√ Thẩm định phương pháp phân tích dư lượng một số chất nhóm quinolon trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi bằng kỹ thuật LC-MS/MS

Cao Công Khánh[1], Nguyễn Tường Vy[2*]
[1]Viện Kiểm nghiệm Vệ sinh an toàn thực phẩm Quốc gia
[2]Trường Đại học Dược Hà Nội
** E-mail: vynguyentuong@gmail.com*

Summary

A liquid chromatography coupled mass spectrometry (HPLC/MS) method for simultaneous determination of 14 quinolones including nalidixic acid, oxolinic acid, flumequine, cinoxacin, ciprofloxacin, enoxacin, ofloxacin, norfloxacin, lomefloxacin, difloxacin, danofloxacin, enrofloxacin, orbifloxacin, sarafloxacin by was developed. The chromatographic separation was performed on a static phase XBridge column (150 mm x 2.1 mm, 3.5 µm), in MRM mode with one ion precursor and two ion products, using an MS TripQuad ESI (+) detector. The method was validated in terms of the following AOAC criteria: specificity/selectivity, linear range and calibration curve, limit of detection, limit of quantitation, repeatability, recovery. The method proved practically applicable to screening, quantification and confirming the residues of these substances.

Keywords: *HPLC/MS; Quinolon; Nalidixic acid; Oxolinic acid; Flumequine; Cinoxacin, Ciprofloxacin· Enoxacin; Ofloxacin; Norfloxacin; Lomefloxacin, Difloxacin, Danofloxacin, Enrofloxacin; Orbifloxacin; Sarafloxacin.*

Đặt vấn đề

An toàn thực phẩm là vấn đề đang được toàn xã hội quan tâm. Trong đó, công tác kiểm nghiệm thực phẩm đóng vai trò rất quan trọng. Việc này đòi hỏi phải có phương pháp kiểm nghiệm đáp ứng được các yêu cầu trong nước và thế giới, đặc biệt là các phương pháp phân tích dư lượng trong thực phẩm. Thẩm định phương pháp thử trong lĩnh vực hóa học nhằm đảm bảo phương pháp được xây dựng là phù hợp với mục đích sử dụng hoặc đảm bảo phòng thí nghiệm có đủ điều kiện và khả năng thực hiện tốt các phương pháp tiêu chuẩn. Theo quy định của ISO 17025 : 2005[3] thì tất cả các phương pháp cần phải được thẩm định trước khi được triển khai áp dụng. Vì vậy chúng tôi đã tiến hành thẩm định phương pháp phân tích đồng thời 14 chất nhóm quinolon trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi bằng kỹ thuật LC-MS/MS nhằm đáp ứng các yêu cầu trên và có thể áp dụng phân tích mẫu tại phòng thí nghiệm của Viện Kiểm nghiệm Vệ sinh an toàn thực phẩm Quốc gia.

Đối tượng và hóa chất, thiết bị nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

Các chất nhóm quinolon (14 chất): Acid oxolinic, acid nalidixic, flumequin, cinoxacin, ciprofloxacin, enoxacin, ofloxacin, norfloxacin, lomefloxacin, difloxacin, danofloxacin, enrofloxacin, orbifloxacin, sarafloxacin.

- Các loại nền mẫu phân tích: Mẫu thức ăn chăn nuôi và mẫu thịt lợn.

Dụng cụ, trang thiết bị

- Hệ thống LC-MS/MS: API 5500 TripQuad (ABS Sciex) kết hợp Shimadzu 20A

- Cột XBridge (150 mm x 2,1 mm; 3,5 µm) (Waters) và tiền cột tương ứng.

- Các loại bình định mức (Isolab) và pipet chính xác (Eppendorf).

- Cân phân tích có độ chính xác đến 0,01 mg (Mettler Toledo).

Hóa chất, chất chuẩn

- Các chất chuẩn nhóm quinolon (14 chất) (Sigma Aldrich).

- Nội chuẩn ciprofloxacin D8 (Dr Ehrenstorfer)

- Methanol, acetonitril (ACN), acid formic (FA), acid acetic, amoni format, amoni acetat (Merck) và nước cất 2 lần đạt yêu cầu dùng cho HPLC.

