



ỨNG DỤNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG GHEP KHỐI PHỔ TỬ CỰC/THỜI GIAN BAY (UPLC-QTOF-MS) ĐỂ GIÁM SÁT TỒN DƯ KHÁNG SINH TRONG THỊT, CÁ

Nguyễn Văn Chính*, Đặng Mai Tuyết Trang, Đoàn Thị Trúc Kha,
Cao Thị Quỳnh Mai, Lê Văn Thiện, Bùi Huy Hoàng, Lâm Văn Tú

Chi Cục Thú y vùng VI

(Ngày đến tòa soạn: 1/7/2019; Ngày sửa bài sau phản biện: 26/8/2019;
Ngày chấp nhận đăng: 5/9/2019)

Tóm tắt

Tồn dư kháng sinh trong thịt và sản phẩm động vật là một trong những vấn đề đang nhận được sự quan tâm của cả xã hội vì những ảnh hưởng và nguy cơ mà nó gây ra cho sức khỏe con người, đặc biệt là tình trạng kháng kháng sinh. Hiện nay có rất nhiều loại kháng sinh đang được sử dụng trên thị trường với nhiều đặc tính sinh học và hóa học khác nhau. Do đó, việc giám sát, theo dõi các chất tồn dư trong thịt và sản phẩm động vật thông qua kiểm nghiệm mẫu là việc làm cần thiết. Các phương pháp sắc ký lỏng, ELISA trong thời gian qua là phương pháp được nhiều phòng thử nghiệm sử dụng để thực hiện phân tích mẫu tìm những chất, nhóm chất tồn dư cụ thể. Hiện nay, kỹ thuật Khối phổ thời gian bay (Time-Of-Flight - TOF) là một phương pháp mới, hiện đại có độ chính xác khối cao đã được một số phòng xét nghiệm ứng dụng để thực hiện kiểm nghiệm sàng lọc, phát hiện các chất, nhóm chất tồn dư trong thực phẩm. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng hệ thống sắc ký lỏng ghép nối tứ cực thời gian bay (UPLC-QTOF-MS) để kiểm nghiệm sàng lọc, phân tích tồn dư kháng sinh, chất cấm khác nhau thuộc các nhóm như Sulfonamid, Quinolone, Tetracycline, Beta-Agonist... và một số loại độc tố khác trong mẫu thịt heo, thịt gà, thịt bò, cá. Kết quả bước đầu thực hiện kiểm nghiệm sàng lọc đối với 93 mẫu khảo sát được thu thập ngẫu nhiên đã phát hiện tồn dư một số loại kháng sinh như Amoxicillin, Cefalexin và Ampicillin.

Từ khóa: Giám sát, tồn dư, kháng sinh, thịt, cá, QTOF-MS.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Từ năm 1928, kháng sinh đã đóng một vai trò rất quan trọng trong sự phát triển của con người, trong việc điều trị nhiều loại bệnh mà trước kia có thể gây tử vong. Ngày nay kháng sinh được sử dụng rất rộng rãi, không chỉ trong trị bệnh cho con người mà còn dùng nhiều trong chăn nuôi và thủy sản, với mục đích phòng, trị bệnh và kích thích tăng trưởng. Tuy nhiên, việc lạm dụng thuốc kháng sinh, cả trong điều trị và chăn nuôi đã gây ra nhiều hệ lụy xấu, như xuất hiện vi khuẩn kháng kháng sinh, tồn dư các chất và chất chuyển hóa có khả năng gây bệnh, gây ung thư với con người. Việc tầm soát, kiểm soát tồn dư kháng sinh trong sản phẩm động vật dùng làm thực phẩm đã được sự quan tâm của các cơ quan ban ngành như Bộ Y tế, Bộ Nông nghiệp và phát triển nông thôn qua hàng loạt các Chỉ thị, Quyết định và Thông tư [1,2].

