

XÁC ĐỊNH DƯ LƯỢNG CHẤT KHÁNG KHUẨN HỌ SULFOAMIT TRONG THỰC PHẨM BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÍ LỎNG HIỆU NĂNG CAO (HPLC)

PHẦN 2. XÁC ĐỊNH DƯ

LƯỢNG SULFAGUANIDIN, SULFAMETHOXYPYRIDIN, SULFADOXIN VÀ SULFAMETHOXAZON TRONG CÁC MẪU THỨC ĂN CHĂN NUÔI VÀ MẪU THỰC PHẨM

CHU ĐÌNH BÌNH, NGUYỄN PHƯƠNG THANH, NGUYỄN THỊ ÁNH NGUYỆT, PHẠM LUẬN

1. GIỚI THIỆU

Ngày nay với cuộc sống ngày càng hiện đại vấn đề về an toàn thực phẩm luôn được đặt lên hàng đầu, bởi nó ảnh hưởng rất lớn đến sức khoẻ con người, nó cũng là một vấn đề lớn của các cơ sở chăn nuôi, sản xuất, chế biến và nhất là xuất khẩu sản phẩm thực phẩm. Do vậy, cần thiết phải kiểm soát, kiểm định các chất độc hại, có thể gây độc hại trong thực phẩm.

Sulfoamit (SAs) là một họ chất kháng khuẩn phổ rộng, nó là thành phần của các loại thuốc ho, sốt, cảm cúm. Bên cạnh đó sulfoamit còn được sử dụng rộng rãi trong thức ăn chăn nuôi gia súc, gia cầm và thủy hải sản để phòng một số bệnh nhiễm khuẩn cho vật nuôi. Việc tự do sử dụng các chất này ở nước ta hiện nay có thể dẫn đến tồn dư một lượng lớn quá giới hạn cho phép trong cơ thể động vật. Vì vậy nếu không kiểm soát thời gian dùng thuốc trước khi thu hoạch làm thực phẩm có thể dẫn đến việc xuất hiện các chủng kháng thuốc, và khi các vi sinh vật kháng thuốc xâm nhập vào cơ thể con người, có thể truyền khả năng kháng thuốc cho các vi sinh vật gây bệnh với tần suất cao hơn nhiều so với ngoài tự nhiên... Cho nên yêu cầu cần phải có phương pháp tốt để tách và xác định chính xác hàm lượng các sulfoamit trong thức ăn chăn nuôi và lượng tồn dư của chúng trong sản phẩm từ động vật. Có rất nhiều phương pháp xác định các sulfoamit trong các đối tượng mẫu khác nhau như phương pháp điện di mao quản [3, 8], phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao (HPLC) [6], phương pháp sắc kí lỏng khối phổ (LC-MS) [7].... Như đã đề cập trong [1] phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao HPLC với detector UV - Vis là một phương pháp thích hợp vì nó có độ chọn lọc và độ nhạy khá tốt đáp ứng được yêu cầu phân tích dư lượng chất kháng khuẩn trong mẫu thức ăn chăn nuôi và các mẫu thực phẩm.

2. DỤNG CỤ VÀ HOÁ CHẤT

2.1. Hoá chất

Sulfadoxin (SDO), sulfaguanidin (SGU), sulfamethoxypyridin (SMP) và sulfamethoxazon (SMX) loại chất đối chiếu hoá học, tinh khiết 99,9% của Viện Kiểm nghiệm Dược, Bộ Y tế Hải Bà Trung, Hà Nội.

Dung dịch gốc 1000 µg/ml được pha từ lượng cân trong metanol tinh khiết HPLC, dung dịch gốc được bảo quản trong tủ lạnh ở 4°C. Các dung dịch chuẩn được pha từ dung dịch gốc bằng dung môi giống như pha động chạy sắc kí để tránh pic ảo do sai khác dung môi gây ra. Các dung dịch loãng chỉ pha trong ngày, siêu âm loại khí và lọc qua cartridge loại 0,2 µm trước khi cho chạy HPLC. Metanol (MeOH), axetonitril (ACN), etylaxetat, n-hexan loại tinh khiết HPLC, Scharlaul, Tây Ban Nha.

