

XÂY DỰNG QUY TRÌNH CHIẾT PHA RẮN ĐỂ ĐỊNH LƯỢNG MỘT SỐ CHẤT THUỘC HỌ QUINOLONE TRONG MẬT ONG BẰNG PHƯƠNG PHÁP LC-MS

● ĐẶNG XUÂN DỰ

TÓM TẮT:

Trong nghiên cứu này, quy trình chiết pha rắn (SPE) để phân tích Difloxacin, Flumequin và Nalidixic acid thuộc họ Quinolone đã được đề xuất. Các loại cột chiết pha rắn, dung dịch chiết mẫu, dung dịch rửa cột và dung môi rửa giải đều có ảnh hưởng đến hiệu suất thu hồi chất phân tích. Cột chiết Oasis HLB phù hợp để chiết tách một số chất thuộc họ Quinolone. (EDTA 0,05M); ($H_2O+0,1\%FA$) và ($MeOH + 1\%FA$) lần lượt là dung dịch chiết mẫu, dung dịch rửa cột và dung môi rửa giải cho hiệu suất thu hồi cao đối với chất nghiên cứu trong quá trình chiết pha rắn trên cột Oasis HLB.

Từ khóa: Quinolone, chiết pha rắn, hiệu suất thu hồi, mật ong.

1. Đặt vấn đề

Mật ong là thực phẩm cao cấp do chứa nhiều chất dinh dưỡng. Chất lượng mật ong phụ thuộc khá nhiều vào thời tiết. Khi thời tiết thay đổi, ong dễ mắc bệnh, các loại kháng sinh thường được sử dụng để chữa bệnh cho ong dẫn đến việc tồn dư kháng sinh trong mật là không thể tránh khỏi. Các họ kháng sinh thường được tìm thấy trong mật ong bao gồm: Chloramphenicol, Tetracyclines, Sulfonamids, Quinolone và Nitrofurans... Trong đó, Quinolone là họ kháng sinh có phổ diệt khuẩn rộng nên thường được sử dụng để trị bệnh cho ong. Kết quả, dư lượng của họ kháng sinh này gây ra các tác hại đối với người sử dụng như: suy thận, tổn hại hệ thần kinh, gây đau cơ, viêm gân, khớp... [1].

Việc kiểm soát chất lượng mật ong hiện nay tập trung vào việc đánh giá dư lượng các loại kháng sinh có trong mật. Trong đó, tiêu biểu nhất là các chất họ Quinolone. Nhiều phương pháp phân tích dư lượng Quinolone trong mật ong cũng đã được

nghiên cứu như phương pháp kiểm tra nhanh ELISA, sắc ký lỏng hiệu năng cao...[2]. Trong đó, phương pháp sắc ký lỏng ghép khối phổ (LC-MS) được sử dụng nhiều nhất do có độ chọn lọc, độ chính xác và độ nhạy cao [3]. Tuy nhiên, thành phần chính của mật ong là các loại đường, vì vậy việc xử lý mẫu để phân tích hàm lượng Quinolones gặp rất nhiều trở ngại, việc loại bỏ đường mà không làm mất các chất cần phân tích là một yêu cầu không dễ để thực hiện.

Hiện nay, số lượng các nghiên cứu trong nước về xây dựng phương pháp xác định dư lượng họ Quinolone trong mật ong còn rất hạn chế. Nguyên nhân là do các loại kháng sinh này tồn tại trên nền đường, nên quá trình tách chiết chúng trước khi xác định nồng độ gặp rất nhiều trở ngại.

Trong nghiên cứu này, quy trình chiết mẫu trên pha rắn (SPE) đáp ứng yêu cầu xác định dư lượng Difloxacin, Flumequin và Nalidixic acid thuộc họ Quinolone trong mật ong bằng phương pháp LC-

MS đã được đề nghị. Ảnh hưởng của các yếu tố đến quá trình SPE cũng đã được khảo sát.

2. Thực nghiệm
2.1. Nguyên liệu, hóa chất

Các chất chuẩn Difloxacin hydrochloride, Flumequine và Nalidixic acid là sản phẩm tinh khiết của Sigma-Aldrich. Acid Formic (FA) và Methanol (MeOH) sản phẩm tinh khiết của Merck, Đức. Mẫu mật ong không nhiễm Quinolone của Highlandbee. Nước cất 2 lần được sử dụng cho toàn bộ thí nghiệm.