Do có hàng trăm loại kháng sinh khác nhau đã được các nhà khoa học nghiên cứu và đưa vào sử dụng và các phương pháp phân tích thông dụng hiện nay (ELISA, HPLC, LC-MS) chỉ có thể phân tích 1 nhóm chất nhất định nên có khả năng bỏ qua mẫu nhiễm kháng sinh. Phương pháp sử

* Điện thoại: 093 345 9823 Email: nvchinh.blue@gmail.com

dụng thiết bị sắc ký lỏng siêu hiệu năng ghép nối detector khối phổ tứ cực thời gian bay (UPLC-QTOF-MS), kết hợp với cơ sở dữ liệu về nhiều loại kháng sinh khác nhau, có thể giải quyết được điều này. Dữ liệu thu được có độ phân giải cao, lên đến 45000 FWHM (Full Width at Half Maximum - Độ rộng tại ½ chiều cao peak) và độ chệch khối nhỏ, đến dưới 2 ppm [3] giúp phát hiện chính xác các chất chưa biết. Những thiết bị sử dụng kỹ thuật này trong những năm gần đây được sử dụng nhiều trong các hoạt động nghiên cứu, xác định cấu trúc, tìm các chất mới trong thực phẩm [4,5] hay trong các loại thảo dược [6,7]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng hệ máy UPLC-ESI-QTOF-MS để phân tích sàng lọc tồn dư kháng sinh trong các mẫu sản phẩm động vật. Phương pháp đã được thẩm định và cho kết quả đáng tin cậy.

2. NỘI DUNG, NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nội dung nghiên cứu

Thu thập mẫu sản phẩm động vật, thủy sản (thịt heo, gà, trâu, bò, cá) từ các chợ tại địa phương. Mẫu được phân tích bằng UPLC-QTOF-MS. Dữ liệu thu được được so sánh với Cơ sở dữ liệu thuốc thú y (Vet Drugs Personal Compound Database and Library - Vet Drugs PCDL) để tìm ra các chất kháng sinh có thể có trong mẫu.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thu thập mẫu

Mẫu được lấy ngẫu nhiên từ chợ tại địa phương sau đó mẫu được xay nhuyễn đồng nhất và được bảo quản trong điều kiện -20°C. Trước khi thực hiện phân tích, mẫu được đưa đến nhiệt độ phòng.

2.2.2. Quy trình phân tích bằng UPLC-QTOF-MS

Mẫu được phân tích như sau: [8] Hai (2) gam mẫu được tách chiết bằng 5 mL acetonitrile. Dịch chiết được làm sạch bằng bột C18, sau đó được lọc bằng màng lọc 0,22 µm và được tiêm vào máy. Thiết bị sử dụng bao gồm:

- Máy sắc ký lỏng siêu hiệu năng (UPLC)
- Detector khối phổ: Tứ cực (Triplequad) - Thời gian bay (Time-of-flight)
- Máy tính với hệ thống dữ liệu về khối phổ của các chất kháng sinh.

Điều kiện phân tích: Cột sắc ký sử dụng là cột Eclipse Plus C18 RRHD 1,8 µm, 3,0 x 150 mm. Pha động gồm H₂O/0,1% acid formic và acetonitrile, phân tích theo chế độ gradient, với acetonitrile 5% trong 1 phút, tăng lên 50% tại phút thứ 5, lên 95% tại phút thứ 9 và được giữ trong 5 phút. Thời gian phân tích 1 mẫu là 20 phút. Tốc độ dòng là 0,3 ml/phút và cột sắc ký được giữ tại 40°C. Thể tích mẫu được tiêm vào là 5 µl. Mẫu được phân tích tại chế độ ion hóa phun điện tử dương (+ESI – positive Electrospray Ionization), với nhiệt độ khí là 200°C, tốc độ 10 l/phút. Khoảng khối phổ từ 50 đến 1000 m/z, tại 3 mức năng lượng bắn phá 0, 10 và 40 eV. Trước mỗi lần phân tích mẫu, máy được hiệu chuẩn khối (tune) bằng dung dịch chuẩn đã được chuẩn bị sẵn với các chất có m/z từ 118 đến 1521,97. Trong quá trình phân tích, dung dịch hiệu chuẩn liên tục được phun vào bộ ion hóa cùng với mẫu. Các phổ được lựa chọn là 121,0508 và 922,009 m/z. Dữ liệu thu được sẽ được xử lý, so sánh với dữ liệu phổ chuẩn trong Cơ sở dữ liệu. Từ đó xác định các chất tồn dư có thể có trong mẫu. Quá trình này dựa vào 3 yếu tố:

- Độ chính xác khối phổ (Mass accuracy - Mass error): Là sự sai lệch về khối phổ giữa số khối lý thuyết và số khối đo được từ thiết bị.

$$\text{Độ chệch khối} = \frac{\text{Số Khối đo được} - \text{Số khối lý thuyết}}{\text{Số khối lý thuyết}} \times 10^6 \text{ (ppm)}$$

- Khối phổ của đồng vị và tỷ lệ đồng vị
- Các mảnh ion con.



