XÁC ĐỊNH DƯ LƯỢNG CHLORAMPHENICOL TRONG SỮA BẰNG KỸ THUẬT SẮC KÝ LỎNG HAI LẦN KHỐI PHỔ (LC/MS/MS)

Chử Văn Tuất[(1)], Đậu Ngọc Hào[(2)], Trần Thị Mai Thảo[(1)], Phan Thị Huệ[(1)], Vũ Dũng Minh [(1)] và Phạm Thị Trang[(1)]

TÓM TẮT

Phương pháp xác định dư lượng chloramphenicol (CAP) trong sữa bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hai lần khối phổ (LCMSMS) đã được lập dựng và phê duyệt thành công. Phương pháp là phù hợp để phát hiện lượng vết CAP ở ngưỡng đòi hỏi của thị trường (MRPL là 0,3 µg/kg).

Dư lượng CAP trong sữa được chiết bằng ethyl acetate, sau đó được lọc và bơm lên hệ thống máy LCMSMS. Phát hiện CAP bằng nguồn ion phun điện tử (ESI âm cực, chế độ chạy SIM. Khẳng định CAP và CAP-d5 đã được kiểm soát bằng 3 ion đặc trưng. Phương pháp đã được phê duyệt dựa theo quyết định 657/2002/EC của cộng đồng chung châu Âu cho nhóm dư lượng thuốc thú y trong thực phẩm. Độ lập lại và độ thu hồi ở các nồng độ thêm chuẩn 0,3; 0,45; 0,6 µg/kg là 7,6% và nằm trong khoảng -50 ÷ +20%. Độ tái lập của phương pháp trên các nền mẫu sữa khác nhau là 16,5%. Giới hạn quyết định (CCα) và khả năng phát hiện (CCβ) tương ứng là 0,10 và 0,12 µg/kg. Độ không đảm bảo đo của phương pháp là 33,1%.

Từ khóa: Chloramphenicol, Dư lượng, Phương pháp xác định, Sữa, Sắc ký lỏng hai lần khối phổ.

Determination of chloramphenicol residue in milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LCMSMS)

Chu Van Tuat, Dau Ngoc Hao ,Tran Thi Mai Thao, Phan Thi Hue, Vu Dung Minh and Pham Thi Trang,

SUMMARY

The method for determination of chloramphenicol residue in milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry was successfully developed and validated. The method is 'fit for purpose' to detect trace amount of the CAP at Minimum Required Performance Limit (MRPL, 0.3 µg/kg).

The trace amount of CAP in milk was extracted by ethyl acetate, filtered and injected onto the LC-MS/MS system. Detection of CAP was achieved by negative ionization electrospray (ESI) in the selected ionization monitoring (SIM) mode. For confirmation, three characteristic mass transitions were monitored each for the CAP and the CAP-d5 standard. The method was validated according to the decision 657/2002/EC of European Union criteria for the analyses of veterinary drug residues in food. The repeatability and the recovery at all three fortification levels at 0.3, 0.45, 0.6 µg kg^{-1} at different days of the method was 7.6% and within the ranges of -50 ÷ +20%, respectively. The within-laboratory reproducibility on different milk matrices was 16.5%. The decision limit (CCα) and the detection capability (CCβ) were at 0.10 and 0.12 µg kg^{-1}, respectively. The meaurement uncertainty of the method was 33.1%.

Key words: Chloramphenicol, Residue, Validation method, Milk, Liquid chromatography tandem mass spectrometry.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

CAP là một chất kháng khuẩn phổ rộng, từng được sử dụng rộng rãi ở động vật nuôi làm thực phẩm để điều trị nhiều loại bệnh nhiễm trùng vì hiệu quả điều trị rất tốt và chi phí thấp. Vì CAP có thể gây ra chứng thiếu máu do suy tuỷ nên chúng đã bị cấm sử dụng trong chăn nuôi động vật làm thực phẩm ở Việt Nam (BNN, 2005) cũng như nhiều nước trên thế giới (Reuters, 2002).

Trên thế giới, nhiều tác giả đã nghiên cứu thành công phương pháp xác định dư lượng CAP trong sữa bằng kỹ thuật sắc ký khác nhau (Choon, 2005). Gần đây với sự phát triển nhanh chóng của kỹ thuật sắc ký, áp dụng kỹ thuật sắc ký lỏng khối phổ để phân tích CAP tỏ ra có nhiều

---

(1) Trung tâm Kiểm tra vệ sinh thú y trung ương I
(2) Hội thú y Việt Nam

ưu điểm nổi trội vì bằng kỹ thuật này có thể phát hiện và khẳng định một cách chính xác các chất độc hại CAP trong thực phẩm ở ngưỡng thị trường (MRPL là 0,3 µg/kg).

Ở trong nước, việc áp dụng kỹ thuật sắc ký lỏng khối phổ để phát hiện dư lượng CAP trong thực phẩm đã được triển khai (Nguyễn Thị Thu Thuỷ và cs, 2007). Mỗi phép thử áp dụng áp dụng tại phòng thí nghiệm phải được nghiên cứu thông qua quá trình xác định hiệu lực phương pháp. Khi phương pháp được phê duyệt, kết quả phân tích tại phòng thí nghiệm đó sẽ được các tổ chức khác hoặc các quốc gia khác thừa nhận hoặc công nhận là tương đương (Văn phòng công nhận chất lượng, 2005).

