

PHÂN TÍCH ĐU' LƯỢNG MỘT SỐ KHÁNG SINH TRONG NƯỚC THẢI BỆNH VIỆN BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG SIÊU HIỆU NĂNG CAO GHEP NỐI KHỐI PHỔ PHÂN GIẢI CAO (UPLC- ORBITRAP MS)

Đến tòa soạn 05-03-2021

**Lê Minh Thùy, Nguyễn Xuân Hưng, Nguyễn Văn Thường, Hoàng Hải Linh,
Nguyễn Thị Xuyên, Hoàng Thế Anh, Vũ Đức Nam**

Trung tâm Nghiên cứu và Chuyển giao Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Chu Đình Bính

Viện Kỹ thuật Hóa học, Trường Đại học Bách Khoa Hà Nội

Phạm Thị Vân, Lê Thái Hà

Viện Sức khỏe nghề nghiệp và Môi trường, Bộ Y tế

SUMMARY

STUDY ON DETERMINATION OF 6 ANTIBIOTICS IN WASTEWATER COLLECTED FROM SEVERAL HOSPITALS BY ULTRA HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY TANDEM WITH HIGH RESOLUTION MASS SPECTROMETRY (UPLC- ORBITRAP MS)

This work has introduced method UPLC- Orbitrap MS to determine six antibiotic compounds (Ciprofloxacin, Cephalexin, Moxifloxacin, Clarithromycin, Levofloxacin) in wastewater collected from several hospitals in Vietnam. The chromatographic procedure used Zorbax-eclipse XDB C18 100 x 4,6 mm, 3,5 μ m (Agilent) and 0.1% FA in deionized water and MeOH as mobile phases. Selected ion monitoring (SIM) mode was used for qualification and quantification of target analytes. The parameters such as: temperature column, mobile phases, gradient, flowrate were optimized. The investigated compounds were cleanup from matrix based on SPE extraction using HLB column(supelco). The spiked experiments were carried out for method evaluation through several parameters, such as: repeatability, recovery ($85,2 \pm 10,1\%$ - $107,6 \pm 3,5\%$), linearity, MDL 0,03 ng/L (Cephalexin, Amoxicillin) – 0,07 ng/L (Clarithromycin, Ciprofloxacin, Levofloxacin) và LOQ nằm trong khoảng từ 0,10 ng/L (Cephalexin) – 0,23 ng/L (Clarithromycin). Applying this method, 30 real samples collected from five hospitals in our country were analyzed. It can be clearly seen that their systems of treatment wastewater have been operated effectively.

Keywords. antibiotics, wastewater, solid phase extraction SPE, LC/MS.

1. GIỚI THIỆU

Hiện nay, trước tình hình các loại dịch bệnh ngày càng nhiều, thuốc kháng sinh là một công cụ đắc lực trong y tế giúp con người và vật nuôi khỏi được các bệnh do vi khuẩn gây nên [1]. Tuy nhiên, kháng kháng sinh cũng đang là vấn đề nhức nhối của ngành y tế do sự khó

khăn trong điều trị các dòng vi khuẩn kháng kháng sinh và chi phí điều trị tăng lên rất lớn. Việc sử dụng quá nhiều cũng dẫn đến nguy cơ tích lũy dư lượng kháng sinh trong môi trường tự nhiên và thức ăn của con người, từ đó xâm nhập vào cơ thể [2]. Hầu hết kháng sinh được sử dụng ở người và thải ra môi trường dưới