3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Kết quả phân tích mẫu

Tổng cộng 93 mẫu đã được thu thập ngẫu nhiên và được phân tích, gồm có thịt trâu, bò, gà, lợn và cá. Chi tiết mẫu được thể hiện ở bảng dưới đây:

Bảng 1. Kết quả phân tích mẫu

Mẫu	Số mẫu					Tổng số mẫu
	Thịt trâu	Thịt bò	Thịt gà	Thịt lợn	Cá	
Số mẫu	17	22	36	12	6	93
Mẫu phát hiện có kháng sinh	0	0	1	1	1	3
Loại kháng sinh	-	-	Cefalexin	Amoxicillin	Ampicillin	

Dữ liệu phân tích được xử lý bằng phần mềm, so sánh với thư viện phổ (Vetdrugs PCDL) chứa 2153 chất kháng sinh. Kết quả thu được như sau: 90 mẫu không phát hiện tồn dư kháng sinh và 3 mẫu phát hiện tồn dư các kháng sinh nhóm β -Lactam là Cefalexin, Amoxicillin và Ampicillin.

3.2. Phân tích kết quả

3.2.1. Độ chệch khối

Các khối phổ thu được có độ chệch càng nhỏ so với lý thuyết thì tính tin cậy, chính xác càng cao. Từ dữ liệu tính toán cho thấy các chất nghi ngờ có trong mẫu đều có độ chệch khối nhỏ, cụ thể được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Độ chệch khối của các chất tồn dư trong mẫu

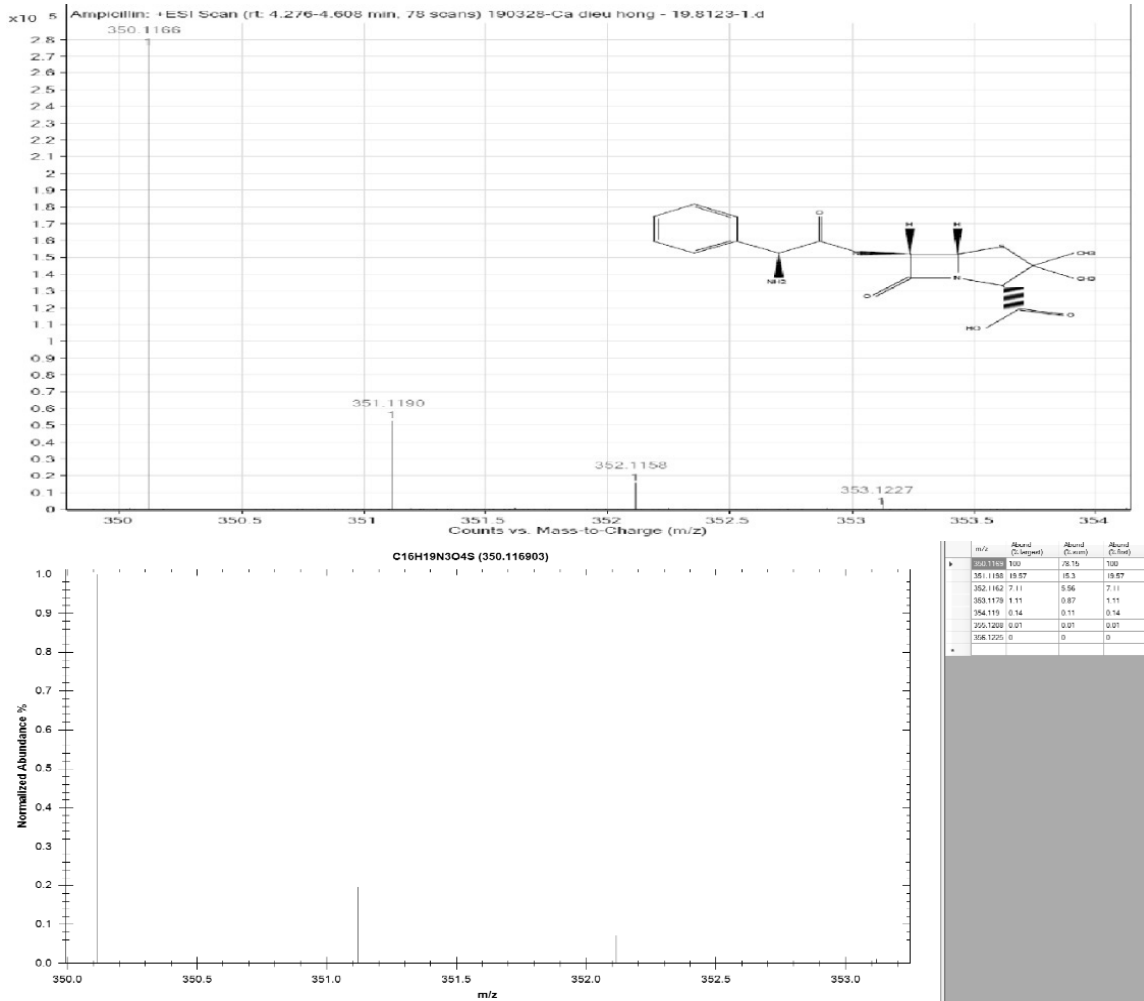
Mẫu	Tên chất	Công thức phân tử	Phân tử lượng (mass)	Số khối lý thuyết (m/z)	Số khối đo được (m/z)	Độ chệch khối (ppm)
Thịt gà	Cefalexin	C ₁₆ H ₁₇ N ₃ O ₄ S	347,0951	348,1013	348,1023	- 2,9
Thịt lợn	Amoxicillin	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₅ S	365,1044	366,1118	366,1117	0,27
Cá	Ampicillin	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₄ S	349,1094	350,1169	350,1168	0,29