Để có phương pháp phân tích dư lượng CAP trong sữa phù hợp cho mục đích sử dụng, việc lập dựng và phê duyệt phương pháp là thực sự cần thiết.

II. ĐỐI TƯỢNG, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Dư lượng CAP trong mẫu sữa tươi.

2.2. Nội dung nghiên cứu

- Tối ưu hóa điều kiện phân tích CAP trên máy LC/MS/MS;
- Tối ưu hoá quy trình chuẩn bị mẫu thử;
- Phê duyệt phương pháp phân tích dư lượng CAP trong sữa bằng LCMSMS.

2.3. Địa điểm nghiên cứu

Phòng thí nghiệm của Trung tâm Kiểm tra vệ sinh thú y TƯ1 - Cục Thú y.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Thiết bị

Hệ thống sắc ký lỏng khối phổ khối phổ UPLC – xevo TQMS (hãng Waters).

2.4.2. Nguyên liệu, vật tư, hóa chất

- Chuẩn CAP và CAP-d5 (Dr. Ehrenstorfer).
- Các loại dung môi: ethyl acetate, methanol, acetonitril, n-hexan, nước ... (loại tinh khiết dùng cho LCMS).
- Mẫu sữa trắng (gồm mẫu sữa bò và sữa dê không nhiễm CAP); Mẫu sữa trắng thêm chuẩn; Mẫu sữa dương tính (sữa dê thí nghiệm).

2.4.3. Thiết kế các thí nghiệm

Thí nghiệm 1. Tạo mẫu sữa trắng, mẫu sữa dương tính với CAP.

Thí nghiệm 2. Tối ưu hóa các điều kiện sắc ký và phổ khối trên hệ thống LC/MS/MS.

Thí nghiệm 3. Tối ưu hóa quy trình chuẩn bị mẫu thử phân tích dư lượng CAP trong sữa.

Thí nghiệm 4. Phê duyệt phương pháp thử (theo Quyết định 2002/675/EC của EC).

2.4.4. Phương pháp xử lý số liệu

- Bảo quản dữ liệu bằng phần mền Excel.
- Phần mền Masslyns 4.1 (lập dựng đường chuẩn tự động).
- Thống kê mô tả để tính tỷ lệ %, hệ số phân tán (CV%)....
- Thống kê phân tích dùng tử nghiệm F-test, t-test.
- Đánh giá hiệu lực phương pháp theo của quyết định 657/2002/EC của EC.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Tối ưu hóa điều kiện phân tích CAP trên máy LC/MS/MS

3.1.1. Điều kiện bắn phá ion mẹ

CAP được tối ưu hóa bằng kỹ thuật ion hóa phun điện tử ESI với chế độ bắn phá ion âm. Chọn chế độ khảo sát tự động đối với CAP và CAP-d5; tối ưu hóa từng ion mẹ, ta được điều kiện chạy nguồn ion hóa ESI như sau:

Bảng 1. Điều kiện chạy nguồn ion hóa ESI

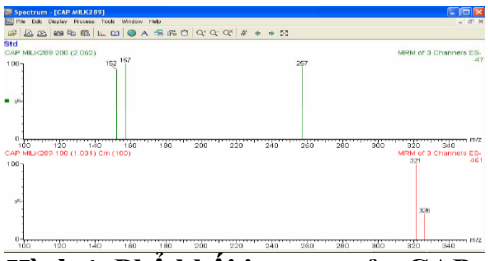
Thông số*	Điều kiện
Tốc độ khí phun	30 L/h
Thế phun điện tử	3kV
Nhiệt độ mao quản	400°C

*Ghi chú: * Các thông số khác tùy điều kiện cụ thể của hệ thống máy.*

Trong kĩ thuật ion hóa phun điện tử với chế độ bắn ion âm, các ion mẹ thường ở dạng (M-1). Tiến hành khảo sát bắn phá các ion mẹ. Tiếp theo tiến hành bắn phá lựa chọn ion con. Yêu cầu ion con phải có tín hiệu lớn gấp ít nhất 10 lần so với ion mẹ. Tiến hành tối ưu hóa mức năng lượng bắn phá ion mẹ, ion con. Kết quả thu được ở bảng 2.

Bảng 2. Kết quả bắn phá các ion mẹ, ion con của CAP, CAP-d5

	Khối lượng phân tử	*Ion mẹ*	*Ion con 1*	*Ion con 2*
CAP	323,13	326,16	257,12	152, 07
CAP-d5	226	326,15	257,12	157,07



Hình 1. **Phổ khối ion con của CAP, CAP-d5 sau khi bắn phá**

3.1.2. Pha tĩnh

CAP là chất kém phân cực, do đó cột tách được sử dụng là cột pha đảo. Khảo sát các loại cột sắc ký khác nhau. Kết quả cho thấy CAP có thể tách ra một cách dễ dàng bằng cột sắc ký pha đảo (RP). Cột phù hợp là cột C_{18} 2,1 mm x 50mm hoặc tương đương.