2.2. Phương pháp
2.2.1. Quy trình chiết pha rắn

Sơ đồ quy trình được thể hiện trên Hình 1. Mẫu được cân chính xác 2,00 g vào ống ly tâm 50 mL. Thêm 10 mL dung dịch EDTA. Đánh vortex 1 phút, đánh siêu âm 30 phút. Ly tâm với tốc độ 7000 rpm trong 5 phút ở 25°C. Hút 2 mL dịch chiết qua cột SPE đã được hoạt hóa bằng 3 mL MeOH, 3 mL nước cất. Rửa cột SPE bằng nước cất. Hút khô cột SPE trong 15 phút bằng bơm chân không. Rửa giải cột SPE bằng 3 mL MeOH. Dung dịch rửa giải được đem đi đuổi khô bằng hệ đuổi khí N₂. Phần còn lại sau khi đuổi khô được định mức bằng 1 mL hỗn hợp MeOH/H₂O cất (1/1).

Mẫu sau khi chiết theo quy trình được đánh vortex khoảng 1 phút, lọc qua siêu lọc nylon 0,22 μm, cho dung dịch sau lọc vào vial 2 mL, tiêm vào máy LC-MS [3].

2.2.2. Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình chiết pha rắn

Để xây dựng quy trình (Hình 1) hoàn chỉnh, các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình SPE như cột chiết, nồng độ dung dịch chiết mẫu, dung dịch rửa cột và dung môi rửa giải sẽ được khảo sát để lựa chọn các điều kiện phù hợp thông qua đánh giá hiệu suất thu hồi (HSTH), H% [4-5].

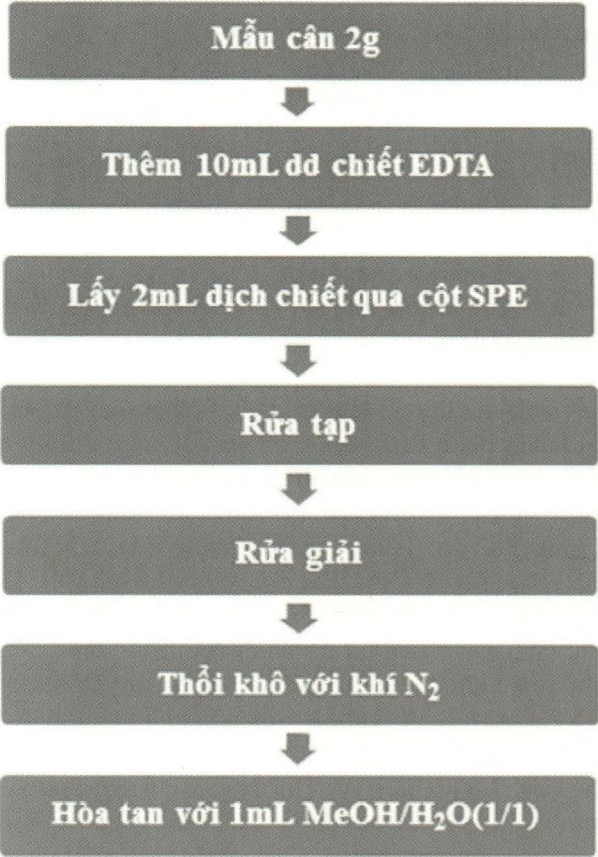
$H\% = (C_t/C_c) \cdot 100\%$

Trong đó: C_c là nồng độ chuẩn thêm vào (lý thuyết), C_t là nồng độ thực tế của chất phân tích trong mẫu trắng thêm chuẩn.

Chuẩn bị mẫu khảo sát: Cân chính xác 2,00 g mẫu trắng, thêm 200 μL chuẩn C_{mix} 100μg/L, nồng độ chuẩn thêm vào mẫu trắng là 10μg/kg, vortex. Để yên 1 giờ ở nhiệt độ phòng trước khi phân tích.