3.2.2. Đồng vị

Yếu tố thứ 2 để định danh một chất là dựa vào các đồng vị và tỷ lệ đồng vị của chất đó. Đồng vị của một nguyên tố là những nguyên tử có cùng số proton nhưng khác nhau về số notron, nên có số khối khác nhau. Hầu hết các nguyên tố trong tự nhiên đều là hỗn hợp của nhiều đồng vị. Ví dụ: trong tự nhiên, Carbon (C) có 3 đồng vị là ¹²C, ¹³C và ¹⁴C; trong đó ¹⁴C là đồng vị phóng xạ (thời gian bán rã là 5730 năm) và 2 đồng vị ¹²C và ¹³C là đồng vị bền. Tỷ lệ số nguyên tử của các đồng vị này khá ổn định, ví dụ: ¹²C chiếm 98,90% còn ¹³C chiếm hơn 1,10%, ¹⁴N chiếm 99,63% và ¹⁵N chiếm 0,37%. Các chất kháng sinh, ngoài số khối chính ra thì luôn có các số khối đồng vị với tỷ lệ khác nhau, thông thường hơn kém nhau 1 đơn vị khối (Da-Dalton) [9]. Với mỗi công thức phân tử nhất định, khi phân tích trên phổ phân giải cao, sẽ thấy được các peak của các đồng vị, với tỷ lệ và thành phần có thể được dự đoán trước thông qua các công cụ ứng dụng, như Isotope Distribution Calculator.

Ampicillin theo tính toán lý thuyết, tại điện tích +1 (M⁺H⁺) có 3 peak đồng vị lớn là 350,1169, 351,1198 và 352,1162, với tỷ lệ lần lượt là 78,15%, 15,3% và 5,56%, còn ampicillin tìm thấy

trong mẫu cũng có các đồng vị nói trên, và tỷ lệ tín hiệu giữa chúng cũng tương đồng so với lý thuyết (hình 1). Từ đó khẳng định thêm sự có mặt của chất này trong mẫu. Sự so sánh này được áp dụng cho tất cả các chất khác, giúp nâng cao độ chính xác của kết quả định danh chất tồn dư có trong mẫu.



