế tổng hợp ADN, do đó được dùng phổ biến và hiệu quả cho cả người và động vật. Tuy nhiên, việc sử dụng nhóm kháng sinh này trong chăn nuôi và thủy sản có tác dụng xấu đến môi trường và sức khỏe cộng đồng. Kháng sinh nhóm fluoroquinolone được cho là có nguy cơ gây đột biến gene, gây sảy thai khi sử dụng cho động vật mang thai, có thể gây rối loạn phát triển xương, sụn (gót asin ở người) [1, 2]. Bên cạnh đó, sự tồn lưu thời gian dài sau khi sử dụng thuốc kháng sinh nhóm fluoroquinolone

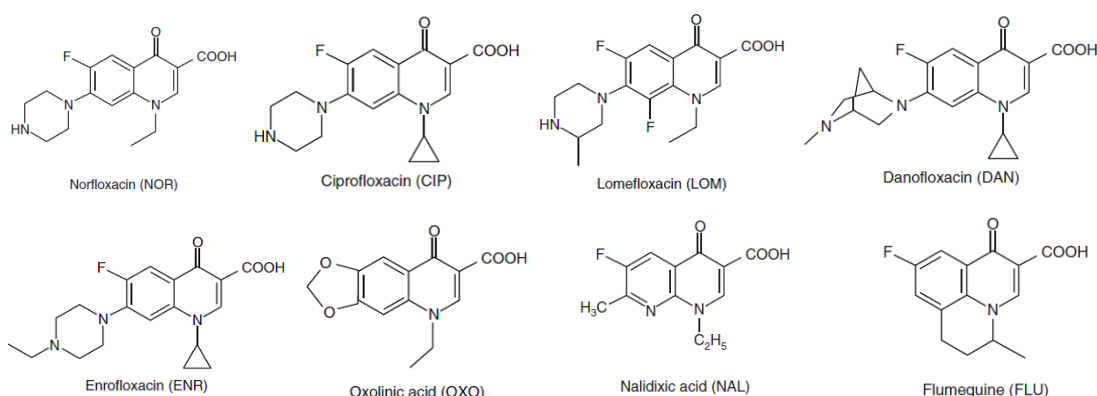
cũng là nguyên nhân dẫn đến việc hạn chế và cấm sử dụng những kháng sinh thuộc nhóm này. Để kiểm soát dư lượng kháng sinh quinolone đảm bảo sức khỏe người tiêu dùng cũng như bảo vệ môi trường, dư lượng tối đa (maximum residue limits – MRLs) của các loại quinolone đã được Liên hiệp Châu Âu (EU) qui định là 100ng.g⁻¹ [3]. Ở Việt Nam, dư lượng tối đa của ciprofloxacin, danofloxacin và enrofloxacin cũng là 100 ng.g⁻¹ (quyết định 07/2005/QĐ-BTS ngày 24/2/2005 của Bộ trưởng Bộ thủy sản).

Các phương pháp phân tích dư lượng kháng sinh quinolone trong thực phẩm như sắc kí lỏng hiệu năng cao ghép đầu dò UV, đầu dò huỳnh

quang bị hạn chế về số lượng quinolone có thể phân tích đồng thời cũng như giới hạn định lượng ở hàm lượng thấp ng.g⁻¹ [4, 5]. Do đó, trong đề tài này, chúng tôi tiến hành khảo sát trên một phương pháp phân tích có độ nhạy và độ chọn lọc cao là sắc ký lỏng hiệu năng cao pha đảo ghép với khối phổ micro QTOF (HPLC-MS/MS) và lựa chọn qui trình chiết và làm sạch thích hợp để phân tích đồng thời 8 quinolone (Hình 1) trong nhiều đối tượng mẫu thực phẩm khác nhau.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Hóa chất



Hình 1. Cấu trúc hóa học của 8 quinolone

Thiết bị và dụng cụ

Hệ thống sắc ký lỏng LC Agilent 1200 với hệ thống tiêm mẫu tự động sử dụng cột sắc ký Supelco™ Ascentis C18 (5 cm × 3 mm i.d., 3 m) với cột bảo vệ Phenomenex C18 (4 mm × 2 mm i.d.). Pha động gồm có dung môi acetonitril và đệm amoni format 0,2% (pH 3,5). Chương trình gradient pha động được trình bày trong Bảng 1.