nhieu hình thức khác nhau như bài tiết, tồn dư trong dụng cụ, bông, băng y tế... Theo thống kê báo cáo của Cục Quản lý môi trường y tế (2015), cả nước có trên 14.000 cơ sở khám chữa bệnh, hằng ngày phát sinh khoảng 150.000 m³ nước thải. Nước thải bệnh viện bao gồm nước thải sinh hoạt của cán bộ công nhân viên, bệnh nhân, người nhà bệnh nhân và nước thải từ các hoạt động khám chữa bệnh. Nước thải bệnh viện có thể gây ô nhiễm môi trường do các chất hữu cơ, các hợp chất của nito, photpho, các chất rắn lơ lửng, các vi khuẩn và hoạt chất phóng xạ... Ngoài ra, nước thải bệnh viện có thể có một số kim loại nặng như Hg, Cr..., dư lượng kháng sinh và chất độc khác... Phương pháp xác định kháng sinh trong các nền mẫu môi trường, thực phẩm và sinh phẩm ngày nay đã được thực hiện tại nhiều phòng thí nghiệm và chủ yếu trên thiết bị sắc ký lỏng ghép nối khối phổ (LC/MS, LC/MS/MS) [2]–[5], Đối với mẫu nước, có thể sử dụng phương pháp chiết lỏng lỏng hoặc chiết kết hợp làm sạch SPE [2], [5]. Tuy nhiên, việc xác định kháng sinh trong nước thải bệnh viện vẫn chưa được quan tâm chú ý đến nhiều. Do vậy, nghiên cứu “Phân tích dư lượng một số kháng sinh trong nước thải bệnh viện bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao ghép nối khối phổ phân giải cao (UPLC-Orbitrap MS) được thực hiện nhằm phân tích nhanh, đơn giản và đồng thời hàm lượng của 06 kháng sinh thuộc 3 nhóm quinolone, macrolide, β -lactam trong mẫu nước thải, sử dụng kỹ thuật chiết pha rắn kết hợp làm giàu mẫu và thiết bị sắc ký lỏng siêu hiệu năng cao ghép nối khối phổ phân giải cao. Đây là nghiên cứu đầu tiên tại Việt Nam sử dụng thiết bị phân tích hiện đại này. Nghiên cứu cũng bước đầu đánh giá về dư lượng kháng sinh trong nước thải tại một số bệnh viện ở nước ta.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Chất chuẩn và hóa chất

Chất chuẩn: 06 chất chuẩn bao gồm ciprofloxacin, levofloxacin, moxifloxacin, cephalixin, amoxilin, clarithromycin, độ tinh khiết 99 % của hãng Sigma Aldrich.

Dung môi: methanol, Acetone với độ tinh khiết sắc ký, của hãng VWR (Pháp), axit formic 98% (FA, Merck, Đức). Nước deion được cất từ thiết bị Mili-Q Integral 3 (Merck Millipore, Pháp). Các dụng cụ thủy tinh được tráng rửa và nung ở 450⁰C trong 3 giờ để loại bỏ các tạp chất hữu cơ.

Tiến hành chuẩn bị các dung dịch chất chuẩn trong dung môi H₂O:MeOH (1:1, v:v) chứa 0,1% FA. Chuẩn bị đường chuẩn 7 điểm có nồng độ từ 1, 2, 5, 10, 25, 50, 100 ppb. Các dung dịch chuẩn được bảo quản ở 4 ⁰C trong các vial tối màu. Đường chuẩn được xây dựng bằng cách bơm phân tích 10 μ L các dung dịch chuẩn làm việc từ cal1 – cal7.

2.2. Thiết bị phân tích

Hệ thống sắc ký lỏng siêu hiệu năng cao UPLC (Ultimate 3000) ghép nối khối phổ phân giải cao Orbitrap MS của hãng Thermo Scientific (Mỹ) được sử dụng để phân tích đồng thời 06 kháng sinh. Các thông số điều khiển thiết bị UPLC/Orbitrap MS được kiểm soát trên phần mềm Xcalibur phiên bản 4.0 (Thermo) và đạt điều kiện ổn định mới tiến hành bơm chuẩn và mẫu phân tích. Nguyên tắc chung của phương pháp này là sử dụng đầu dò có độ nhạy cao xác định mảnh khối của các ion phân tích để định lượng các chất này trong mẫu. Các chất được xác định bởi thời gian lưu và mảnh phổ của ion đặc trưng, độ lệch khối; định lượng bằng phương pháp ngoại chuẩn trên phần mềm TraceFinder phiên bản 3.3 (Thermo).