3.1.3. Pha động

3.1.3.1. Khảo sát thành phần pha động

Trong phương pháp sắc kí lỏng khối phổ, với kĩ thuật ion hóa phun điện tử bắn phá ở chế độ ion âm, quá trình ion hóa tăng khi có thêm các chất như axit focmic.

Khảo sát sự ảnh hưởng của thành phần pha động (B/A) trong đó pha động 1 là acetonitrile / nước tinh khiết với 0,1% axit focmic; pha động 2 là acetonitrile : methanol (9:1)/ đệm amonium acetate 10 mM pha trong nước tinh khiết.

Tiến hành: Bơm cùng 1 nồng độ chất chuẩn CAP 0.5 ppb, chạy chế độ đẳng dòng, tỷ lệ B/A là 85/15, tốc độ dòng là 0,3 mL/phút.

Kết quả: Cả 2 thành phần pha động này đều có thể sử dụng làm pha động để phân tích CAP trong mẫu sữa (đều đẩy được CAP ra khỏi cột, sắc đồ phổ khối gồm ion mẹ và 02 ion con điển hình của CAP). Tuy nhiên nhược điểm của thành phần pha động có đệm amonium acetate 10 mM là nhanh làm bẩn cone của nguồn. Do đó, chúng tôi chọn pha động là acetonitrile/ nước - axit focmic 0,1% cho các khảo sát tiếp theo.

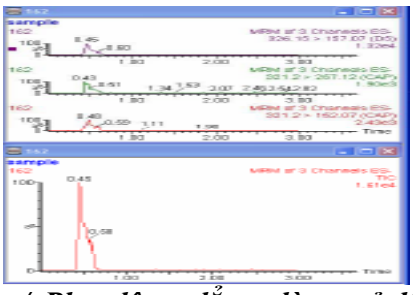
3.1.3.2. Khảo sát tối ưu hóa pha động

- Dựa vào kết quả khảo sát trên, tiếp tục khảo sát tối ưu hóa pha động đối với dung dịch chuẩn và mẫu trắng thêm chuẩn khi các điều kiện thí nghiệm khác là cố định. Kết quả đã tìm được chương trình pha động tối ưu để phân tích CAP trong sữa (bảng 3).

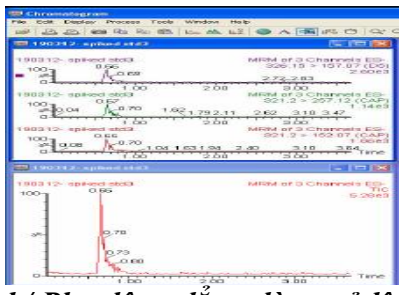
Bảng 3. Chương trình pha động gradient

Thời gian (phút)	*Tốc độ dòng (mL/phút)*	*Kênh A (nước - axit focmic 0,1%)*	*Kênh B (acetonitrile)*
0	0,3	30	70
0,2	0,3	50	50
1,0	0,3	50	50
1,1	0,3	80	20
2,0	0,3	30	70

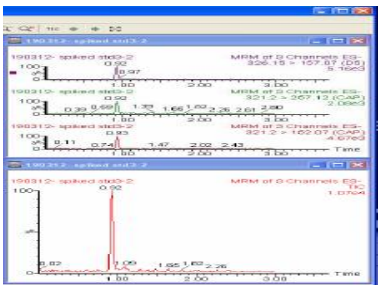
Hình ảnh mô tả quá trình tối ưu hóa pha động:



a/ Pha động đẳng dòng, tỷ lệ kênh B:A là 85: 15



b/ Pha động đẳng dòng, tỷ lệ kênh B:A là 95: 5



c/ Pha động gradient

Hình 2: Sắc đồ tối ưu hóa pha động

3.2. Kết quả tối ưu hoá quy trình chuẩn bị mẫu thử

3.2.1. Khảo sát tách bơ trong mẫu sữa trước khi tiến hành chiết tách mẫu

- Chuẩn bị 2 nhóm mẫu, mỗi nhóm gồm 01 mẫu sữa trắng và 06 mẫu thêm chuẩn CAP để nồng độ cuối cùng của dịch chiết mẫu là 1 ng/mL.
- Tiến hành chiết và làm sạch mẫu như quy trình dự kiến của AFFSSA, 2004.
- Thực tế, sau khi cho ethyl acetate vào, lắc, ly tâm thì chỉ hút được 3 mL lớp phía trên vì có hiện tượng nhũ hóa.
- Với 3 mL lớp phía trên hút đực, tiến hành các bước chuẩn bị mẫu tiếp theo và phân tích sắc ký. Trên cơ sở so sánh diện tích pic (điểm điện) của 02 quy trình thử nghiệm bằng thử nghiệm F-test. Kết quả như bảng sau:

Bảng 4. **Kết quả thử nghiệm quy trình tách chiết CAP trong sữa của mẫu không tách bơ và mẫu tách bơ trước khi chuẩn bị mẫu thử**

	Quy trình không tách bơ	*Quy trình tách bơ*
Cặp mẫu BLK	8,347	9,650
Cặp mẫu SPK1	35,742	54,864
Cặp mẫu SPK1	51,470	86,122
Cặp mẫu SPK1	32,525	60,430
Cặp mẫu SPK1	98,372	95,814
Cặp mẫu SPK1	117,085	272,394
Cặp mẫu SPK1	198,685	300,657
Phương sai	$4{,}319E^{+09}$	$1{,}289E^{+10}$
$F_{tính\ toán}$	0,335	
$F_{0,05}$	0,233	
$p_{0,05}$	0,105	