Bảng 1. Chương trình gradient pha động

t (phút)	Đệm amoni format 0,2 % (pH 3,5) (%)	Acetonitril (%)
0	90	10
1	90	10
7	80	20
10	65	35

Các chất chuẩn rắn quinolone (norfloxacin, ciprofloxacin, lomefloxacin, danofloxacin, enrofloxacin, acid oxolinic, acid nalidixic và flumequine) được cung cấp bởi Phân viện Kiểm nghiệm Dược phẩm thành phố Hồ Chí Minh. Dung dịch có nồng độ 100 g.mL⁻¹ được pha trong nước cất 2 lần và được bảo quản trong tủ mát ở 4°C. Các dung môi hữu cơ n-hexane, methanol, ammoniac, acid formic đều thuộc loại tinh khiết của Merck. Dung môi acetonitril có độ tinh khiết dùng cho sắc ký lỏng của Labscan.

12	65	35
13	90	10
15	90	10

Hệ thống phân tích khối phổ bao gồm nguồn ion hóa phun điện tử (ESI), bộ phân tích khối kết hợp tứ cực và thời gian bay (microQTOF) và đầu dò microchannel plate của Bruker với phần mềm điều khiển thiết bị và xử lý dữ liệu Analyst 1.4.2. Chúng tôi tiến hành khảo sát điều kiện phân tích đồng thời 8 quinolone bằng kỹ thuật ion hóa phun điện tử với chế độ bắn ion dương. Để tối ưu hóa điều kiện khối phổ, dùng bơm xy lanh 500 L bơm trực tiếp từng chất chuẩn ở nồng độ 1 g.mL⁻¹ vào buồng ion hóa để khảo sát

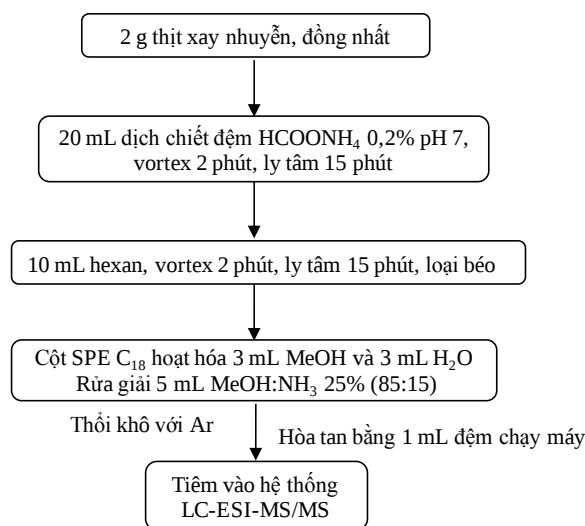
và tối ưu điều kiện định tính và định lượng cho từng chất phân tích.

Ngoài ra còn có các thiết bị và dụng cụ khác như cân phân tích có độ chính xác 0,1 mg, hệ

Quy trình chiết và làm sạch mẫu

Quá trình khảo sát được thực hiện trên hai quy trình chiết và làm sạch: chiết pha rắn (solid

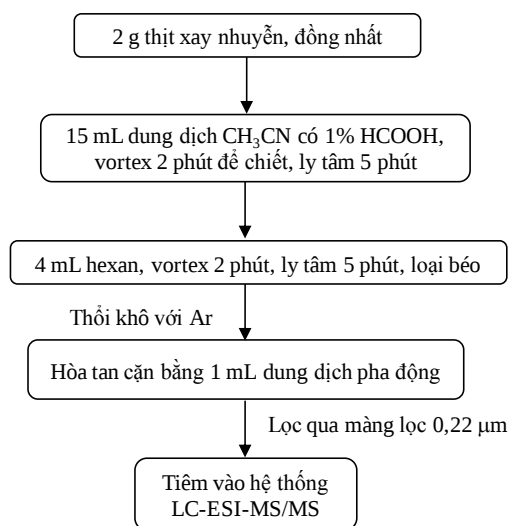
Quy trình 1: Chiết pha rắn (SPE)



thống lọc dung môi phù hợp với màng lọc có kích thước lỗ 0,45 μm , máy li tâm, bể siêu âm, máy vortex ...

phase extraction – SPE) [6] và chiết lỏng lỏng (liquid liquid extraction – LLE) [7] (Hình 2).