Ảnh hưởng của cột chiết: Các loại cột lựa chọn để khảo sát được trình bày ở Bảng 1. Mẫu khảo sát được xử lý theo quy trình như ở mục 2.2.1 đối với

Hình 1: Sơ đồ quy trình chiết pha rắn



Bảng 1. Các loại cột được lựa chọn để khảo sát

Ký hiệu	Tên cột	Hãng sản xuất
SPE1	Bond Elut C18	Agilent
SPE2	Oasis HLB	Water
SPE3	Strata SDB-L	Phenomenex

các loại cột khác nhau, thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Hiệu quả chiết tách của cột được đánh giá bằng HSTH khi thêm chuẩn có nồng độ 10 μg/kg vào mẫu trắng.

Ảnh hưởng của nồng độ dung dịch chiết EDTA: Các dung dịch chiết được lựa chọn để khảo sát gồm DD1 (H₂O), DD2 (0,05M EDTA) và DD3 (0,05M EDTA). Mẫu được xử lý theo quy trình như ở mục 2.2.1, thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Hiệu quả chiết kim loại cũng được đánh giá bằng HSTH khi thêm chuẩn có nồng độ 10 μg/kg vào mẫu trắng.

Ảnh hưởng của dung dịch rửa cột: Các dung dịch rửa cột được lựa chọn để khảo sát gồm RC1 (H₂O +

5% MeOH), RC2 (H₂O) và RC3 (H₂O + 0,1% FA). Mẫu được xử lý theo quy trình như ở mục 2.2.1, lặp lại 3 lần và đánh giá HSTH.

Ảnh hưởng của dung môi rửa giải: Các dung môi rửa giải được lựa chọn để gồm RG1 (MeOH), RG2 (MeOH + 1% FA) và RG3 (MeOH + 5% FA). Mẫu khảo sát được xử lý theo quy trình như ở mục 2.2.1, thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Hiệu quả rửa giải cũng được đánh giá bằng HSTH.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Ảnh hưởng của cột chiết và dung dịch chiết mẫu EDTA

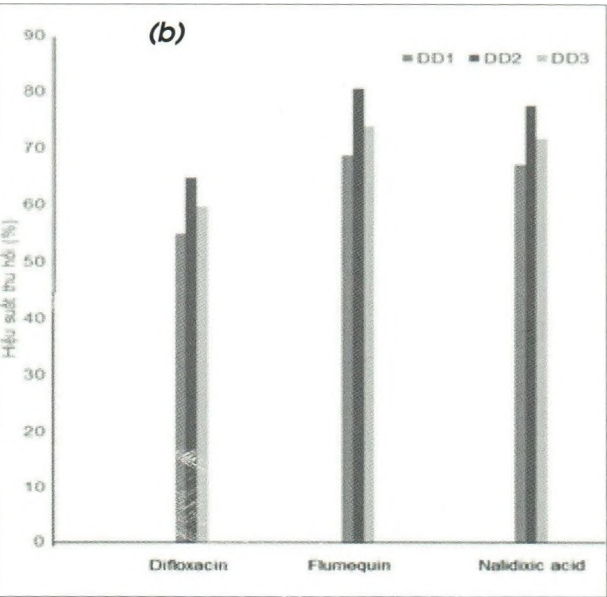
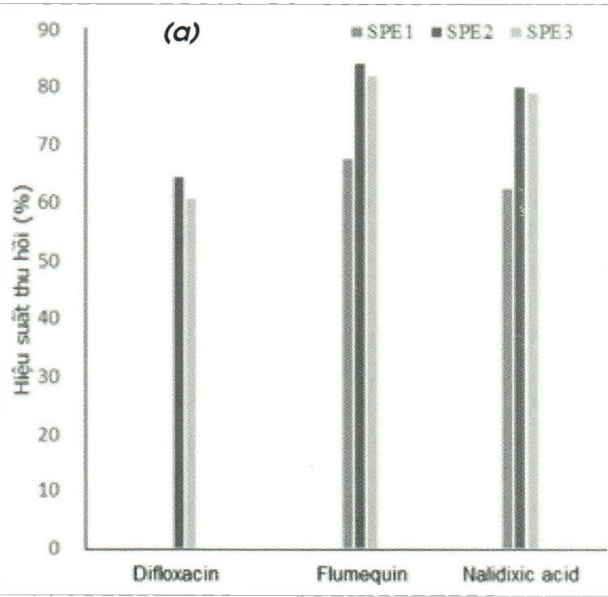
Mục tiêu của chiết pha rắn là loại nền mẫu và tạp chất mà không làm mất chất phân tích. HSTH của chất phân tích trên các loại cột được thể hiện trên Hình 2a. Hình ảnh cho thấy Difloxacin thu hồi kém trên cột SPE1, HSTH gần như bằng không. Trong khi đó, Flumequin và Nalidixic acid cho HSTH tương đối tốt. Điều này có thể là do C18 (SPE1) là cột pha đảo không phân cực, trong khi các chất phân tích có độ phân cực trung bình nên khó được lưu giữ lại trên cột [1]. Đối với cột SPE3, HSTH đạt được tương đối tốt. Flumequin và Nalidixic acid cho HSTH đạt được trên 79%. Mặc dù vậy, HSTH đối với Difloxacin chỉ đạt được ở mức 62%. SPE3 sử dụng chất hấp phụ là các polymer pha đảo, tương đối có ái lực với chất phân tích hơn so với các nhóm silanol hay gốc

hydrocarbon mạch thẳng kỵ nước có trong cột C18 [4]. Vì vậy, HSTH của SPE3 được cải thiện tốt hơn so với cột SPE1.

Khác với kết quả thu được từ SPE1 và SPE3, HSTH, các chất phân tích trên cột SPE2 đều lớn hơn 65%. HSTH cao đạt được đối với cột SPE2 là do loại cột này được cấu tạo bởi chất hấp phụ là co-polymer. Chất này vừa có khả năng ưa nước, vừa có pha đảo mạnh, nên sử dụng được cho rất nhiều hợp chất phân cực và không phân cực. Do đó, SPE2 có khả năng lưu giữ tốt chất phân tích. HSTH đối với chất phân tích thu được đối với SPE2 là khá cao. Vì vậy, loại cột này được chọn cho những khảo sát tiếp theo.

EDTA được dùng để loại bỏ ion kim loại, thành phần khoáng trong nền mẫu mật ong, để quá trình chiết chất phân tích diễn ra thuận lợi hơn. Hình 2b cho thấy, HSTH các chất phân tích khi sử dụng DD1, chỉ có H₂O không có EDTA, đều tương đối thấp hơn 70%, Trong đó, Difloxacin cho HSTH chỉ đạt khoảng 55%. Đối với DD2 và DD3, có thêm EDTA, HSTH đạt được cao hơn so với DD1. Điều này được giải thích là do các chất nghiên cứu thuộc họ Quinolone có khả năng tạo phức với ion kim loại [6]. Khi không dùng EDTA, các ion kim loại trong mật ong sẽ tạo phức với các chất nghiên cứu, gây trở ngại đối với quá trình chiết, dẫn đến HSTH đạt được không cao.

Hình 2: Hiệu suất thu hồi của các chất nghiên cứu trên các loại cột SPE (a) và theo nồng độ của EDTA (b)



Đối với DD2, khi có EDTA ở nồng độ 0,05M, HSTH các chất nghiên cứu thu được là khá tốt. Trong đó, Nalidixic acid có HSTH lớn hơn 75%, Flumequin cho HSTH đạt 80%. Khi tăng nồng độ EDTA lên 0,1M (DD3), HSTH các chất phân tích giảm. HSTH lớn nhất thu được là 75% đối với Flumequin. Điều này có thể là do ở nồng độ cao EDTA có sự cạnh tranh hấp phụ với các chất nghiên cứu trong cột SPE, làm HSTH giảm. Như vậy, DD2 (EDTA 0,05M) là dung dịch chiết mẫu phù hợp đối với cột SPE2.