Xử lý kết quả

- Sử dụng các phần mềm Analyst 1.5.1 được cài đặt trong hệ thống LC-MS/MS.

- Phương pháp tính toán thống kê có sự hỗ trợ của phần mềm Microsoft Excel.

Quy trình phân tích

Các điều kiện phân tích trên LC-MS/MS

+ Cột sắc kí C18 XBrigde (150 mm x 2,1 mm; 3,5 µm) (Waters) và tiền cột tương ứng.

+ Thể tích tiêm mẫu 20 µl; nhiệt độ buồng cột: 30°C; tốc độ dòng: 0,5 ml/phút.

+ Chương trình Gradient pha động như sau:

Bảng 1: *Gradient pha động phân tích các chất quinolon trên cột XBrigde*

Thời gian (phút)	*ACN (FA 0,1%)*	*H_2O (FA 0,1%)*
Bắt đầu	20%	80%
1,0	50%	50%
7,0	70%	30%
7,5	20%	80%
10,0	20%	80%

Bảng 2: *Các thông số chung của detector MS*

Chế độ ion hóa	*ESI (+)*	*Nhiệt độ (Tem) (°C)*	*450*
Khí màn (CUR) (psi)	15	Khí nguồn ion 1 (GS1) (psi)	20
Khí phân mảnh (CAD) (psi)	7	Khí nguồn ion 2 (GS2) (psi)	20
Thế ion hóa (IS) (volt)	5000	Thế đầu vào (EP) (volt)	10

Bảng 3: *Các thông số chi tiết của các chất phân tích trên detector MS*

Chất phân tích	*$(M+H)^+$ m/z*	*DP (volt)*	*Product Ion 1*			*Product Ion 2*		
			m/z	*CE (eV)*	*CXP (volt)*	*m/z*	*CE (eV)*	*CXP (volt)*
Acid oxolinic	262	56	224	23	30	216	39	28
Acid nalidixic	233	96	215	19	22	187	23	24
Flumequin	262	106	202	43	26	244	25	28
Cinoxacin	263	111	189	37	18	245	21	20
Ciprofloxacin	332	91	314	27	34	288	23	22
Enoxacin	321	111	303	27	18	232	47	30
Ofloxacin	362	116	318	25	18	261	35	26
Norfloxacin	320	96	276	23	26	302	25	14
Lomefloxacin	352	86	265	31	30	308	23	18
Difloxacin	400	61	356	25	20	299	37	18
Danofloxacin	358	76	340	29	20	283	31	22
Enrofloxacin	360	41	316	25	18	342	27	20
Orbifloxacin	396	71	352	31	18	295	23	22
Sarafloxacin	386	51	342	37	18	299	25	20
Ciprofloxacin d8	340	96	322	25	34	296	27	38

(Trong đó: DP-declustering potential: thế phân mảnh; CE-collistion energy : năng lượng bắn phá tạo ion con; CXP-collision cell exit potential : thế chọn lọc ion con)

Quá trình xử lí mẫu

Xử lí mẫu sơ bộ: các mẫu thịt được bỏ phần da, gân, xương và xay nhỏ cho đồng nhất. Các mẫu thức ăn chăn nuôi được xay nghiền nhỏ và trộn đều cho đồng nhất.

Giai đoạn chiết mẫu: Cân khoảng 2 g mẫu đã đồng nhất cho vào ống ly tâm 50 ml có nắp kín. Thêm lượng nội chuẩn tương ứng với khoảng 100 ng/ml khoảng 30 ml acetonitril/TCA 4% trong nước cất (70/30), lắc đều, đem rung siêu âm 15 phút. Sau đó đem ly tâm 6000 vòng/phút trong 5 phút, lấy ra gạn phần dịch trong cho vào bình cô quay 100 ml. Chiết lại lần 2 với 15 ml acetonitril/

TCA 4% trong nước cất (70/30). Gộp dịch chiết thu được, đem cô quay chân không đến khi còn khoảng 10 ml. Thêm khoảng 20 ml nước cất, lắc đều, làm sạch qua cột SPE.