Quá trình tách sắc ký được thực hiện trên cột Zorbax-eclipse XDB C18 100 x 4,6 mm, 3,5 μ m (Agilent) ở 40 ⁰C. Pha động sử dụng 2 kênh là (A): 0,1% FA trong nước deion và 0,1% FA trong MeOH. Các thông số sắc ký đã được tối ưu bao gồm: tốc độ dòng pha động được giữ không đổi ở 0,4 mL/phút. 10 μ L mẫu được bơm qua hệ thống bơm mẫu tự động ở nhiệt độ buồng chứa mẫu là 8 ⁰C. Chương trình pha động bắt đầu từ 5% B (giữ 1 phút), tăng lên 60% B (giữ 7 phút), tăng tiếp tới 100% B (giữ 3 phút) trước khi giảm về điều kiện đầu là 5%B và giữ 2 phút. Tổng thời gian phân tích 1 mẫu là 17 phút.

Hệ thống khối phổ phân giải cao sử dụng kiểu ion hóa tia lửa điện (ESI) ở độ phân giải 70000-FWHM, vận hành ở chế độ ion hóa dương. Trước mỗi đợt phân tích, hệ thống khối phổ được hiệu chuẩn đội chính xác khối bằng dung dịch Pierce Positive ion mass calibration solution (Thermo, CAS number 88324). Các thông số vận hành ở buồng MS bao gồm: các khí mang (sheath gas 32 psi, auxiliary gas 7 L/phút), điện thế +2,8kV, nhiệt độ nguồn ion hóa 320 °C. Chế độ đo chọn lọc các ion đặc trưng của chất phân tích SIM (selected ion monitoring) được thiết lập cho phân tích định lượng.

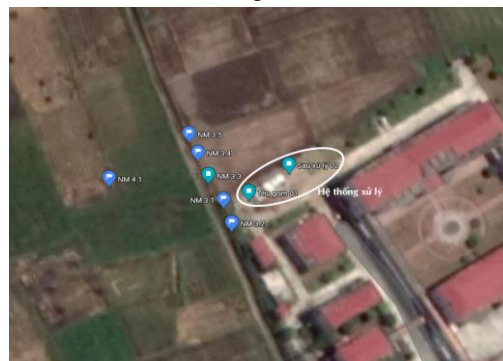
2.3. Thu thập, xử lý sơ bộ và bảo quản mẫu

Nghiên cứu đã thu thập 30 mẫu nước có thể tích khoảng 1 L/mẫu bao gồm nước thải, nước mặt, nước trước xử lý và sau xử lý tại 5 bệnh viện đã được mã hóa lần lượt là Bv A, Bv B, Bv C, Bv D, Bv E. Mẫu bàn giao cho phòng thí nghiệm được mã hóa thông tin và bảo quản trong chai thủy tinh tối màu ở nhiệt độ 4 °C, không có ánh sáng chiếu vào để hạn chế biến đổi sinh học của mẫu. Trước khi phân tích, mẫu được lọc bằng giấy lọc sợi thủy tinh (GFF) 1 µm để loại bỏ các hạt chất rắn lơ lửng, sau đó điều chỉnh pH của mẫu đến 3 (sử dụng axit formic).