Axit axetic băng, muối natri axetat, loại tinh khiết phân tích, Merck.

Dung dịch đệm pH = 4,5. Cân chính xác một lượng muối $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot \text{H}_2\text{O}$ loại tinh khiết phân tích đã tinh trước, hoà tan bằng khoảng 900 ml nước cất hai lần, chỉnh pH của dung dịch bằng axit axetic 20% loại tinh khiết hoá học tới pH = 4,5. Chuyển vào bình định mức dung tích 1000 ml và định mức tới vạch bằng nước cất. Lọc qua cartridge lọc 0,45 µm, loại khí bằng siêu âm trước khi chạy HPLC.

Các hoá chất khác: nước cất hai lần, tricloaxetat (TCA) loại tinh khiết phân tích, Na_2SO_4 khan loại tinh khiết phân tích, Merck.

2.2. Dụng cụ

Máy quang phổ hấp thụ phân tử UV-Vis 8453 của hãng Agilent - Mỹ (được điều khiển bằng phần mềm Chemstation cho phép quét phổ từ 190 – 1100 nm).

Máy đo pH TIM 800 của hãng Radiometer- Đan mạch với điện cực Red – Rod dùng để đo pH và bổ chỉnh nhiệt độ tự động.

Máy sắc kí lỏng hiệu năng cao bao gồm: Bộ loại khí cho dung môi degassor 7100, bơm cao áp 4 kênh LC 7600 Pump của hãng Hitachi – Nhật bản, van bơm mẫu sáu chiều của Reodyn - Mỹ, detector từ ngoại khả kiến UV- 200 Linear - Mỹ, máy ghi Kipp- Zonen của Đức.

Máy sinh khí N_2 của hãng Chropack, Đức, máy khuấy từ gia nhiệt, máy li tâm và các dụng cụ thí nghiệm cần thiết khác.

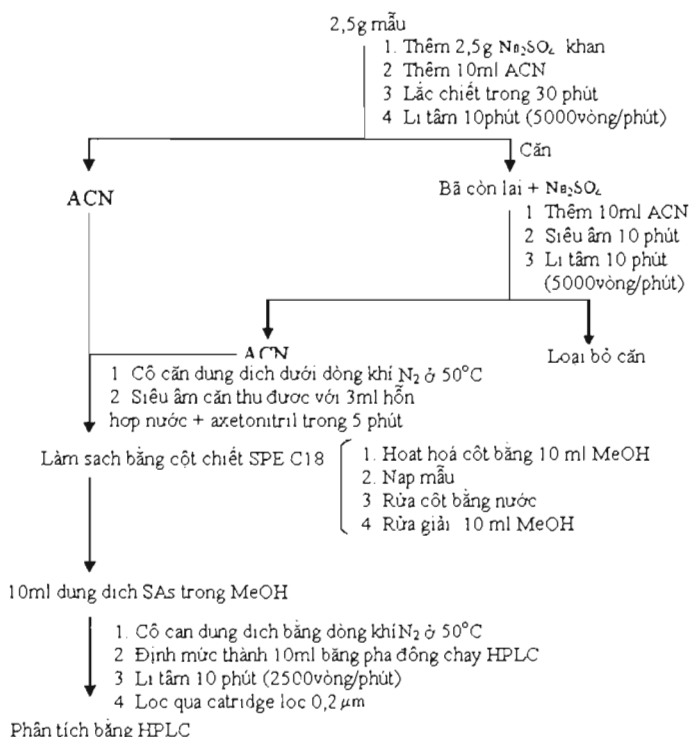
2.3. Mẫu phân tích

a. Mẫu thực phẩm (tôm đông lạnh, gan gà và gan lợn) được thu thập từ các chợ đầu mối, mẫu lấy về được phân loại và bảo quản trong tủ lạnh ở 4°C. Mẫu được nghiền mịn bằng cối mã não sau đó xử lí theo quy trình dưới đây [3, 4].

b. Mẫu thức ăn chăn nuôi thu thập từ các cơ sở chế biến bao gồm các mẫu thức ăn cho tôm, thức ăn cho gia cầm và thức ăn cho gia súc. Mẫu được xử lí theo hai quy trình.