3.2. Ảnh hưởng của dung dịch rửa cột và dung môi rửa giải

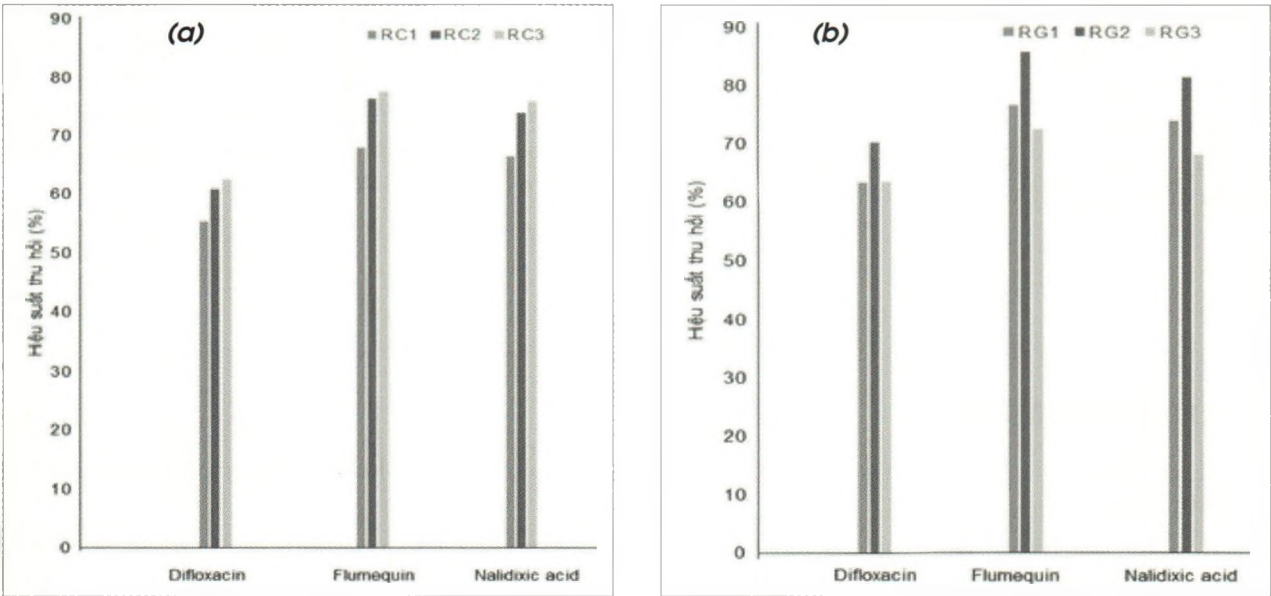
Quá trình rửa cột là bước làm tinh sạch chất phân tích bằng cách loại đi các tạp chất còn sót lại trong cột. HSTH chất phân tích theo các loại dung dịch rửa cột được thể hiện trên Hình 3a. Từ Hình 3a có thể nhận thấy, HSTH các chất phân tích đối với RC1 cho kết quả thấp hơn so với RC2 và RC3. Khi rửa cột bằng RC1, Flumequin và Nalidixic acid có HSTH không quá 70%, trong khi đó HSTH đối với Difloxacin chỉ đạt khoảng 55%. Cột SPE2 (Oasis HLB) thông thường được rửa bằng dung dịch H₂O + 5%MeOH. Tuy nhiên, kết quả khảo sát cho thấy dung dịch nước không chứa MeOH lại cho HSTH tốt hơn. Điều này có thể là do đối với nền mẫu mật ong có chứa nhiều đường và sử dụng EDTA trong dung dịch chiết nên H₂O không chứa

MeOH sẽ rửa tạp chất tốt hơn. Mặt khác khi thêm 5% MeOH vào dung dịch nước sẽ làm giảm độ phân cực của dung dịch rửa cột, dẫn đến chất phân tích có thể bị rửa đi một phần làm cho HSTH thấp. Đối với RC3, khi thêm 0,1%FA vào dung dịch nước, độ phân cực của dung dịch tăng thêm, HSTH cũng được gia tăng so với RC2. Từ kết quả thu được, RC3 (H₂O + 0,1%FA) là dung dịch rửa cột phù hợp đối với cột SPE2.

Xuất phát từ yêu cầu của dung môi rửa giải là phải rửa giải được hết các chất phân tích, nhưng không rửa luôn các tạp chất khác có trong cột. Do các chất họ Quinolone là chất phân cực trung bình, nên MeOH được chọn làm dung môi rửa giải. Để cải thiện hiệu quả rửa giải, dung môi được tăng dần độ phân cực bằng cách thêm vào FA. HSTH các chất phân tích theo các loại dung môi được thể hiện trên Hình 3.b.