2.4. Xử lý mẫu

Phương pháp phân tích dư lượng thuốc kháng sinh Ciprofloxacin, Levofloxacin, Moxifloxacin, Clarithromycin, Amoxillin và Cephalixin trong nước thải bệnh viện được tham khảo theo phương pháp tiêu chuẩn của US EPA Method 1694 [6]. Các chất kháng sinh được chiết kết hợp làm sạch bằng cột chiết pha rắn Sulpeco HLB 200 mg 6 mL Để đánh giá phương pháp, làm lặp lại 3 lần mẫu trộn (mẫu pool) của 3 mẫu ngẫu nhiên thêm chuẩn 100 ppb để tính hiệu suất thu hồi và thêm chuẩn 10 ppb để đánh giá giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng của phương pháp. Cột chiết pha rắn được hoạt hóa ở tốc độ dòng 1 giọt/s với 3 mL MeOH và 3 mL nước deion pH2. Nạp 100 mL mẫu nước lọc đã chỉnh pH lên cột với tốc độ 1 giọt/s, hút chân không cột SPE trong 10 phút. Chất phân tích được rửa giải bằng 10 mL MeOH rồi hút chân không khoảng 30s đến

khô. Dung dịch rửa giải được cô N₂ ở 40 °C đến cạn rồi định mức lại bằng 1 mL H₂O:MeOH (1:1, v:v) chứa 0,1% FA. Mẫu được lọc qua màng nylon 0.45 µm trước khi chuyển sang vial và chuẩn bị bơm phân tích trên thiết bị LC/Orbitrap MS.

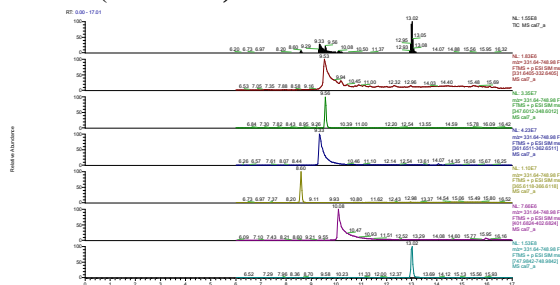


Hình 1. Sơ đồ lấy mẫu tại bệnh viện B

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tối ưu quá trình tách sắc ký

Nghiên cứu đã tiến hành khảo sát và phân tích thử nghiệm trên 3 cột sắc ký pha đảo bao gồm cột Hypersil Gold PFP 150 x 2,1 mm, 3 µm (Thermo), aQ C18 (Thermo) và Zorbax-eclipse XDB C18 100 x 4,6 mm, 3,5 µm (Agilent). Kết quả tách sắc ký dung dịch chuẩn 100 ppb cho cột Zorbax-eclipse XDB C18 tách được đủ 6 chất. Hai chất Amoxicillin và Cephalixin khó tách trên 2 cột còn lại. Sau khi lựa chọn được cột tách, nghiên cứu tiếp tục tiến hành khảo sát điều kiện tách sắc ký chủ yếu bao gồm tốc độ dòng, chương trình pha động. Kết quả điều kiện phân tích tối ưu các thông số như đã nêu trong mục 2.2. Ngoài ra, Bảng 1 cho thấy, độ lặp lại về thời gian lưu và độ chính xác khối của ion 6 chất phân tích là tương đối tốt (RSD ≤ 1%).



Hình 2. Sắc đồ tách 6 chất phân tích trong dung dịch chuẩn 100 ppb trên thiết bị LC/Orbitrap MS

Bảng 1. Thời gian lưu và độ lệch khối của 6 chất phân tích

STT	Tên chất	Phân loại	Ion phân tích _{LT}	RT ± SD (n=6, min)	Ion phân tích _{TT}	
					m/z ± SD (m=6)	Độ chính xác khối
1	Ciprofloxacin	Quinolone	332,1405 [M+H] ⁺	9,53 ± 0,03	332,1406 ± 0,0005	0,15
2	Levofloxacin		362,1511 [M+H] ⁺	9,33 ± 0,04	362,1511 ± 0,0007	0,05
3	Moxifloxacin		402,1824 [M+H] ⁺	10,08 ± 0,05	402,1822 ± 0,0005	-0,41
4	Clarithromycin	Macrolide	748,4842 [M+H] ⁺	13,02 ± 0,03	748,4845 ± 0,0005	0,33
5	Amoxicillin	β-lactam	398,1380 [M+CH ₃] ⁺	8,60 ± 0,07	398,1376 ± 0,0009	1,00
6	Cephalexin		348,3942 [M+H] ⁺	9,56 ± 0,29	348,3940 ± 0,0004	1,35