Quy trình 1: Mẫu thức ăn chăn nuôi được nghiền nhỏ, trộn đều. Cân một lượng chính xác 0,2g cho vào bình nón 200 ml. Thêm vào 10 ml dung môi etylaxetat 20% tricloaxetat (TCA) và 5 g Na_2SO_4 khan, lắc đều trên máy lắc trong 30 phút. Sau đó đem li tâm với tốc độ 5000 vòng/phút khoảng 10 phút. Gạn lấy phần dung môi trong, quá trình chiết được lặp lại 3 lần. Dịch chiết được gom lại (khoảng 30 ml) và làm bay hơi dịch chiết bằng khí N_2 ở 50°C. Phần cặn còn lại hoà tan và định mức thành 10ml bằng pha động chạy sắc kí. Lọc dung dịch qua cartridge 0,2 µm trước khi bơm vào cột HPLC.

Quy trình 2: Cân một lượng chính xác 0,2 g mẫu đã được nghiền đồng thể, chuyển vào bình nón 200 ml. Thêm vào 10 ml dung môi ACN 20% tricloaxetat (TCA) lắc đều trên máy lắc 30 phút. Rồi thêm 5 ml n-hexan và trộn đều trong bể siêu âm trong 5 phút. Đem hỗn hợp li tâm với tốc độ 5000 vòng/phút. Gạn lấy phần dịch trong, quá trình chiết được lặp lại 3 lần. Dịch chiết được gom lại (khoảng 30 ml) và làm bay hơi bằng khí N_2 ở 50°C. Phần cặn còn lại định mức thành 10 ml bằng hỗn hợp pha động. Lọc dung dịch qua cartridge 0,2 µm trước khi bơm vào cột HPLC.



Hình 2.3.1. Quy trình xử lý mẫu thực phẩm

2.4. Các điều kiện phân tích

Từ các điều kiện đã khảo sát và kết quả thực nghiệm các điều kiện tối ưu để tách và định lượng SDO, SGU, SMP và SMX như sau [1]:

Các điều kiện HPLC

Van bơm mẫu	6 chiều, thể tích bơm mẫu: 20 μl
Cột tách	Supelcosil C_{18} (25 cm $\times$ 4,6 mm; 5 μm)
Thành phần pha động:	20% ACN 80 % dung dịch đệm axetat 0,01 M, pH = 4,5 chạy đẳng dòng
Tốc độ pha động:	F = 0,8 ml/phút
Detector UV – Vis:	$\lambda = 270 \text{ nm}$ Rise time: 0,1 giây Range: 0,01 (AUFS)
Nhiệt độ:	Nhiệt độ phòng
Máy ghi:	Tốc độ giấy: 1 mm/ phút Thế ghi: 10 mV

3. KẾT QUẢ VA THẢO LUẬN

3.1. Xác định hiệu suất thu hồi

3.1.1. Mẫu thức ăn chăn nuôi

Với hai quy trình xử lý mẫu như trên đã đề cập, tiến hành xử lý mẫu và phân tích trong cùng điều kiện. Kết quả thu được trong bảng sau.

Bảng 3.1.1. Kết quả xác định hiệu suất thu hồi theo phương pháp 1

C_i(ppm) SAs	0	0,04						$\overline{C_x}$ (ppm)	$\overline{H}$ (%)
		Lần 1		Lần 2		Lần 3			
		H _{pic} (mm)	C _x (ppm)	H _{pic} (mm)	C _x (ppm)	H _{pic} (mm)	C _x (ppm)		
SGU	36,0	48,0	0,0288	47,0	0,0321	47,0	0,0321	0,0310	77,50
SMP	0,0	8,0	0,0248	9,0	0,0292	9,0	0,0292	0,0280	70,00
SDO	0,0	7,0	0,0282	7,0	0,0282	7,0	0,0282	0,0292	70,50
SMX	0,0	6,5	0,0297	6,0	0,0268	7,0	0,0327	0,0297	74,33