Có thể nhận thấy trên Hình 3.b, HTSH các chất phân tích đối với RG1 là tương đối thấp. Như vậy, MeOH chưa phải là dung môi cho hiệu quả cao đối với quá trình rửa giải, dung môi này có thể chưa thể lôi kéo hoàn toàn chất phân tích ra khỏi cột. Đối với RG2, khi được tăng độ phân cực bằng 1%FA, HSTH các chất phân tích được gia tăng rõ rệt, đáng chú ý là Flumequin và Nalidixic acid cho HSTH trên 80%. Điều này chứng tỏ các chất phân tích được rửa giải khá hiệu quả bằng hệ

Hình 3: Hiệu suất thu hồi của các chất nghiên cứu theo dung dịch rửa cột (a) và dung môi rửa giải (b).



dung môi RG2. Đối với RG3, khi tiếp tục gia tăng độ phân cực bằng 5%FA, HSTH các chất phân tích giảm xuống. Điều này có thể là do độ phân cực lớn của dung môi rửa giải đã rửa giải luôn cả các tạp chất khác trong cột gây ảnh hưởng đến HSTH các chất phân tích. Như vậy, RG2 (MeOH + 1%FA) là dung môi rửa giải hiệu quả cho quá trình xử lý mẫu.

3.3. Xây dựng quy trình chiết pha rắn

Từ kết quả phân tích các yếu tố ảnh hưởng đến HSTH các chất nghiên cứu, sơ đồ quy trình xử lý mẫu khi phân tích Difloxacin, Flumequin và Nalidixic acid thuộc họ Quinolone trên nền mật ong được đề xuất như trên Hình 4. Mô tả chi tiết quy trình như sau:

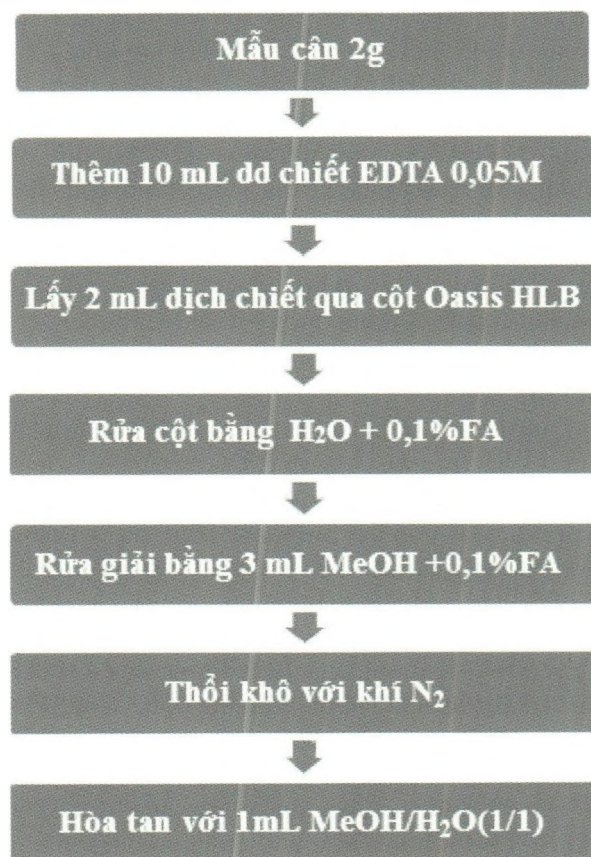
Mẫu mật ong được cân chính xác khoảng 2,00 g vào ống ly tâm 50 mL. Thêm 10 mL dung dịch 0,05M EDTA. Đánh vortex 1 phút, siêu âm 30 phút. Li tâm với tốc độ 7000 rpm trong 5 phút ở nhiệt độ 25°C. Hút 2 mL dịch chiết qua cột SPE Oasis HLB đã được hoạt hóa bằng 3 mL MeOH, 3 mL nước. Rửa cột SPE bằng H₂O + 0,1%FA. Hút khô cột SPE trong 15 phút bằng bơm chân không. Rửa giải cột SPE bằng 3 mL MeOH + 1%FA. Dung dịch rửa giải được đem đi đuổi khô bằng hệ đuổi khí N₂. Phần còn lại sau khi đuổi khô được định mức bằng 1 mL hỗn hợp MeOH/H₂O (1/1).