3.2. Độ chính xác khối của chất phân tích

Độ chính xác khối của 6 chất phân tích được tính bằng cách bơm lặp lại 6 lần độc lập dung dịch chuẩn 100 ppb trên thiết bị LC/Orbitrap MS theo các điều kiện đã tối ưu. Mảnh khối của ion phân tích được tính dựa trên công thức phân tử của chất bằng phần mềm online Envipat phiên bản 2.2. Từ bảng 1 có thể thấy, độ chính xác khối của ion các chất phân tích đo thực nghiệm đều $< \pm 1$ ppm so với lý thuyết.

3.3. Xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp

Nghiên cứu tiến hành khảo sát khoảng tuyến tính trong đường chuẩn làm việc của 6 kháng sinh bằng cách bơm phân tích 7 điểm có nồng độ từ 1, 2, 5, 10, 25, 50, 100 ppb. Kết quả thu được khoảng tuyến tính của Ciprofloxacin,

Moxifloxacin, Clarithromycin từ 2 – 100 ppb; của Levofloxacin từ 5 – 100 ppb và Amoxicillin, Cephalexin từ 1 – 100 ppb với hệ số tương quan hồi quy $R^2 \geq 0,99$.

Mặt khác, giới hạn phát hiện của phương pháp được xác định bằng cách thêm chuẩn nồng độ 5 ppb trên nền mẫu thực, làm lặp 7 lần và tính thông qua giá trị tỉ lệ tín hiệu so với nhiễu nền (S/N). Bảng 1 cho kết quả giá trị MDL các chất nằm trong khoảng 0,03 ng/L (Cephalexin, Amoxicillin) – 0,07 ng/L (Clarithromycin, Ciprofloxacin, Levofloxacin) và LOQ nằm trong khoảng từ 0,10 ng/L (Cephalexin) – 0,23 ng/L (Clarithromycin). Điều này chứng tỏ phương pháp có độ nhạy đáp ứng yêu cầu phân tích rất tốt.

Bảng 2. Đường chuẩn, MDL, LOQ, độ thu hồi của phương pháp trong nghiên cứu

TT	Tên chất	Ion phân tích	RT (phút)	Phương trình đường chuẩn	R ²	Re ± RSD (%)	MDL	LOQ
							ng/L	
1	Ciprofloxacin	332,1405 [M+H] ⁺	9,53	Y = 3,118E7*X – 2,756E5	0.9993	95,5 ± 10,9	0,07	0,22
2	Levofloxacin	362,1511 [M+H] ⁺	9,33	Y = 7,103E7*X – 3,551E5	0.9975	107,6 ± 3,5	0,07	0,22
3	Moxifloxacin	402,1824 [M+H] ⁺	10,08	Y = 1,162E8*X – 4,954E5	0.9988	85,2 ± 10,1	0,04	0,12
4	Clarithromycin	748,4842 [M+H] ⁺	13,02	Y = 4,169E7*X + 2,543E6	0.9998	93,0 ± 6,3	0,07	0,23
5	Amoxicillin	398,1380 [M+CH ₃] ⁺	8,60	Y = 3,316E6*X + 2,956E4	0.9996	96,6 ± 8,0	0,03	0,11
6	Cephalexin	148,1012 [M+H] ⁺	9,56	Y = 1,900E6*X + 1,042E4	0.9997	95,1 ± 4,9	0,03	0,10