Bảng III.1.2. Kết quả xác định hiệu suất thu hồi theo phương pháp 2

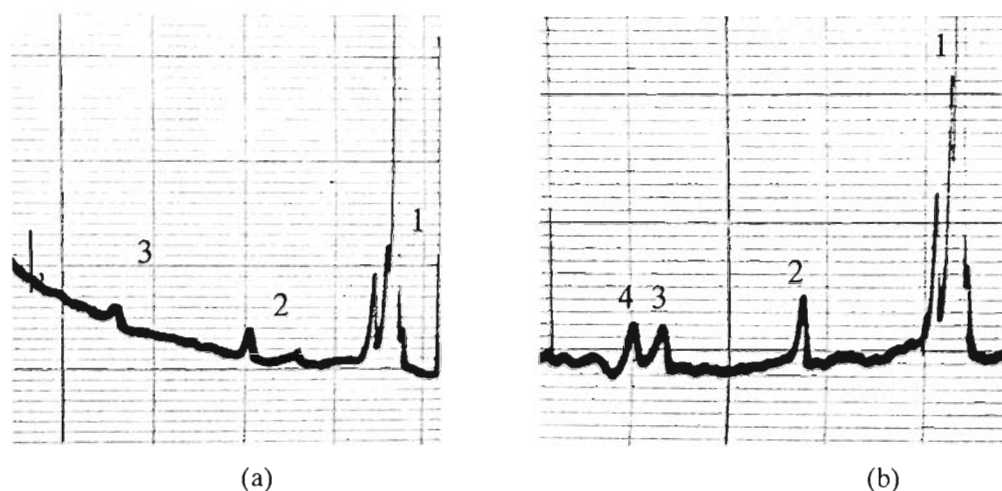
C_i (ppm) SAs	0	0,04						$\overline{C_x}$ (ppm)	$\overline{H}$ (%)
		Lần 1		Lần 2		Lần 3			
		H_{pic} (mm)	C_x (ppm)	H_{pic} (mm)	C_x (ppm)	H_{pic} (mm)	C_x (ppm)		
SGU	45	55,0	0,0288	57,0	0,0350	57,5	0,0360	0,0332	83,00
SMP	0	9,0	0,0292	9,0	0,0292	9,0	0,0292	0,0292	73,00
SDO	0	7,0	0,0282	7,0	0,0282	7,0	0,0282	0,0282	70,50
SMX	0	6,5	0,0297	6,5	0,0297	7,5	0,0356	0,0317	79,25

Áp dụng phương pháp thông kê để đánh giá sự khác nhau giữa hai quy trình xử lý mẫu. Quy trình xử lý mẫu hai cho hiệu suất thu hồi các SAs cao hơn nên các mẫu thức ăn chăn nuôi được xử lý theo quy trình này.

3.1.2. Mẫu thực phẩm

Sử dụng quy trình phân tích mẫu ở trên để đánh giá hiệu suất thu hồi của tổng thể quy trình xử lý mẫu sử dụng mẫu là sản phẩm tôm đông lạnh. Mẫu tôm đông lạnh được để rã đông sau đó

nghiên nhỏ và cân một lượng chính xác và tiến hành xử lí. Một mẫu khác cũng tiến hành tương tự nhưng có thêm các chất phân tích. Tiến hành làm lặp mỗi mẫu ba lần và kết quả được chỉ ra trong bảng 3.1.2 và hình 3.1.2



Hình 3.1.2. Sắc đồ của mẫu tôm

a. mẫu tôm chưa thêm, b. mẫu tôm đã thêm 4 chất nồng độ 0,004ppm
thứ tự các pic trên sắc đồ là 1. SGU, 2. SMP, 3. SDO, 4. SMX