*Ghi chú * File kết quả lưu: CAP_MILK_32-47.qld*

Kết quả cho thấy:

- Phương sai của quy trình không tách bơ là $4{,}319E^{+09}$ nhỏ hơn một chút so với phương sai của quy trình có tách bơ là $1{,}289E^{+10}$ song giá trị $F_{tính\ toán} = 0{,}335$ lớn hơn giá trị $F_{0,05} = 0{,}233$, cho thấy không có sự khác biệt về độ chính xác về kết quả thử nghiệm giữa 2 quy trình chuẩn bị mẫu thử ($p>0{,}05$).
- Không thể áp dụng chiết toàn phần;
- Không cần phải tách bơ trước khi chiết tách mẫu nhưng cần phải nghiên cứu bổ sung một bước để giảm hiện tượng mẫu bị nhũ hóa và nâng cao độ thu hồi của quy trình.

3.2.2. Khảo sát ngăn ngừa sự nhũ hóa khi chiết tách mẫu

Chuẩn bị 2 nhóm mẫu, mỗi nhóm gồm 01 mẫu sữa trắng và 06 mẫu thêm chuẩn CAP để nồng độ cuối cùng của dịch chiết mẫu là 1 ng/mL.

Tiến hành chiết và làm sạch mẫu như quy trình dự kiến nhưng sau bước cho ethyl acetate và lắc, một lô mẫu để ở nhiệt độ âm sâu (-15^0C) trong 30'; lô kia để ở nhiệt độ phòng thí nghiệm.

Lô để ở nhiệt độ âm sâu, sau khi lấy ra, lắc nhẹ cho tan dung môi và phần nhũ hóa. Cả 2 lô, tiếp tục tiến hành các bước tiếp theo như quy trình dự kiến.

Kết quả thí nghiệm cho thấy: So với thí nghiệm trước, lớp dung môi phía trên của lô để ở nhiệt độ âm sâu hút được nhiều hơn (8 mL), lô kia vẫn chỉ hút được khoảng 3 mL. Tiến hành các bước xử lý mẫu tiếp theo rồi bơm lên hệ thống máy sắc ký. Trên cơ sở so sánh diện tích (điểm điện) của 02 quy trình thử nghiệm bằng thử nghiệm F-test; sử dụng thử nghiệm t-test có phương sai khác nhau cho 2 lô mẫu này để tìm 2 sự khác biệt giữa 2 kết quả thử nghiệm. Kết quả như sau:

Bảng 5. Kết quả thử nghiệm quy trình tách chiết CAP trong sữa của Lô mẫu để ở nhiệt độ phòng và Lô mẫu để ở nhiệt độ âm sâu

Đơn vị: Diện tích pic (điểm điện)

Mẫu	**Lô mẫu để ở nhiệt độ phòng***	**Lô mẫu để ở nhiệt độ âm sâu***
Mẫu SPK1	56,658	504,284
Mẫu SPK2	166,647	426,315
Mẫu SPK3	48,535	417,863
Mẫu SPK4	71,870	418,250
Mẫu SPK5	47,907	441,825
Mẫu SPK6	27,456	413,700
Phương sai	$2,46E^{+09}$	$1,19E^{+09}$
$F_{tính\ toán}$	2,073	
$F_{0,05}$	5,050	
$p_{0,05}$	0,221	
$t_{tính\ toán}$	14,906	
$t_{0,05/2}$	2,262	
$p_{0,05/2}$	0,000	

*Ghi chú * File kết quả lưu: CAP_MILK_32-47.qld*

Kết quả bảng trên cho thấy: Trung bình của Lô mẫu để ở nhiệt độ âm sâu (điểm điện là 437039,5) cao hơn so với trung bình của Lô mẫu để ở nhiệt độ phòng (điểm điện là 69845,5); giá trị $t_{tính\ toán}$ = 14,906 lớn hơn giá trị $t_{0,05/2}$ = 2,262, cho thấy về kết quả thử nghiệm của Lô mẫu để ở nhiệt độ âm sâu có độ thu hồi tốt hơn rõ rệt so với Lô mẫu để ở nhiệt độ phòng ($p<0,05$).

Như vậy: bằng cách bổ sung bước để mẫu để ở nhiệt độ âm sâu (-15^0C) đã khắc phục được hiện tượng nhũ hóa; Độ thu hồi của phương pháp đã tăng lên rõ rệt ($p<0,05$).