Quy trình 2: Chiết lỏng lỏng (LLE)



Hình 2. Sơ đồ 2 quy trình chiết và làm sạch mẫu

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Chúng tôi giữ cố định các thông số của nguồn ion hóa ESI (source) và bộ lọc khối lượng cực Q1 (hexapole) theo khuyến cáo của nhà sản xuất (Bảng 2) và tiến hành tối ưu hóa từng năng lượng bắn phá ion mẹ, ion con, thời gian chuyển khối (transfer time) bằng cách chọn chế độ cân chỉnh máy bằng tay. Kết quả thu được trình bày trong Bảng 3. Tuy nhiên, khi kết hợp với điều kiện phân tích sắc ký lỏng thì các điều kiện phân tích khối phổ được chia thành 3 segment tương ứng với 3 nhóm thời gian lưu (t_R) của các mũi sắc ký (Bảng 4 và Hình 3). Kết quả thu được cho thấy cả 8 quinolone đều có khoảng tuyến tính rộng từ 5 ng.mL^{-1} đến 800 ng.mL^{-1} với R^2 từ 0,995 đến 0,998 (Hình 4).

Bảng 2. Các thông số của nguồn ion hóa ESI (source) và bộ lọc khối lượng cực Q1 (hexapole)

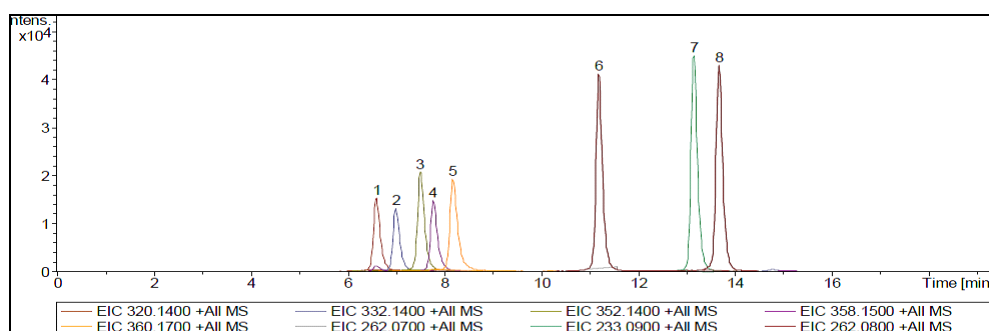
Source	End Plate Offset	-500 V
	Capillary	4500 V
	Nebulizer	1,2 Bar
	Dry Gas	11,0 l/min
Transfer	Dry Temp	200°C
	Funnel 1 RF	200,0 Vpp
	Funnel 2 RF	225,0 Vpp
	ISCID Energy	0,0 eV
	Hexapole	275,0 Vpp

Bảng 3. Các thông số tối ưu cho từng chất phân tích với microQTOF

Thứ tự mẫu	Tên hợp chất	Khối lượng phân tử	m/z tìm được	Quadrupole IE (eV)	CE (eV)	Collision RF (Vpp)	Transfer time (s)
1	Nor	319,30	320,1404	8,5	10,0	210	25 - 30
2	Cip	331,35	332,1404	6,0	10,5	250	28
3	Lome	351,36	352,1467	6,0	10,0	210	30
4	Dano	357,40	358,1561	8,5	10,5	250	30
5	Enro	359,40	360,1717	8,0	10,5	250	29
6	Oxo	261,23	262,0709	5,0	10,5	250	28
7	Nal	232,24	233,1003	5,0	10,5	250	25
8	Flu	261,25	262,0873	5,0	10,5	250	25

Bảng 4. Thông số của bộ phân tích khối phân tích đồng thời 8 quinolone theo từng segment

Thông số		Segment 1 (t _R : 0 – 9 phút)	Segment 2 (t _R : 9 – 12 phút)	Segment 3 (t _R : 12 – 15 phút)
Quadrupole	Ion Energy	7.5 eV	5.0 eV	5.0 eV
	Low Mass	100,00 m/z	100,00 m/z	100,00 m/z
Collision Cell	Collision Energy	10,5 eV	10,5 eV	10,5 eV
	Collision RF	210,0 Vpp	250,0 Vpp	250,0 Vpp
	Transfer Time	29,0 s	28,0 s	25,0 s
	Pre Pulse Storage	5,0 s	5,0 s	5,0 s