Bảng 3.1.2. Kết quả xác định hiệu suất thu hồi các SAs

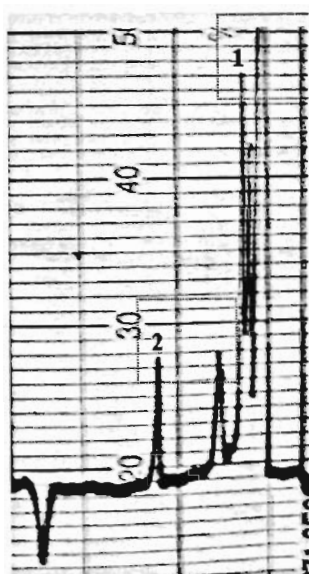
Các SAs	$C_i(\mu\text{g/ml})$	$C_x(\mu\text{g/ml})$	H%
SGU	0,0400	0,0346	86,50
	0,0600	0,0485	80,83
	0,0800	0,0646	80,75
SMP	0,0400	0,0300	75,00
	0,0600	0,0462	77,00
	0,0800	0,0646	80,75
SDO	0,0400	0,0300	75,00
	0,0600	0,0480	80,00
	0,0800	0,0630	78,75
SMX	0,0400	0,0300	75,00
	0,0600	0,0530	88,89
	0,0800	0,0720	90,00

Như vậy trong khoảng nồng độ 0,04 – 0,08 $\mu\text{g/ml}$, hiệu suất thu hồi các chất kháng khuẩn SAs đạt từ 75 – 90%, hiệu suất thu hồi như vậy là đạt yêu cầu. Tuy nhiên kết quả xác định hiệu

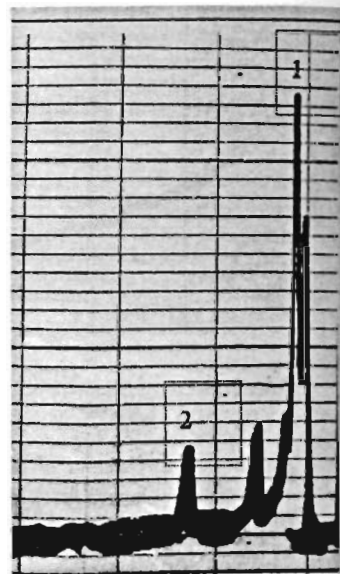
xuất thu hồi trên có lặp lại kém vì vậy các mẫu phân tích được tiến hành bằng phương pháp thêm chuẩn.

3.2. Phân tích một số mẫu thực

Phân tích một số mẫu thức ăn chăn nuôi



(a)



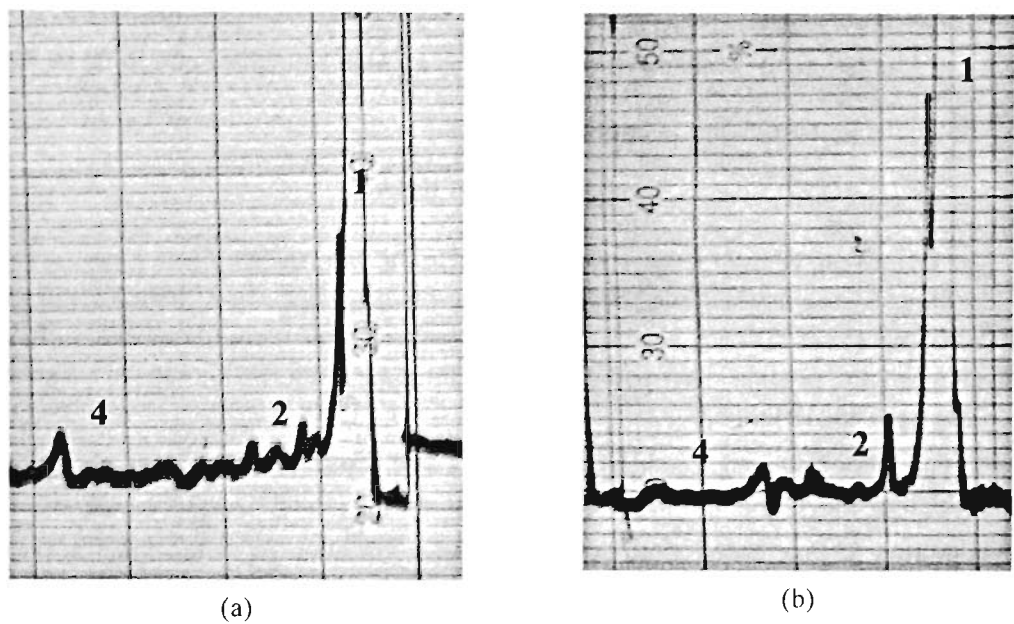
(b)