3.2.3. Thử nghiệm lại quy trình chiết mẫu thử CAP trong sữa theo quy trình được điều chỉnh

3.2.3.1. Tóm tắt quy trình chiết tách CAP trong mẫu sữa

Theo các kết quả nghiên cứu, quy trình chiết tách CAP trong mẫu sữa tóm tắt như sau:

Bảng 6. Tóm tắt các bước chuẩn bị mẫu thử phân tích CAP trong sữa

Bước	**Nội dung**
Bước 1.	Cân 2g mẫu đã đồng nhất vào ống ly tâm 50ml
Bước 2.	Thêm CAP-d5 (nồng độ là 0,5 µg/kg)
Bước 3.	Voltex 30 giây ở tốc độ cao nhất
Bước 4.	Thêm vào 9ml Ethylacetate
Bước 5.	Lắc 10 phút ở tốc độ 270 lần/phút
Bước 6.	Để ở nhiệt độ âm sâu (-15^0C) trong 30’
Bước 6.	Lắc nhẹ, ly tâm 4500 vòng/ 5 phút/ 4^0C
Bước 7.	Chuyển 6ml bề mặt sang ống thuỷ tinh
Bước 8.	Bay hơi bằng khí N_2 đến khô ở nhiệt độ 40^0C
Bước 9.	Hoà tan bằng 0,5ml n-hexan hoặc iso -octan
Bước 10.	Thêm vào 0,4 ml H_2O
Bước 11.	Ly tâm 4000 vòng trong 5 phút
Bước 12.	Loại bỏ lớp trên
Bước 13.	Hút vào lọ để bơm trên máy LCMSMS

3.2.3.2. Thử nghiệm lại quy trình chiết tách CAP trong mẫu sữa

- Chuẩn bị 2 nhóm mẫu, mỗi nhóm gồm 06 mẫu thêm chuẩn CAP để nồng độ cuối cùng trong mẫu thử là 0,5 µg/kg. Tiến hành chuẩn bị mẫu thử theo quy trình tóm tắt nói trên.

- Dùng thử nghiệm t-test với phương sai khác nhau (đã kiểm tra bằng thử nghiệm F-test), so sánh trung bình diện tích (điểm điện) của Lô mẫu chuẩn bị theo quy trình được điều chỉnh theo bảng 6 với Lô để ở nhiệt độ âm sâu. Kết quả như bảng sau:

Bảng 7. So sánh kết quả quy trình chiết CAP trong sữa của Lô mẫu chuẩn bị theo quy trình được điều chỉnh và Lô mẫu chuẩn bị theo quy trình chưa được điều chỉnh

Đơn vị: Diện tích pic (điểm điện)

Mẫu	**Lô mẫu chuẩn bị theo quy trình chưa được điều chỉnh***	**Lô mẫu chuẩn bị theo quy trình được điều chỉnh***
Mẫu SPK1	504,284	855,275
Mẫu SPK2	426,315	830,790
Mẫu SPK3	417,863	594,185
Mẫu SPK4	418,250	705,184
Mẫu SPK5	441,825	748,244
Mẫu SPK6	413,700	669,803
Trung bình	437039,5	733913,5
$t_{tính\ toán}$	6,952	
$t_{0,05/2}$	2,447	
$p_{0,05/2}$	0,000	

*Ghi chú * File kết quả lưu: CAP_MILK_32-73.qld*

Kết quả bảng trên cho thấy: Trung bình của Lô mẫu chuẩn bị theo quy trình được điều chỉnh (điểm điện là 733913,5) cao hơn Lô mẫu để ở nhiệt độ âm sâu (điểm điện là 437039,5); giá trị $t_{tính\ toán}$ = 6,952 lớn hơn giá trị $t_{0,05/2}$ = 2,447, cho thấy về kết quả thử nghiệm của Lô mẫu chuẩn bị theo quy trình được điều chỉnh có độ thu hồi tốt hơn rõ rệt ($p<0,05$) so với Lô mẫu chuẩn bị theo quy trình chưa được điều chỉnh (Lô mẫu để ở nhiệt độ âm sâu).

3.3. Phê duyệt phương pháp thử

3.3.1. Khoảng tuyến tính

3.3.1.1. Xây dựng đường chuẩn CAP tinh khiết

Tiến hành lập đường chuẩn tinh khiết của dãy dung dịch chuẩn có nồng độ 0,2; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 25 ppb trên hệ thống máy theo điều kiện tối ưu của quy trình phân tích CAP. Quá trình này lập lại 2 lần. Đường chuẩn được thiết lập tự động bằng phần mềm Masslyns 4.1. Kết quả cho thấy khoảng tuyến tính của đường chuẩn CAP tinh khiết là 0,2-25,0 µg/mL, tương ứng với nồng độ trong mẫu là 0,05-12,5 ppb.

3.3.1.2. Xây dựng đường chuẩn trên nền mẫu thực

Trên cơ sở khảo sát khoảng tuyến tính của đường chuẩn tinh khiết, tiến hành khảo sát thêm chuẩn với nồng độ cuối cùng trong mẫu là 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 10,0 µg/kg. Tiến hành các bước chiết và làm sạch mẫu như quy trình trên.