- Giai đoạn làm sạch mẫu được tiến hành với 02 loại cột SPE (C18-E và HLB): hoạt hóa với 6 ml methanol, 6 ml nước cất; loại tạp bằng 3 ml nước cất, 3 ml methanol:H_2O (10/90) và rửa giải lấy chất phân tích bằng 2 x 2 ml acetonitril. Dịch thu được lọc qua màng 0,45 µm và phân tích trên LC-MS/MS.

Kết quả và bàn luận

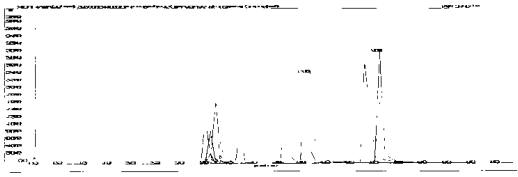
Tính thích hợp/phù hợp của hệ thống

Phân tích một dung dịch chuẩn hỗn hợp các chất có nồng độ xác định lặp lại tối thiểu 06 lần trên thiết bị LC-MS/MS với các thông số như trên. Tính toán độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của thời gian lưu và tỉ lệ diện tích pic thu được. Kết quả như sau:

Bảng 4: *Kết quả phân tích tính thích hợp của hệ thống*

RSD (%)	OXO	NAL	CIN	FLU	CIP	ENO	OFL
Std/IS	1,10	1,12	1,08	1,24	1,44	1,33	1,39
tR	0,67	0,42	0,68	0,40	1,22	1,21	1,25
RSD (%)	NOR	LOM	DIF	DAN	ENR	ORB	SAR
Std/IS	1,55	1,36	1,33	1,46	1,34	1,41	1,35
tR	1,30	1,15	0,70	1,19	0,99	0,84	0,68

Nhận xét: Từ những kết quả ở bảng trên nhận thấy các chất phân tích đều có giá trị RSD của thời gian lưu và tỉ lệ diện tích pic chuẩn/diện tích pic nội chuẩn nhỏ hơn 2% (trong khoảng từ 0,08% đến 1,55%). Như vậy, hệ thống LC-MS/MS phù hợp để phân tích đồng thời các chất nhóm quinolon.



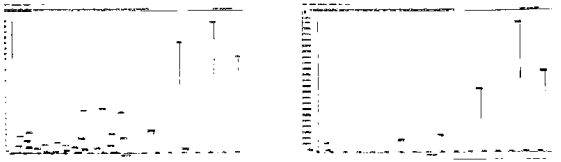
Hình 1: *Sắc đồ phân tích chuẩn các chất nhóm quinolon*

Độ đặc hiệu, độ chọn lọc

Trong phương pháp này, chúng tôi đã lựa chọn được chế độ phân tích là MRM với mỗi chất nghiên cứu sẽ có 02 cặp ion. Theo quy định của châu Âu (2002/657/EC) về phân tích dư lượng, các phương pháp phải đạt yêu cầu có ít nhất 4 điểm IP (Identification Point). Phương pháp của chúng tôi có 1 ion mẹ (precursor ion = 1 IP) và 2 ion con (product ion = 1,5 IP) với mỗi chất. Như vậy, phương pháp đã xây dựng đạt yêu cầu về độ đặc hiệu của châu Âu.

Mặt khác, trên sắc đồ mẫu dung dịch chuẩn hỗn hợp cho thấy pic của các chất nhóm quinolon xuất hiện độc lập tại các sắc đồ MRM. Trên sắc đồ mẫu trắng không xuất hiện pic nào tại thời gian lưu của quinolon trên sắc đồ mẫu dung dịch chuẩn, chỉ xuất hiện của pic nội chuẩn (IS). Trên sắc đồ mẫu trắng thêm chuẩn hỗn hợp xuất hiện các pic tại thời gian lưu của các chất nhóm quinolon trên sắc đồ mẫu dung dịch chuẩn.