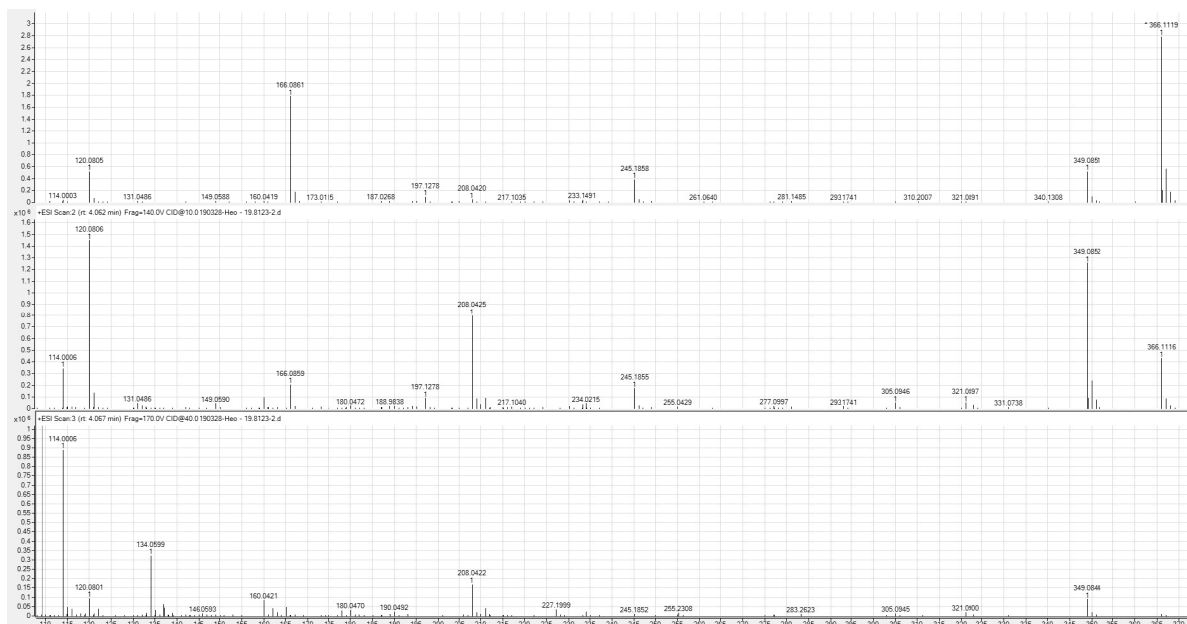
Hình 1. Các đồng vị và tỷ lệ đồng vị của Ampicillin trong mẫu và theo lý thuyết

3.2.3. Các mảnh ion con

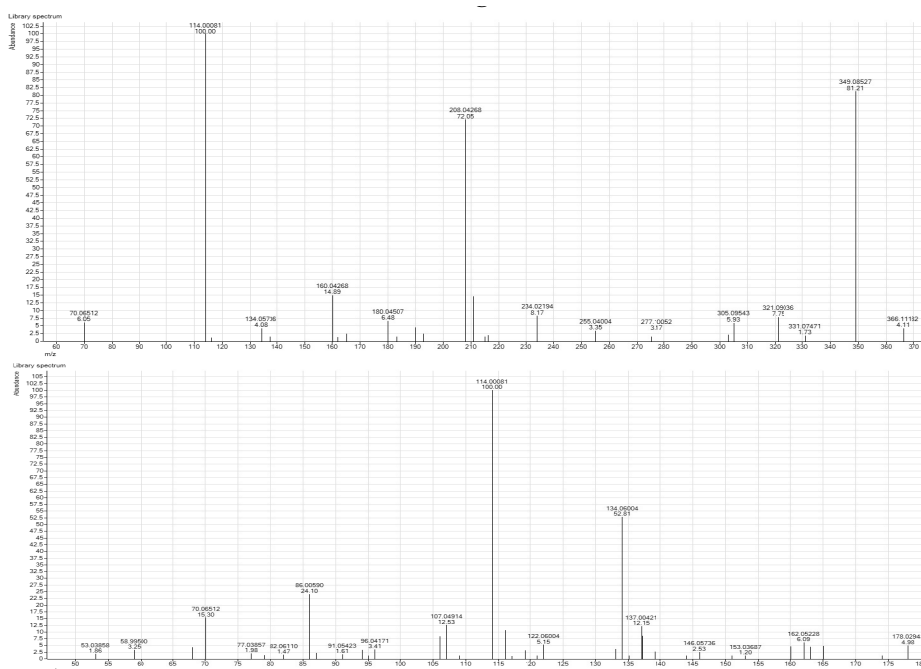
Yếu tố cuối cùng là dựa vào các mảnh con sau khi đã đi qua buồng va chạm (collision cell) với các năng lượng va chạm (collision energy - CE) khác nhau (0, 10 và 40 eV). Với mỗi chất có công thức cấu tạo khác nhau, năng lượng liên kết giữa các nguyên tử khác nhau sẽ có các mảnh ion con khác nhau và tỷ lệ khác nhau.

Trong cơ sở dữ liệu đã sẵn có các phổ của từng chất tại các năng lượng và điều kiện ion hóa khác nhau (ESI negative hoặc positive). Việc so sánh các phổ này có thể thực hiện tự động hoặc có thể xem thủ công. Hình 2 thể hiện phổ của amoxicillin trong mẫu, so sánh với hình 3 là phổ từ cơ sở dữ liệu.

Do các chất có cấu trúc và năng lượng liên kết khác nhau nên sẽ có nhiều mức năng lượng bắn phá khác nhau. Đồng thời do hầu hết các kháng sinh là các chất có phân tử nhỏ, dễ bị phân mảnh nên để cho tổng quát, khi phân tích mẫu đã áp dụng tại 3 mức năng lượng, thấp cho đến cao (0, 10 và 40 eV). Kết quả từ mẫu cho thấy các chất tồn dư đều có các mảnh phổ giống với dữ liệu chuẩn, với nhiều mảnh phổ khác nhau tại các mức năng lượng khác nhau.



Hình 2. Phổ của Amoxicillin trong mẫu thịt lợn tại CE = 0, 10 và 40 eV



Hình 3. Phổ của Amoxicillin (10 eV và 40 eV) trong Cơ sở dữ liệu

4. KẾT LUẬN

Từ kết quả nghiên cứu, chúng tôi có một số kết luận sau:

Việc sử dụng phương pháp phân tích sàng lọc bằng UPLC-QTOF-MS giúp phát hiện nhanh các yếu tố nguy cơ về vi phạm tồn dư kháng sinh trong thực phẩm từ sản phẩm động vật so với các phương pháp thông thường khác (ELISA, LC-MS/MS,...), cần nhiều thời gian và chi phí để xác định. Với 93 mẫu được phân tích, việc xác định nhanh chóng có 3 mẫu tồn dư kháng sinh nhóm β -Lactam giúp cho việc sử dụng các phương pháp khác để định lượng dễ dàng hơn. Trong những năm qua, các cơ quan quản lý liên tục phát hiện các vi phạm về vệ sinh an toàn thực phẩm: chất tạo nạc nhóm β -Agonist trong thịt lợn, chất Vàng O, chất gây mê,... cho thấy việc sử dụng các chất

độc hại, chất cấm dẫn đến tồn dư trong thực phẩm là vô cùng phức tạp. Phương pháp phân tích sàng lọc chất chưa biết (Unknowns) bằng UPLC-QTOF-MS có thể giúp các cơ quan nhanh chóng biết được các hóa chất tồn dư trong thực phẩm, để từ đó có các biện pháp giám sát phù hợp.

Ngoài các kháng sinh ban đầu, các chất chuyển hóa từ kháng sinh đó cũng có thể được tìm thấy trong dữ liệu. Từ đó việc sử dụng UPLC-QTOF-MS giúp cho việc nghiên cứu, theo dõi quá trình biến đổi của kháng sinh được dễ dàng hơn, giúp ích cho việc nghiên cứu ảnh hưởng của các loại hóa chất lên cơ thể sống.

Ngoài ra, với việc thu nhận dữ liệu một cách tổng quát với toàn bộ các phổ đi đến detector giúp cho việc có thể kiểm tra dữ liệu, phát hiện các chất lạ, chưa biết bất kỳ lúc nào. Ngoài cơ sở dữ liệu về thuốc thú y, phương pháp này còn có 2 cơ sở dữ liệu khác là thuốc trừ sâu (Pesticides PCDL) và độc chất (Toxins PCDL) với hàng ngàn chất và luôn được cập nhật bổ sung.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chỉ thị số 1865/CT-BNN-BYT ngày 04/03/2015 của Bộ Y tế và Bộ Nông nghiệp và phát triển nông thôn về việc tăng cường quản lý sản xuất kinh doanh, sử dụng thuốc kháng sinh trong chăn nuôi, nuôi trồng thủy sản đảm bảo an toàn thực phẩm.
2. Quyết định 127/QĐ-BYT ngày 15/01/2019 của Bộ Y tế về việc ban hành “Hướng dẫn thực hiện giám sát quốc gia về kháng kháng sinh”.
3. Data sheet 5991-5500EN, Agilent 6545 Q-TOF Specification.
4. Qiang Lv, Fenglei Luo, Xiaoyong Zhao, Yu Liu, Guibing Hu, Chongde Sun, Xian Li, Kunsong Chen (2015), “Identification of Proanthocyanidins from Litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) Pulp by LC-ESI-QTOF-MS and Their Antioxidant Activity”, *PLoS ONE*, 10(3).
5. Annalaura Restivo, Ilaria Degano, Erika Ribechini, Maria Perla Colombini (2014), “Development and Optimisation of an HPLC-DAD-ESI-Q-ToF Method for the Determination of Phenolic Acids and Derivatives”, *PLoS ONE* 9(2).
6. Hui Li, Weifeng Yao, Qinan Liu, Jia Xu, Beihua Bao, Mingqiu Shan, Yudan Cao, Fangfang Cheng, Anwei Ding, Li Zhang (2017), “Application of UHPLC-ESI-Q-TOF-MS to Identify Multiple Constituents in Processed Products of the Herbal Medicine *Ligustri Lucidi Fructus*”, *Molecules*, 22, 689.
7. Hailin Zhu, Hongqiang Lin, Jing Tan, Cuizhu Wang, Han Wang, Fulin Wu, Qinghai Dong, Yunhe Liu, Pingya Li, Jinping Liu (2018), “UPLC-QTOF/MS-Based Nontargeted Metabolomic Analysis of Mountain- and Garden-Cultivated Ginseng of Different Ages in Northeast China”, *Molecules*, 24, 33.
8. Application Note 5991-6651EN, Analysis of 122 Veterinary Drugs in Meat Using All Ions MS/MS with an Agilent 1290/6545 UHPLC-Q-TOF System.
9. Piotr Dittwald, Dirk Valkenborg, Jürgen Claesen, Alan L. Rockwood, Anna Gambin (2015), “On the Fine Isotopic Distribution and Limits to Resolution in Mass Spectrometry”, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 26(10), 1732-1745.

Summary

APPLICATION OF ULTRA PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY- TRIPLE QUADRUPOLE TIME-OF-FLIGHT MASS SPECTROMETRY (UPLC-QTOF-MS) FOR THE DETERMINATION OF ANTIBIOTIC RESIDUES IN MEAT AND FISH

Nguyen Van Chinh, Dang Mai Tuyet Trang, Doan Thi Truc Kha, Cao Thi Quynh Mai
Le Van Thien, Bui Huy Hoang, Lam Van Tu

Regional Animal Health Office No.6



The residue of antibiotics in meat and meat products is one of the social problems for its effects and risks to human health, especially in the antibiotic resistance crisis. Nowadays, there are hundreds of drugs commercially available, with difference biochemical characteristics. Therefore, it is necessary to determine and monitor these residues in meat and meat products. The methods using liquid chromatography (LC) and ELISA are widely applied in numbers of laboratories to determine specified substances. In several laboratories, the state-of-the-art high-resolution analytical technique, using Ultra Performance Liquid chromatography-triple quadrupole Time-of-flight mass spectrometry (UPLC-QTOF-MS), is applied to analyse the knowns and unknowns residues in food. In this study, we used this technique for screening the residue of antibiotics, banned substances (Sulfonamids, Quinolones, Tetracyclines, β -Agonists...) and other toxins in pork, chicken, beef and fish samples. Ninety-three randomly collected samples have been screened and residues of Amoxicillin, Cefalexin and Ampicillin have been detected in three of them.

Keywords: *Residues, antibiotics, meat, fish, QTOF.*