Việc xây dựng các qui trình để phát triển và thẩm định các phương pháp nội bộ có ý nghĩa quan trọng trong việc giảm chi phí cho các doanh nghiệp có nhu cầu phân tích theo các phương pháp không tiêu chuẩn [7]. Đối với họ kháng sinh Quinolone mới mức độ sử dụng khá phổ biến, việc nghiên cứu mở rộng quy trình phân tích trên các nền mẫu đa dạng khác cần được nghiên cứu mở rộng.

4. Kết luận

Quy trình xử lý mẫu để phân tích Difloxacin, Flumequin và Nalidixic acid thuộc họ Quinolone đã

Hình 4: Sơ đồ quy trình chiết pha rắn đề nghị



được đề xuất. Các loại cột chiết pha rắn, dung dịch chiết mẫu, dung dịch rửa cột và dung môi rửa giải có ảnh hưởng đến HSTH chất phân tích. Cột chiết SPE2 (Oasis HLB) phù hợp để chiết tách một số chất thuộc họ Quinolone. DD2 (EDTA 0,05M), RC3 (H₂O + 0,1%FA) và RG2 (MeOH + 1%FA) lần lượt là dung dịch chiết mẫu, dung dịch rửa cột và dung môi rửa giải cho hiệu suất thu hồi cao đối với chất nghiên cứu trong quá trình chiết pha rắn trên cột Oasis HLB ■

TÀI LIỆU THAM KHẢO:

1. K. J. Aldred, R. J. Kerns, N. Osheroff (2014). Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry*, 53(10), 1565-1574.
2. R. Mahmoudi, R. Norian, M. Pajohi-Alamoti (2014). Antibiotic residues in Iranian honey by ELISA. *Int. J. Food Prop.*, 17(10), 2367-2373.

3. Q. Tang, T. Yang, Tongtong, X. Tan (2009). Simultaneous determination of fluoroquinolone antibiotic residues in milk sample by solid - phase extraction - liquid chromatography - tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 57(11), 4535-4539.
4. Agilent Technologies (2017). *Agilent Bond Elut Silica-Based SPE Selection Guide*. USA: Agilent Technologies, Inc..
5. EU (2015). SANTE/11945/2015: Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed European Commission. [Online] Available at https://www.eurl-pesticides.eu/library/docs/allcrl/AqcGuidance_SANTE_2015_11945.pdf
6. V. Uivarosi (2013). Metal complexes of quinolone antibiotics and their applications: an update. *Molecules*, 18(9), 11153-11197.
7. Trần Cao Sơn và các cộng tác viên (2010). *Thẩm định phương pháp trong phân tích hóa học và vi sinh vật*. Hà Nội: Nxb Khoa học Kỹ thuật.

Ngày nhận bài: 25/1/2023

Ngày phản biện đánh giá và sửa chữa: 15/2/2023

Ngày chấp nhận đăng bài: 29/2/2023

Thông tin tác giả:

ĐẶNG XUÂN DUY

Trường Đại học Sài Gòn

DEVELOPING A SOLID-PHASE EXTRACTION PROCEDURE COUPLED WITH LC-MS FOR THE DETERMINATION OF SOME QUINOLONES IN HONEY

● **DANG XUAN DU**

Sai Gon University

ABSTRACT:

This study proposes a solid-phase extraction (SPE) procedure for the determination of Difloxacin, Flumequin and Nalidixic acid in the Quinolone family. The study finds out that the recovery rate of analytes is influenced by the SPE column types, sample-extraction solution, washing solvent, and elution solvent. The Oasis HLB SPE-column is appropriate for the extraction of some analytes of the Quinolone family. The high recovery rate of analytes achieved for SPE procedure on Oasis HLB column with sample-extraction solution, washing solvent and elution solvent are (EDTA 0.05M); (H₂O+0.1 percent FA) and (MeOH + 1 percent FA), respectively.

Keywords: Quinolones, SPE, recovery rate, honey.