Hình 3. Sắc kí đồ hỗn hợp 8 chuẩn 100 ng.mL⁻¹ khi chạy chương trình gradient pha động

Khi chúng tôi tiến hành khảo sát quá trình chiết và làm sạch với qui trình 1 sử dụng cột SPE C18 500 mg trên hệ sắc kí lỏng đầu dò huỳnh quang thì thu được hiệu suất thu hồi trên mẫu thịt gà thêm chuẩn 25 ng.g⁻¹ là khá tốt và đường nền khá sạch. Tuy nhiên, khi phân tích trên hệ LC-ESI-microQTOF thì nhiễu nền cao và che phủ cả

8 peak, giảm tín hiệu chất phân tích. Nguyên nhân là do dùng dung dịch rửa giải là hỗn hợp metanol và amonia nồng độ lớn 25% (tỉ lệ 85:15) nên pH rất cao dẫn đến trong quá trình rửa giải một phần chất nền silica của cột SPE cũng sẽ bị rửa trôi. Đầu dò huỳnh quang không nhận biết sự có mặt của silica nhưng đầu dò khối phổ ghi nhận

silica hàm lượng cao với m/z đặc trưng. Do vậy, chúng tôi tiếp tục khảo sát với qui trình 2 chiết lỏng lỏng kết quả thu được tốt hơn rất nhiều (Bảng 5). Qui trình xử lý mẫu số 2 sử dụng dung

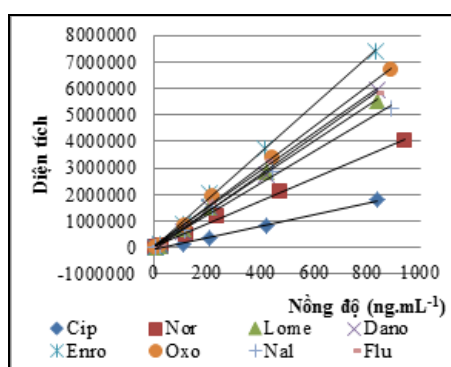
dịch chiết là ACN có 1% acid formic cho dịch chiết rất sạch so với qui trình 1 dùng đệm amoni format pH 7.

Bảng 5. So sánh hiệu suất thu hồi (H) áp dụng 2 qui trình chiết và làm sạch trên mẫu thịt gà ở hàm lượng mẫu thêm chuẩn 25 ng.g⁻¹

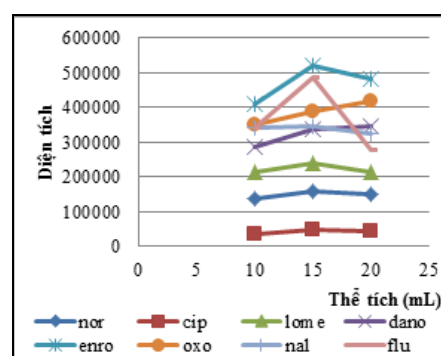
Hợp chất	Qui trình 1		Qui trình 2	
	H (%)	% RSD (n=3)	H (%)	% RSD (n=3)
Nor	2,4	9,4	94,2	3,3
Cip	28,7	13,6	79,6	5,5
Lome	21,0	5,1	93,5	1,7
Dano	29,5	13,1	92,1	4,7
Enro	24,2	5,4	82,9	3,7
Oxo	35,4	10,1	96,2	2,1
Nal	53,9	17,6	93,6	5,3
Flu	42,3	4,2	97,3	5,1

Một thông số quan trọng trong qui trình 2 là thể tích dung dịch chiết acetonitril có 1% acid formic cũng đã được khảo sát. Các thí nghiệm được làm ở cùng một điều kiện: thêm chuẩn trên mẫu thịt gà không có chất phân tích ở hàm lượng 50 ng.g⁻¹. Kết quả thu được cho thấy thể tích 15 mL nhìn chung chiết 8 quinolone tốt hơn và kinh tế hơn là 20 mL như trong nghiên cứu của *Chang và cộng sự* [7] (Hình 5). Vậy nên chúng tôi áp dụng thể tích dung dịch chiết 15 mL cho qui trình chiết và làm sạch.