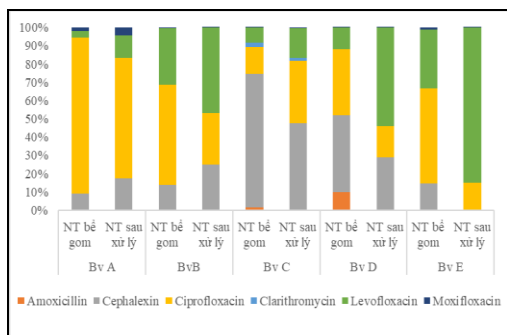
Ngoài ra, nghiên cứu tiến hành thêm chuẩn 100 ppb vào mẫu thực và làm lặp 7 lần để tiến hành đánh giá hiệu suất thu hồi của phương pháp. Giá trị hiệu suất thu hồi của 6 chất quan tâm nằm trong khoảng từ 85,2 ± 10,1% (Moxifloxacin)- 107,6 ± 3,5% (Levofloxacin),

đáp ứng yêu cầu thẩm định một phương pháp phân tích mới.

3.4. Phân tích mẫu thực thu thập tại các bệnh viện

Nghiên cứu áp dụng phương pháp đã được phát triển để phân tích 30 mẫu nước thải bao

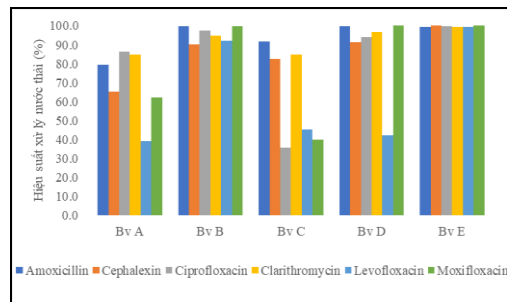
gồm nước tại bể gom (trước xử lý), sau xử lý và nước thải ở môi trường tiếp nhận tại 5 bệnh viện trong cả nước. Đối với mẫu nước thải tại bể gom (trước xử lý), kết quả phân tích cho thấy hàm lượng kháng sinh tồn đọng tương đối lớn, đặc biệt với một số hoạt chất như Cephalexin, Ciprofloxacin và Levofloxacin. Hàm lượng Ciprofloxacin phân tích được lên tới gần 40 ppb (Bv B) và cũng là chất đóng góp nhiều nhất trong các mẫu nước thu thập tại Bv A, B, E. Trung bình các mẫu nước chưa qua xử lý tại các Bv C và D thì hàm lượng Cephalexin chiếm ưu thế (lần lượt 73% và 42%). Clarithromycin được phát hiện hàm lượng tương đối thấp ở các mẫu nước bể gom tại tất cả 5 bệnh viện. Tuy nhiên, tất cả các bệnh viện hiện nay đều đã được lắp đặt hệ thống xử lý nước thải. Qua hệ thống này, hàm lượng kháng sinh đã giảm đi đáng kể. Sau xử lý, hàm lượng Levofloxacin chiếm ưu thế ở bệnh viện D (53,9%) và Bv E (84,9%), còn Cephalexin chiếm ưu thế tại bệnh viện C (42%).



Hình 3. Phân bố của 6 kháng sinh trong mẫu nước thải trước và sau xử lý tại 5 bệnh viện

Từ kết quả phân tích các mẫu trước và sau xử lý cho thấy hệ thống xử lý nước thải của 2/5 bệnh viện đã xử lý tương đối tốt các chất kháng sinh tích lũy trong quá trình hoạt động của bệnh viện, với hiệu suất xử lý của tất cả 6 kháng sinh đều đạt $\geq 90\%$ (Bv B và E). Đáng chú ý, một số hoạt chất như Amoxicillin, Clarithromycin và Moxifloxacin gần như không phát hiện được tại trong nước đã qua xử lý tại bệnh viện B, C, D, E. Hai kháng sinh được sử dụng nhiều là Cephalexin và Ciprofloxacin được xử lý khá hiệu quả tại hầu

hết các bệnh viện ($\geq 65\%$), trừ bệnh viện C (Hiệu suất xử lý nước thải đạt khoảng 40% đối với Ciprofloxacin).