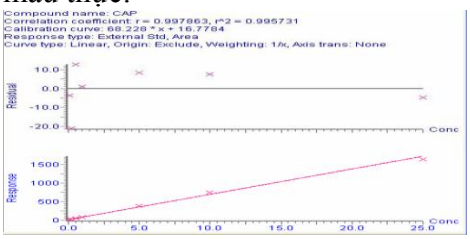
***Bảng 8:* Khoảng tuyến tính của đường chuẩn CAP trên nền mẫu thực**

Đơn vị: µg/kg

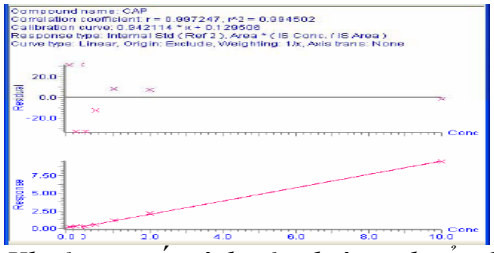
Nồng độ (µg/kg)	**Lần (1)**	**Lần (2)**
0,1	0,15	0,13
0,25	0,13	0,17
0,5	0,42	0,44
1	1,02	1,08
2	2,30	2,15
10	9,83	9,88
R^2	0,988	0,994
Phương trình tuyến tính	Y= 0,957X+0,127	Y = 0,942X + 0,129

Ghi chú: File kết quả lưu: (1) CAP MILK LOD 080512.qld, (2) CAP MILK LOD 080512.qld

Nhận xét: Đường chuẩn chấp nhận được (R^2 ≥0,98). Khoảng tuyến tính của đường chuẩn CAP trên nền mẫu thực là 0,1 – 10,0 µg/kg, tương ứng với nồng độ trong mẫu là 0,1-10,0 µg/kg.
Hình 3 minh họa khoảng tuyến tính của đường chuẩn CAP tinh khiết và đường chuẩn trên nền mẫu thực:



Khoảng tuyến tính của đường chuẩn CAP tinh khiết



Khoảng tuyến tính của đường chuẩn CAP trên nền mẫu thực

Hình 3: Khoảng tuyến tính của đường chuẩn CAP trên nền mẫu thực

3.3.2. Giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ)

Tiến hành chuẩn bị 10 mẫu sữa trắng thêm chuẩn ở nồng độ là 0,3 µg/kg (phương pháp thêm chuẩn). Kết quả phân tích được trình bày trong bảng sau:

Bảng 9: Kết quả thí nghiệm về giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ)

Mẫu*	Nồng độ (µg/kg)
SPK0,3-1	0,30
SPK0,3-2	0,30
SPK0,3-3	0,32
SPK0,3-4	0,26
SPK0,3-5	0,27
SPK0,3-6	0,27
SPK0,3-7	0,30
SPK0,3-8	0,31
SPK0,3-9	0,26
SPK0,3-10	0,26
Trung binh	0,29
SD	0,023
LOD	0,07
LOQ	0,23
$R_{tính\ toán}$	4,09

*Ghi chú: *File kết quả lưu CAP_MILK_74-133.qld*

- Đánh giá tính hợp lý: Từ giá trị LOD đã tính được, tính $R_{tính\ toán} = x / LOD = 4,09$ trong đó x là trị số trung bình. Do $4 < R_{tính\ toán} < 10$, nên nồng độ dung dịch thử của mẫu sữa trắng thêm chuẩn là phù hợp, LOD tính được là đáng tin cậy. Vậy LOD là 0,07 µg/kg, LOQ là 0,23 µg/kg.

3.3.3. Giới hạn phát hiện (CCα), giới hạn định lượng (CCβ)

Từ kết quả các thí nghiệm, tiến hành tính các giá trị CCα và CCβ theo tiêu chuẩn ISO11843. Kết quả trình bày trong bảng sau:

***Bảng 10.* Tính toán giá trị CCα và CCβ qua các ngày khác nhau**

Đơn vị: µg/kg

Nồng độ	Tín hiệu			
	(1)	(2)	(3)	(4)

0,05	0,030	0,050	0,040	0,040
0,1	0,130	0,070	0,100	0,090
0,25	0,240	0,330	0,360	0,250
0,5	0,500	0,550	0,450	0,520
CCα	0,10		0,09	
CCβ	0,12		0,12	

Ghi chú: File kết quả lưu

(1): [CAP_MILK_188-216.qld] (3): [CAP_MILK_74-133.qld]
(2): [CAP_MILK_153-172.qld] (4): [CAP_MILK_173-187.qld]

Như vậy: Giá trị CCα là 0,10 µg/kg và giá trị và CCβ là 0,12 µg/kg.

3.3.4. Độ lặp lại của phương pháp

Tiến hành chuẩn bị 3 lô mẫu sữa trắng thêm chuẩn CAP, nồng độ cuối cùng trong mẫu là 0,30; 0,45 và 0,60 µg/kg, mỗi lô gồm 6 mẫu, lập lại 3 ngày khác nhau. Kết quả trình bày trong bảng sau:

***Bảng 11.* Kết quả xác định độ chụm trung gian ở các nồng độ**

Đơn vị: µg/kg

Tiêu chí	Mức 0,30 µg/kg			Mức 0,45			Mức 0,60 µg/kg			Tính chung
	KQ^a	KQ^b	KQ^c	KQ^a	KQ^b	KQ^c	KQ^a	KQ^b	KQ^c	
Lần thứ 1	0,32	0,24	0,30	0,50	0,45	0,55	0,64	0,60	0,68	
Lần thứ 2	0,27	0,32	0,32	0,58	0,49	0,50	0,63	0,60	0,65	
Lần thứ 3	0,37	0,28	0,30	0,46	0,45	0,47	0,62	0,65	0,63	
Lần thứ 4	0,31	0,24	0,33	0,54	0,44	0,51	0,71	0,67	0,69	
Lần thứ 5	0,35	0,35	0,29	0,50	0,52	0,48	0,64	0,62	0,62	
Lần thứ 6	0,27	0,26	0,29	0,51	0,49	0,55		0,64	0,71	
Trung bình	0,32	0,28	0,31	0,52	0,47	0,51	0,65	0,63	0,66	
Độ lệch chuẩn (SD)	0,04	0,04	0,02	0,04	0,03	0,03	0,04	0,03	0,04	
Hệ số phân tán (CV%)	13,0	15,9	5,4	7,9	6,6	6,7	5,5	4,5	5,4	
Độ lệch chuẩn tương đồng (S_R)										0,11
Trung bình chung (µg/kg)										1,45
Hệ số phân tán chung khác nồng độ (CV%)										7,6