Chúng tôi tiến hành khảo sát hiệu suất thu hồi trên mẫu thịt gà, tôm và cá điều hồng không có chất phân tích lấy từ siêu thị và thêm chuẩn ở hàm lượng 12,5 ng.g⁻¹. Kết quả thu được cho thấy hiệu suất thu hồi trên mẫu tôm và cá điều hồng khá tốt tương tự như mẫu thịt gà (Bảng 6), qui trình phân tích không bị ảnh hưởng nhiều bởi bản chất của nền mẫu. Tuy nhiên, với mẫu tôm, hiệu suất thu hồi của flumequine thấp (50,6 %), điều này là do nhiễu nền cao làm giảm tín hiệu của flumequine.



Hình 4. Đường hồi qui của 8 quinolone



Hình 5. Đồ thị biểu diễn sự biến thiên của diện tích mũ sắc kí theo sự thay đổi thể tích dung dịch chiết

Bảng 6. Hiệu suất thu hồi (H) trên mẫu thịt, tôm, cá ở hàm lượng 12,5 ng.g⁻¹

Hợp chất	Gà		Tôm		Cá điêu hồng	
	H (%)	%RSD (n=3)	H (%)	%RSD (n=3)	H (%)	%RSD (n=3)
Nor	91,9	4,1	75,1	3,7	90,5	2,7
Cip	81,1	3,7	96,5	1,3	106,9	1,9
Lome	88,0	4,1	84,1	3,9	89,6	4,9
Dano	86,5	7,1	73,8	1,1	96,3	4,0
Enro	83,1	4,7	93,0	2,4	113,2	6,8
Oxo	94,8	2,0	73,2	9,4	105,4	3,8
Nal	86,8	3,3	93,2	4,0	101,6	2,1
Flu	92,4	6,1	50,6	3,2	100,7	6,1

Giới hạn phát hiện (3xS/N) được ước lượng từ 0,1 đến 1,3 ng.g⁻¹ và giới hạn định lượng (10xS/N) từ 0,4 đến 4,3 ng.g⁻¹ với % RSD từ 2,7% đến 5,7% tùy theo từng hợp chất. Giới hạn này là rất thấp so với tiêu chuẩn MLDs 100 ng.g⁻¹. Như vậy cho thấy phương pháp phân tích có độ nhạy và độ chọn lọc cao.

Quy trình phân tích được áp dụng để khảo sát dư lượng các quinolone này trong các mẫu thịt gà, thịt heo, tôm, cá mua ở chợ Phú Thọ, Bình

Dương. Nhận thấy trong mẫu có sự hiện diện của các chất khảo sát nhưng nồng độ khá nhỏ nằm trong giới hạn cho phép (nhỏ hơn 100 ng.g⁻¹) (Bảng 7). Kết quả này cũng hợp lý vì kháng sinh quinolone đã được nhà nước kiểm soát chặt chẽ liều lượng cho phép dùng cho gia súc, gia cầm, đặc biệt các sản phẩm thịt đầu vào ở siêu thị. Với mẫu thịt gà mua ở chợ chúng tôi tìm thấy dư lượng kháng sinh norfloxacin là khá cao (64,8 ng.g⁻¹) nhưng vẫn ở trong hàm lượng cho phép.

Bảng 7. Dư lượng kháng sinh quinolone (ng.g⁻¹) trong mẫu thịt gà, thịt heo, tôm, cá điêu hồng

Hợp chất	Gà	Heo	Tôm	Cá điêu hồng
Nor	64,8	Không định lượng	Không định lượng	Không định lượng
Cip	Không định lượng	Không định lượng	Không định lượng	Không định lượng
Lome	3,5	Không định lượng	Không định lượng	Không định lượng
Dano	Không định lượng	0,9	Không định lượng	Không định lượng
Enro	5,3	1,2	Không định lượng	4,1
Oxo	Không định lượng	0,4	Không định lượng	2,4
Nal	1,0	0,8	0,4	2,6
Flu	3,6	0,9	Không định lượng	5,0

KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tìm được chương trình gradient pha động tách 8 quinolone trên cột sắc kí pha đảo C18 trong khoảng thời gian ngắn 15 phút và các thông số cho nguồn ion hóa ESI, bộ phân tích khối phân tích đồng thời 8

quinolone. Hiệu suất thu hồi ở hàm lượng thêm chuẩn 12,5 ng.g⁻¹ là 81,1 đến 94,8 % cho thịt gà, từ 73,2 đến 96,5% cho tôm (ngoại trừ flumequine có hiệu suất thu hồi 50,6%) và từ 89,6 đến 113,2 % cho cá điêu hồng. Giới hạn phát hiện ước

lượng từ 0,1 đến 1,3 ng.g⁻¹ và giới hạn định lượng từ 0,4 đến 4,3 ng.g⁻¹ nhỏ hơn nhiều so với các chỉ tiêu MRLs của Việt Nam cũng như EU nên ta có thể dùng qui trình phân tích này xác định dư lượng kháng sinh quinolone trên mẫu ngoài thị trường.

LỜI CẢM ƠN: Nhóm tác giả chân thành cảm ơn ThS. Nguyễn Huy Du và CN. Nguyễn Khắc Mạnh về sự hỗ trợ kỹ thuật trong quá trình phân tích với hệ thống khối phổ microQTOF tại Phòng Phân tích Trung tâm thuộc Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh.

Simultaneous determination of quinolone residues in meat, shrimp and fish by liquid chromatography tandem mass spectrometry

• **Tran Thanh Truc**

• **Tran Thi Nhu Trang**

University of Science, VNU-HCM

ABSTRACT:

Quinolones are broad-spectrum synthetic antimicrobial agents used in the treatment of bacterial infection of livestock and in aquaculture. An simple and efficient analytical method consisting of the liquid - liquid extraction, the separation on the C18 reversed phase column and the analysis with microQTOF mass spectrometer was developed to identify and determine simultaneously eight quilonones (norfloxacin, ciprofloxacin, lomefloxacin, danofloxacin,

enrofloxacin, oxolinic acid, nalidixic acid and flumequine) in chicken, pork, shrimp and red tilapia. The obtained recoveries are from 81.1 to 94.8 % for chicken, 73.2 to 96.5 % for shrimp (except for flumequine 50.6 %) and 89.6 to 113.2 % for red tilapia. The limits of detection and quantification are from 0.1 to 1.3 ng.g⁻¹ and from 0.4 to 4.3 ng.g⁻¹ respectively. The method was applied to analyze these quilonones in chicken, pork, shrimp, red tilapia samples.

Key words: Quinolone, LC-MS/MS, SPE, LLE

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] <http://uv-vietnam.com.vn/NewsDetail.aspx?newsId=1497>, (2012).
- [2] Nguyễn Thu Thủy, Nghiên cứu xác định Ciprofloxacin (CIP) trong một số dược phẩm bằng phương pháp điện hóa, *Luận văn Thạc Sĩ*, Trường ĐH Khoa học Tự nhiên Hà Nội (2009).
- [3] G. van Vyncht, A. Janosi, G. Bordin, B. Toussaint, G.M. Rogister, E.D. Pauw, Adela Rosa Rodriguez, Multiresidue determination of (fluoro)quinolone antibiotics in swine

- kidney using liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 952, 121-129 (2002).
- [4] J. Barbosa, D. Barron, M. del Pilar Hermo, A.N. O. Ballesteros, Determination and characterization of quinolones in foodstuffs of animal origin by CE-UV, LC-UV, LC-FL, LC-MS AND LC-MS/MS, *Departament de Quimica Analitica. Universidad de Granada. Av. Fuentenueva s/n, 18071. Granada, Spain*, 20, 2, 165-179 (2009).
- [5] C.S. Chang, W.H. Wang, C.E. Tsai, Simultaneous Determination of Eleven Quinolones Antibacterial Residues in Marine Products and Animal Tissues by Liquid Chromatography with Fluorescence Detection, *Journal of Food and Drug Analysis*, 16, 6, 87-96 (2008).
- [6] M. Ramos, A. Aranda, E. Garcia, T. Reuvers, H. Hooghuis, Simple and sensitive determination of five quinolones in food by liquid chromatography with fluorescence detection, *Journal of Chromatography B*, 789, 373-381 (2003).
- [7] C.S. Chang, W.H. Wang, C.E. Tsai, Simultaneous Determination of 18 Quinolone Residues in Marine and Livestock Products by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry, *Journal of Food and Drug Analysis*, 18, 2, 87-97 (2010).