Hình 2.2.1. Sắc đồ của mẫu thức ăn chăn nuôi
a. mẫu thức ăn cho gia cầm, b. mẫu thức ăn cho gia súc

Mẫu phân tích		SDO($\mu\text{g/g}$)	SGU($\mu\text{g/g}$)	SMP($\mu\text{g/g}$)	SMX($\mu\text{g/g}$)
Thức ăn gia cầm	M11	< LOQ	$37,50 \pm 0,34$	$7,50 \pm 0,15$	< LOQ
	M12	< LOQ	$33,50 \pm 1,04$	$5,98 \pm 0,32$	< LOQ
	M13	< LOQ	$36,05 \pm 1,31$	$7,34 \pm 0,58$	< LOQ
Thức ăn gia súc	M21	< LOQ	$8,75 \pm 0,20$	< LOQ	< LOQ
	M22	< LOQ	$85,20 \pm 1,79$	$8,79 \pm 0,52$	< LOQ
	M23	< LOQ	$102,90 \pm 1,56$	$4,63 \pm 0,33$	< LOQ
Thức ăn tôm, cá	M31	< LOQ	$122,06 \pm 7,34$	$15,38 \pm 0,40$	< LOQ
	M32	< LOQ	$241,44 \pm 8,75$	$285,90 \pm 3,50$	< LOQ

Ghi chú: Mẫu M11, M13 là mẫu thức ăn hỗn hợp dạng viên, M12 là mẫu thức ăn dạng viên. M21 là mẫu thức ăn gia súc đậm đặc dạng bột, M22 là mẫu thức ăn cho heo 15 – 30 kg, M23 là mẫu thức ăn cho heo. M31 là mẫu thức ăn cho cá dạng viên, M32 là mẫu thức ăn cho tôm dạng bột

Áp dụng quy trình phân tích và xử lí mẫu trên phân tích một số mẫu thực là tôm, gan gà, gan lợn thu được sắc đồ và kết quả trong hình và bảng dưới.



Hình 3.2.1. Sắc đồ của mẫu thực phẩm a. mẫu gan gà, b.mẫu gan lợn

Mẫu phân tích		SDO($\mu\text{g/g}$)	SGU($\mu\text{g/g}$)	SMP($\mu\text{g/g}$)	SMX($\mu\text{g/g}$)
Mẫu tôm đông lạnh	M1	$0,053 \pm 0,006$	$0,120 \pm 0,016$	$0,053 \pm 0,002$	< LOQ
	M2	$0,064 \pm 0,007$	$0,268 \pm 0,010$	$0,043 \pm 0,005$	< LOQ
Mẫu gan gà	< LOQ	< LOQ	$0,100 \pm 0,010$	$0,052 \pm 0,005$	$0,148 \pm 0,007$
Mẫu gan lợn	< LOQ	< LOQ	$0,273 \pm 0,010$	$0,055 \pm 0,003$	$0,068 \pm 0,007$

Với kết quả thu được nhận thấy trong thức ăn chăn nuôi các sulfoamit chủ yếu được sử dụng là SGU và SMP với hàm lượng khá lớn và nhận thấy trong các thực phẩm hàm lượng của hai chất này cũng khá cao và một vài mẫu thức ăn vượt ra ngoài tiêu chuẩn cho phép đối với các sulfoamit là 100 $\mu\text{g/kg}$ [2].

4. KẾT LUẬN

Bằng phương pháp phân tích sắc kí lỏng hiệu năng cao (HPLC) có khả năng phân tích xác định đồng thời các chất kháng khuẩn họ sulfoamit trong thức ăn chăn nuôi và trong thực phẩm. Kết quả phân tích cho thấy trong thức ăn chăn nuôi có chứa các chất kháng khuẩn và có thể đây là nguồn gốc tồn dư chất kháng khuẩn trong thực phẩm. Tuy nhiên để đánh giá chính xác và truy nguyên được nguồn gốc tồn dư của các chất này cần phải có nghiên cứu về quá trình tích lũy và đào thải của các chất này đối với các gia súc và gia cầm. Các vấn đề này sẽ được đề cập trong một nghiên cứu khác.