Ghi chú: "KQ^a": Kết quả đo ngày 1, file lưu là CAP_MILK_134-160.qld
"KQ^b": Kết quả đo ngày 2, file lưu là CAP_MILK_74-133.qld
"KQ^c": Kết quả đo ngày 3, file lưu là CAP_MILK_188-216.qld

Kết quả bảng cho thấy: Hệ số phân tán chung (CV%) ở nồng độ CAP trong mẫu sữa là 0,3; 0,45 và 0,6 µg/kg, giữa các ngày khác nhau là 7,6%. So với quy định trong quyết định 2002/657/EC ở ngưỡng <1 µg/kg, kết quả này chấp nhận được.

3.3.5. Độ thu hồi của phương pháp

Từ kết quả thí nghiệm về lập lại của phương pháp tiến hành ở các nồng độ khác nhau trong các ngày khác nhau, tiến hành tính độ thu hồi của từng mẫu ở mỗi nồng độ và độ thu hồi chung ở mỗi nồng độ. Kết quả trình bày trong bảng sau:

Bảng 12. Độ thu hồi của phương pháp

Độ thu hồi (%)		
Nồng độ 0,3 µg/kg	*Nồng độ 0,45 µg/kg*	*Nồng độ 0,6 µg/kg*

	KQ[a]	KQ[b]	KQ[c]	KQ[a]	KQ[b]	KQ[c]	KQ[a]	KQ[b]	KQ[c]
Lần thứ 1	106,7	80,0	100,0	111,1	100,0	122,2	106,7	100,0	113,3
Lần thứ 2	90,0	106,7	106,7	128,9	108,9	111,1	105,0	100,0	108,3
Lần thứ 3	123,3	93,3	100,0	102,2	100,0	104,4	103,3	108,3	105,0
Lần thứ 4	103,3	80,0	110,0	120,0	97,8	113,3	118,3	111,7	115,0
Lần thứ 5	116,7	116,7	96,7	111,1	115,6	106,7	106,7	103,3	103,3
Lần thứ 6	90,0	86,7	96,7	113,3	108,9	122,2	0,0	106,7	118,3
Độ thu hồi chung (%)	100,2			111,0			107,8		

Ghi chú: "KQ[a]": Kết quả đo ngày 1, file lưu là CAP_MILK_134-160.qld

"KQ[b]": Kết quả đo ngày 2, file lưu là CAP_MILK_74-133.qld

"KQ[c]": Kết quả đo ngày 3, file lưu là CAP_MILK_188-216.qld

Kết quả bảng cho thấy: Độ thu hồi (%) của phép thử CAP trong mẫu sữa thêm chuẩn:

- Ở nồng độ 0,6 µg/kg biến động từ 100,0-118,3%.

- Ở nồng độ 0,3 µg/kg biến động từ 80,0-123,3% trong đó 1 phép thử ngày thứ nhất nằm ngoài khoảng chấp nhận (vượt ra ngoài khoảng quy định một chút) nhưng độ thu hồi chung trong các ngày là 100,2%.

- Ở nồng độ 0,45 µg/kg biến động từ 97,8-128,9% trong đó 1 phép thử ngày thứ nhất và 1 phép thử ngày thứ 2 nằm ngoài khoảng chấp nhận (vượt ra ngoài khoảng quy định một chút) nhưng độ thu hồi chung trong các ngày là 111,0%.

Kết quả độ thu hồi chung trong các ngày ở các nồng độ là chấp nhận được theo Quyết định 2002/657/EC ở ngưỡng <1 µg/kg.

3.3.6. Độ tái lập và tính độ không đảm bảo đo của phương pháp

Độ tái lập và độ không đảm bảo đo của phương pháp được nghiên cứu trên nền mẫu sữa bò và sữa dê. Kết quả như sau:

Bảng 13. Độ tái lập và tính độ không đảm bảo đo của phương pháp

Thông số	*Sữa dê*[*]			*Sữa bò*[**]			*Tính chung*
Nồng độ spike (µg/kg)	0,30	0,45	0,60	0,30	0,45	0,60	
Trung bình (µg/kg)	0,30	0,50	0,61	0,29	0,38	0,65	
Độ tự do - 1	17	17	16	5	5	5	
Độ lệch chuẩn (SD)	0,037	0,039	0,156	0,061	0,024	0,107	
Hệ số phân tán (CV%)	12,3	7,7	25,5	20,8	6,3	16,5	
Phương sai	0,258	0,101	1,044	0,215	0,020	0,137	1,775
Tổng độ tự do - 1							65
Phương sai chung							0,03
Hệ số phân tán chung (CV%)							16,5
Hệ số phủ							2,0
Độ không đảm bảo đo (%)							33,1

Ghi chú: "Sữa dê[*]": file lưu kết quả là CAP_MILK_134-160.qld; CAP_MILK_74-133.qld; CAP_MILK_188-216.qld; "Sữa bò[**]": file lưu là CAP MILK LOD 080512.qld

Kết luận:

- Độ tái lập của phương pháp trên nền mẫu sữa khác nhau là 16,5%.
- Độ không đảm bảo đo của phương pháp là 33,1%.