Như vậy phương pháp phân tích đồng thời các chất quinolon bằng kỹ thuật LC-MS/MS có độ đặc hiệu và độ chọn lọc đạt yêu cầu.



Hình 2: *Phổ khối MS của norfloxacin (trái) và nalidixic acid (phải)*

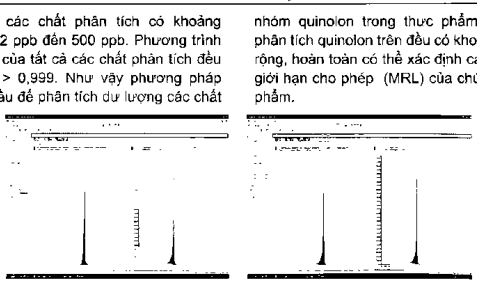
Khoảng tuyến tính và đường chuẩn

Phân tích dãy dung dịch chuẩn hỗn hợp trên hệ thống LC-MS/MS. Xây dựng đồ thị biểu thị mối tương quan tuyến tính giữa tỉ lệ diện tích pic chuẩn/diện tích pic nội chuẩn với nồng độ chất phân tích tương ứng. Kết quả thu được như sau:

Bảng 5: *Khoảng tuyến tính (TT) và đường chuẩn của các chất nhóm quinolon*

Chất phân tích	*Khoảng tuyến tính* (ppb)	PT y = ax + b	Hệ số R^2
Acid oxolinic	5 – 500	y = 0,015x - 0,0179	0,9997
Acid nalidixic	2 – 500	y = 0,0818x + 0,4696	0,9998
Cinoxacin	2 – 500	y = 0,02x + 0,0640	0,9999
Enoxacin	5 – 500	y = 0,0032x + 0,0429	0,9999
Ofloxacin	2 – 500	y = 0,0124x + 0,0222	0,9997
Lomefloxacin	2 – 500	y = 0,0125x + 0,1063	0,9997
Difloxacin	2 – 500	y = 0,0156x + 0,0815	0,9996
Danofloxacin	2 – 500	y = 0,0101x + 0,0365	0,9999
Orbifloxacin	2 – 500	y = 0,0125x + 0,0381	0,9996
Sarafloxacin	5 – 500	y = 0,0057x + 0,0278	0,9998
Norfloxacin	5 – 500	y = 0,0083x + 0,0262	0,9999
Flumequin	2 – 500	y = 0,0431x + 0,5179	0,9998
Ciprofloxacin	5 – 500	y = 0,0023x + 0,0082	0,9997

Nhận xét: các chất phân tích có khoảng tuyến tính từ 2 ppb đến 500 ppb. Phương trình đường chuẩn của tất cả các chất phân tích đều có giá trị $R^2 > 0,999$. Như vậy phương pháp này đạt yêu cầu để phân tích dư lượng các chất nhóm quinolon trong thực phẩm. Cả 14 chất phân tích quinolon trên đều có khoảng tuyến tính rộng, hoàn toàn có thể xác định các chất ở mức giới hạn cho phép (MRL) của chúng trong thực phẩm.



Hình 3: *Sắc đồ xây dựng đường chuẩn 200 ppb của cinoxacin và difloxacin*

Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng

Cách tính LOD và LOQ trong các phương pháp sắc kí thường dựa vào tỷ số tín hiệu/nhiễu đường nền (Signal/Noise). Thông thường:

LOD = nồng độ ứng với S/N = 3 và LOQ = nồng độ ứng với S/N = 10. Kết quả phân tích thử nghiệm mẫu trắng thêm chuẩn ở nồng độ thấp thu được kết quả sau:

Bảng 6: *Kết quả phân tích xác định LOD và LOQ của các chất*

Chất PT	*LOD (ppb)*	*LOQ (ppb)*	*Chất PT*	*LOD (ppb)*	*LOQ (ppb)*
Oxolinic acid	2,0	5,0	Norfloxacin	2,0	5,0
Nalidixic acid	0,6	2,0	Lomefloxacin	0,6	2,0
Flumequin	0,6	2,0	Difloxacin	0,6	2,0
Cinoxacin	0,6	2,0	Danofloxacin	0,6	2,0
Ciprofloxacin	2,0	5,0	Enrofloxacin	2,0	5,0
Enoxacin	2,0	5,0	Orbifloxacin	0,6	2,0
Ofloxacin	0,6	2,0	Sarafloxacin	2,0	5,0

Nhận xét: Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của phương pháp thấp hơn rất nhiều so với mức giới hạn tồn dư tối đa cho phép (MRL) của các chất phân tích trong thực phẩm. Vì vậy phương pháp đạt yêu cầu về độ nhạy để phân tích đồng thời dư lượng của các chất nhóm quinolon trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi.

Độ thu hồi và độ lặp lại của phương pháp

Tiến hành thêm một lượng chuẩn xác định của các chất phân tích vào nền mẫu trắng (mẫu đã xác định không có các chất cần phân tích) và tiến hành xử lí mẫu theo quy trình trên. Phân tích đồng thời 10 mẫu song song. Kết quả thu được như sau:

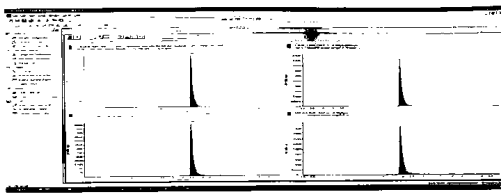
Bảng 7: *Kết quả phân tích độ lặp lại và độ thu hồi trên nền mẫu thịt lợn*

Chất phân tích	*SPE C18-E*		*SPE HLB*	
	R (%) (TB)	*RSD (%)*	*R (%) (TB)*	*RSD (%)*
Acid oxolinic	77,3 – 88,6 (82,4)	4,80	82,3 – 92,5 (86,3)	4,74
Acid nalidixic	78,7 – 90,7 (84,3)	5,33	82,9 – 97,6 (89,7)	6,27
Cinoxacin	66,3 – 81,3 (73,9)	6,15	78,5 – 93,7 (85,1)	6,58
Enoxacin	77,8 – 88,7 (82,0)	5,18	81,1 – 93,9 (88,5)	5,33
Ofloxacin	79,1 – 92,7 (84,6)	5,37	80,7 – 94,7 (86,0)	5,62
Lomefloxacin	76,4 – 93,4 (85,4)	6,08	82,3 – 97,8 (86,6)	5,61
Difloxacin	70,7 – 86,4 (79,2)	6,39	76,3 – 92,9 (83,1)	7,79
Danofloxacin	75,3 – 87,5 (81,9)	5,42	76,2 – 91,1 (85,2)	5,58
Orbifloxacin	78,8 – 93,9 (85,0)	6,52	82,1 – 96,3 (89,4)	5,53
Sarafloxacin	78,7 – 93,9 (85,3)	5,39	80,6 – 92,6 (87,6)	4,64
Norfloxacin	81,9 – 96,1 (88,8)	5,58	82,0 – 97,9 (90,8)	5,08
Flumequin	80,5 – 96,1 (88,3)	5,69	85,2 – 96,5 (90,8)	5,56
Ciprofloxacin	74,3 – 89,7 (82,7)	7,64	78,4 – 95,2 (84,9)	7,46
Enrofloxacin	75,0 – 91,7 (83,8)	7,57	82,8 – 92,5 (86,2)	6,36

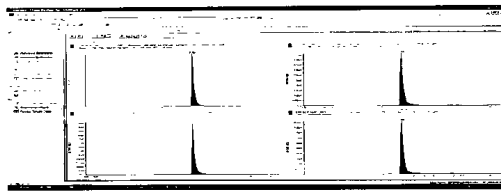
Bảng 8: *Kết quả phân tích độ lặp lại và độ thu hồi trên nền mẫu thức ăn chăn nuôi*

Chất phân tích	*SPE C18-E*		*SPE HLB*	
	R (%) (TB)	*RSD (%)*	*R (%) (TB)*	*RSD (%)*
Acid oxolinic	81,9 – 93,0 (85,4)	4,68	83,6 – 98,5 (89,8)	5,78
Acid nalidixic	73,4 – 84,7 (80,1)	4,84	84,3 – 97,7 (90,2)	5,02
Cinoxacin	72,0 – 89,6 (80,7)	7,69	77,6 – 95,3 (85,5)	7,80
Enoxacin	70,3 – 84,4 (76,6)	5,84	77,5 – 87,2 (80,7)	6,21
Ofloxacin	63,7 – 79,4 (73,8)	6,93	81,5 -92,9 (86,3)	5,62
Lomefloxacin	80,4 – 94,6 (85,4)	4,92	83,1 – 96,7 (87,2)	5,71
Difloxacin	70,4 – 79,1 (73,2)	5,38	87,3 – 96,5 (89,7)	5,25
Danofloxacin	56,3 – 69,4 (63,1)	5,79	77,4 – 91,3 (82,9)	5,92
Orbifloxacin	80,3 – 96,8 (86,4)	6,08	84,3 – 95,7 (88,9)	4,95
Sarafloxacin	78,7 – 92,6 (85,9)	5,75	80,1 – 92,7 (86,9)	5,39
Norfloxacin	70,2 – 79,7 (75,2)	5,19	75,0 – 87,9 (81,1)	5,29
Flumequin	77,7 – 93,2 (83,6)	5,60	86,7 – 96,6 (91,3)	4,88
Ciprofloxacin	75,7 – 85,7 (81,0)	4,89	77,8 – 89,2 (83,8)	4,45
Enrofloxacin	76,3 – 94,0 (83,8)	6,05	82,5 – 96,5 (91,5)	4,29

Nhận xét: Theo quy định của FDA và AOAC [1,2] thì khi phân tích dư lượng thuốc thú y trong thực phẩm các phương pháp phải có độ thu hồi tại khoảng nồng độ từ 10 µg/kg đến 100 µg/kg đạt trong khoảng từ 70% đến 110% và độ lặp lại phải có RSD < 15%. Từ các kết quả trên cho thấy phương pháp phân tích đồng thời dư lượng của 14 chất nhóm quinolon trong thịt và thức ăn chăn nuôi được thẩm định đạt yêu cầu của FDA, AOAC về độ thu hồi và độ lặp lại



Hình 4: *Sắc đồ phân tích độ lặp lại, độ thu hồi difloxacin/ thịt lợn (SPE HLB)*



Hình 5: *Sắc đồ phân tích độ lặp lại, độ thu hồi ciprofloxacin/TACN (SPE C18E)*

Kết luận

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng hệ thống LC-MS/MS hiện đại kết hợp với qui trình xử lí mẫu đã được nghiên cứu, lựa chọn các thông số điều kiện thích hợp để phân tích đồng thời dư lượng 14 chất nhóm quinolon trong thực phẩm [4,5]. Phương pháp đã được thẩm định theo các tiêu chí của AOAC. Kết quả cho thấy phương pháp có độ chọn lọc cao, khoảng tuyến tính rộng, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng thấp, độ lặp lại và độ thu hồi đạt yêu cầu. Như vậy phương pháp nghiên cứu có thể được áp dụng để triển khai phân tích dư lượng các chất nhóm quinolon trong các mẫu thực tế.

Tài liệu tham khảo

1 AOAC Official methods of analysis (2002), "Interlaboratory Collaborative study", *Appendix D: Guideline for Collaborative Study procedures to validate characteristics of a method of analysis.*

2. FDA, Food program Guidelines for chemical methods.

3. ISO/IEC 17025 (2005), General requirements for competence of testing and calibration laboratories.

4. R. Amatya (2010), "Multi-class, multi residue method for determination of penicillins, cephalosporins and quinolones in cow milk and validation in accordance with Commission Decision 2002/657/EC", *Masters thesis, University of Barcelona*, Barcelona.

5 Susan B. Clark, Joseph M. Storey (2008), "Optimization and validation of multi-class, multi-residue LC-MS/MS screening and confirmation method for drug residues in milk", *Food and Drug Administration*, USA.

(Ngày nhận bài: 04/03/2015 - Ngày duyệt đăng: 04/08/2015)