Với những kết quả thu được thì phương pháp HPLC này có thể sử dụng để phân tích dư lượng các chất kháng khuẩn trong đối tượng là thực phẩm phục vụ cho công tác vệ sinh an toàn thực phẩm bảo vệ sức khoẻ con người.

Lời cảm ơn. Các tác giả xin chân thành cảm ơn sự hỗ trợ kinh phí nghiên cứu từ đề tài B2008-01-191.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chu Đình Bính, Nguyễn Phương Thanh, Nguyễn Thị Ánh Nguyệt, Phạm Luận - Xác định dư lượng kháng khuẩn trong thực phẩm bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), Phần 1. Tối ưu hoá các điều kiện tách và định lượng đồng thời sulfadoxin, sulfaguanidin, sulfamethoxypyridin và sulfamethoxazon bằng HPLC, Tạp chí Khoa học và Công nghệ **45** (1B) (2007).
2. Bộ thủy sản - Danh mục các hoá chất và kháng sinh hạn chế sử dụng trong sản xuất, kinh doanh thủy sản, Quyết định số 07/2005/QĐ-BTS ngày 22/02/2005 của Bộ Thủy sản.
3. Ming-Ren S. Fuh, Su-Yi Chu - Quantitative determination of sulfonamide in meat by solid-phase extraction and capillary electrophoresis, *Analytica Chimica Acta* **499** (2003) 215-221.
4. Leo M. N. - *Nollet Food analysis by HPLC*, Second edition Revised and Expanded, Marcel Dekker Inc., 2000, pp. 621-693.
5. Ivan Pecorelli, Rita Bibi, Laura Fioroni, Roberta Galarini - Validation of a confirmatory method for determination of sulphonamides in muscle according to the European Union regulation 2002/657/EC, *Journal of Chromatography A* **1032** (2004) 23-29.
6. Che-Yi Lin, Shang-Da Huang - Application of liquid-liquid microextraction and high performance liquid chromatography for the determination of sulfonamides in water *Analytica Chimica Acta* **612** (2008) 37-43.
7. Doreen Richter, Uwe Dunnbier, Gudrun Massmann, Asaf Pekdeger - Quantitative determination of three sulfonamides in environmental water samples using liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* **1157** (2007) 115-121.
8. Guillermina Font, Ana Juan-García, Yolanda Picó - Pressurized liquid extraction combined with capillary electrophoresis-mass spectrometry as an improved methodology for the determination of sulfonamide residues in meat, *Journal of Chromatography A* **1159** (2007) 233-241.

SUMMARY

DETERMINATION SULPHONAMIDES RESIDUES IN FOOD BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

PART 2. SEPARATION AND QUANTIFICATION SULFAGUANIDINE, SULFAMETHOXYPYRIDINE, SULFADOXINE AND SULFAMETHOXAZONE IN ANIMAL FOODSTUFFS AND FOOD PRODUCTS

Use of an RP-C18 analytical column with a mobile phase at pH = 4,5 enabled excellent chromatographic separation and quantification of sulfadoxine (SDO), sulfaguanidine (SGU), sulfamethoxypyridine (SMP) and sulfamethoxazole (SMX) in animal foodstuffs (for fish, shrimp, chicken and pig) and food products (frozen shrimp, chicken liver and pig liver). The proposed conditions are used for rapid and reliable analytical SDO, SGU, SMP and SMX content all samples above. Results was indicated sulphonamides residues in some samples of animal foodstuffs and food products higher than maximum residue level [2].

Địa chỉ:

Nhận bài ngày 29 tháng 5 năm 2008

Chu Đình Bính, Nguyễn Phương Thanh

Khoa Công nghệ Hoá học, Trường Đại học Bách khoa Hà Nội

Phạm Luận, Nguyễn Thị Ánh Nguyệt,

Khoa Hoá học, Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội.