

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Đỗ Thị Thái Nguyên

**XÂY DỰNG QUY TRÌNH THỰC NGHIỆM PHÂN TÍCH
ĐỊNH LƯỢNG CHLORAMPHENICOL TỒN DƯ TRONG
MỘT SỐ SẢN PHẨM ĐỘNG VẬT BẰNG PHƯƠNG PHÁP
SẮC KÝ LỎNG GHÉP KHỐI PHỔ KÉP (LC – MS/MS) TẠI
VIỆT NAM**

LUẬN VĂN THẠC SĨ HÓA HỌC

ĐỖ THỊ THÁI NGUYỄN

HÓA PHÂN TÍCH

2023

Hà Nội - Năm 2023

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Đỗ Thị Thái Nguyên

**XÂY DỰNG QUY TRÌNH THỰC NGHIỆM PHÂN TÍCH ĐỊNH
LƯỢNG CHLORAMPHENICOL TỒN DƯ TRONG MỘT SỐ SẢN
 PHẨM ĐỘNG VẬT BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG GHÉP
KHỐI PHỔ KÉP (LC – MS/MS) TẠI VIỆT NAM**

Chuyên ngành : Hóa phân tích
Mã số: 8 44 01 18

**LUẬN VĂN THẠC SĨ NGÀNH
HÓA PHÂN TÍCH**

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC :
1. PGS.TS. Đào Việt Hà
2. TS. Bùi Quang Minh

Hà Nội - Năm 2023

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi dựa trên những tài liệu, số liệu do chính tôi tự tìm hiểu và nghiên cứu dưới sự hướng dẫn khoa học của PGS. TS Đào Việt Hà và Tiến sĩ Bùi Quang Minh, trong khuôn khổ nội dung Hợp phần 1 của đề án trọng điểm cấp Viện Hàn lâm KHCNVN, mã số TĐĐTĐB0.01/21-23. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và khách quan nhất. Đồng thời, kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực nếu sai tôi hoàn toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật.

Tác giả luận văn

Đỗ Thị Thái Nguyên

LỜI CẢM ƠN

Để có thể hoàn thành luận văn thạc sĩ, bên cạnh sự nỗ lực cố gắng của bản thân còn có sự hướng dẫn nhiệt tình của quý Thầy Cô, cũng như sự động viên, ủng hộ của gia đình và đồng nghiệp trong suốt thời gian học tập nghiên cứu và thực hiện luận văn thạc sĩ.

Đặc biệt, xin chân thành bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến PGS.TS Đào Việt Hà và TS Bùi Quang Minh – thông qua đề tài TĐĐTĐB0.01/21-23 đã trực tiếp hướng dẫn, giúp đỡ về kiến thức, tài liệu và phương pháp để tôi hoàn thành đề tài nghiên cứu khoa học này. Xin chân thành bày tỏ lòng biết ơn đến Ban lãnh và toàn thể quý Thầy, Cô phòng Đào tạo trong Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn Lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tận tình truyền đạt những kiến thức quý báu, cũng như tạo mọi điều kiện thuận lợi tốt nhất cho tôi trong suốt quá trình học tập nghiên cứu và cho đến khi thực hiện đề tài luận văn.

Cuối cùng, tôi xin chân thành cảm ơn đến gia đình, các anh chị và các bạn đồng nghiệp đã hỗ trợ cho tôi rất nhiều trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu và thực hiện đề tài luận văn thạc sĩ.

MỤC LỤC

Trang

LỜI CAM ĐOAN	
LỜI CẢM ƠN	
MỤC LỤC.....	
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT	
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	
DANH MỤC CÁC HÌNH.....	
MỞ ĐẦU.....	1
CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU	5
1.1. CHLORAMPHENICOL.....	5
1.1.1. Tính chất Chloramphenicol.....	5
1.1.2. Tình hình sử dụng Chloramphenicol và thực phẩm chứa tồn dư Chloramphenicol ở Việt Nam trong những năm gần đây.....	7
1.1.3. Các phương pháp phân tích Chloramphenicol (CAP) trong thực phẩm ..	9
1.1.4. Kỹ thuật chiết ly pha rắn (Solid – Phase Extraction).....	12
1.1.5. Kỹ thuật phân mảnh thường dùng trong phân tích Chloramphenicol bằng phương pháp sắc ký lỏng ghép đầu dò khối phổ (LC/ MS – MS)	16
1.1.6. Một số quy trình xác định dư lượng Chloramphenicol bằng phương pháp Sắc ký lỏng ghép đầu dò khối phổ (LC – MS/MS).....	17
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	23
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU	23
2.1.1. Đối tượng phân tích.....	23
2.1.2. Hóa chất.....	23
2.1.3. Dụng cụ	23
2.1.4. Thiết bị nghiên cứu	23
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	24

2.2.1. Tối ưu hóa các điều kiện sắc ký lỏng siêu năng cao (UPLC).....	24
2.2.2. Tối ưu hóa điều kiện phân tích Chloramphenicol trên thiết bị sắc ký lỏng ghép đầu dò khối phổ 2 lần.....	24
2.2.3. Tối ưu hóa qui trình xử lý mẫu xác định hàm lượng CAP trong mẫu thịt động vật bằng phương pháp LC-MS/MS.....	26
2.2.4. Xây dựng quy trình định lượng CAP tồn dư trong các sản phẩm động vật bằng phương pháp sắc ký lỏng ghép khối phổ (LC-MS/MS).....	32
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	33
3.1. Kết quả tối ưu hóa điều kiện phân tích Chloramphenicol trên thiết bị sắc ký lỏng ghép đầu dò khối phổ 2 lần.....	33
3.2. Kết quả tối ưu hóa các điều kiện sắc ký lỏng siêu năng cao (UPLC).....	34
3.3. Kết quả tối ưu hóa quy trình xử lý mẫu trong phương pháp xác định hàm lượng hàm lượng Chloramphenicol trong mẫu thịt động vật bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao ghép đầu dò khối phổ (UPLC – MS/MS).....	36
3.4. Kết quả tối ưu quy trình chiết tách và làm giàu chất phân tích Chloramphenicol qua cột chiết pha rắn.....	38
3.5. Kết quả xây dựng quy trình thực nghiệm định lượng Chloramphenicol tồn dư trong các sản phẩm thịt động vật bằng phương pháp sắc ký lỏng siêu năng ghép nối khối phổ 2 lần (LC – MS/MS)	39
3.6. Kết quả thẩm định quy trình định lượng Chloramphenicol tồn dư các sản phẩm thịt động vật bằng phương pháp sắc ký lỏng siêu năng ghép nối khối phổ 2 lần (UPLC – MS/MS)	44
3.6.1 Xác định giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ) của phương pháp	44
3.6.2. Xác định độ chụm (độ lặp lại và độ tái lặp) của phương pháp.....	45
3.6.3. Đánh giá hiệu suất thu hồi của phương pháp	47
3.7. Kết quả phân tích một số mẫu thực tế	49
CHƯƠNG 4: KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	51
KẾT LUẬN.....	51

KIẾN NGHỊ	52
TÀI LIỆU THAM KHẢO	53
PHỤ LỤC	

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ CÁI VIẾT TẮT

ACN		Acetonitrile
AOAC	Association of Official Analytical Chemists	Hiệp hội các nhà hóa phân tích chính thức.
ARN		Đại lượng phân tử sinh học
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization Source	Ion hóa hóa học tại áp suất khí quyển
CAP		Chloramphenicol
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay	Kỹ thuật miễn dịch liên kết Enzyme.
ESI	ElectroSpray Ionization	ion hóa mẫu bằng phương pháp ion
FTIR	Fourier transform infrared	Phổ hồng ngoại
GC - ECD	Gas Chromatography Electron Capture Detector	Sắc ký khí đầu dò cộng kết điện tử
GC - MS	Gas chromatography Mass Spectrometry	Sắc ký khí Khối phổ.
GMP	Good manufacturing practice	Thực hành sản xuất tốt
HACCP	Hazard Analysis and Critical Control Point	Hệ thống phân tích mối nguy và kiểm soát điểm tới hạn
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	Sắc ký lỏng hiệu năng cao
HPLC - UV	High Performance Liquid	Sắc ký lỏng hiệu năng cao

	Chromatography - Ultraviolet	đầu dò UV
ISO	International Standard Organization	Tổ chức tiêu chuẩn quốc tế.
LC – MS/MS	Liquid Chromatography Mass Spectrometry	Sắc ký lỏng Khối phổ kép
LOD	Limit of Detection	Giới hạn phát hiện
LOQ	Limit of Quantification	Giới hạn định lượng
MRM	Multiple reaction monitoring	Kỹ thuật ghi phổ đa phản ứng MRM
NAFIQUAD	National Agro-Forestry- Fisheries Quality Assurance Department	Cục quản lý nông lâm thủy sản
OD	Optical Density	Mật độ quang
SEM	Nitrofurazone Semicarbazide Metabolite	Kháng sinh Semicarbazide thuộc nhóm Nitrofurazone
SOP	Standard Operation Procedure	Quy trình thao tác chuẩn
SPE	Solid Phase Extraction	Kỹ thuật chiết pha rắn
TCVN		Tiêu chuẩn Việt Nam
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography	Sắc ký lỏng siêu hiệu năng
UPLC – MS/MS	Ultra Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry	Sắc ký lỏng siêu hiệu năng ghép khối phổ kép.

DANH MỤC CÁC BẢNG

	Trang
Bảng 1.1. Chương trình pha động phân tích CAP trên nền mẫu cá.....	20
Bảng 1.2. Chương trình pha động phân tích CAP trên nền mẫu mật ong	21
Bảng 1.3 . Chương trình pha động phân tích CAP trên nền mẫu sữa	22
Bảng 1.4. Điều kiện phân mảnh của CAP và CAP_d5	23
Bảng 3.1. Các thông số tối ưu điều kiện khối phổ trong phân tích CAP	34
Bảng 3.2. Hệ pha động và chương trình gradient tối ưu cho phân tích CAP	36
Bảng 3.3. Hệ pha động và chương trình gradient tối ưu cho phân tích CAP	41
Bảng 3.4. Điều kiện phân mảnh các ion con của CAP và CAP _ D ₅	42
Bảng 3.5. Bảng kết quả khảo sát giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ) của phương pháp.....	45
Bảng 3.6. Kết quả khảo sát độ lặp lại và độ tái lặp của phương pháp	47
Bảng 3.7. Kết quả khảo sát hiệu suất thu hồi của phương pháp	48

DANH MỤC CÁC HÌNH

	Trang
Hình 1.1. Cấu trúc phân tử gốc của Chloramphenicol (CAP)	5
Hình 1.2. Cơ chế tác dụng của Chloramphenicol (CAP).....	6
Hình 1.3 Nguyên tắc của phương pháp Elisa	10
Hình 1.4. Mô hình hệ thống LC-MS/MS	12
Hình 1.5 Sơ đồ mô tả quy trình kỹ thuật chiết SPE	15
Hình 1.6. Quy trình chiết Chloramphenicol từ nền mẫu thịt, cá.....	18
Hình 2.1 Sơ đồ tối ưu các điều kiện khối phổ của CAP và CAP_D ₅	25
Hình 2.2 Sơ đồ chiết CAP bằng dung môi ethyl Acetate	27
Hình 2.3 Sơ đồ Chiết CAP bằng dung môi acetone	28
Hình 2.4 Sơ đồ chiết CAP bằng dung môi acetonitrile.....	29
Hình 2.5 Sơ đồ khảo sát hiệu quả của quy trình làm sạch dịch chiết CAP bằng cột chiết ly pha rắn C ₁₈	31
Hình 3.1 Tín hiệu CAP tối ưu với nguồn ion ES ⁻	33
Hình 3.2 Tín hiệu phổ đồ khảo sát hệ pha động cố định 2 kênh CH ₃ COONH ₄ (0,1 %) và MeOH.....	35
Hình 3.3. Tín hiệu phổ đồ khảo sát hệ pha động gradient thể tích 2 kênh CH ₃ COONH ₄ (0,1 %) và MeOH theo thời gian	35
Hình 3.4. Tương quan hiệu suất thu hồi và dung môi tách chiết.....	38
Hình 3.5 Tương quan giữa hiệu suất thu hồi và thể tích dung môi rửa giải.....	39
Hình 3.6. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính đường chuẩn của phương pháp.....	43
Hình 3.7. Đồ thị khảo sát khoảng tuyến tính đường chuẩn của phương pháp.....	43

MỞ ĐẦU

Chloramphenicol (CAP) là một loại kháng sinh ban đầu được phân lập từ vi khuẩn *Streptomyces venezuelae*, sau đó được sản xuất bằng phương pháp tổng hợp [1]. CAP có tác dụng ức chế trên nhiều vi khuẩn hiếu khí (gram dương và gram âm), vi khuẩn kỵ khí, đặc biệt là đối với vi khuẩn *Salmonella*, trực khuẩn và vi khuẩn cúm CAP ức chế sự hình thành protein của vi khuẩn nên có tác dụng kìm khuẩn khi được sử dụng ở nồng độ thấp và có thể có tác dụng diệt khuẩn khi được sử dụng ở nồng độ cao [2]. Vì vậy, CAP được sử dụng phòng ngừa dịch bệnh ở gia cầm và thủy sản, khử trùng và vệ sinh môi trường chăn nuôi hiệu quả Chloramphenicol có vùng phổ kháng khuẩn rộng, khả năng phân bố tốt vào các mô trong cơ thể nên Chloramphenicol được dùng phổ biến trong chăn nuôi. CAP được sử dụng như một loại thuốc kháng sinh để điều trị sốt thương hàn, bệnh còi xương và các bệnh truyền nhiễm khác đối với người.

Tuy nhiên, từ khi phát hiện những bệnh nhân sử dụng CAP có thể có những rối loạn nghiêm trọng liên quan đến chức năng tạo máu ở tủy xương (suy tủy, chứng giảm tiểu cầu ở máu ngoại vi - có thể dẫn đến bệnh bạch cầu) [2,3], CAP đã bị cấm trong điều trị bệnh cho người cũng như trong chăn nuôi gia súc, gia cầm và thủy sản tại nhiều quốc gia (Mỹ, Canada, EU, Úc, Nhật, Trung Quốc ...). Ở nước ta, Bộ Nông nghiệp và phát triển Nông thôn cũng đã ra thông tư số 10/2016/TT - BNN quy định CAP không được phép có mặt trong sản xuất, kinh doanh động vật trên cạn và thủy sản [4].

Mặc dù vậy, khi kiểm tra an toàn vệ sinh thực phẩm, vẫn phát hiện dư lượng CAP trong một số thực phẩm nguồn gốc động vật trên thị trường Việt Nam. Theo thống kê của Bộ Nông Nghiệp và Phát Triển Nông Thôn, 9 tháng đầu năm 2016, đã phát hiện 43/63 mẫu tôm, cá, mực (thu mua ngẫu nhiên tại các chợ và siêu thị) bị nhiễm CAP ở mức dưới 10 mg/kg [5]. Tháng 8, 9 năm 2017 Sở Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn Hà Nội đã phát hiện 2/56 mẫu thủy sản chứa tồn dư CAP. Ngay cả các lô hàng thủy sản xuất khẩu cũng đã bị phát hiện chứa dư lượng kháng sinh cấm. Điển hình là trong 6 tháng cuối năm 2016, có 43 lô hàng thủy sản Việt Nam xuất khẩu sang Nhật Bản đã bị trả về do chứa dư lượng kháng sinh cấm trong đó có tới 41 lô nhiễm CAP [6]. Tình trạng hàng thủy sản xuất khẩu bị trả về đã gây thiệt hại khá nhiều cho người

dân và làm giảm uy tín của ngành thủy sản Việt Nam. Điều này cho thấy, việc sử dụng CAP một cách thiếu kiểm soát ở Việt Nam hiện ở mức đáng báo động.

Tình trạng lạm dụng CAP trong ngành chăn nuôi ở nước ta do nhóm chất này có giá thành rẻ, phổ biến về mặt thương mại. Bên cạnh đó, việc kiểm soát dư lượng CAP trong sản phẩm thực phẩm ở nước ta còn nhiều bất cập, chưa đáp ứng yêu cầu thế giới do các phương pháp phân tích CAP tiêu chuẩn hiện hành ở Việt Nam có giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) cao hơn so với quy định quốc tế. Chẳng hạn, theo phương pháp TCVN 8140 ÷ 2009 (định lượng CAP trong thịt và các sản phẩm thịt bằng phương pháp Sắc ký lỏng pha đảo với đầu dò tia tử ngoại) giá trị LOD > 6,5 mg/kg [7]; phương pháp TCN 186 ÷ 2003 (định lượng CAP trong thủy sản bằng phương pháp sắc ký khí với đầu dò bắt điện tử) có LOD = 0,3 mg/kg [8]. Một số nước hiện đã ban hành phương pháp tiêu chuẩn cho phép định lượng CAP với giới hạn thấp (ví dụ: 2,5 ppb ở Canada; 0,3 ppb ở EU; 5 ppb ở Mỹ). Tuy vậy, cho đến nay vẫn chưa có phương pháp chính thống nào (như ISO, AOAC...) để định lượng CAP trong thực phẩm. Điều này gây khó khăn cho các cơ quan chức năng Việt Nam trong việc quản lý chất lượng sản phẩm động vật lưu hành nội địa, đặc biệt là các mặt hàng thủy sản xuất khẩu.

Hiện nay, thế giới đã có các phương pháp được phát triển và thẩm định để xác định dư lượng CAP trong thực phẩm như phương pháp quang phổ tử ngoại, phương pháp ELISA, phương pháp sắc ký khí với đầu dò bắt điện tử (GC-ECD), phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao với đầu dò tia tử ngoại (HPLC-UV), phương pháp sắc ký lỏng ghép khối phổ kép (LC-MS/MS) [9-13]. Tại Việt Nam cũng đã có một số nghiên cứu như phát hiện CAP bằng phương pháp vi sinh, ELISA, LC-MS/MS [14,16]. Tuy nhiên các phương pháp trắc quang, HPLC-UV, GC-ECD, ELISA nhìn chung đều có LOD cao hơn nhiều so với quy định thế giới. Do vậy, việc đề xuất một quy trình phân tích cho phép định lượng CAP trong thịt và các sản phẩm thịt với giới hạn định lượng thấp, phù hợp với quy định thế giới là một yêu cầu rất cần thiết đối với các cơ sở làm công tác kiểm nghiệm, quản lý an toàn vệ sinh thực phẩm ở Việt Nam nói chung và ở Trung tâm Kiểm nghiệm tỉnh Khánh Hòa nói riêng.

Để đạt giá trị LOD đôi với CAP như quy định thế giới (ppb), đồng thời cho phép phân tích nhanh và chính xác cần sử dụng thiết bị phân tích hiện đại như LC-MS/MS. Tuy nhiên, trước khi áp dụng một phương pháp phân tích sẵn có nào đó vào điều kiện thực tế phòng thí nghiệm, cần tiến hành thẩm định quy trình (và hiệu chỉnh một số thông số nếu cần) nhằm đạt được yêu cầu đặt ra (tính chọn lọc, độ lặp lại, độ đúng, khoảng tuyến tính,) đối với đối tượng mẫu và chất cần phân tích.

Đó là lý do chúng tôi thực hiện luận văn cao học: “ Xây dựng quy trình thực nghiệm phân tích định lượng Chloramphenicol tồn dư trong các sản phẩm thịt động vật bằng phương pháp sắc ký lỏng ghép khối phổ kép (LC – MS/MS) tại Việt Nam”.

Trong đề tài này chúng tôi tiến hành thẩm định phương pháp LC-MS/MS định lượng CAP trong cơ thịt gà do hãng Waters [17] đề xuất và áp dụng quy trình này trên các sản phẩm thịt động vật khác (thịt heo, thịt bò khô, tôm, thịt gà).

Mục đích của đề tài: Xây dựng được quy trình thực nghiệm định lượng Chloramphenicol tồn dư trong sản phẩm động vật bằng phương pháp sắc ký lỏng khối phổ kép LC – MS/MS tại phòng thí nghiệm thuộc Trung tâm Kiểm nghiệm tỉnh Khánh Hòa với giới hạn định lượng đáp ứng với quy định trong nước và thế giới.

Để đạt được mục tiêu nghiên cứu đặt ra, các nội dung nghiên cứu cụ thể là:

- *Khảo sát quy trình phân tích trên mẫu chuẩn*: áp dụng quy trình định lượng CAP bằng phương pháp LC-MS/MS trên mẫu chuẩn. Đánh giá quy trình trên các tiêu chí (tính chọn lọc, khoảng tuyến tính).
- *Khảo sát quy trình xử lý mẫu*: khảo sát quy trình chiết CAP từ mẫu thực, hiệu chỉnh quy trình để đạt hiệu suất chiết tốt nhất có thể.
- *Xây dựng quy trình định lượng CAP tồn dư trong một số sản phẩm động vật bằng phương pháp sắc ký lỏng ghép khối phổ kép (LC-MS/MS)*: tiến hành định lượng tồn dư CAP song song trên mẫu chuẩn CAP, mẫu thử đại diện với những thông số đã tối ưu, thông qua phương pháp xây dựng đường chuẩn.

- Thẩm định quy trình *định lượng CAP tồn dư trong một số sản phẩm động vật bằng phương pháp sắc ký lỏng ghép khối phổ kép (LC-MS/MS)*: thẩm định quy trình định lượng đã xây dựng được trên mẫu chuẩn, mẫu thử đại diện thông qua các thông qua các tiêu chí độ tuyến tính, độ lặp lại, độ tái lập, độ thu hồi.

CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

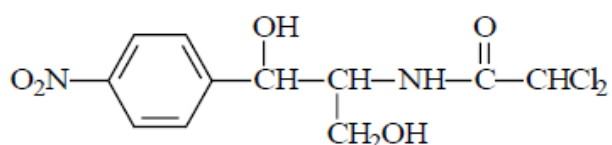
1.2. CHLORAMPHENICOL

1.2.1. Tính chất Chloramphenicol

Danh pháp hóa học 2,2-Dichloro-*N*-[β -hydroxy- α -(hydroxymethyl)-4-nitrophenethyl]acetamide.

Công thức phân tử: $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$. Khối lượng phân tử: 323,13 g/mol.

Công thức cấu tạo:



Hình 1.1. Cấu trúc phân tử gốc của Chloramphenicol (CAP) [1]

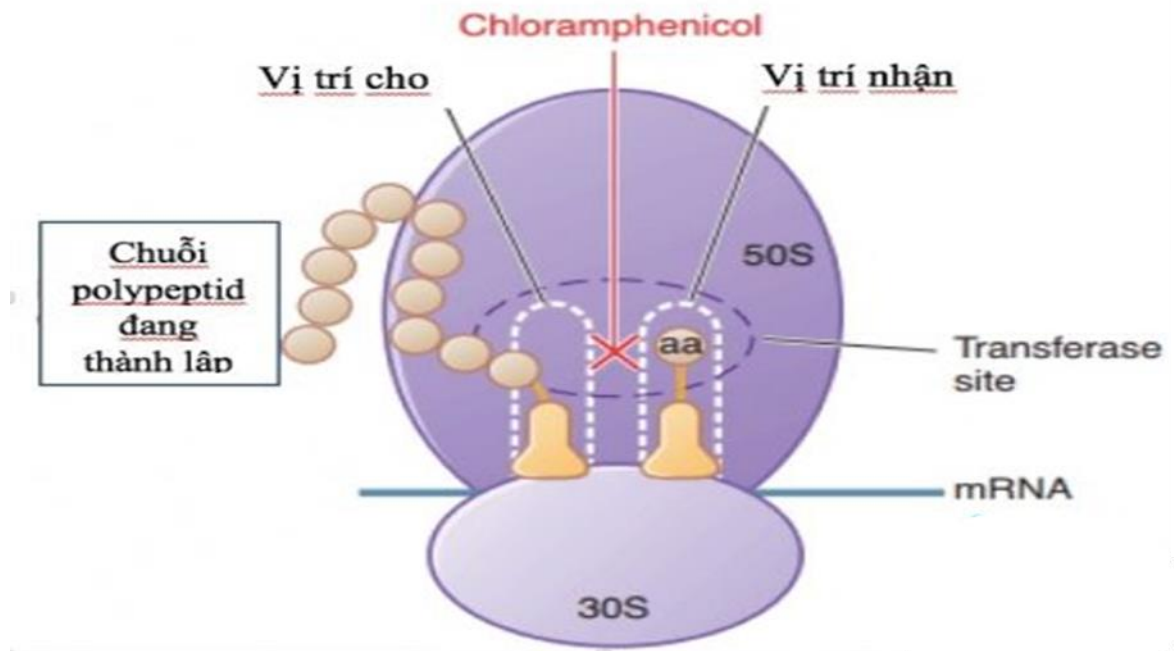
Chloramphenicol (CAP) là một loại kháng sinh ban đầu được phân lập từ vi khuẩn *Streptomyces venezuelae*, sau đó được sản xuất bằng phương pháp tổng hợp, thuộc nhóm Phenicol [1].

Chloramphenicol tồn tại ở dạng tinh thể màu trắng hoặc có ánh màu vàng; có vị đắng; ít tan trong nước, tan tốt trong Methanol, Ethanol, Acetone, Propylen Glycol; vững bền ở nhiệt độ thường, có khả năng chịu nhiệt lên đến 100 độ C; bền vững trong môi trường hơi Acid hay trung có khoảng pH từ 2 - 9... [1].

Chloramphenicol có tác dụng ức chế trên nhiều vi khuẩn hiếu khí (gram dương và gram âm), vi khuẩn kỵ khí, đặc biệt là đối với vi khuẩn *Salmonella*, trực khuẩn và vi khuẩn cúm CAP ức chế sự hình thành protein của vi khuẩn nên có tác dụng kìm khuẩn khi được sử dụng ở nồng độ thấp và có thể có tác dụng diệt khuẩn khi được sử dụng ở nồng độ cao [2].

Chloramphenicol tan nhiều trong Alcohol, hấp thu tốt qua đường tiêu hóa và ngoại tiêu hóa, phân bố đồng đều trong dịch nội và ngoại bào. Do không có tính ion hóa nên chloramphenicol tan tốt trong Lipid, được phân bố rộng khắp các mô trong cơ thể. Chloramphenicol có tác dụng kìm khuẩn, gắn vào tiểu phần 50s của ribosom nên ngăn cản ARN m gắn vào ribosom, đồng thời ức chế transferase nên acid amin được mã hóa không gắn được vào

polypeptid. Chloramphenicol cũng ức chế tổng hợp protein của ty thể ở tế bào động vật có vú (vì ribosom của ty thể cũng là loại 70s như vi khuẩn), hồng cầu động vật có vú đặc biệt nhạy cảm với Chloramphenicol [3].



Hình 1.2. Cơ chế tác dụng của Chloramphenicol (CAP). [3]

Khi Chloramphenicol có mặt ở tế bào động vật, khoảng 60% gắn vào Protein huyết tương thấm dễ dàng vào các mô, nhất là các hạch mạc treo, nồng độ đạt được cao hơn trong máu, thấm tốt vào dịch não tủy, qua được rau thai. Chloramphenicol được chuyển hóa qua quá trình khử, phần lớn bị mất hoạt tính do quá trình chuyển hóa ở gan và được thải trừ chủ yếu qua thận dưới dạng chuyển hóa.

Tuy nhiên, nếu cơ thể không đào thải được hoặc lượng Chloramphenicol tích lũy trong cơ thể lớn thì gây ra những độc tính rất nguy hiểm. CAP có thể làm suy yếu hệ xương ở trẻ sơ sinh gây hội chứng "gray syndrome", là do trẻ chưa hình thành cơ chế khử độc (khả năng liên kết với glucuronide ở gan) [19]. Ngoài ra, CAP làm giảm huyết cầu toàn thể do suy tuỷ thực sự, tỷ lệ tử vong từ 50% - 80% và tần suất mắc từ 1: 150.000 đến 1: 6.000 [18].

1.2.2. Tình hình sử dụng Chloramphenicol và thực phẩm chứa tồn dư Chloramphenicol ở Việt Nam trong những năm gần đây [15]

Việt Nam hiện có 567 nhà máy chế biến thủy sản quy mô công nghiệp đang đáp ứng các tiêu chuẩn an toàn thực phẩm như HACCP, GMP, SSOP; hơn 400 nhà máy đông lạnh có công suất 7.500 tấn; 415 nhà máy đủ tiêu chuẩn xuất khẩu sang EU, tăng 398 nhà máy so với năm 1999; và nhiều nhà máy, vùng nuôi đạt chứng nhận tự nguyện như GlobalGAP, ASC, BAP, BRC... Đến nay, sản phẩm thủy sản Việt Nam vươn tới hơn 170 thị trường, trong đó những thị trường chính là EU, Mỹ, Nhật, Úc; kim ngạch xuất khẩu năm 2013 đạt hơn 6,7 tỷ USD, gấp hơn 32 lần so năm 1990, trở thành một trong những nước xuất khẩu thủy sản lớn trên thế giới.

Tuy đạt được những thành tựu nhất định, xuất khẩu Việt Nam cũng gặp không ít khó khăn. Từ việc cạnh tranh của những nước xuất khẩu thủy sản khác đến vấn đề an toàn thực phẩm trong xuất khẩu thủy sản. Trong đó, việc sử dụng kháng sinh bừa bãi, mất kiểm soát trong khâu nuôi trồng đã làm mất uy tín trầm trọng của thủy sản Việt Nam trên thị trường thế giới. Theo kết quả báo cáo của Tổ chức Phát triển Công nghiệp của Liên Hợp Quốc (UNIDO) ở 4 thị trường lớn là EU, Hoa Kỳ, Nhật Bản, Úc thì Việt Nam là một trong ba nước đứng đầu về số vụ bị từ chối nhập khẩu sản phẩm thủy sản giai đoạn 2006-2010 cao hơn so với các nước nhập khẩu khác. Tính trung bình từ 2006-2010, mỗi năm Việt Nam thiệt hại hơn 14 triệu USD do hàng xuất khẩu thủy sản bị trả lại (Chiếm 0,39% doanh thu trung bình từ 2006-2010 là 3,2 tỷ USD).

Mức độ và số lượng lô hàng bị nước ngoài cảnh báo năm 2011 không có dấu hiệu giảm trong bối cảnh Cục NAFIQAD đã áp dụng các biện pháp kiểm soát tăng cường nhằm vào thành phẩm trước xuất khẩu, đặc biệt là hơn một nửa số cảnh báo do lây nhiễm kháng sinh cấm có nguồn gốc từ khâu nuôi trồng, nhất là tôm. Điều đáng lưu ý là các cảnh báo nhiễm kháng sinh của nước ngoài có cả các loại kháng sinh đã bị cấm sử dụng trong nuôi trồng từ trước đó như Chloramphenicol, Trifluralin. Việc cho phép sử dụng một số loại kháng sinh trong nuôi trồng thủy sản, kiểm soát không tốt việc sản xuất, lưu thông các chất đã bị cấm và thiếu kiểm soát đồng đều của Nhà nước trên “chuỗi sản xuất”, nhưng doanh nghiệp lại là chủ thể phải chịu sự trừng phạt (xử lý vi phạm) khi bị phát hiện cảnh báo trong bối cảnh đã tuân thủ đầy đủ theo yêu cầu lấy mẫu kiểm nghiệm & cấp Chứng thư của Cục NAFIQAD. Điều này không chỉ mất công bằng, mà còn đặt ra một câu hỏi lớn về tính

hiệu quả của biện pháp kiểm soát An toàn thực phẩm kháng sinh cần phải được xem lại.

Diễn hình là trong 6 tháng cuối năm 2016, có 43 lô hàng thủy sản Việt Nam xuất khẩu sang Nhật Bản đã bị trả về do chứa dư lượng kháng sinh cấm trong đó có tới 41 lô nhiễm CAP [6]. Tình trạng hàng thủy sản xuất khẩu bị trả về đã gây thiệt hại khá nhiều cho bà con và làm giảm uy tín của ngành thủy sản Việt Nam.

Theo số liệu thống kê [5], đã phát hiện 43/63 mẫu tôm, cá, mực (thu mua ngẫu nhiên tại các chợ và siêu thị) bị nhiễm CAP ở mức dưới 10 mg/kg. Tháng 8, 9 năm 2017 Sở Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn Hà Nội đã phát hiện 2/56 mẫu thủy sản chứa tồn dư CAP. Như vậy, việc sử dụng CAP ở Việt Nam hiện ở mức đáng báo động.

Tại Hội nghị bàn giải pháp phát triển ngành tôm 2022 và ký quy chế phối hợp quản lý tôm giống, Cục quản lý chất lượng nông lâm sản và thủy sản (Nafiqad) - Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn cho biết, trong năm ngoái, Nafiqad đã thực hiện lấy 1.768 mẫu tôm nuôi (tôm thẻ chân trắng và tôm sú) tại 111 vùng nuôi tập trung để phân tích dư lượng hóa chất, kháng sinh; thì có 13 mẫu tôm vi phạm. Theo đó, các lô tôm vi phạm liên quan đến chỉ tiêu hóa chất kháng sinh, bao gồm Chloramphenicol, Ciprofloxacin, Oxytetracycline, Ormetoprim, Enrofloxacin và SEM.

Cho đến nay trên thế giới đã có khá nhiều phương pháp được phát triển và thẩm định để xác định dư lượng CAP trong thực phẩm như phương pháp quang phổ tử ngoại, phương pháp ELISA, phương pháp sắc ký khí với đầu dò bắt điện tử (GC-ECD), phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao với đầu dò tia tử ngoại (HPLC-UV), phương pháp sắc ký lỏng ghép khối phổ kép (LC-MS/MS) [9 -13].

Tại Việt Nam cũng đã một số nghiên cứu như phát hiện Chloramphenicol bằng phương pháp vi sinh, ELISA, LC-MS/MS [14,16]. Tuy nhiên các phương pháp trắc quang, HPLC-UV, GC-ECD, ELISA nhìn chung đều có LOD cao hơn nhiều so với quy định thế giới. Một số nước hiện đã ban hành phương pháp tiêu chuẩn cho phép định lượng

Chloramphenicol với giới hạn thấp (ví dụ: ở Canada là 2,5 ppb; ở EU là 0,3 ppb; ở Mỹ là 5 ppb).

Công tác kiểm soát dư lượng Chloramphenicol trong sản phẩm thực phẩm ở nước ta còn có những vấn đề bất cập, chưa đáp ứng yêu cầu của thế giới do các phương pháp phân tích CAP tiêu chuẩn hiện hành ở Việt Nam có giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) cao hơn so với quy định quốc tế. Chẳng hạn, phương pháp TCVN 8140 : 2009 - Định lượng Chloramphenicol trong thịt và sản phẩm thịt bằng phương pháp sắc ký lỏng pha đảo với đầu dò tia tử ngoại) có LOD > 6,5 mg/kg [7]; phương pháp TCN 186 : 2003 - Định lượng Chloramphenicol trong thủy sản bằng phương pháp sắc ký khí với đầu dò bắt điện tử) có LOD = 0,3 mg/kg [8]. Điều này gây khó khăn cho các cơ quan chức năng Việt Nam trong việc quản lý chất lượng sản phẩm động vật lưu hành nội địa, đặc biệt là các mặt hàng thủy sản xuất khẩu.

1.2.3. Các phương pháp phân tích Chloramphenicol (CAP) trong thực phẩm.

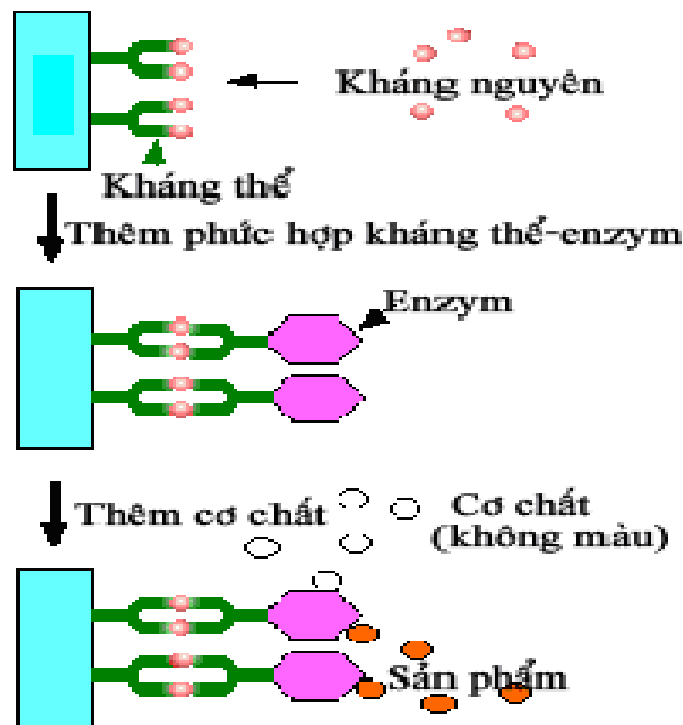
1.1.3.1 Phương pháp Elisa

ELISA (Enzyme - Linked Immunosorbent Assay) - gắn kết enzym cộng hợp được mô tả lần đầu tiên vào năm 1971 và từ đó đã trở thành một phương pháp được sử dụng ngày càng rộng rãi và quan trọng hơn trong nghiên cứu, chẩn đoán và xét nghiệm bởi vì nó có khả năng phát hiện nhạy bén với một lượng vật chất rất nhỏ. Xét nghiệm ELISA có thể được tiến hành với một số phương pháp như ELISA “trực tiếp”, “gián tiếp”, “sandwic” và “cạnh tranh“. [20].

Nguyên tắc cơ bản của phương pháp ELISA là kháng nguyên đã hoà tan trong dung dịch đệm thích hợp có thể phủ lên bề mặt plastic (như polystyrene). Quá trình này có thể là trực tiếp hoặc thông qua một kháng thể. Khi huyết thanh được thêm vào, các kháng thể có thể kết hợp với kháng nguyên ở pha đặc (solid phase). Xét nghiệm ELISA được thực hiện trong đĩa plastic kích thước 8cm x 12cm, chứa 8x12 giếng (giếng có chiều cao khoảng 1cm và đường kính là 0,7cm). Đĩa ELISA 96 giếng được sử dụng nhiều nhất trong ELISA thường là polystyrene hoặc các dẫn xuất của polystyrene thu

được bằng cách biến đổi hóa học hoặc chiếu xạ bề mặt. Phổ biến nhất là đĩa 96 giếng được tổ chức thành 8 hàng và 12 cột.

Các kháng thể sử dụng trong phương pháp ELISA được gắn với enzyme bằng liên kết đồng hoá trị. Kháng nguyên được gắn với giếng plastic và kháng thể liên kết với enzyme được gắn với kháng nguyên. Kháng thể không gắn kháng nguyên sẽ bị rửa trôi đi. Enzyme được giữ lại và vì vậy lượng kháng thể gắn enzyme được phát hiện bằng cách cho thêm vào một cơ chất làm thay đổi màu do hoạt tính của enzyme. Độ màu tạo thành là tỉ lệ với lượng enzyme bám ở giếng plastic, từ đó tính toán được lượng kháng thể, sau đó tiếp tục tính toán lượng kháng nguyên tham gia phản ứng.



Hình 1.3 Nguyên tắc của phương pháp Elisa.

Phản ứng ELISA trực tiếp được thiết lập nhằm xác định dư lượng Chloramphenicol (CAP) trong thực phẩm. Kháng thể đa dòng kháng Chloramphenicol (CAP), được phủ trên bề mặt của các giếng và ủ qua đêm ở điều kiện $37^{\circ}\text{C} \div 40^{\circ}\text{C}$. Phức hợp CAP và Enzyme horseradish peroxydase (HRPO) được tổng hợp và sử dụng cho phản ứng miễn dịch cạnh tranh với kháng nguyên Chloramphenicol (CAP) tự do và Chloramphenicol (CAP) có trong mẫu phân tích. Phương pháp cho kết quả phân tích CAP nhanh chóng,

chính xác; nhưng nhược điểm của phương pháp có giới hạn phát hiện cao [19]

1.1.3.2. Phương pháp Sắc ký khí (GC – Gas Chromatography) [1,8]

Sắc ký khí là một phương pháp tách dựa trên sự phân bố khác nhau của các chất giữa hai pha không trộn lẫn vào nhau, trong đó pha động là chất khí (khí mang) đi qua pha tĩnh chứa trong cột. Sắc ký khí được áp dụng để tách những chất hoặc dẫn xuất của chúng mà có thể hóa hơi ở nhiệt độ phân tích. Phương pháp sắc ký khí dựa trên cơ chế hấp phụ, phân bố hoặc loại theo kích thước (dùng rây phân tử).

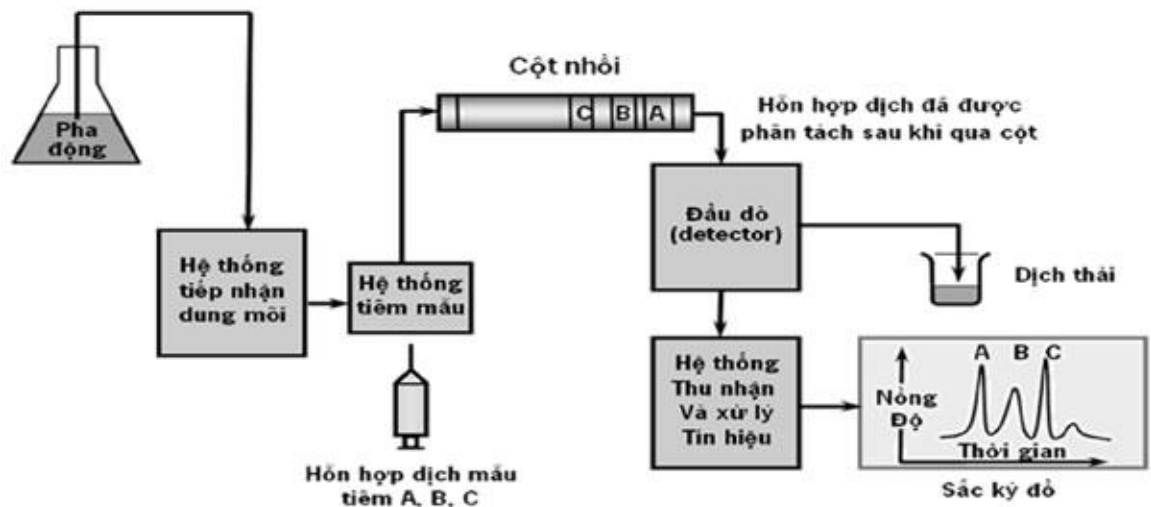
Nguyên tắc của phương pháp xác định hàm lượng Chloramphenicol trong thủy sản và sản phẩm thủy sản bằng hệ thống sắc ký khí là CAP trong mẫu thủy sản được chiết tách bằng Ethyl Acetaet. Dịch chiết sau đó được cô cạn, cạn được xử lý với sylon (chất tạo dẫn xuất Trimetylsylyl), để tạo dẫn xuất trimetylsylyl của CAP. Hàm lượng dẫn xuất CAP được xác định trên hệ thống GC với đầu dò bắt giữ điện tử (sau đây gọi tắt là ECD) theo phương pháp nội chuẩn. Phương pháp cho kết quả phân tích chính xác, nhưng thời gian phân tích dài, quy trình tạo dẫn xuất phức tạp, giới hạn phát hiện lớn - chưa đáp ứng yêu cầu của thế giới

1.1.3.3. Phương pháp Sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC - High Performance Liquid Chromatography) [1,7,22]

Sắc ký lỏng (HPLC) là phương pháp tách sắc ký các chất dựa trên sự phân bố khác nhau của chúng giữa hai pha không trộn lẫn, trong đó pha động là một chất lỏng chảy qua pha tĩnh chứa trong cột. Sắc ký lỏng được tiến hành chủ yếu dựa trên cơ chế hấp phụ, phân bố khối lượng, trao đổi ion, loại trừ theo kích thước hoặc tương tác hóa học lập thể. Trong hỗn hợp các chất phân tích, do cấu trúc phân tử và tính chất lí hoá của các chất khác nhau, nên khả năng tương tác của chúng với pha tĩnh và pha động khác nhau. Các thành phần mẫu hiển thị các tương tác mạnh hơn với pha tĩnh sẽ di chuyển chậm hơn qua cột so với các thành phần có tương tác yếu hơn. Do vậy, chúng di chuyển với tốc độ khác nhau và tách ra khỏi nhau.

1.1.3.4. Phương pháp Sắc ký lỏng ghép đầu dò khối phổ (LC – MS - Liquid Chromatography Mass Spectrometry) [21]

Sắc ký ghép khối phổ (Liquid chromatography–mass spectrometry) là một kỹ thuật hóa học mà gắn kết tiềm năng phân tích lý học của sắc ký lỏng hiệu năng cao với một khả năng phân tích khối (Mass Analysis) của cơ chế khối phổ (Mass Spectrometry). Thiết bị LC-MS là một kỹ thuật đầy tiềm năng sử dụng trong nhiều ứng dụng có độ nhạy và tính chọn lọc cao. Ứng dụng của phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao là xác định các chất hóa học trong sự có mặt của các chất hóa học khác (trong một hợp chất phức tạp).



Hình 1.4. Mô hình hệ thống LC-MS/MS

Nguyên tắc của phương pháp Sắc ký lỏng ghép đầu dò khối phổ là chất phân tích được chuyển sang thể khí và ion hoá, tạo thành các ion dương hoặc âm. Phương pháp phổ khối dựa trên việc đo trực tiếp tỷ số m/z , là tỷ số giữa khối lượng m và điện tích z của ion chất phân tích. Tỷ số này được trình bày dưới dạng đơn vị khối lượng nguyên tử ($1\text{a.m.u} = 1/12$ khối lượng của ^{12}C) hay dalton ($1\text{Da} =$ khối lượng nguyên tử hydro).

1.1.4. Kỹ thuật chiết ly pha rắn (Solid – Phase Extraction)

Kỹ thuật chiết ly pha rắn (Solid – Phase Extraction - SPE) ra đời vào giữa những năm 1970, vừa mới ra đời, kỹ thuật này đã bộc lộ những tính năng ưu việt hơn. Tuy nhiên mãi đến năm 1998, thuật ngữ khoa học “chiết pha rắn” mới được công nhận trên toàn thế giới. Từ đó đến nay, kỹ thuật chiết

pha rắn được phát triển mạnh mẽ trong nhiều lĩnh vực phân tích, đặc biệt trong phân tích các chất dạng vết.

Chiết pha rắn (hay chiết rắn-lỏng) là quá trình phân bố các chất tan giữa hai pha lỏng và rắn. Trong đó, chất tan ban đầu ở trong pha lỏng (nước hoặc dung môi hữu cơ); chất để hấp thụ chất tan ở dạng rắn (dạng hạt nhỏ và xốp) gọi là pha rắn.

Pha rắn (còn được gọi là pha tĩnh) thường là các hạt Silica gel xốp trung tính, hạt oxit nhôm, silica gel đã được ankyl hóa nhóm $-OH$ bằng các gốc Hydrocarbon mạch thẳng $-C_2$, $-C_4$, $-C_8$, $-C_{18}$, ... hay nhân phenyl, các polymer hữu cơ, các loại nhựa hoặc than hoạt tính. Các hạt này được nhồi vào cột chiết nhỏ (thường là cột có kích thước 5×1 cm) hoặc nén ở dạng đĩa dày $1 - 2$ mm với đường kính $3 - 4$ cm (đĩa chiết).

Pha lỏng là pha chứa chất cần phân tích, chúng có thể là dung môi hữu cơ, dung dịch đệm.... Khi cho pha lỏng đi qua cột chiết hoặc đĩa chiết, pha rắn tương tác với chất phân tích và giữ một nhóm (hoặc một số nhóm) của chất phân tích lại trên pha rắn; các chất còn lại đi ra khỏi cột cùng với dung môi hòa tan mẫu.

Quá trình rửa giải (giải hấp) chất phân tích được thực hiện bằng một dung môi thích hợp. Thông thường, thể tích dung dịch rửa giải nhỏ hơn nhiều so với dung dịch hòa tan mẫu ban đầu, điều này có nghĩa là chất phân tích đã được làm giàu.

Theo đặc điểm và bản chất của sự chiết, các chất chiết pha rắn được chế tạo và phân chia theo các loại chất:

- Loại hấp phụ pha thường: Đó là các Silica trung tính và oxit nhôm,
- Hấp phụ pha ngược: Đó là các Silica thường được alkyl hoá nhóm $-OH$,
- Loại chất trao đổi iôn (để tách Cation và Anion),
- Chất rây hay sàng lọc phân tử theo độ lớn, kích thước của phân tử chất,
- Loại chất hấp phụ khí (purge and trap Extraction), để hấp thụ chất khí.

Quá trình chiết ở đây thực chất cũng là sự phân bố của chất phân tích giữa 2 pha, pha rắn (chất chiết) và pha lỏng (dung dịch chứa chất phân tích) không

trộn lẫn vào nhau trong những điều kiện nhất định, như pH, dung môi, nhiệt độ, tốc độ chảy của mẫu qua cột chiết. Trong đó hệ số phân bố nhiệt động K_b của chất phân tích giữa hai pha (rắn và lỏng chứa mẫu) cũng là một yếu tố quyết định hiệu quả của sự chiết. Nó cũng tương tự như trong hệ sắc ký cột lỏng-rắn (của các hệ HPLC). Vì thế muốn thực hiện chiết pha rắn tốt phải có các điều kiện sau đây:

- Pha rắn hay chất chiết (dạng cột chiết hay đĩa chiết) phải có tính chất hấp thụ hay trao đổi chọn lọc với một chất, hay một nhóm chất phân tích nhất định, tức là tính chọn lọc của pha tĩnh chiết.

- Các chất chiết và dung môi rửa giải phải có độ sạch cao theo yêu cầu của cấp hàm lượng phân tích.

- Hệ số phân bố nhiệt động K_b của cân bằng chiết phải lớn, để có được hiệu suất chiết cao.

- Quá trình chiết phải xảy ra nhanh và nhanh đạt cân bằng, nhưng không có tương tác phản ứng hoá học làm mất hay hỏng pha rắn và chất phân tích.

- Quá trình chiết phải có tính thuận nghịch, để còn có thể rửa giải được tốt chất phân tích ra khỏi pha chiết bằng một pha động phù hợp.

- Không làm nhiễm bẩn thêm chất phân tích trong quá trình chiết bởi bất kỳ từ nguồn nào.

- Sự chiết phải được thực hiện trong điều kiện nhất định phù hợp, phải lặp lại được tốt và tất nhiên là càng đơn giản dễ thực hiện thì càng tốt.

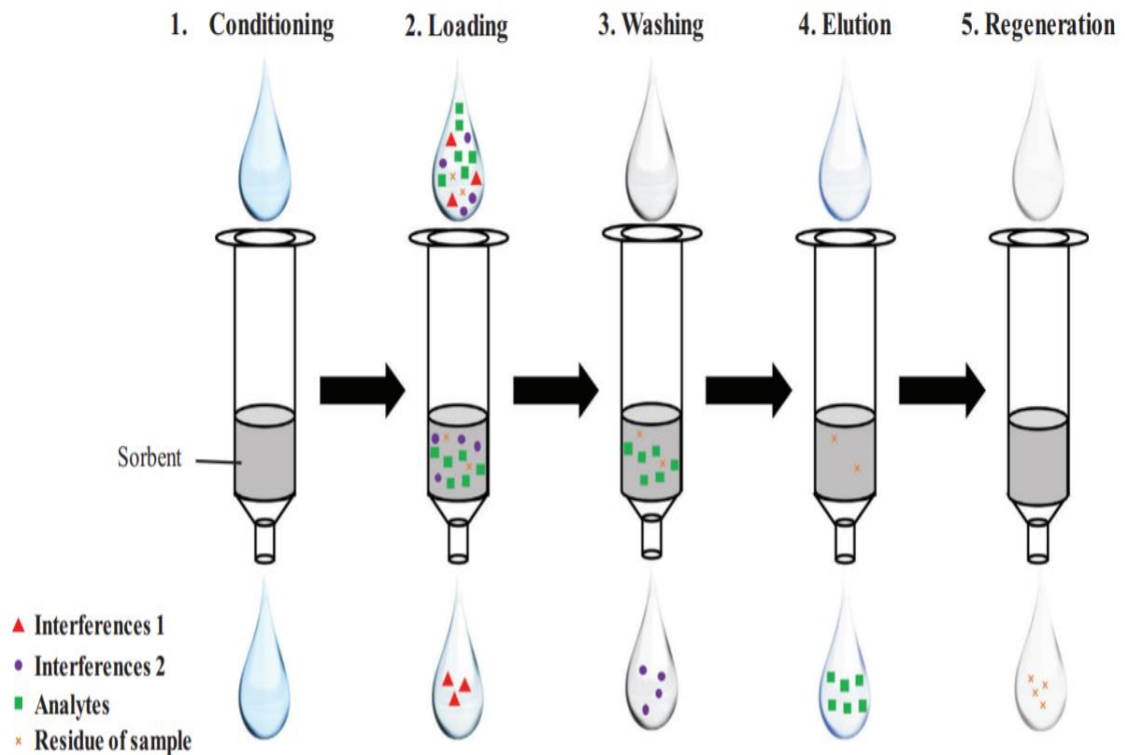
Việc lựa chọn dung môi trong kỹ thuật kỹ thuật SPE là rất quan trọng. Cấu trúc phân tử và nền mẫu hai yếu tố quan trọng quyết định cơ chế nào thích hợp cho trình tách. Việc quan tâm đầu tiên trong quá trình xác định phương pháp SPE thích hợp là cấu trúc và độ phân cực chất cần phân tích. Khoảng phân cực chất phân tích tương đối rộng từ hợp chất không phân cực PCB, DDT đến không phân cực PAH đến phân cực thuốc diệt cỏ. Hầu hết hợp chất phân cực chứa nhiều nhóm chức phân cực chứa nhóm ion (cả cation anion). Do đó loại cột SPE và dung môi cần sử dụng tùy thuộc vào độ phân cực hợp chất. VD: Với hầu hết chất không phân cực cả C18 và C8 sử dụng tốt để hấp phụ chất cần phân tích khỏi dung dịch nước pha đảo. Tuy nhiên C8 cho hiệu thu hồi tương đối tốt với hầu hết chất không phân cực. Điều này do

hợp chất không phân cực rửa giải dễ dàng khỏi cột C8 do lực tương tác Val der waals bị giảm. Đối với chất có độ phân cực vừa phải SPE C18 lại thích hợp để sử dụng. Tuy nhiên đối với các hợp chất phân cực C18 không đủ độ kỵ nước để hấp phụ hợp chất từ dung dịch nước. Bước cơ bản khác trong quá trình chiết pha rắn là việc tìm ra tính kỵ nước so với tính phân cực chất phân tích để xác định chế hấp phụ. Có hai bước chủ yếu để xác định cơ chế cho việc phân tích mẫu nước và mẫu không nước.

Cơ chế SPE cho phép phân tích các mẫu nước: Với mẫu nước, việc quyết định sử dụng chất hấp phụ nào là dựa vào đặc tính phân cực, đặc tính ion chất phân tích quan tâm. Nếu mẫu phân cực là ion chất hấp phụ có tính trao đổi ion được sử dụng. Nếu chất phân tích phân cực mà không có tính ion thì chất hấp phụ sử dụng tốt nhất là pha đảo (ví dụ C18) và nếu chất phân tích không phân cực, thì chọn pha đảo với chất hấp phụ C8 và C18.

Cơ chế SPE cho phép phân tích các mẫu không phải mẫu nước: Với mẫu này, việc quyết định sử dụng chất hấp phụ nào ngược lại so với trường hợp trên. Nếu chất phân tích là phân cực và là ion thì hiệu suất thu hồi tốt nhất là sử dụng trao đổi ion (tương tự trên). Nếu chất phân tích là phân cực không phải ion thì chất hấp phụ là pha đảo hoặc pha thường. Sự lựa chọn tùy thuộc vào dung môi hữu phân cực hay không phân cực tương ứng. Nếu chất phân tích không phân cực chất hấp phụ chọn pha đảo.

Trong chiết pha rắn, kỹ thuật thường được lựa chọn sử dụng là: Kỹ thuật SPE điều kiện động. Trong kỹ thuật SPE điều kiện động, vật liệu pha rắn nạp trước vào cột (cartridge) và được cố định bởi 2 tấm ngăn polyetylen xốp. Có khi vật liệu SPE cố định trong các mạng lưới polytetrafluoroethylene (PTFE) và được ép thành khối dạng đĩa. Kỹ thuật chiết SPE trong điều kiện động gồm bốn bước chính (được mô tả ở hình 1.5)



Hình 1.5. Sơ đồ mô tả quy trình kỹ thuật chiết SPE.

1.1.5. Kỹ thuật phân mảnh thường dùng trong phân tích Chloramphenicol bằng phương pháp sắc ký lỏng ghép đầu dò khối phổ (LC/MS – MS)

Dựa trên cơ sở về đặc điểm và tính chất của Chloramphenicol (CAP), đã có các nghiên cứu về điều kiện phân mảnh Chloramphenicol trên đầu dò khối phổ. Chẳng hạn, theo Phạm Kim Đăng, và các cộng sự [16] - Xác định đồng thời dư lượng kháng sinh Chloramphenicol (CAP), florphenicol (FF), thiamphenicol (TAP) trong một số sản phẩm động vật bằng phương pháp sắc ký lỏng khối phổ đã tối ưu được điều kiện phân mảnh Chloramphenicol trên thiết bị sắc ký lỏng ghép đầu dò khối phổ HPLC 20 AXL Shimadzu và khối phổ ABI 5500 QQQ Applied Biosystem bằng kỹ thuật ion hóa phun điện tử ESI với chế độ bắn phá ion âm với: thế phun điện tử 4,0 kV; nhiệt độ đầu phun (IS) 300°C; khí màn (CUR) 30 L/h; khí va chạm (CAD) 7 L/h; nguồn khí ion 1 (GS1) 20 eV; nguồn khí ion 2 (GS1) eV; thế phân nhóm (DP) -100 V; thế đầu vào (Entrance Potential) (EP) -1 kV. Điều kiện bắn phá và phân mảnh tạo các ion con như sau: từ 320,972→152,221/ 257,192: thế phân nhóm: - 100 V; năng lượng va chạm: -22V.

Theo nghiên cứu của Barbara và các cộng sự tối ưu điều kiện phân mảnh trên thiết bị Thermo Quest Finnigan TSQ 7000 with API2 (API-2 metal needle kit; part no OPTON-53003 from ThermoFinnigan) bằng kỹ thuật ion hóa phun điện tử ESI với chế độ bắn phá ion âm với ion mẹ (m/z): 321; ions thứ cấp (m/z): 257, 194, 176, 152; Spray Voltage: 1.5 kV; năng lượng va chạm: 26 V ; Điện thế: 1,27 kV; nhiệt độ capillary: 350°C; tốc độ khí mang: 80 l/h; áp lực dòng N₂: 35 psi; loại khí dùng va chạm: Ar [12].

Trong nghiên cứu về phân tích tồn dư Chloramphenicol trên nền mẫu thịt bò của Widiastuti R và các cộng sự (năm 2016) đã khảo sát điều kiện phân mảnh Chloramphenicol trên thiết bị đầu dò khối phổ tứ cực Agilent 6410A Triple Quad LC/MS với chế độ Ion hóa phun điện tử ESI - bắn phá ion âm trong các điều kiện như sau: nhiệt độ khí: 300 °C; tốc độ khí: 5 L/min; nhiệt độ buồng hóa hơi: 160 °C; áp suất đầu phun: 60 psi; điện áp Capillary: 2500 V; cường độ dòng điện qua Capillary: 4 µA. Điều kiện bắn phá tạo các mảnh định lượng và định tính cụ thể là: 321,0→152,0/257,0 điện thế 100V/30V; năng lượng va chạm 100V/15V.

1.1.6. Một số quy trình xác định dư lượng Chloramphenicol bằng phương pháp Sắc ký lỏng ghép đầu dò khối phổ (LC – MS/MS)

a. Quy trình phân tích dư lượng Chloramphenicol trên các nền mẫu có nguồn gốc thịt động vật bằng phương pháp Sắc ký lỏng ghép khối phổ

❖ Quy trình xử lý mẫu (Hình 1.6)

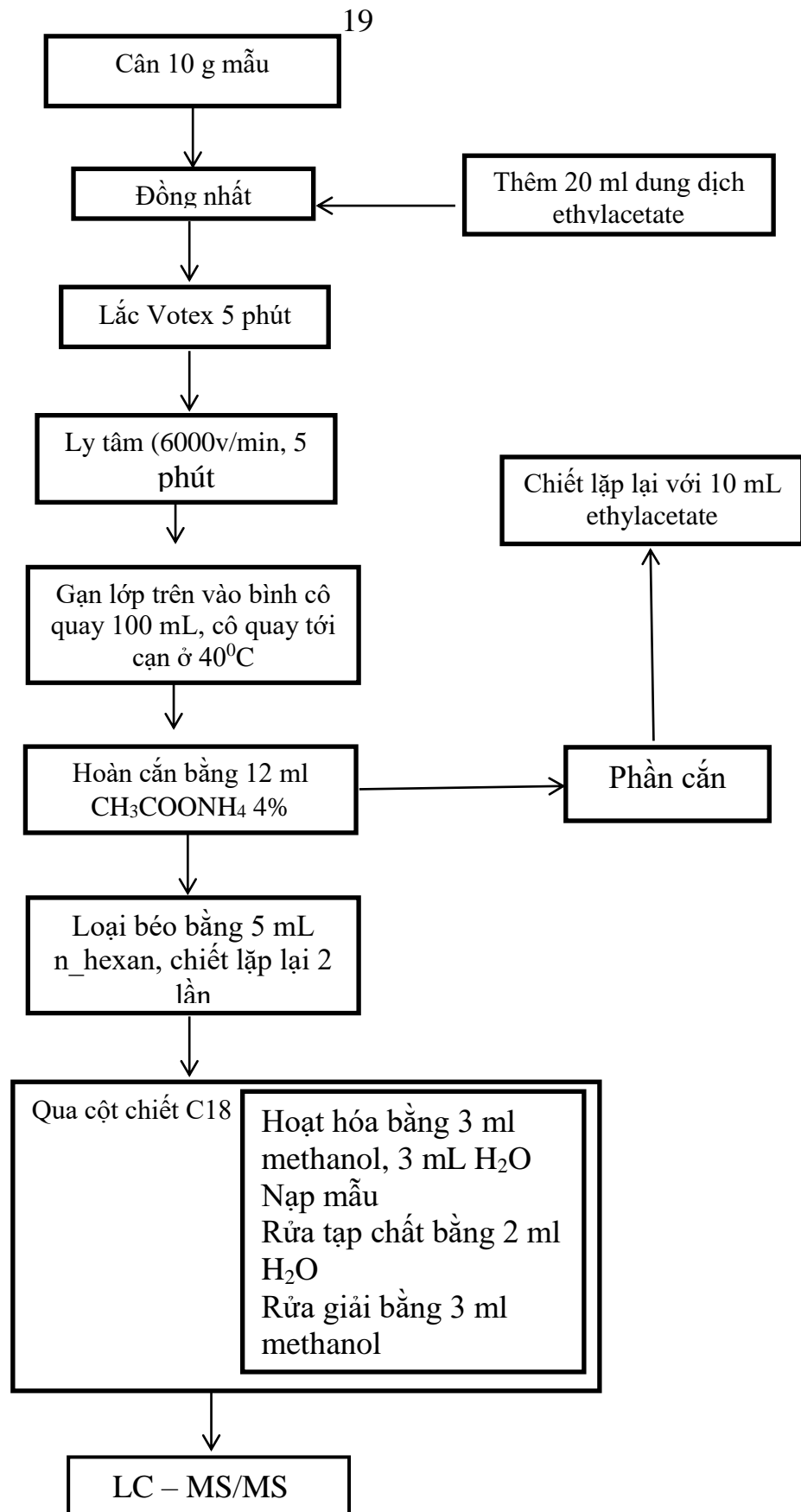
- Mẫu cần xác định dư lượng Chloramphenicol (thịt lợn, thịt gà, cá, ...) được xay nhuyễn, đồng nhất; lưu giữ trong điều kiện 20 °C trong suốt thời gian khảo sát. Cân chính xác khoảng 10 g mẫu vào ống ly tâm 50 ml thêm 20 ml dung môi ethyl acetate đồng nhất kỹ bằng máy Vortex trong 5 phút. Dung môi ethyl acetate hòa tan được nhóm Chloramphenicol trong mẫu thử.

- Tiến hành ly tâm mẫu trong 5 phút với 6000 vòng/ phút để tách phần lipid, protein, màu,... ra khỏi mẫu thử. Gạn lấy lớp trên của ống ly tâm cho vào bình cô quay 100 mL, cô quay tới cạn ở 40 °C. Phần cặn sau ly tâm, thực hiện chiết lặp lại hai lần mỗi lần với 10 ml dung môi ethyl acetate.

- Phần cặn khô thu được sau quá trình cô quay, được hòa tan hoàn toàn bằng 12 ml dung dịch CH₃COONH₄ 4%; đồng thời loại chất béo ra khỏi mẫu

thử bằng n-hexan (chiết lặp lại 2 lần, mỗi lần 5 ml n-hexan). Loại bỏ hoàn toàn lớp n-hexan. Lấy lớp dưới cho qua cột chiết pha rắn C₁₈ để làm giàu mẫu.

- Cột C₁₈ được hoạt hóa bằng 3 ml H₂O và 3 ml methanol, nạp toàn bộ lượng mẫu sau khi đã loại chất béo cột chiết; rửa tạp chất bằng 2 ml H₂O; sau đó rửa giải bằng 3 ml methanol; tiến hành phân tích bằng hệ thống sắc ký lỏng ghép đầu dò khối phổ.



Hình 1.6. Quy trình chiết Chloramphenicol từ nền mẫu thịt, cá.

❖ Dãy chuẩn nồng độ Chloramphenicol:

- Chất chuẩn Chloramphenicol (CAP) được pha trong methanol ở nồng độ 1µg/mL và bảo quản trong tủ lạnh ở 0 – 4 °C.

- Dung dịch chuẩn làm việc được pha loãng từ dung dịch gốc (1µg/mL) bằng nước cất, với khoảng tuyến tính từ 0,5 ng/g đến 3,3 ng/g.

❖ Điều kiện phân tích trên sắc ký lỏng ghép khối phổ

- Cột sắc ký: cột Symmetry Shield C18 của Water (150mm x 4,6mm x 5mm) và tiền cột Symmetry C18 của Water (20mm x 3,9mm x 5mm).

- Pha động: Chương trình gradient theo Bảng 1.1:

Bảng 1.1. Chương trình pha động phân tích CAP trên nền mẫu cá.

Thời gian (phút)	Tốc độ dòng (mL/phút)	A (Methanol)	B (CH ₃ COOH - 1 % trong nước)
0,01	0,4	20	80
4	0,4	100	0
6	0,4	100	0
6,01	0,4	20	80
10	0.4	20	80

- Điều kiện khối phổ bằng kỹ thuật ion hóa phun điện tử ESI với chế độ bắn phá ion âm: thế phun điện tử 4,0 kV; nhiệt độ đầu phun (IS) 300°C; khí màn (CUR) 30; khí va chạm (CAD) 7; nguồn khí ion 1 (GS1) 20; nguồn khí ion 2 (GS1) 10; thế phân nhóm (DP) -100; thế đầu vào (Entrance Potential) (EP) -1.

- Điều kiện bắn phá và phân mảnh tạo các ion con: từ 320,972→152,221/257,192: thế phân nhóm: - 100 V; năng lượng va chạm: -22V.

- Giới hạn pháp hiện của phương pháp là 0,3 µg/ kg

b. Quy trình phân tích dư lượng Chloramphenicol trên nền mẫu mật ong bằng phương pháp Sắc ký lỏng ghép khối phổ [17]

❖ Quy trình chiết và xử lý mẫu:

- Cân chính xác khoảng 5g mật ong vào ống ly tâm 50 mL, thêm 5mL nước cất và 15 ml ethyl acetate, sau đó tiến hành ly tâm.

- Sau khi ly tâm gộp toàn bộ lượng dung dịch chiết mẫu cho qua cột Oasis HLB (6cc/200 mg) đảm bảo tốc độ 2 giọt/ phút. Cho 5 ml qua cột để rửa tạp chất. Rửa giải với 5ml methanol, dung dịch rửa giải được chứa vào vial. Làm khô dung dịch rửa giải bằng khí trơ nitơ nóng (50 °C) để thu được cặn. Hòa tan cặn trong 500 µl dung dịch hỗn hợp nước : methanol (9:1 – v/v) lọc mẫu quang lọc 0,22 µm để phân tích trên thiết bị HPLC – MS/MS.

❖ Điều kiện phân tích trên sắc ký lỏng ghép khối phổ (Alliance HPLC 2695)

- Cột sắc ký: Symmertry C₈, 3,5 µm, 2,1 x 50 mm, tiền cột Symmertry C₈, 3,5 µm, 2,1 x 50 mm.

- Thể tích tiêm mẫu: 20 µl.

- Nhiệt độ ổn cột: 30 °C.

- Pha động: Chương trình gradient theo Bảng 1.2:

Bảng 1.2. Chương trình pha động phân tích CAP trên nền mẫu mật ong.

Thời gian (phút)	Tốc độ dòng (ml/phút)	A (Nước)	B (Methanol)
0,00	0,3	90	10
8	0,3	10	90
10	0,3	10	90
10,01	0,3	90	10
15	0,3	90	10

- Điều kiện khối phổ: chế độ ISE âm; 321 → 152 và 257.

- Giới hạn phát hiện của phương pháp là 0,3 µg/ kg.

c. Quy trình phân tích dư lượng Chloramphenicol trong sữa bằng phương pháp Sắc ký lỏng ghép khối phổ [37].

❖ Quy trình chiết và xử lý mẫu:

- Lấy khoảng 10 ml mẫu sữa thêm 10ml nước, Vortex kỹ, ly tâm 3500 vòng/ phút trong 20 phút ở nhiệt độ 4 °C. Lấy 3ml dịch mẫu sau ly tâm cho vào ống ly tâm 15 ml; thêm 6ml ethyl acetate, Vortex kỹ. Lấy 4 ml mẫu thử ở lớp ethyl acetate cho vào ống nghiệm thủy tinh, thổi khô để thu được cặn bằng dòng khí nitơ nóng ở 50 °C.

- Hòa tan cặn hòa tan với 0,5 ml nước, Vortex kỹ (siêu âm nếu cần thiết), thêm 0,5 ml hỗn hợp cacbon tetrachloride : n – hexan (tỉ lệ 1: 1) Vortex kỹ và ly tâm 2500 vòng/ phút trong 5 phút. Loại bỏ lớp dung môi hữu cơ, lấy lớp nước lọc qua màng lọc 0,22 µm phân tích HPLC – MS/MS.

❖ Dãy chuẩn làm việc của Chloramphenicol tuyến tính nằm trong khoảng từ 0,02 ÷ 1,00 µg/kg.

❖ Điều kiện phân tích trên máy sắc ký lỏng ghép khối phổ:

- Hệ thống: HPLC Waters – Alliance 2695 ion hóa phun điện tử ESI với chế độ bắn phá ion âm.

- Cột sắc ký: C18 – Metry Shield 10 cm x 2,1 mm ID x 3,5 µm (Waters)

- Thể tích tiêm mẫu: 20 µL.

- Pha động: Chương trình gradient theo Bảng 1.3

Bảng 1.3 . Chương trình pha động phân tích CAP trên nền mẫu sữa.

Thời gian (phút)	Tốc độ dòng (ml/phút)	A (nước chứa 0,1M acid formic và amoni acetate 0,025M)	B (acetonitrile)
0,00	0,2	80	20
4	0,2	40	60

5.5	0,2	40	60
7	0,2	80	20

- Điều kiện bắn phá và phân mảnh tạo các ion con Bảng 1.4

Bảng 1.4. Điều kiện phân mảnh của CAP và CAP_{d5}

Thành phần	Tỷ số m/z	Mảnh ion con	Thế Voltage (v)	Năng lượng bắn phá (v)
CAP	321	321 → 152	52	15
		321 → 257	52	10
d ₅ _ CAP	326	321 → 157	54	15
		321 → 262	54	10

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

2.1.1. Đối tượng phân tích

Trong luận văn này, dư lượng Chloramphenicol trong một số sản phẩm thịt động vật như: thịt gà, chả lụa được mua các siêu thị trên địa bàn thành phố Nha Trang (tỉnh Khánh Hòa); và các mẫu thịt đà điểu, tôm, khô bò,... được các đơn vị sản xuất kinh doanh gửi đến Trung Tâm Kiểm Nghiệm tỉnh Khánh Hòa (năm 2022).

Các mẫu thịt khảo sát tồn dư Chloramphenicol tại phòng thí nghiệm, được mã hóa, và bảo quản trong điều kiện âm sâu 20 °C trong quá trình khảo sát, đánh giá.

2.1.2. Hóa chất

- Chuẩn Chloramphenicol của Sigma (Code: 29414000) và nội chuẩn Chloramphenicol của LGC Labor GmbH – Đức (Code: DRE-C11120100).

- Acetonitrile và Methanol dùng cho LC-MS/MS (Merck - Đức)

- Acid formic, Acid Acetic, Etylacetate, nước cất siêu sạch (Merck - Đức).

2.1.3. Dụng cụ

- Cột chiết được sử dụng trong luận văn này cột chiết C18 – E (55µm,70A); 500 mg/6 mL (tubes) của hãng Phenomenex (Prod Lot: S21 – 007422).

- Màng lọc mẫu 0,22 µm (Sartorius, Đức, Lot No: 2020101404)

- Lọ đựng mẫu 2 ml (có nắp và septa) dùng cho sắc ký (Waters, Mỹ).

2.1.4. Thiết bị nghiên cứu

Nghiên cứu này sử dụng thiết bị LC-MS/MS của hãng Waters (Mỹ), code: C22.2 No.61010 – 1 với cấu hình như sau:

* **Hệ thống HPLC**, gồm:

- Hệ thống bơm dung môi 4 kênh (UPLC Quaternary Solvent Manager):

+ Số dòng dung môi: lên đến 4 dòng

+ Xử lý dung môi: tích hợp bộ khử khí chân không 6 kênh (4 kênh dung môi và 2 kênh bơm hút mẫu)

- Hệ thống bơm mẫu tự động với FTN: cho phép thay đổi nhiệt độ buồng mẫu từ 4 - 40°C

- Lò cột: cho phép điều chỉnh nhiệt độ từ 20°C - 90°C

- Cột phân tích: cột sắc ký C18 1,7 µm; 2,1 x50 mm; Bộ lọc trước cột: Kit, ACQUITY Col. In-Line Filter, KIT, FRIT AND NUT, 0,2µm, 2,1mm, PKG 5.

* **Hệ thống khối phổ 2 lần MS/MS** :Xevo TQ-S Cronos; Waters-Mỹ.

- Nguồn ion hóa: công nghệ Z-Spray kiểu trực giao giúp tăng độ nhạy.

- Kiểu ion hoá: nguồn ion hoá đa chức năng (Multimode) cho phép ion hóa đồng thời theo 2 kiểu ion hóa đầu phun điện tử (ESI) và (ion hóa hóa học ở áp suất khí quyển) APCI.

+ Đường truyền quang học của nguồn ion: cấu tạo theo kiểu lệch trục công nghệ Stepwave dẫn ion đi lệch trục để loại tạp nhiễu (StepWave ion transfer optics).

+ Hệ thống phân tích khối lượng: (Mass Analyser): gồm 2 bộ tứ cực có độ phân giải cao (MS1 và MS2); các prefilter để tăng tối đa độ phân giải và truyền dẫn khi ngăn chặn nhiễm bẩn đến phần phân tích chính.

+ Bộ phận định hướng phân mảnh ion - Collision Cell: Các ion chuyển động kiểu hình sóng T-Wave™.

+ Đầu dò (Detector): ống nhân quang photomultiplier (PMT) lệch trục.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Tối ưu hóa các điều kiện sắc ký lỏng siêu năng cao (UPLC):

- Trong phân tích sắc ký, tỷ lệ pha động ảnh hưởng rất nhiều đến khả năng phân tách của Chloramphenicol ra khỏi hỗn hợp và pha tĩnh. Do đó việc ưu tiên khảo sát loại pha động được sử dụng và chế độ rửa giải là nhất định phải được tối ưu. Dựa vào tính chất của Chloramphenicol, cùng một số tài liệu tham khảo, hệ pha động được sử dụng là dung dịch Amoni Acetate (CH₃COONH₄) 0,1 % trong nước cất và Methanol được lựa chọn để sử

dụng trong luận văn này. Hệ pha động trên được tiến hành khảo sát ở 2 chế độ:

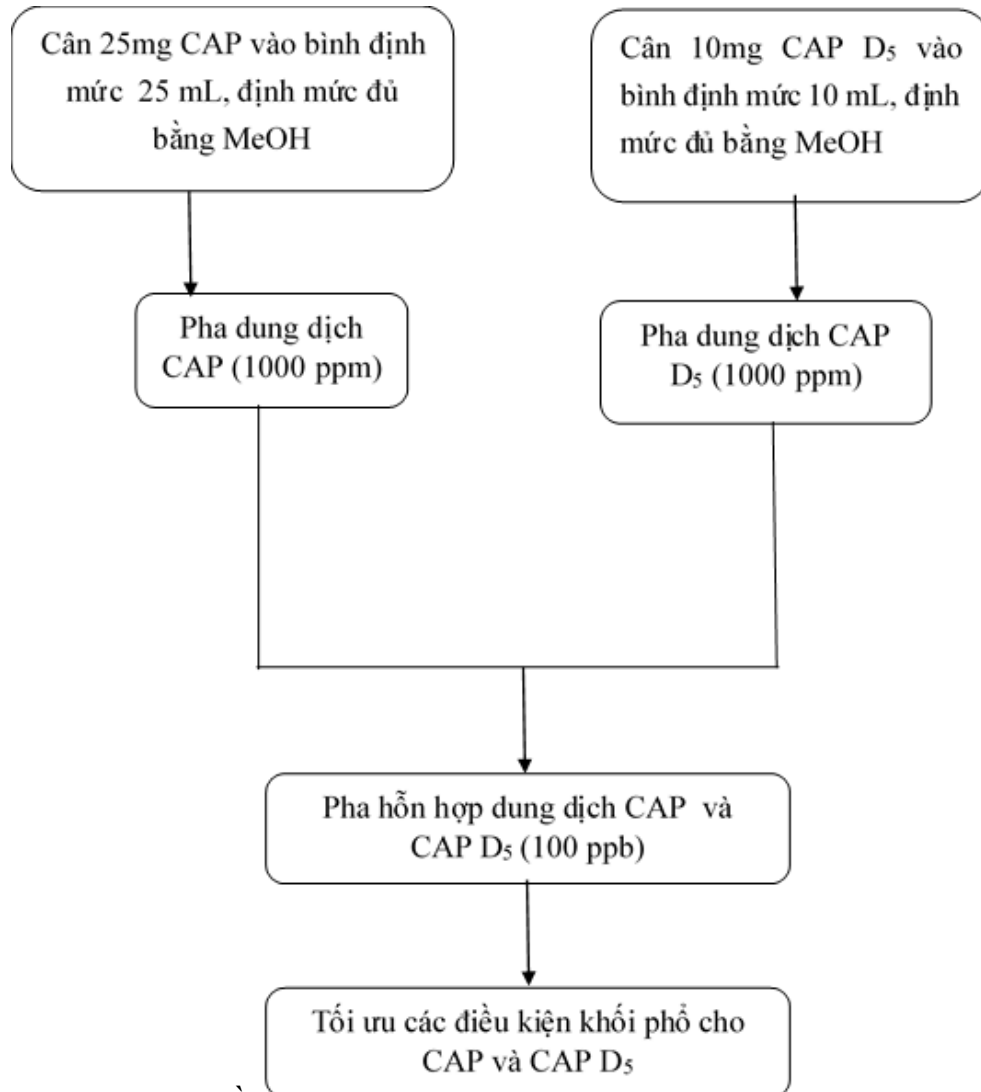
- Isocratic: cố định tỉ lệ hai kênh của pha động
- Chế độ gradient: quét tuyến tính từ 10% dung dịch Amoni Acetate 0,1% trong nước (90% Methanol) đến 100% dịch amoni acetate 0,1 % trong nước (10% methanol) trong thời gian 3 phút.

2.2.2. Tối ưu hóa điều kiện phân tích Chloramphenicol trên thiết bị sắc ký lỏng ghép đầu dò khối phổ 2 lần:

Tiến hành trên mẫu chuẩn Chloramphenicol tinh khiết và nội chuẩn Chloramphenicol _ D₅ với nồng độ gấp 100 lần nồng độ chuẩn làm việc (khoảng 100 µg/Kg).

Dựa vào tính chất của Chloramphenicol và Chloramphenicol _ D₅ có tỷ số giữa khối lượng và điện tích ion (m/z) đặc trưng lần lượt là 321 và 326, tiến hành tìm dò các mảnh ion con định lượng và định tính bằng phương pháp tìm dò tự động trên đầu dò khối phổ thông qua độ nhạy của tín hiệu thu được.

Việc tối ưu hóa các điều kiện bán phá và phân mảnh các ion con là xác định các thông số kỹ thuật như: kỹ thuật ion hóa, chế độ bán phá, điện thế để thu được dòng ion nhiều nhất, năng lượng bán phá các ion trong điều kiện hóa chất và trang thiết bị thực tế tại phòng thí nghiệm.



Hình 2.1 Sơ đồ tối ưu các điều kiện khối phổ của CAP và CAP_{D5}

2.2.3. Tối ưu hóa quy trình xử lý mẫu xác định hàm lượng CAP trong mẫu thịt động vật bằng phương pháp LC-MS/MS [25-30].

Trong các nhóm mẫu động vật trên thì mẫu thịt gà chứa hàm lượng lipid cao, và chứa sắc tố màu vàng (đặc biệt trong da gà), do đó trong luận văn này, chúng tôi lựa chọn mẫu thịt gà làm nền mẫu đại diện để đánh giá tối ưu phương pháp tách chiết. Sau khi tối ưu quy trình chiết tách Chloramphenicol trên nền mẫu thịt gà đại diện, quy trình được kiểm chứng trên một số mẫu khác. Mẫu thịt gà tươi được xay nhuyễn đồng nhất bằng máy xay thịt; sau đó được lưu giữ bảo quản trong điều kiện âm 20 °C trong suốt thời gian khảo sát.

❖ Lựa chọn dung môi chiết Chloramphenicol từ mẫu thử:

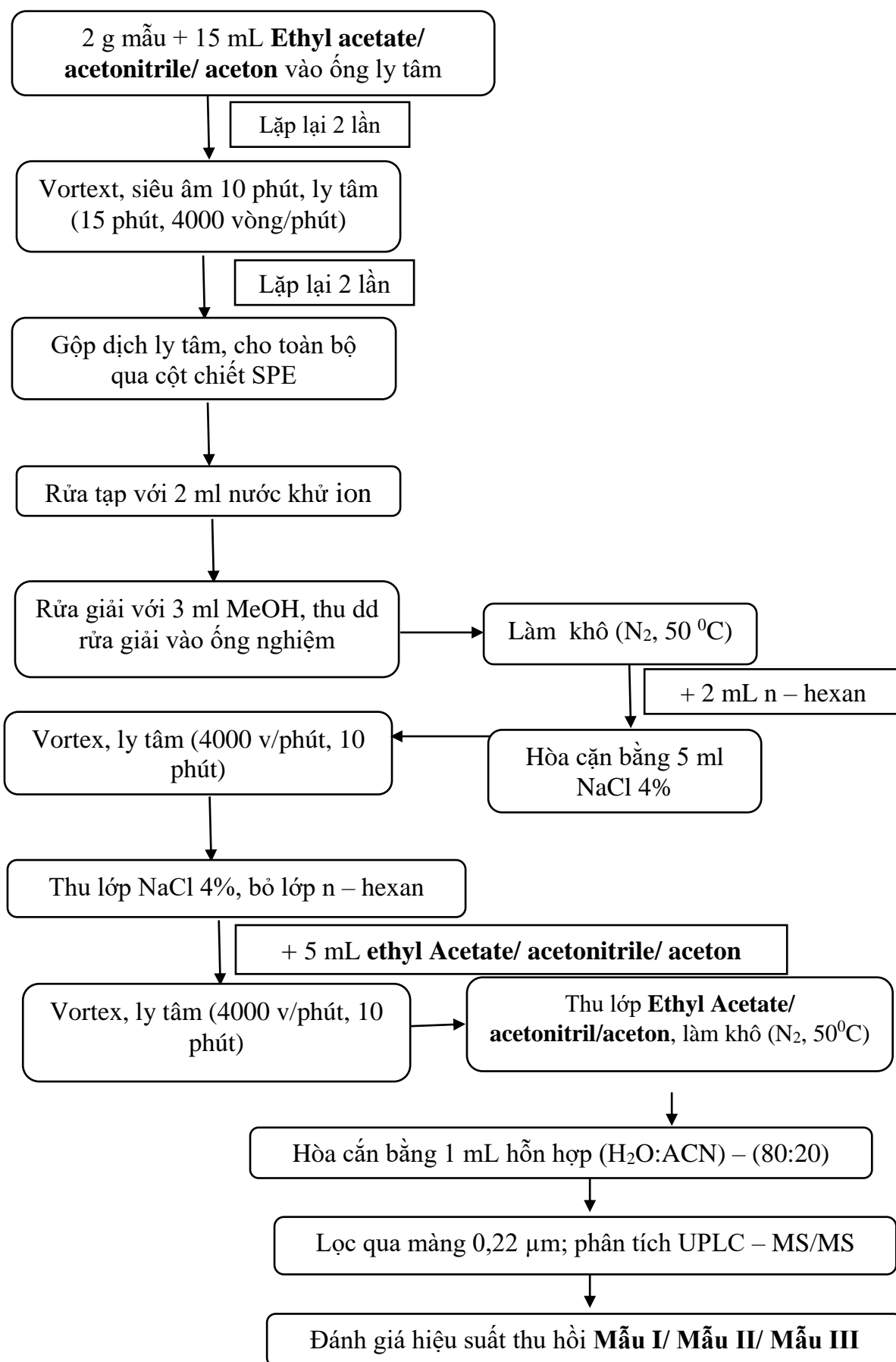
Dựa vào độ phân cực và một số đặc điểm hóa học của Chloramphenicol, dung môi chiết được thử nghiệm bao gồm ethyl acetate (mẫu I), acetone (mẫu

II), acetonitrile (mẫu III). Hiệu quả hòa tan và tách chiết của các dung môi tách chiết được đánh giá thông qua hiệu suất thu hồi của lần lượt 3 mẫu.

Thí nghiệm 1: Cân khoảng 2 g phần mẫu thử đã đồng nhất, chính xác đến 0,1 g cho vào ống ly tâm dung tích 50 mL (1), thêm chuẩn CAP, thêm 15 mL Ethyl Acetate lắc bằng máy Vortex, siêu âm 10 phút, ly tâm 4000 vòng/ phút trong 15 phút thu dịch trong. Công đoạn chiết rút này được lặp lại 2 lần; gộp dịch chiết sau khi ly tâm cho qua cột chiết pha rắn SPE – C₁₈ (tốc độ dòng chảy qua cột khoảng 2 ÷ 3 mL/ phút). Tiếp tục rửa tạp bằng 2 mL nước cất khử ion, rửa giải bằng 2 mL MeOH. Hứng toàn bộ dung dịch rửa giải vào ống nghiệm 3mL, bay hơi hoàn toàn MeOH bằng dòng khí nitơ nóng (50⁰C). Hòa tan cặn bằng 5 mL dung dịch NaCl 4 %, Vortex hòa tan kỹ cặn, thêm 2 mL n-Hexan, Vortex, ly tâm với tốc độ 4000 vòng/ phút trong 10 phút để loại bỏ n – Hexan, thu lớp dịch NaCl vào ống ly tâm 15 mL (2). Thêm 5mL ethyl acetate vào ống ly tâm (2), Vortex kỹ, ly tâm 4000 vòng/ phút trong 15 phút. Thu lớp Ethyl acetate, thổi khô bằng dòng khí N₂ (50⁰ C); cặn thu được hoàn tan hoàn toàn trong 1 mL hỗn hợp dung môi H₂O: ACN (80: 20). Lọc mẫu qua màng lọc kích thước lỗ 0,22 μm, làm bằng PTFE, đường kính 13 mm, phân tích UPLC – MS/MS - (mẫu I).

Thí nghiệm 2: Thí nghiệm 2 được thực hiện trình tự tương tự thí nghiệm 1, với dung môi chiết rút ban đầu là acetone (thay vì ethyl acetate), thu được Mẫu II.

Thí nghiệm 3: Thí nghiệm 3 được thực hiện trình tự tương tự thí nghiệm 1, với dung môi chiết rút ban đầu là acetonitrile (thay vì ethyl acetate), thu được Mẫu III.

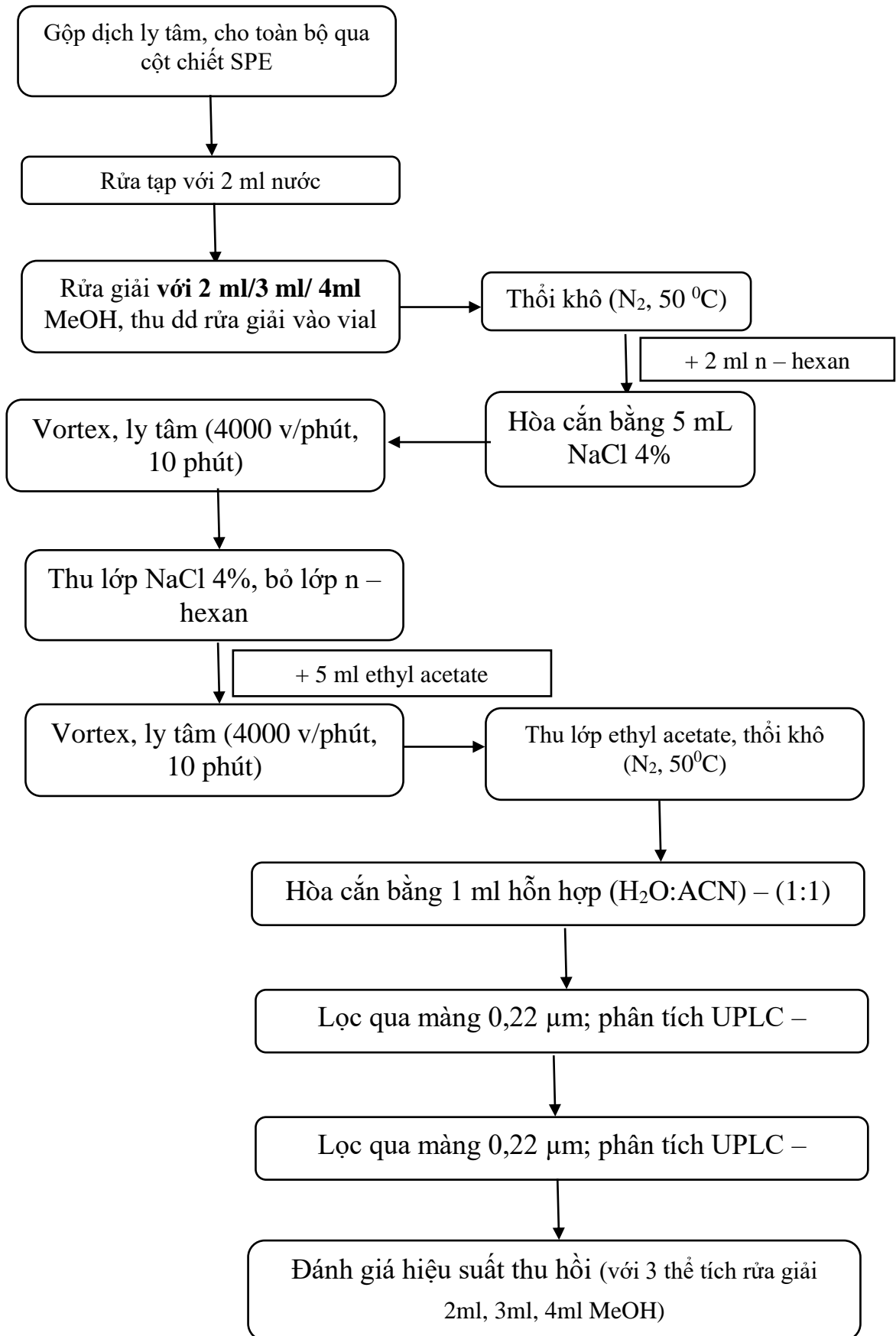


Hình 2.2 Sơ đồ khảo sát hiệu quả chiết CAP của các dung môi ethyl acetate/ acetonitrile/ acetone.

❖ Khảo sát hiệu quả quá trình làm sạch dịch chiết bằng phương pháp chiết ly pha rắn

Do dịch chiết Chloramphenicol từ những nền mẫu sinh học thường chứa nhiều tạp chất (lipid, các acid béo, amin,) nên mẫu cần được làm sạch qua cột chiết pha rắn C₁₈.

Chloramphenicol có tính tan và độ phân cực trung bình nên Methanol được lựa chọn làm dung môi rửa giải. Tuy nhiên thể tích dung môi Methanol rửa giải ảnh hưởng đến nồng độ dư lượng Chloramphenicol được chiết tách từ mẫu thử. Trong nghiên cứu này, các mức thể tích Methanol được khảo sát lần lượt là 2mL, 3mL, 4mL. Đánh giá hiệu quả của các mức thể tích Methanol rửa giải qua hiệu suất thu hồi.



Hình 2.5 Sơ đồ khảo sát hiệu quả của quy trình làm sạch dịch chiết CAP bằng cột chiết ly pha rắn C₁₈.

2.2.4. Xây dựng quy trình định lượng CAP tồn dư trong một số sản phẩm động vật bằng phương pháp sắc ký lỏng ghép khối phổ (LC-MS/MS):

- Từ những kết quả khảo sát điều kiện sắc ký, điều kiện phân mảnh khối phổ, quy trình xử lý mẫu (dung môi chiết, chế độ rửa giải qua cột C₁₈) mà cho hiệu suất thu hồi cao nhất, tổng hợp và xây dựng quy trình thực nghiệm định lượng Chloramphenicol trong mẫu thử đại diện.

- Trong quy trình cần tiến hành song song mẫu chuẩn và mẫu thử trong cùng điều kiện thí nghiệm, đưa ra công thức tính định lượng Chloramphenicol trong mẫu thử theo quy trình chiết mẫu thực tế bằng phương pháp ngoại chuẩn.

- Các điểm nồng độ của đường chuẩn Chloramphenicol (0,1; 0,3; 0,6; 1,0; 1,5 µg/L) được tính toán và xây dựng trên nền mẫu phân tích để thu được dải nồng độ nằm trong khoảng tuyến tính. ($R^2 \geq 0.99$).

2.2.3. Thẩm định quy trình định lượng CAP tồn dư trong một số sản phẩm động vật bằng phương pháp sắc ký lỏng ghép khối phổ UPLC-MS/MS [28,29,30]:

Từ quy trình đưa ra, tiến hành thẩm định lại phương pháp cho phù hợp với yêu cầu của một phương pháp định lượng của chuẩn phòng thí nghiệm ISO 17025: 2017 - với các nội dung cơ bản như sau:

- **Xác định khoảng tuyến tính** – Dựng đường chuẩn

- **Xác định độ chụm (độ lặp lại, độ tái lặp) của phương pháp.**

Độ lặp lại được thực hiện lặp lại ít nhất 05 lần thử nghiệm trên nền mẫu thị gà; tính giá trị trung bình, độ lệch chuẩn, độ lệch chuẩn tương đối của các lần thử nghiệm

• Tính giá trị trung bình:
$$X_{tb} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

Trong đó: x_i : Nồng độ chất phân tích ở thí nghiệm thứ i .
 n : Số lần lặp lại của thí nghiệm.

• Tính độ lệch chuẩn lặp lại (S_r)

$$S_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - x_{tb})^2}{(n-1)}}$$

Trong đó: x_i : Nồng độ chất phân tích ở thí nghiệm thứ i .
 x_{tb} : Nồng độ trung bình của mẫu với n lần lặp lại.
 n : Số lần lặp lại.

- Tính độ lệch chuẩn lặp lại tương đối (RSD_r): $RSD_r = \frac{S_r}{x_{tb}} \times 100$

Trong đó: S_r : Độ lệch chuẩn lặp lại.
 x_{tb} : Nồng độ trung bình của mẫu với n lần lặp lại.

Độ tái lặp xác định trên kết quả của 3 thử nghiệm viên khác nhau thực hiện thử nghiệm cùng một phép thử (mỗi thử nghiệm viên thực hiện ít nhất 03 lần thí nghiệm để lấy giá trị trung bình của mỗi thử nghiệm viên). Tính giá trị trung bình, độ lệch chuẩn các kết quả các thử nghiệm viên

- Tính giá trị trung bình: $X_{tb} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$

Trong đó: x_i : Nồng độ chất phân tích ở thí nghiệm thứ i ;
 n : Số lần lặp lại của thí nghiệm.

- Độ lệch chuẩn tái lặp (S_R): $S_R = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - x_{tb})^2}{(n-1)}}$

Trong đó: x_i : Nồng độ chất phân tích ở thí nghiệm thứ i ;
 x_{tb} : Nồng độ trung bình của mẫu với n lần lặp lại;
 n : Số lần lặp lại.

- Độ lệch chuẩn tái lặp tương đối (RSD_R): $RSD_R = \frac{S_R}{x_{tb}} \times 100$

Trong đó: S_R : Độ lệch chuẩn tái lặp;
 x_{tb} : Nồng độ trung bình của mẫu với n lần lặp lại.

- Xác định giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ) của phương pháp:

Xác định LOD của phương pháp bằng cách dựa trên độ lệch chuẩn của

10 lần thử nghiệm trên nền mẫu thịt gà có nồng độ CAP thấp nhất - đảm bảo chắc chắn sự có mặt của chất cần phân tích thiết bị phát hiện được.

Tiến hành 10 lần thử nghiệm mẫu độc lập, tính độ lệch chuẩn (SD), tính giá trị trung bình của 10 lần thử nghiệm (x_{tb}).

$$\bullet \text{ SD} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_{i_i} - x_{tb})^2}{(n-1)}}; \quad \text{LOD} = 3 * \text{SD}.$$

Đánh giá LOD đã được tính theo hệ số $R = \frac{x_{tb}}{\text{LOD}}$. Đảm bảo $4 < R < 10$

thì nồng độ dung dịch thử khảo sát là phù hợp, giá trị LOD tính được là đáng tin cậy [28,29,30].

$$\bullet \text{ LOQ} = 3,3 * \text{LOD}.$$

- **Đánh giá hiệu suất thu hồi:** Thực hiện thêm chuẩn ở 3 mức nồng độ 0,1; 0,5; 1,0 ppb vào mẫu thử; tại điểm mỗi nồng độ chuẩn thêm vào thực hiện lặp lại 2 lần. Tính hiệu suất thu hồi tại mỗi nồng độ thêm chuẩn.

$$\text{Hiệu suất thu hồi: } R (\%) = \frac{X_1 - X_2}{X_3} \times 100\%$$

Trong đó: X_1 : nồng độ xác định được trên mẫu thêm chuẩn (ppb)

X_2 : nồng độ xác định được trên mẫu không thêm chuẩn (ppb)

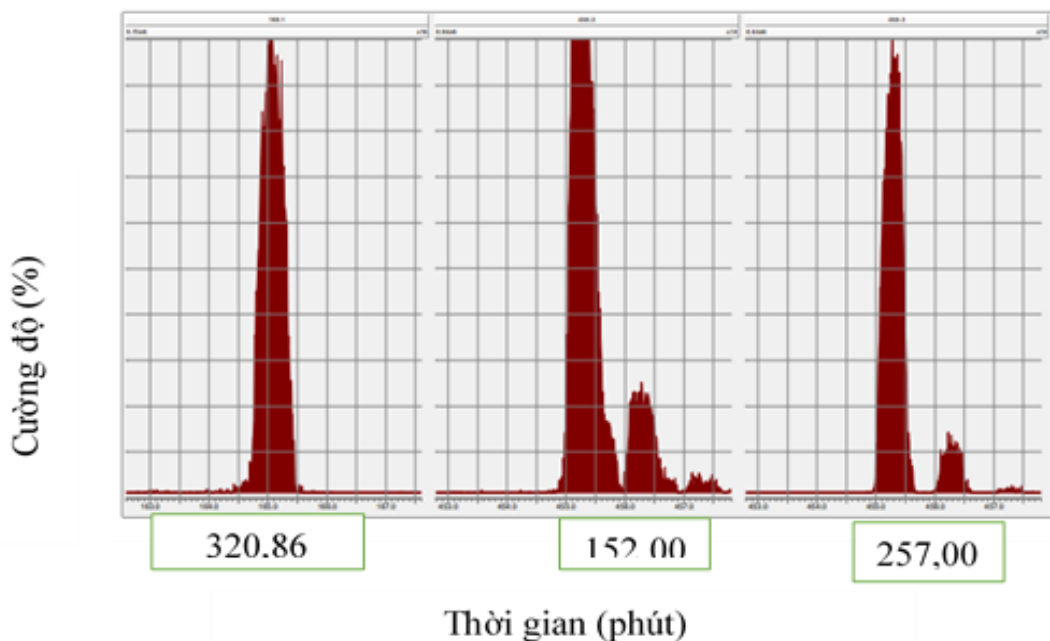
X_3 : nồng độ chuẩn thêm vào mẫu (ppb).

CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả tối ưu hóa điều kiện phân tích Chloramphenicol trên thiết bị sắc ký lỏng ghép đầu dò khối phổ kép

Tối ưu hóa các điều kiện khối phổ bằng phương pháp dò tự động trên máy cho hỗn hợp dung dịch chuẩn Chloramphenicol và Chloramphenicol_D₅ với nồng độ 100 µg/l, tiến hành bơm trực tiếp 30 µl hỗn hợp dung dịch chuẩn CAP và CAP_D₅ vào đầu dò để khảo sát, với điều kiện nguồn ion hóa ES⁻ như sau:

- Nhiệt độ hóa hơi dung môi: 400 °C.
- Nhiệt độ nguồn ion hóa: 150 °C.
- Tốc độ khí mang: 1000L/ giờ.



Hình 3.1. Tín hiệu CAP tối ưu với nguồn ion ES⁻.

Từ kết quả nghiên cứu, đã cho thấy kỹ thuật ion hóa phun điện tử ES chế độ bắn phá âm cho thu tín hiệu của Chloramphenicol rõ nét với cường độ hấp thụ cao nhất, vì trong điều kiện bắn phá ES âm các phân tử CAP dễ bị ion hóa và phá vỡ các liên kết để phân ra nhiều mảnh con.

Thực hiện chế độ giám sát đa phản ứng (MRM), kết quả trung bình các thông số của 05 lần khảo sát độc lập, luận văn đã lựa chọn được các điều kiện

tối ưu trên đầu dò khối phổ và lựa chọn các ion con đặc trưng của chất cần phân tích theo Bảng 3.1

Bảng 3.1. Các thông số tối ưu điều kiện khối phổ trong phân tích CAP.

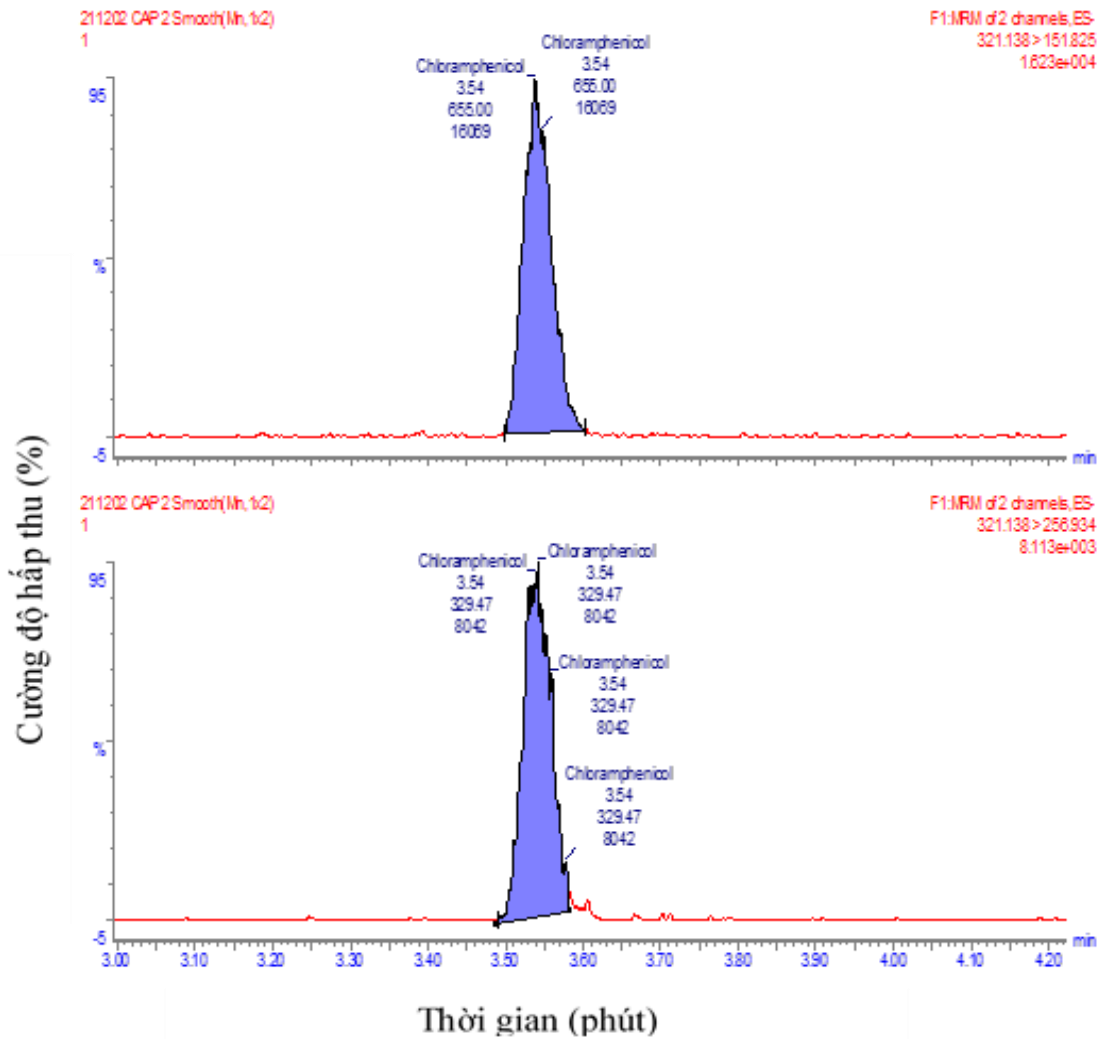
Chất phân tích	Ion sơ cấp (m/z)	Ion thứ cấp (m/z)	Điện thế (V)	Năng lượng va chạm (V)
Chloramphenicol	320,86	152,00	45	12
		257,00	45	8
Chloramphenicol – d ₅	326,00	157,00	45	20

So với các kết quả nghiên cứu đã công bố Julijonas Petraitis cùng các cộng sự (xác định CAP trong sữa), trên cùng thiết bị khối phổ của Waters, điều kiện khối phổ để bắn phá các mảnh ion được tối ưu với mức điện thế thấp hơn ($45\text{ V} < 52\text{ V}$) và năng lượng va chạm thấp hơn ($12\text{ V} < 15\text{ V}$) – điều này tiết kiệm được năng lượng ion hóa, bắn phá phân tử nhưng vẫn đảm bảo hiệu suất của quá trình ion hóa và phân mảnh của CAP với cường độ hấp thụ cao. Với điều kiện khối phổ ở mức năng lượng thấp - bảo vệ hệ thống ion hóa, nâng cao thời hạn sử dụng cho thiết bị.

3.2. Kết quả tối ưu hóa các điều kiện sắc ký lỏng siêu năng cao (UPLC):

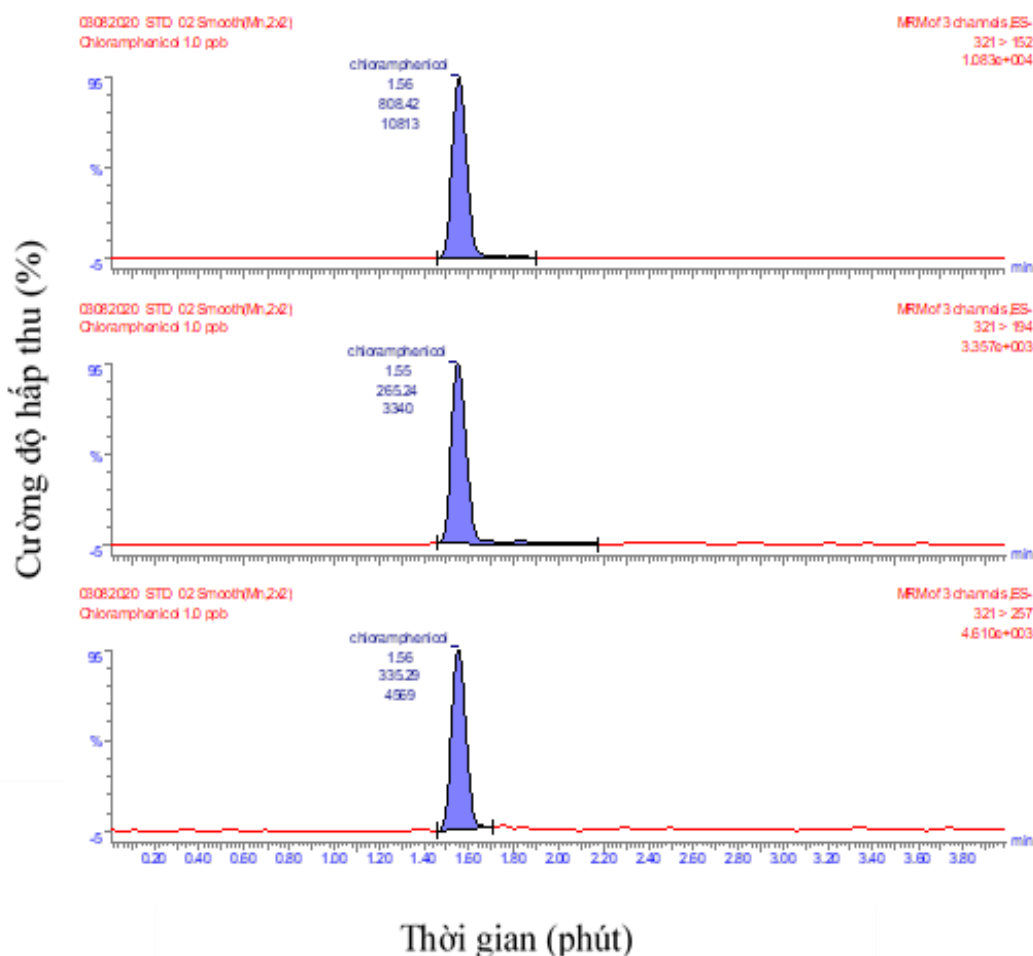
Trong cùng điều kiện khối phổ để phân tích Chloramphenicol trên thiết bị sắc ký lỏng ghép khối phổ kép đã được tối ưu (chế độ ion hóa: ES⁻; nhiệt độ hóa hơi dung môi: 400 °C; nhiệt độ nguồn ion hóa: 150 °C, tốc độ khí mang: 1000L/ giờ; chế độ quét MRM, theo các điều kiện phân mảnh - Bảng 3.1)

Kết quả về tín hiệu độ hấp thụ mảnh định lượng (321 → 152) và mảnh định tính (321 → 257) của Chloramphenicol khi khảo sát hệ pha động ở chế độ cố định tỷ lệ thể tích của hai kênh CH₃COONH₄ 0,1% trong nước và methanol được trình bày trong Hình 3.2.



Hình 3.2 Phổ đồ CAP khảo sát hệ pha động cố định 2 kênh $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (0,1 %) và MeOH.

Kết quả về tín hiệu độ hấp thụ mảnh định lượng (321 → 152) và mảnh định tính (321 → 257) của Chloramphenicol khi khảo sát hệ pha động ở chế độ gradient: quét tuyến tính từ 10% dung dịch amoni acetate 0,1% trong nước (90% Methanol) đến 100% dịch amoni acetate 0,1 % trong nước (10% methanol) được trình bày trong Hình 3.3.



Hình 3.3. Phổ đồ CAP khảo sát hệ pha động gradient thể tích 2 kênh $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (0,1 %) và MeOH theo thời gian.

Các tín hiệu trên được thực hiện trên cùng các điều kiện phân tích sắc ký như:

- Cột nhồi sắc ký pha đảo C_{18} - (50 x 2 mm; 1,7 μm); có gắn cột bảo vệ cùng loại (Lot. No: 0042322973).
- Nhiệt độ cột: 40 $^{\circ}\text{C}$.
- Nhiệt độ buồng tiêm mẫu: 20 $^{\circ}\text{C}$.
- Thể tích tiêm mẫu: 10 μl .

Qua các tín hiệu thu được, ta thấy hệ pha động gradient về thể tích 2 kênh $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ - 0,1 % trong nước và MeOH theo thời gian cho tín hiệu peak cao và sắc nét, thời gian lưu ngắn và ổn định hơn so với hệ pha động cố định hai kênh pha động. Khi phân tích với hệ pha động gradient về thể tích 2 kênh $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ - 0,1 % trong nước và MeOH theo thời gian, với những tỷ

lệ dung môi thích hợp đã tối ưu quá trình hấp thụ, rửa giải CAP trên pha tĩnh; đặc biệt quá trình hấp thụ các tạp chất với pha tĩnh cao hơn so với hệ pha động cố định hai kênh nên tính chọn lọc, hiệu năng tách chiết trên hệ thống sắc ký đạt hiệu quả cao hơn rất nhiều. Bên cạnh đó, nghiên cứu đã tìm ra được tỷ lệ và chương trình gradient tối ưu cho quá trình phân tích với thời gian lưu tối ưu nhất (Bảng 3.2)

- Kênh A: dung dịch $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ - 0,1 % trong nước.
- Kênh B: methanol (siêu tinh khiết).

Bảng 3.2. Hệ pha động và chương trình gradient tối ưu cho phân tích CAP.

Thời gian (phút)	Tốc độ dòng (ml/ phút)	A (%)	B (%)
0	0,4	90	10
0,4	0,4	90	10
0,8	0,4	5	95
1,5	0,4	5	95
1,6	0,4	90	10
3,0	0,4	90	10

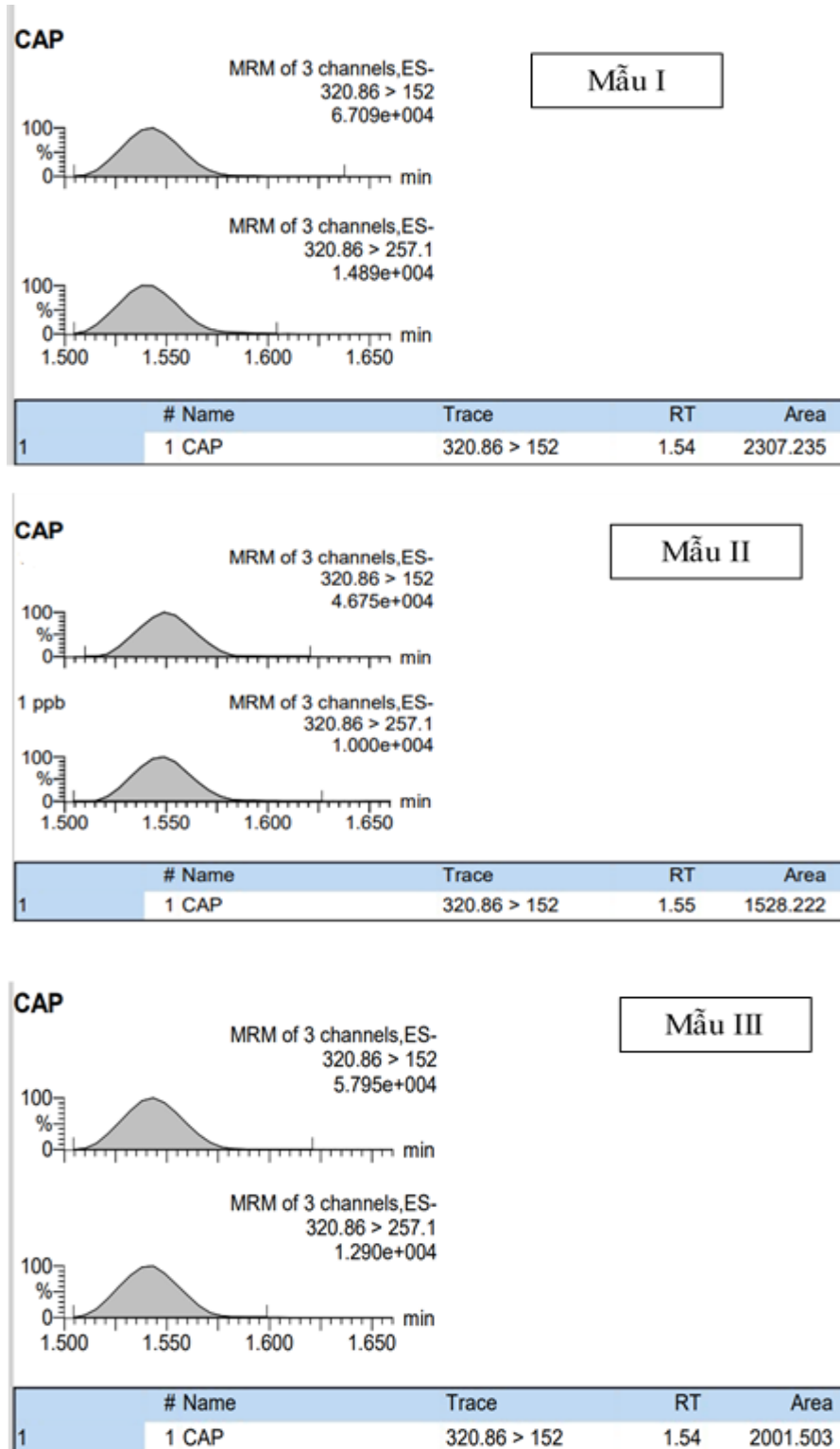
Với chương trình gradient về thành phần pha động theo thời gian như trên đã tăng hiệu quả của quá trình tách, đảm bảo tính phân giải, tiết kiệm được thời gian và dung môi trong quá trình phân tích.

So với các công trình nghiên cứu đã công bố như công trình nghiên cứu của Phạm Kim Đăng cùng các cộng sự, kết quả nghiên cứu của luận văn có thời gian phân tích ngắn hơn rất nhiều nên giúp rút ngắn thời gian phân tích; lượng dung môi hóa chất và chi phí phân tích được tiết kiệm đáng kể nhưng vẫn đảm độ phân giải và cường độ hấp thụ của chất phân tích.

3.3. Kết quả tối ưu hóa quy trình xử lý mẫu trong phương pháp xác định hàm lượng hàm lượng Chloramphenicol trong mẫu động vật bằng phương pháp sắc lỏng hiệu năng cao ghép đầu dò khối phổ (UPLC – MS/MS):

Các mẫu động vật khác nhau có bản chất khác nhau về thành phần cơ bản nên ảnh hưởng đến hiệu quả của quá trình tách chiết Chloramphenicol ra

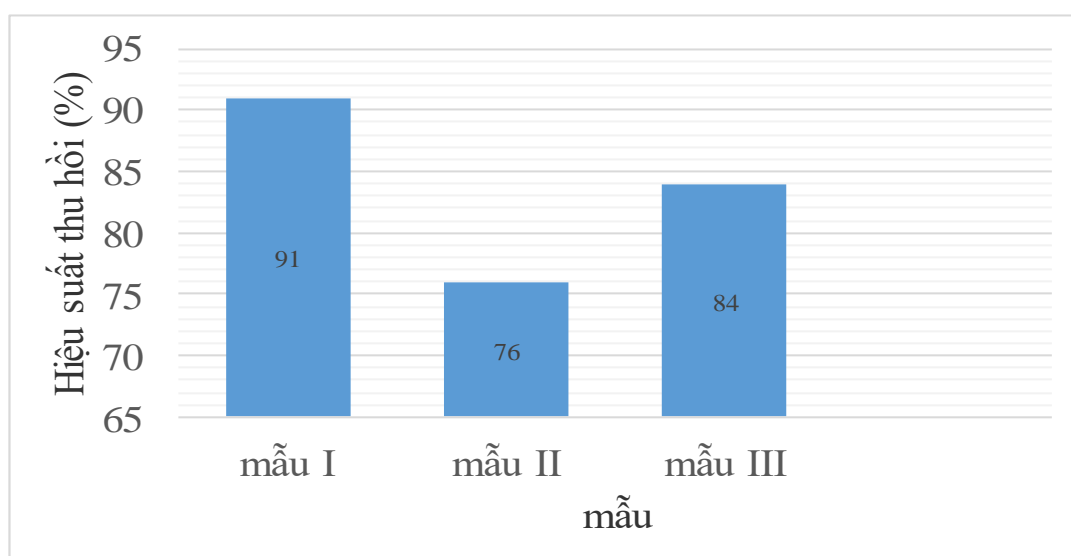
khởi các mẫu thử. Kết quả phổ đồ phân tích CAP lần lượt chiết với các dung môi Ethyl acetate, acetonitrile, acetone được thể hiện trong Hình 3.4



Hình 3.4. Phổ đồ CAP chiết tách với lần lượt các dung môi Ethyl acetate, acetonitrile, acetone.

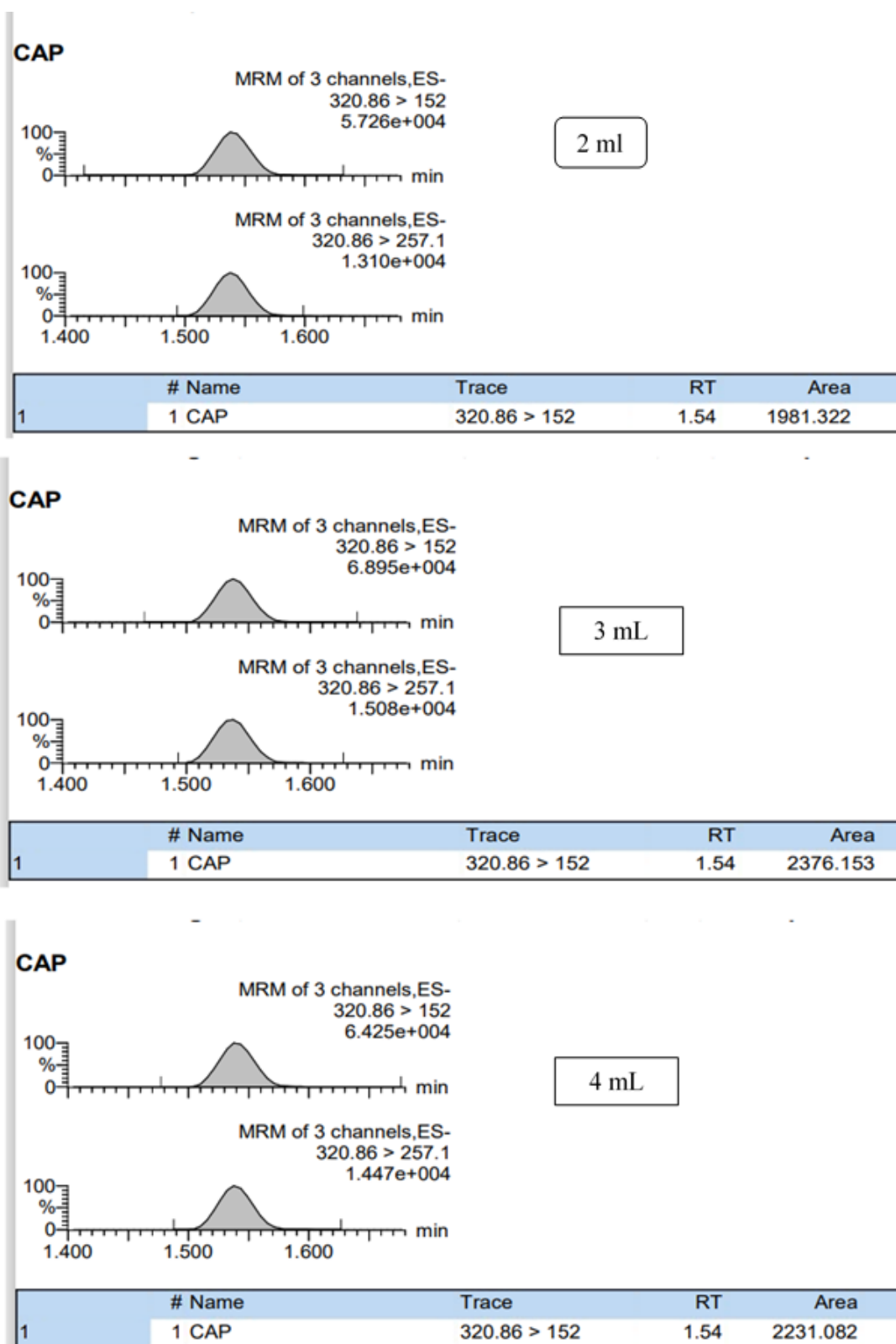
Qua phổ đồ về độ hấp thụ của Chloramphenicol, cho thấy Mẫu I – chiết với dung môi Ethyl acetate có cường độ hấp thụ của CAP là cao nhất. Điều này chứng tỏ, so với dung môi acetonitrile và aceton, hàm lượng CAP trong mẫu thử được chiết ra nhiều nhất với dung môi ethyl acetat.

Kết quả đánh giá về hiệu suất thu hồi cho thấy Mẫu I - chiết với dung môi Ethyl acetate có độ thu hồi cao nhất so với 2 mẫu còn lại (Hình 3.5). Điều này có thể giải thích do dung môi Ethyl acetate có mức độ phân cực trung bình và độ phân cực thấp hơn dung môi acetone và acetonitrile nên khả năng hòa tan dư lượng Chloramphenicol của mẫu thử trong dung môi ethyl acetate tốt hơn so với dung môi acetone, acetonitrile. Đồng thời với dung môi Ethyl acetate các thành phần cơ bản trong mẫu thử như protein, lipid, nước, được loại bỏ nên các tín hiệu nhiễu của tạp chất được loại đáng kể, tăng tính chọn lọc và hiệu suất chiết tách Chloramphenicol trong quá trình xử lý mẫu.



Hình 3.5. Mối liên hệ giữa hiệu suất thu hồi và dung môi tách chiết.

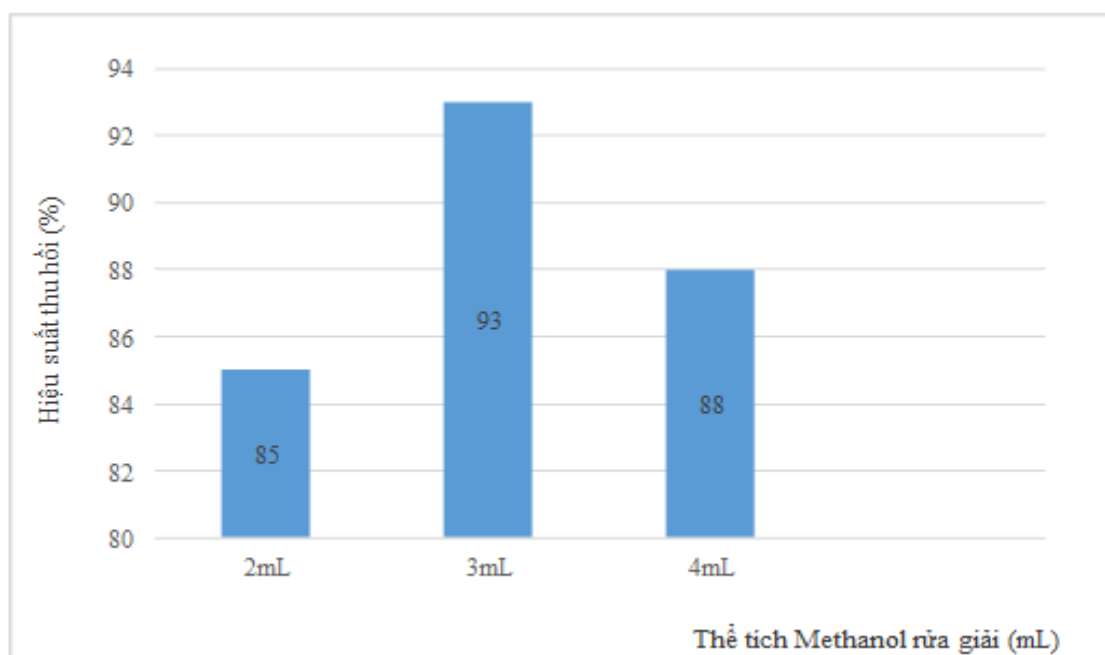
3.4. Kết quả tối ưu quy trình chiết tách và làm giàu chất phân tích Chloramphenicol qua cột chiết pha rắn:



Hình 3.6. Phổ đồ CAP chiết tách với lần lượt các thể tích methanol rửa giải 2 ml, 3 ml, 4 ml.

Kết quả khảo sát hiệu suất thu hồi cho thấy, thể tích 3mL methanol được sử dụng trong quá trình rửa giải cho hiệu suất thu hồi cao hơn so với 2 mức thể tích 2 ml và 4 ml (Hình 3.7). Trong cùng điều kiện chiết tách đặc biệt là

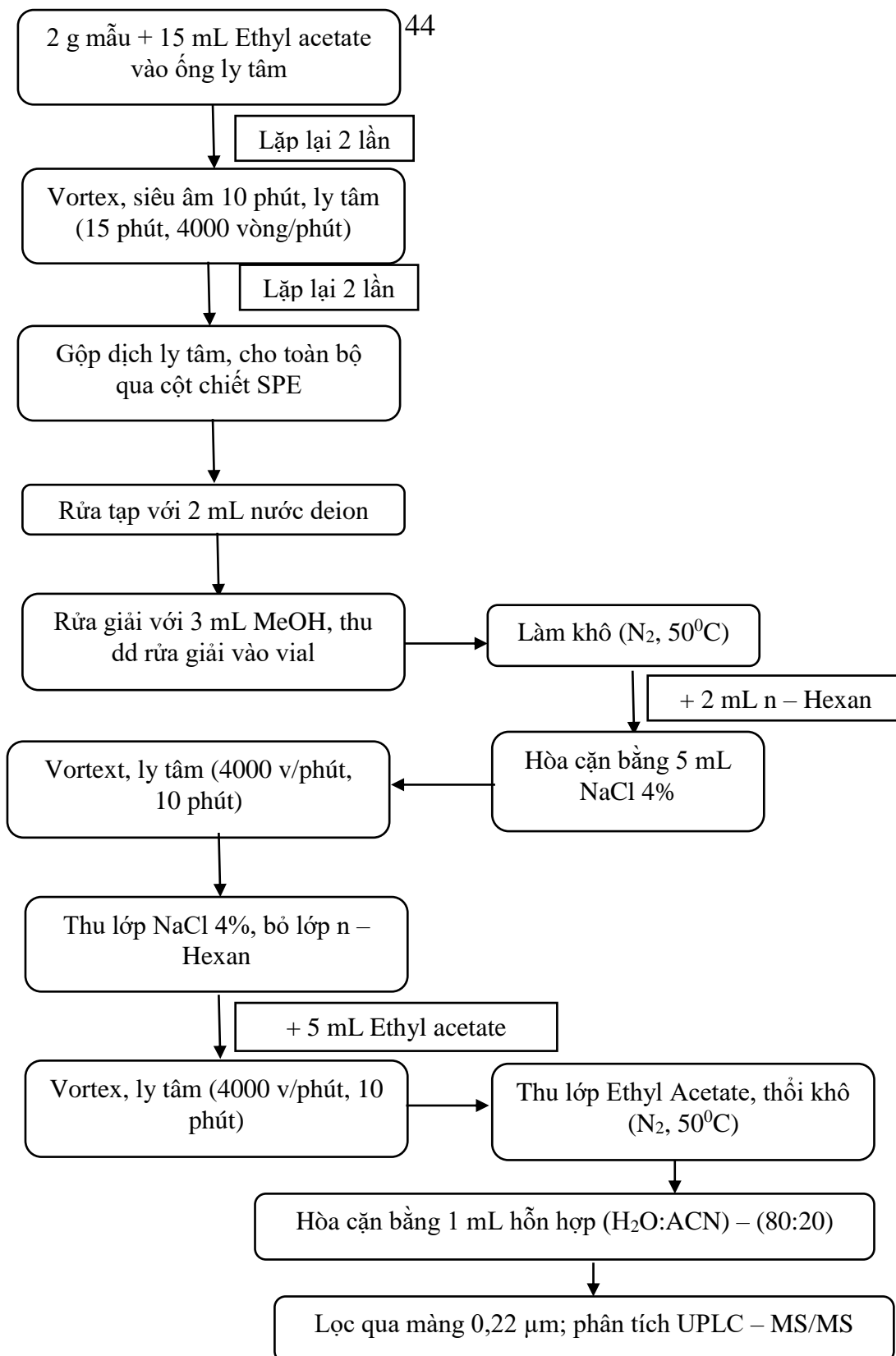
tốc độ dòng chảy qua cột đảm bảo $0,5 \div 0,8$ ml/ phút; khi rửa giải với 3 ml methanol là lượng dung môi đủ để chiết rút hoàn toàn lượng Chloramphenicol trong mẫu thử được cho qua cột, đồng thời với lượng thể tích trên đảm bảo nồng độ của cấu tử phân tích. Với thể tích rửa giải 2 ml methanol, cho cường độ hấp thụ của CAP thấp, hiệu suất thu hồi thấp hơn – do lượng dung môi 2 ml chưa đủ để hoàn tan và rửa giải hoàn toàn lượng CAP hấp thụ trên cột SPE, chưa thu hoàn toàn tồn dư CAP trong quá trình tách chiết mẫu. Với thể tích rửa giải 4 ml methanol, có cường độ hấp thụ của CAP thấp hơn mức rửa giải với thể tích 3 ml methanol. Vì khi rửa giải với 4 ml methanol, lượng thể tích này làm giảm nồng độ CAP trong dung dịch chiết; mặt khác lượng thể tích 4 ml dễ gây ra các sai số thô trong quá trình làm khô mẫu nên hàm lượng CAP được chiết ra từ mẫu thử có tín hiệu và hiệu suất thu hồi thấp hơn lượng thể tích dung môi 3 ml.



Hình 3.7. Mối liên hệ giữa hiệu suất thu hồi và thể tích dung môi rửa giải.

3.5. Kết quả xây dựng quy trình thực nghiệm định lượng Chloramphenicol tồn dư trong một số sản phẩm thịt động vật bằng phương pháp sắc ký lỏng ghép khối phổ (LC – MS/MS)

Từ những kết quả khảo sát được, quy trình thực nghiệm tách chiết Chloramphenicol trong một số sản phẩm thịt động vật được đề xuất theo quy trình được thể hiện qua Hình 3.8.



Hình 3.8. Sơ đồ quy trình xử lý mẫu.

Mô tả - thuyết minh quy trình: Phần mẫu thử được xay nhuyễn và đồng nhất kỹ, cân khoảng 2 g vào ống ly tâm có dung tích 50 mL, thêm 15 mL dung dịch ethyl acetate, vortex, siêu âm trong 10 phút, ly tâm 4000 vòng/phút - trong 15 phút, thu dịch ly tâm trong suốt; phần mẫu thử rắn tiến hành chiết

lặp lại lần 2.

Gom toàn bộ dịch ly tâm cho qua cột chiết pha rắn SPE C₁₈ để loại bỏ tạp chất và làm giàu nồng độ chất phân tích - đáp ứng yêu cầu trong kỹ thuật sắc ký và khối phổ. Cột SPE - C₁₈ được hoạt hóa bằng 6 mL Methanol, 6 mL nước siêu tinh khiết trước khi cho mẫu thử qua cột. Sau khi dịch chiết mẫu hấp thụ qua cột SPE, tiến hành rửa tạp bằng 2 mL nước, rửa giải bằng 3 mL Methanol, thu dung dịch rửa giải vào vial.

Phần dung dịch rửa giải được làm khô bằng khí trơ Nitơ, phần cặn thu được hòa tan bằng 5 mL dung dịch NaCl 4%, vortex kỹ để hòa tan hòa toàn lượng cặn, ngoài ra dung dịch NaCl 4 % còn có tác dụng kết tủa thành phần Protein trong mẫu thử. Tiếp tục thêm 2 mL n-Hexan vào dịch chiết mẫu tiến hành vortex, ly tâm tách lớp để loại bỏ toàn bộ thành phần lipid trong mẫu thử (nằm trong lớp n-hexan). Lớp NaCl 4% được chiết lại qua 5 mL dung môi EthylAcetate để thu được hoàn toàn Chloramphenicol. Làm khô dung môi Ethyl acetate bằng khí Nitơ, hòa tan cặn bằng hỗn hợp dung dịch H₂O : ACN (80:20), lọc qua màng 0,20 µm trước khi phân tích trên hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng siêu cao UPLC – LCMS/MS.

Tiến hành phân tích trên thiết bị Sắc ký lỏng hiệu năng siêu cao ghép nối đầu dò khối phổ 2 lần (UPLC – MS/MS) – Xevo TQ – Scronos Waters với điều kiện cụ thể như sau:

- Cột nhồi sắc ký pha đảo C18, (dài 50 mm, đường kính trong 2 mm; hạt nhồi 1,7 µm); có gắn cột bảo vệ cùng loại.
- Nhiệt độ cột: 40 °C.
- Nhiệt độ buồng tiêm mẫu: 20 °C.
- Thể tích tiêm mẫu: 10 µL.
- Pha động Gradient hai kênh theo Bảng 3.3

Bảng 3.3. Hệ pha động và chương trình gradient tối ưu cho phân tích CAP.

Thời gian (phút)	Tốc độ dòng (mL/ phút)	A (%)	B (%)
0	0,4	90	10
0,4	0,4	90	10
0,8	0,4	5	95

1,5	0,4	5	95
1,6	0,4	90	10
3,0	0,4	90	10

- Chế độ ion hóa: ES⁻
- Nhiệt độ hóa hơi dung môi: 400 °C.
- Nhiệt độ nguồn ion hóa: 150 °C.
- Tốc độ khí mang: 1000L/ giờ.
- Chế độ quét MRM, theo các điều kiện phân mảnh được trình bày trong Bảng 3.4.

Bảng 3.4. Điều kiện phân mảnh các ion con của CAP và CAP _ D₅.

Chất phân tích	Ion sơ cấp (m/z)	Ion thứ cấp (m/z)	Điện thế (V)	Năng lượng va chạm (V)
Chloramphenicol	320,86	152,00	45	12
		257,00	45	8
Chloramphenicol – d ₅	326,00	157,00	45	20

Tiến hành song song mẫu chuẩn và mẫu thử trong cùng điều kiện phân tích, hàm lượng Chloramphenicol trong mẫu thử được xác định bằng phương pháp ngoại chuẩn.

Đường chuẩn 5 điểm được xây dựng bằng cách pha chất chuẩn Chloramphenicol trong nền mẫu trắng thịt gà đã được chiết tách theo quy trình tối ưu Hình 3.6.

Dãy chuẩn tiến hành khảo sát có nồng độ từ 0,5 ÷ 2,5 µg/L. Kết quả về khoảng tính tuyến tính được thể hiện ở Hình 3.9 và 3.10

Compound name: chloramphenicol

Correlation coefficient: $r = 0.999672$, $r^2 = 0.999343$

Calibration curve: $859.674 * x + -35.7591$

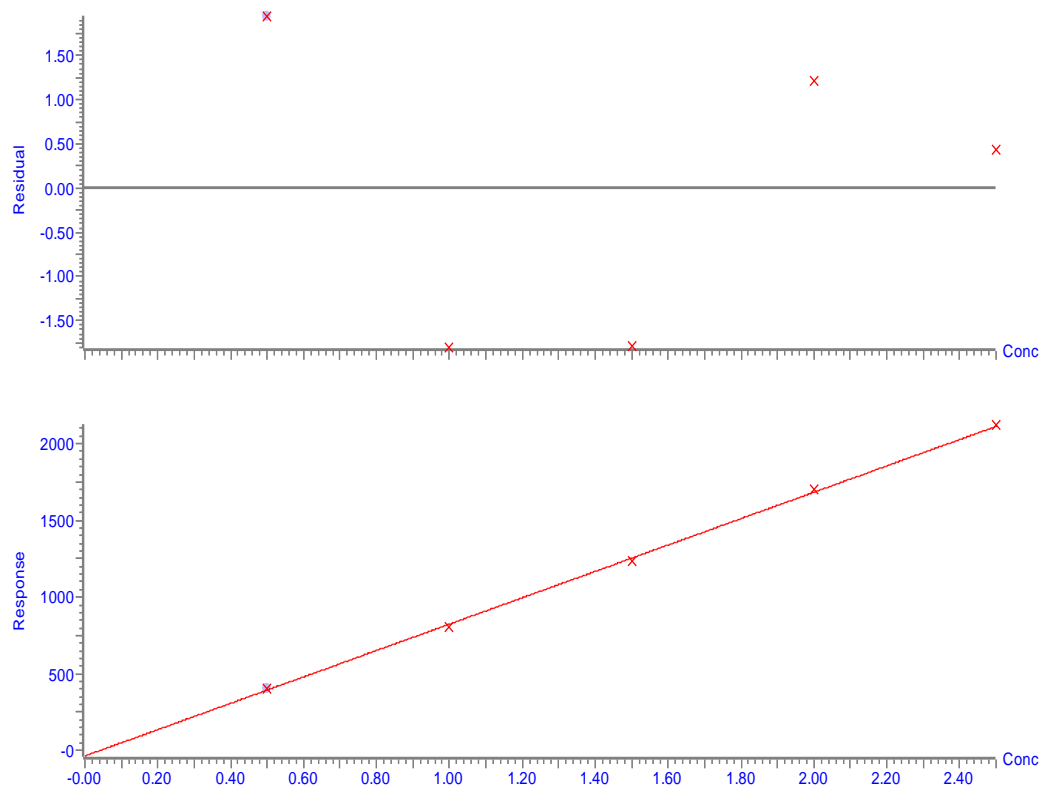
Response type: External Std, Area

Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

	# Name	Type	Std. Conc	RT	Area	Height	S/N	Response	Primar...
1	1 03082020_STD_01	Standard	0.500	1.56	402.428	5385	5385.000	402.428	bb
2	2 03082020_STD_02	Standard	1.000	1.56	808.416	10813	8084.790	808.416	bb
3	3 03082020_STD_03	Standard	1.500	1.56	1230.742	15949	1534.888	1230.742	bb
4	4 03082020_STD_04	Standard	2.000	1.56	1704.345	21918	17048.394	1704.345	bb
5	5 03082020_STD_05	Standard	2.500	1.55	2122.830	28690	12178.301	2122.830	bb

Hình 3.9. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính đường chuẩn của phương pháp.

Compound name: chloramphenicol
 Correlation coefficient: $r = 0.999672$, $r^2 = 0.999343$
 Calibration curve: $859.674 * x + -35.7591$
 Response type: External Std, Area
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



Hình 3.10. Đồ thị khảo sát khoảng tuyến tính đường chuẩn của phương pháp.

Từ kết quả khảo sát, phương trình hồi quy tuyến tính là: $y = 859,674 * x + (-35,7591)$ với hệ số tương quan tuyến tính $r^2 = 0,999$. Hệ số tương quan này hoàn toàn đáp ứng được yêu cầu của AOAC về hệ số hồi quy tuyến tính

$r^2 \geq 0,99$) [28]. Cùng khoảng nồng độ tuyến tính từ $0,5 \div 2,5 \mu\text{g/L}$ thì kết quả khảo sát được của luận văn có hệ số hồi quy tuyến tính r^2 cao hơn ($0,999 > 0,997$) [13]. Kết quả này cho thấy các điều kiện tối ưu như tính tương thích hệ thống, quy trình xử lý mẫu, hóa chất, yếu tố con người,... đáp ứng được những yêu cầu về đánh giá phương pháp thử. Việc xây dựng phương trình hồi quy tuyến tính có hệ số hồi quy tuyến tính r^2 gần đạt giá trị 1 có ý nghĩa lớn trong việc tính toán và kết luận hàm lượng chất phân tích trong mẫu thử; nâng cao độ chính xác, độ tin cậy của kết quả phân tích.

Hàm lượng Chloramphenicol trong mẫu thử được xác định bằng phương pháp ngoại chuẩn thông qua phương trình hồi quy tuyến tính có dạng $y = a \cdot x + b$. Trong đó:

- hệ số a, b: được xác định qua đường chuẩn thực tế tiến hành trước mỗi lần phân tích - đánh giá sự tương thích của hệ thống.

- y: diện tích peak của CAP phát hiện trong mẫu thử.

- x: nồng độ CAP phát hiện trong mẫu thử.

3.6. Kết quả thẩm định quy trình định lượng Chloramphenicol tồn dư trong một số sản phẩm thịt động vật bằng phương pháp sắc ký lỏng ghép khối phổ (UPLC – MS/MS).

3.6.1. Xác định giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ) của phương pháp:

Kết quả khảo sát giới hạn phát hiện LOD được thể hiện trong Bảng 3.6

Bảng 3.6. Bảng kết quả khảo sát giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ) của phương pháp.

Lần TN	Hàm lượng (CAP) ($\mu\text{g/Kg}$)	Độ lệch chuẩn –SD	LOD ($\mu\text{g/Kg}$)	LOQ ($\mu\text{g/Kg}$)
1	0,22	0,010	0,03	0,10
2	0,22			
3	0,21			
4	0,22			
5	0,22			

6	0,23			
7	0,24			
8	0,23			
9	0,22			
10	0,24			
Trung bình ($\mu\text{g/Kg}$)	0,225			
R	7,717			

Với giới hạn phát hiện của quy trình nghiên cứu có giá trị $0,03 \mu\text{g/Kg}$ – ngưỡng phát hiện này đủ điều kiện để phát hiện hàm lượng tồn dư Chloramphenicol trong thực phẩm cho các mặt hàng xuất khẩu đi thị trường thế giới - đạt được mục tiêu của luận văn.

3.6.2. Xác định độ chụm (độ lặp lại và độ tái lặp) của phương pháp

Kết quả khảo sát độ lặp lại và độ tái lặp của phương pháp được thể hiện trong Bảng 3.7

Bảng 3.7. Kết quả khảo sát độ lặp lại và độ tái lặp của phương pháp.

Lần TN	Hàm lượng CAP TNV 1 ($\mu\text{g/kg}$)	Hàm lượng CAP TNV 2 ($\mu\text{g/kg}$)	Hàm lượng CAP TNV 3 ($\mu\text{g/kg}$)
1	79,25	78,99	77,74
2	78,32	80,23	79,52
3	80,26	81,07	79,02
4	81,65	78,61	80,45
5	80,03	79,15	78,95
Trung bình ($\mu\text{g/kg}$)	79,90	79,61	79,14
S_r	1,24	1,01	0,98
RSD_r (%)	1,55	1,27	1,24
S_R	0,39		

RSD _R (%)	0,49
Giới hạn RSD _R theo Codex 2016	- RSD _r ≤ 15 (%) - RSD _R ≤ 22 (%)
Kết luận [37]	Đạt

Kết quả khảo sát về độ lặp lại và độ tái lập cho thấy phương pháp có độ chụm, độ ổn định, độ tin cậy cao để phân tích dư lượng Chloramphenicol trong một số sản phẩm có nguồn gốc từ thịt động vật.

3.6.3. Đánh giá hiệu suất thu hồi của phương pháp

Kết quả hiệu suất thu hồi được thể hiện trong Bảng 3.8

Bảng 3.8. Kết quả khảo sát hiệu suất thu hồi của phương pháp.

	Lần TN	Lượng thêm vào (ppb)	Lượng tìm thấy (ppb)	TB lượng tìm thấy (ppb)	Hiệu suất thu hồi (%)	Yêu cầu theo AOAC	Kết luận
Nền	1	00	9,66	/	/	Tại mức nồng độ thêm vào ≤ 1,00 ppb là 50% ÷ 120%	/
	2						
M1	1	0,10	9,74	16,8300	85,61		Đạt
	2		9,75				
M2	1	0,50	10,13	47,4700	95,59		Đạt
	2		10,12				
M3	1	1,00	10,65	68,6700	98,58		Đạt
	2		10,64				

Kết quả khảo sát cho thấy hiệu suất thu hồi ở cả 03 mức nồng độ 0,1 ppb; 0,5 ppb; 1,0 ppb đều đạt trên 80 % và đáp ứng được yêu cầu về đánh giá phương pháp của hội đồng châu Âu AOAC [27,29]. Đặc biệt tại điểm nồng độ 0,1 ppb (LOQ thực nghiệm) có hiệu suất thu hồi lớn hơn 85% - kết quả

này cho thấy giới hạn định lượng của phương pháp có ý nghĩa thực tiễn, ổn định, độ tin cậy cao trong quá trình phân tích kết luận mẫu thử dư lượng Chloramphenicol trong mẫu thử.

3.7. Kết quả phân tích một số mẫu thực tế

Kết quả phân tích 12 mẫu có nguồn gốc từ thịt động vật (khô bò, thịt đà điểu, chả lụa, tôm, thịt gà, ...) được lấy và gửi đến Trung tâm Kiểm Nghiệm Khánh Hòa năm 2022, phương pháp tối ưu được đã phát hiện 2/12 mẫu dương tính Chloramphenicol có nồng độ 0,51 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ và 0,72 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. Kết quả khảo sát được thể hiện qua bảng 3.9

Bảng 3.9. Kết quả CAP phân tích trên các mẫu thực.

STT	Mẫu	Hàm lượng CAP ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
1	Chả lụa 0086/ 22 GKNTTP	Không phát hiện (LOD: 0,03 $\mu\text{g}/\text{kg}$)
2	Thịt đà điểu 0325/22 LKNTTP	0,72
3	Tôm 515/22 GKNTTP	Không phát hiện (LOD: 0,03 $\mu\text{g}/\text{kg}$)
4	Thịt heo 909/ 22 GKNTTP	Không phát hiện (LOD: 0,03 $\mu\text{g}/\text{kg}$)
5	Thịt bò 910/ 22 GKNTTP	Không phát hiện (LOD: 0,03 $\mu\text{g}/\text{kg}$)
6	Thịt gà 911/ 22 GKNTTP	Không phát hiện (LOD: 0,03 $\mu\text{g}/\text{kg}$)
7	Khô bò 917/ 22 LKNTTP	Không phát hiện (LOD: 0,03 $\mu\text{g}/\text{kg}$)
8	Thịt gà 918/22 GKNTTP	0,51
9	Khô gà 919/22 LKNTTP	Không phát hiện (LOD: 0,03 $\mu\text{g}/\text{kg}$)
10	Chả lụa 1056/ 22 GKNTTP	Không phát hiện (LOD: 0,03 $\mu\text{g}/\text{kg}$)
11	Nem 1061/22 GKNTTP	Không phát hiện (LOD: 0,03 $\mu\text{g}/\text{kg}$)
12	Thịt đà điểu 1066/ 22 GKNTTP	Không phát hiện (LOD: 0,03 $\mu\text{g}/\text{kg}$)

Trong tháng 7/2022, phương pháp đã được tham gia thử nghiệm thành thạo do Viện kiểm nghiệm An toàn vệ sinh thực phẩm quốc gia tổ chức trên nền mẫu thủy sản mã số H22.23, mã số phòng thí nghiệm: PTN 09. Kết quả đạt được với hệ số Zcore = -1,01 (< 2).

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

Đã xây dựng được quy trình thực nghiệm định lượng Chloramphenicol tồn dư trong sản phẩm thịt động vật bằng phương pháp sắc ký lỏng khối phổ kép LC – MS/MS tại phòng thí nghiệm thuộc Trung tâm Kiểm nghiệm tỉnh Khánh Hòa, với quy trình xử lý mẫu để có giới hạn phát hiện là 0,03 µg/Kg, giới hạn định lượng (LOQ) là 0,1 µg/Kg – đáp ứng được yêu cầu theo quyết định 2002/657/CE của ủy ban châu Âu (< 0,3 µg/ Kg).

Quy trình thực nghiệm đã tối ưu các điều kiện phân tích Chloramphenicol tồn dư trong sản phẩm thịt động vật: điều kiện bắn phá ở chế độ ES âm (320 → 152, 320 → 257), sử dụng dung môi Ethyl acetate để chiết mẫu; quá trình chiết tách và làm giàu mẫu qua cột chiết pha rắn với 3 ml methanol để rửa giải; phân tích sắc ký lỏng hiệu năng siêu cao với chế độ gradient 2 pha động amoniacetate và methanol. Xác định được khoảng tuyến tính của phương pháp với khoảng nồng độ CAP từ 0,1 µg/kg đến 2,5 µg/kg.

Quy trình thực nghiệm có tính ổn định của độ chụm, tin cậy cao, đặc biệt hiệu suất thu hồi cao trên 85% ở các mức nồng độ khác nhau. Sử dụng quy trình thực nghiệm này, đã phát hiện được các mẫu dương tính về Chloramphenicol trong quá công tác thanh tra giám sát an toàn vệ sinh thực phẩm trên địa bàn tỉnh Khánh Hòa.

KIẾN NGHỊ

Tiếp tục nghiên cứu thăm dò, thử nghiệm quy trình định lượng đồng thời tồn dư nhóm Phenicol (Flophenicol, Thiamphenicol, Chloramphenicol) trong thực phẩm bằng phương pháp sắc ký lỏng ghép nối đầu dò khối phổ - xử lý mẫu qua cột sắc ký ái lực đặc hiệu với nhóm Phenicol để tăng hiệu quả tách chiết và tiết kiệm được hóa chất, thời gian phân tích.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Y Tế, 2017, *Dược điển Việt Nam V*, Nhà xuất bản y học Hà Nội.
2. Phạm Khắc Hiếu, Lê Thị Ngọc Diệp, 1997, *Giáo trình dược lý học*, Nhà xuất bản Nông Nghiệp Hà Nội, trang 182 – 184.
3. Wongtavatchai, J.G. McLean, F. Ramos, D. Arnold, 2004, Chloramphenicol, *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*, 53, 7 – 62.
4. Bộ Nông Nghiệp, 2016, *Thông tư số 10/2016/TT - BNN quy định CAP không được phép có mặt trong sản xuất, kinh doanh động vật trên cạn và thủy sản*.
5. Đỗ Hương, 2016, Thay đổi kiểm soát dư lượng kháng sinh thủy sản xuất khẩu, *Cục Quản lý Chất lượng Nông lâm sản và Thủy sản (Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn)*.
6. Lê Ngọc Anh, 2016, Chống lạm dụng kháng sinh trong chăn nuôi, *Sở Nông Nghiệp và Phát Triển Nông Thôn Hà Nội*.
7. Bộ khoa học và công nghệ, 2009, *Tiêu chuẩn quốc gia TCVN 8140 : 2009 về thịt và sản phẩm thịt – Xác định CAP – phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao*.
8. Bộ Thủy Sản, 2003, *Tiêu chuẩn ngành 28 TCN 186 : 2003 về hàm lượng CAP trong thủy sản – phương pháp định lượng bằng sắc ký khí*.
9. Robert and Fischer, 1978, High performance Liquid – Chromatographic Assay for CAP in Biological Fluids, *Clinical Chemistry*, 24 (5), pp.778 – 781.
10. Rebecca S.N, Eduardo W-B, Marlice A.S.M, 2006, Food safety evaluation: Detection and cofirmation of CAP in milk by high performace liquid Chromatography –tandem mass Spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, (565), 97 – 102.
11. Letícia R. Guidi¹, Luiza H. M. Silva Christian Fernandes, Nicki J. Engeseth Maria Beatriz A. Gloria, 2015, LC-MS/MS determination of chloramphenicol in food of animal origin in Brazil, *Scientia Chromatographica 2015*, 7(4), pp 287-295.
12. Barbara K. Neuhaus, Jeffrey A. Hurlbut và Walter Hammack, LC/MS/MS Analysis of Chloramphenicol in Shrimp, *FDA/ORA/DFS No 4290*.

13. Widiastuti R, Anastasia Y, 2014, Detection of Chloramphenicol Residue in Bovine Meat Using Liquid Chromatography Mass Spectrometry, *Toxicology Department, Indonesian Research Center for Veterinary Science*, 19 (1), pp 74 – 79.
14. Phạm Kim Đăng, Marie – Louise Sippo, Guy Degand, Caroline Douny, Guy Maghuin – Rogister, 2007, Chuẩn hóa phương pháp sàng lọc định tính kiểm soát tồn dư kháng sinh trong thực phẩm có nguồn gốc động vật theo quy định 2002/657/EC, *Tạp chí khoa học kỹ thuật nông nghiệp*, ĐHN I, 5 (1) 24 – 30.
15. Chu Phạm Ngọc Sơn, Phan Văn Tiến, Bùi Quốc Anh 2014, xu hướng công nghệ phát triển dư lượng kháng sinh trong thủy sản – phương pháp phát hiện nhanh, *Phát hiện dư lượng CAP bằng bộ kit Elisa*, Trung tâm Thông tin Khoa học và Công nghệ TP. HCM.
16. Phạm Kim Đăng, Vũ Thị Ngân, Phạm Hồng Ngân, 2014, Xác định đồng thời dư lượng kháng sinh CAP, Florphenicol, Thiamphenicol trong một số sản phẩm động vật bằng phương pháp sắc ký lỏng khối phổ LC – MSMS, *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, tập 12 (2).
17. Dimple D.Shah, Marian Twohig, Jennifer A. Burgess, 2012, *Quantification of Chloramphenicol in Chicken using Xevo TQD with RADAR technology*, Waters Corporation.
18. Trần Phương Phương, 2011, Chloramphenicol, *Điều trị*.
19. Hắc Bá Thành, Nguyễn Thị Thu, Nguyễn Văn Cường, Nguyễn Thị Diệu Thúy, S.A.Eremin, I.A.Shanin, 2016, Xây dựng phương pháp miễn dịch liên kết Enzyme trực tiếp phát hiện dư lượng Chloramphenicol trong sữa, *Tạp chí khoa học, Trường đại học Hồng Đức*, (29), tr. 121 – 127.
20. Trần Quốc Dung, Nguyễn Hoàng Lộc, Trần Lê Dung, 2006, *Công nghệ chuyển gen (Động vật, thực vật)*, Nhà xuất bản Huế, tr. 94 – 96.
21. Mikkelsen R.S. and C. Eduador, 2004, *Bioanalytical Chemistry*, WileyInterscience, 1st edition, pp. 375 – 422.
22. Phạm Xuân Kỳ, Đào Việt Hà, Nguyễn Thu Hồng, 2013, Đánh giá khả năng áp dụng bộ kit Elisa trong nghiên cứu tích Chloramphenicol ở tôm bạc *Penaeus setiferus* và ghẹ chàm *Portunus trituberculatus*, *Tuyển tập nghiên cứu biển*, tập 19, tr. 134 – 142.

23. Đào Hữu Vinh, Nguyễn Xuân Dũng, Trần Thị Mỹ Linh, Phạm Hùng Việt, 1985, *Các phương pháp sắc ký*, Nhà xuất bản khoa học kỹ thuật Hà Nội, tr. 38 – 60.
24. Phạm Hùng Việt, 2003, *Cơ sở lý thuyết của phương pháp sắc ký*, Nhà xuất bản khoa học kỹ thuật Hà Nội, tr. 21 – 45.
25. Hồ Viết Quý, 2009, *Các phương pháp phân tích công cụ trong hóa học hiện đại*, Nhà xuất bản đại học sư phạm, tr 397 – 438.
26. Nguyễn Hữu Đình, Trần Thị Đà, 1999, *Ứng dụng một số phương pháp phổ nghiên cứu cấu trúc phân tử*, Nhà xuất bản giáo dục, tr 388 – 456.
27. Đoàn Cao sơn, 2010, *Thẩm định phương pháp phân tích trong phân tích hóa học và vi sinh vật*, Nhà xuất bản Khoa học và kỹ thuật Hà Nội, tr. 5 -35.
28. TCVN ISO/IEC 17025:2017 (ISO/IEC 17025:2017), *Yêu cầu chung về năng lực của phòng thử nghiệm và hiệu chuẩn*.
29. AOAC, 2016, *Appendix F: Guideline for Standard Method Performance Requirements*, pp.1 – 6.
30. A. Yibar, F. Cetinkaya, and G. E. Soyutemiz, 2011, ELISA screening and liquid chromatography-tandem mass spectrometry confirmation of chloramphenicol residues in chicken muscle, and the validation of a confirmatory method by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Department of Food Hygiene and Technology*, pp. 2619 – 2631.
31. Mahmoud Abd Elkhabeer, Gouda A. Ramadan Gouda, Lamia Ryad, Eglal R. Souaya, 2020, Analytical Method Optimization and Determination of Sulfonamides, Chloramphenicol and Tetracyclines Drug Residues in Chicken Meat across Egypt, *Journal of Food Processing and Technology*, 825 (11), pp. 1 -14.
32. K Jayalakshmi, M Paramasivam, M Sasikala, TV Tamilam and A Sumithra, 2017, Review on antibiotic residues in animal products and its impact on environments and human health, *India Journal of Entomology and Zoology Studies*, 5(3): 1446-1451.
33. Nguyễn Minh Đức, 2006, *Sắc ký lỏng hiệu năng cao và một số ứng dụng vào nghiên cứu, kiểm nghiệm dược phẩm, dược liệu và hợp chất tự nhiên*, NXB Y học, Thành Phố Hồ Chí Minh, tr. 138 – 149.
34. Allen P Pfenning, Jose E. Roybal, Heidi S Rupp, Sherri B Turnipseed, Steve A Gonzales, Jeffrey A Hurlbut, 2000, *Simultaneous*

Determination of Residues of CAP, Florfenicol, Florfenicol Amine, and Thiamphenicol in Shrimp Tissue by Gas Chromatography with Electron Capture Detection, AOAC, 83 (1), 26-30.

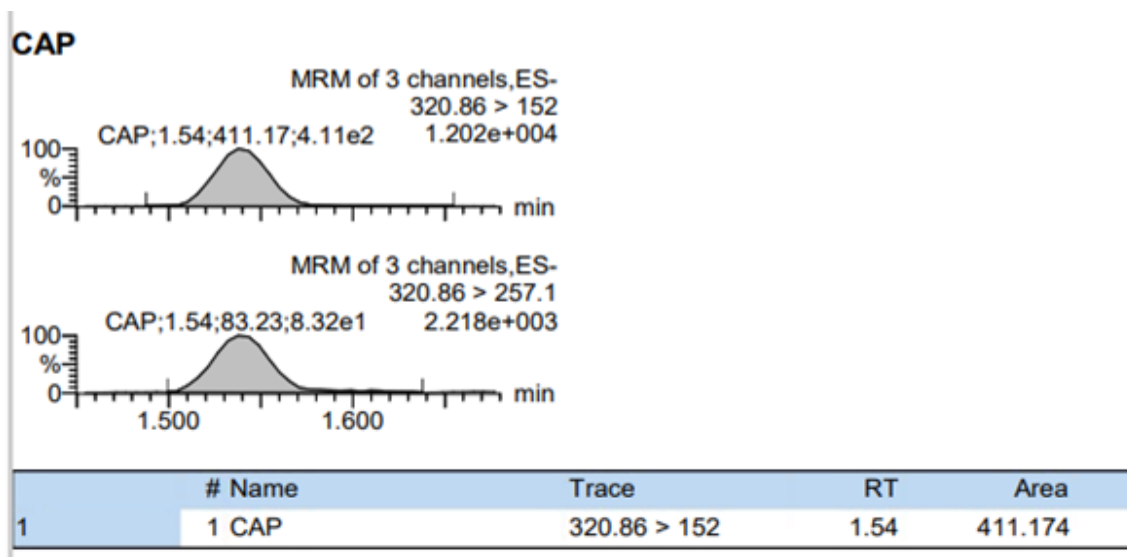
35. Adela Krivohlavek, Irena Zuntar, Martina Ivesic, Ivana Mandic Andacic & Sandra Sikic, 2014, Medicinska naklada - Zagreb, Croatia, *Food safety is an important public health issue: Chloramphenicol residues determination by Liquid chromatography Tandem mass spectrometry (LC – MS/MS) in honey*, 26, (3) 537-545.

36. Julijonas Petraitis and Audrius Padarauskas, 2006, Chloramphenicol determination in milk by liquid chromatography – tandem mass spectrometry, *Chemistry Department, National Veterinary Laboratory, Vilnius, Lithuania*, Vol. 17, (2–3), 25–29.

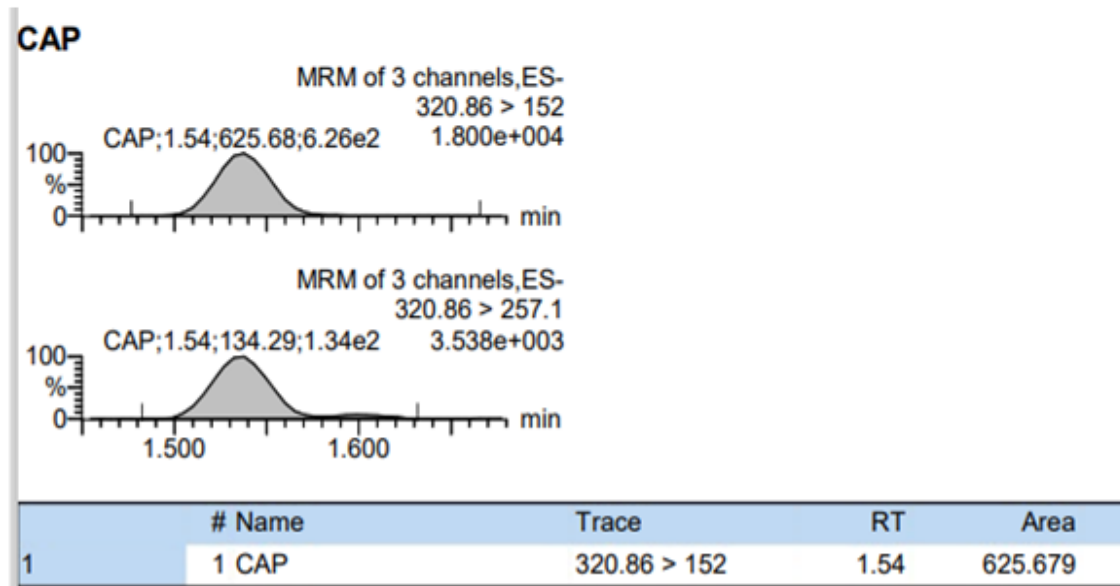
37. Ủy ban Tiêu chuẩn thực phẩm quốc tế, 2016, *Codex Alimentarius Commission*.

PHỤ LỤC

1. Phổ đồ phân tích các mẫu dương tính với CAP tại Trung tâm Kiểm Nghiệm năm 2022



Phổ đồ phân tích định lượng CAP mẫu thịt gà 918/22 GKNTTP



Phổ đồ phân tích định lượng CAP mẫu thịt đà điều 0325/22 LKNTTP

2. Phô đồ phân tích CAP trên nền mẫu thủy sản mã số H22.23 của phòng thí nghiệm PTN 09

Calibration: 13 Jul 2022 10:29:47

Compound name: CAP

Correlation coefficient: $r = 0.998482$, $r^2 = 0.996966$

Calibration curve: $0.0477938 * x + 0.0704912$

Response type: Internal Std (Ref 2), Area * (IS Conc. / IS Area)

Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

	# Name	Type	Std. Conc	RT	Area	Height	S/N	Response	Primar...
1	1 130722 CAP 01	Standard	5.000	1.54	762.029	22512	1768.668	0.304	bb
2	2 130722 CAP 02	Standard	10.000	1.54	1362.788	40166	3188.477	0.573	bb
3	3 130722 CAP 03	Standard	15.000	1.54	1749.004	50681	3724.517	0.759	bb
4	4 130722 CAP 04	Standard	20.000	1.54	2201.698	65103	4808.121	1.044	bb
5	5 130722 CAP 05	Standard	25.000	1.54	2647.252	76624	4873.718	1.256	bb
6	6 130722 TNTT NỀN	Analyte		1.53	35.693	903	59.224	0.011	bb
7	7 130722 TNTT 1	Analyte		1.53	4249.555	119379	6406.739	1.715	bb
8	8 130722 TNTT 2	Analyte		1.53	1715.312	49069	3403.495	0.749	bb
9	9 130722 TNTT TC	Analyte		1.53	6358.921	176420	8019.963	2.961	bb

Compound name: CAP D5

Response Factor: 2281

RRF SD: 174.575, Relative SD: 7.65343

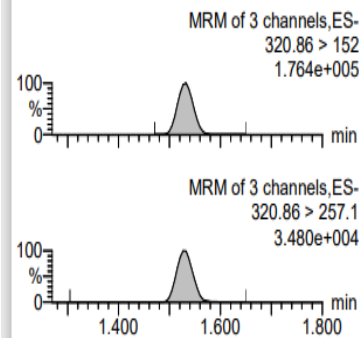
Response type: External Std, Area

Curve type: RF

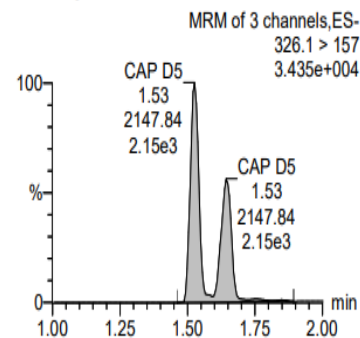
	# Name	Type	Std. Conc	RT	Area	Height	S/N	Response	Primar...
1	1 130722 CAP 01	Standard	1.000	1.53	2509.643	45306	2053.498	2509.643	bb
2	2 130722 CAP 02	Standard	1.000	1.53	2376.585	43332	768.671	2376.585	bb
3	3 130722 CAP 03	Standard	1.000	1.53	2303.198	41101	1366.901	2303.198	bb
4	4 130722 CAP 04	Standard	1.000	1.53	2108.436	38867	486.341	2108.436	bb
5	5 130722 CAP 05	Standard	1.000	1.53	2107.159	38229	971.075	2107.159	bb
6	6 130722 TNTT NỀN	Analyte	1.000	1.53	3345.312	35267	821.077	3345.312	bb
7	7 130722 TNTT 1	Analyte	1.000	1.53	2477.802	26564	486.245	2477.802	bb
8	8 130722 TNTT 2	Analyte	1.000	1.66	2288.723	27294	807.706	2288.723	bb
9	9 130722 TNTT TC	Analyte	1.000	1.53	2147.844	34322	985.875	2147.844	bb

Name: 130722 TNTT TC, Date: 12-Jul-2022, Time: 14:34:37, ID: , Description:

CAP



CAP D5



	# Name	Trace	RT	Area	IS Area	Response	Primar...	Conc.
1	1 CAP	320.86 > 152	1.53	6358.921	2147.844	2.961	bb	60.5
2	2 CAP D5	326.1 > 157	1.53	2147.844		2147.844	bb	0.9

3. Quyết định về việc nghiệm thu và ứng dụng đề tài tại Trung tâm Kiểm nghiệm Khánh Hòa.