3.3.7. Nghiên cứu đảm bảo chất lượng kết quả thử nghiệm

3.3.7.1. Kiểm tra ô nhiễm của hệ thống máy

Trước mỗi ngày chạy loạt mẫu, bơm dung môi ACN để kiểm tra sự tạp nhiễm của máy.

3.3.7.2. Kiểm tra sự nhiễm bẩn sau khi bơm loạt mẫu

Cứ sau khi bơm một loạt 10 mẫu, bơm 01 mẫu ACN. Kết quả máy không bị nhiễm bẩn từ những lần chạy máy trước thì mới được bơm mẫu tiếp.

3.3.7.3. Kiểm tra mẫu mù

Thí nghiệm bố trí để người phân tích mẫu không được biết thông tin về mẫu. Sử dụng mẫu sữa dê thí nghiệm (mẫu sữa trắng và mẫu dương tính với CAP) được đồng nhất, chia làm 02 phần; một phần phân tích tại PTN của Trung tâm, phần kia gửi tới PTN khác. Kết quả như sau:

Bảng 14. **Kết quả phân tích CAP giữa phòng thí nghiệm của Trung tâm (VSTY1) với phòng thí nghiệm khác**

Mẫu	*Phân tích định tính*		*Phân tích định lượng (µg/kg)*		p_{χ^2} *(α=0,05)*
	VSTY1	*PTN khác*	*VSTY1*	*PTN khác*	
Mẫu (-)	-	-	0,00	0,00	0,469
Mẫu (+)	+	+	0,69	0,76	

Ghi chú : (-) : Âm tính ; (+) : Dương tính.

Kết quả bảng trên cho thấy:

+ Kết quả phân tích định tính: Cả 02 PTN đều cho kết quả âm tính đối với mẫu âm tính, phù hợp với thí nghiệm được bố trí.

+ Kết quả phân tích định lượng: Dùng thử nghiệm F-test để đánh giá mức độ chính xác của kết quả thử nghiệm giữa 2 phòng thí nghiệm. Kết quả bảng trên cho thấy: Phương sai phòng thí nghiệm Trung tâm (VSTY1) = 0,24 nhỏ hơn một chút so với phương sai phòng thí nghiệm gửi mẫu đi phân tích = 0,29 song giá trị $F_{tính\ toán}$ = 0,824 lớn hơn giá trị $F_{0,05}$ = 0,006 cho thấy không có sự khác biệt vệ độ chính xác của phương pháp mà phòng thí nghiệm áp dụng so với phương pháp của phòng thí nghiệm kia.

IV. KẾT LUẬN VÀ KHUYẾN NGHỊ

-. Đã nghiên cứu và lập dựng thành công được quy trình phân tích dư lượng CAP trong sữa bằng kỹ thuật sắc ký lỏng khối phổ LCMSMS trong đó hiệu lực của phương pháp được xác định dựa theo hướng dẫn Quyết định 2002/675/EC của EC ngày 20/8/2002.

-. Phương pháp là phù hợp để xác định dư lượng CAP trong sữa ở ngưỡng đòi hỏi của thị trường (0,3 µg/kg).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. AFSSA (2004): Chloramphenicol identification by liquid chromatography tandem mass spectrometry. AFSSA - France.
2. Balizs, G. & Arnold, D. (1989) Reference standards for residue analysis of chloramphenicol in milk and meat: a critical study. *Chromatographia*, 27, 489–494.
3. BNN (2005): Quyết định số 25/2005/QĐ-BNN
4. Choon K. N. và cs (2005): A rapid and sensitive analysis method of Sudan I, II, III & IV in tomato sause using ultra performance LC MS/MS. Waters agency.
5. EU (2002): EU regulation, European commission decision 2002/657/EC
6. Reuters (2002): Chloramphenicol antibiotic is banned in foods - FAO.
7. Nguyễn Thị Thu Thuỷ, Lâm Văn Xự, Phạm Thị Ánh, Trần Kim Tính, Chu Phạm Ngọc Sơn, Kefei Wang (2007): Phân tích clenbuterol trong thịt heo và thức ăn chăn nuôi bằng kỹ thuật sắc ký lỏng khối phổ.
8. Tyler, D. (2006): Determination of chloramphenicol at residue levels in food by solid phase extraction and LC/MS/MS. DEFRA Central Science Laboratory, Britain.
9. Văn phòng công nhận chất lương (2005): Hướng dẫn đánh giá độ không đảm bảo đo trong phân tích hoá học định lượng. Văn phòng công nhận chất lương.

Nhận: 10-6-2012 Phản biện 15-6-2012