Hình 4. Hiệu suất xử lý nước thải của 6 kháng sinh tại 5 bệnh viện

Đối với môi trường tiếp nhận, kết quả phân tích cho thấy hàm lượng kháng sinh đã giảm đáng kể, thậm chí là không phát hiện trong các mẫu này như Amoxicillin, Clarithromycin và Moxifloxacin. Điều này có thể được giải thích là do các chất kháng sinh bị phân hủy trên đường đi từ hệ thống xử lý nước thải ra đến hồ chứa hoặc đã bị pha loãng với nước tự nhiên trong hồ. Mặc dù vậy, một số mẫu vẫn phát hiện được Ciprofloxacin, Levofloxacin hoặc Cephalexin ở hàm lượng rất nhỏ ($< 0,5$ ppb).

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu thành công phương pháp xác định đồng thời 6 chất kháng sinh trong nước sử dụng thiết bị sắc ký lỏng siêu hiệu năng cao ghép nối khối phổ phân giải cao (UPLC/Orbitrap MS). Phương pháp xử lý mẫu là chiết tách kết hợp làm sạch bằng cột chiết pha rắn HLB (Sulpeco). Kết quả nghiên cứu cho thấy phương pháp có độ nhạy rất tốt ($MDL < 0,10$ ng/L) và độ thu hồi ($85,2 \pm 10,1\% - 107,6 \pm 3,5\%$) trong khoảng yêu cầu cho thẩm định phương pháp mới. Bên cạnh đó, nghiên cứu đã áp dụng phương pháp để phân tích và đánh giá dư lượng 6 kháng sinh trong 30 mẫu nước thải thu thập tại 5 bệnh viện trong cả nước. Các kết quả cho thấy hệ thống xử lý nước thải của các bệnh viện đều đạt hiệu quả tương đối cao, phần lớn cho hiệu suất xử lý nước thải $> 80\%$ trước khi thải ra môi trường.

Tuy nhiên, trong các mẫu nước sau xử lý và môi trường tiếp nhận vẫn phát hiện thấy một số kháng sinh tồn đọng ở hàm lượng thấp. Điều này vẫn có nguy cơ cao đối với ô nhiễm môi trường và trong công tác điều trị bệnh của ngành y tế.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Y tế, *Hướng dẫn sử dụng kháng sinh*, (2015).
2. Roya Mirzaei, Masoud Yunesian, Simin Nasser, Mitra Gholami, Esfandiyar Jalilzadeh, Shahram Shoeibi, Hooshang Shafieyan Bidshahi and Alireza Mesdaghinia, *An optimized SPE-LC-MS/MS method for antibiotics residue analysis in ground, surface and treated water samples by response surface methodology- central composite design*, Journal of Environmental Health Science and Engineering, **15**(1), (2017).
3. Cong Kong, Yang Wang, Yuanfei Huang, Hujiuan Yu, *Multiclass screening of >200 pharmaceutical and other residues in aquatic foods by ultrahigh-performance liquid chromatography–quadrupole-Orbitrap mass spectrometry*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, **410**(22), 5545–5553, (2018).
4. Olaf Scheibner, Maciej Bromirski, Thermo Fisher Scientific, *Quick and sensitive analysis of multiclass veterinary drug residues in meat, plasma, and milk on a Q Exactive focus LC-MS system*, Application note 614.
5. Bùi Văn Hối, Patrick Mazellier, *Nghiên Cứu Đánh Giá Sự Hiện Diện Của 20 Dư Lượng Dược Phẩm Trong Nước Bề Mặt Của Sông Seine (Pháp)*, Tạp chí phân tích Hóa, Lý và Sinh học, **20**(3), (2015).
6. US EPA Method 1694, *Pharmaceuticals and personal care products in water, soil, sediment and biosolids by HPLC/MS/MS*, (2007).