

TỐI ƯU HÓA ĐIỀU KIỆN PHÂN TÍCH MỘT SỐ THÀNH PHẦN CHẤT PPCP TRÊN HỆ THỐNG SẮC KÝ LC/QQQ

Đến tòa soạn 20-3-2017

Ngô Huy Thành, Văn Diệu Anh, Huỳnh Trung Hải

Đại học Bách Khoa Hà Nội

Norihide Nakada

Đại học Kyoto, Nhật Bản

Tối ưu hoá các điều kiện chạy sắc ký lỏng ghép nối khối phổ đầu dò ba tứ cực (LC/QQQ) dùng cho phân tích dư lượng một số chất PPCPs trong các mẫu phân tích môi trường đã được thực hiện trong nghiên cứu này. Quá trình tối ưu hoá được thực hiện nhằm xác định được hai thông số quan trọng nhất quyết định đến việc xác định định tính và định lượng các chất là năng lượng phân mảnh và năng lượng va chạm. Mười chín hợp chất PPCPs phổ biến đã được tối ưu hoá và đã có thể xác định định tính và định lượng bằng hệ thống sắc ký lỏng khối phổ dựa trên các kết quả thu được. Optimized LC/QQQ conditions for the analysis of Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCPs) was developed in this study. The optimization was implemented to define Fragmentor and Collision Energy, which is the key for qualification and quantification of PPCPs. Nineteen popular PPCPs was optimized and could be qualified or quantified with LC/QQQ.

Từ khoá: Các sản phẩm được phẩm và chăm sóc sức khoẻ cá nhân (PPCPs), sắc ký lỏng ghép nối khối phổ ba tứ cực (LC/QQQ), năng lượng phân mảnh (Fragmentor), năng lượng va chạm (Collision Energy).

1. MỞ ĐẦU

Thời gian gần đây, nhóm hợp chất dược phẩm và các sản phẩm chăm sóc cá nhân (PPCPs) ngày càng được quan tâm do khả năng gây ô nhiễm môi trường nước và ảnh hưởng sức khoẻ con người. PPCPs, đặc biệt là các chất kháng sinh có mặt trong môi trường nước ở quy mô toàn cầu, bao gồm cả nguồn nước đầu vào của các nhà máy xử lý nước cấp.

Tại Việt Nam, nông nghiệp và thủy sản là một trong các hoạt động chủ đạo phục vụ phát triển kinh tế xã hội. Việc

sử dụng PPCPs không được kiểm soát trong y tế, chăn nuôi, nuôi trồng thủy sản (Managaki et al., 2007 [1]) cùng với việc xả nước thải chưa qua xử lý vào môi trường nước gây ô nhiễm dư lượng PCPP đáng kể trong môi trường. Theo một số kết quả nghiên cứu chỉ ra sự phân bố của các nhóm chất dư lượng kháng sinh thú y: Macrolides, Sulfonamides và Trimethoprim trên khu vực đồng bằng sông Mekong đã được điều tra sự phân bố trong nước bắt nguồn từ đồng bằng sông Mekong và so

sánh với sự phân bố tại sông Tamagawa (Nhật Bản). Tại Việt Nam, chỉ có một vài dư lượng kháng sinh (VD: Macrolides, Sulfonamides, Trimethoprim và erythromycin-H₂O) được phát hiện trong nước sông và kênh đào bắt nguồn từ các vùng đô thị và nông thôn với nồng độ dao động trong khoảng từ 7 ng/L đến 360 ng/L. Tuy nhiên, sự có mặt khắp nơi của sulfamethazine (có trong thuốc thú y) trong nước tại Việt Nam với nồng độ rất cao, dao động trong khoảng từ 15 ng/L đến 328 ng/L. Và đặc biệt, các giá trị này có thể cao hơn gấp nhiều lần nếu phân tích từ các mẫu nước bắt nguồn từ nước thải của các trang trại chăn nuôi cũng như các nguồn tiếp nhận nước thải từ các trang trại (*Satoshi et al., 2007 [2]*).

Theo một kết quả nghiên cứu khác đã chỉ ra Norfloxacin (được sử dụng phổ biến trong nuôi tôm) được phát hiện lên đến 6,1 ppm trong lớp bề mặt và 4,0 ppm ở lớp dưới cùng của mẫu nước lấy từ các kênh rạch xung quanh trang trại nuôi tôm ở miền Nam Việt Nam. Tương tự, Sulfamethoxazole cũng được tìm thấy trong lớp bùn đáy (lớp bùn trên với độ dày 5cm) với nồng độ dao động từ 4,7 ppm đến 820 ppm (*Tuan Xuan Le et*

al., 2004 [3]).

Việt Nam là một nước sản xuất và tiêu thụ một lượng lớn các sản phẩm chứa PPCPs do tốc độ tăng trưởng kinh tế và dân số tăng nhanh làm cho vấn đề ô nhiễm do PPCPs ngày càng nghiêm trọng. Do đó, việc đánh giá và xác định được các hợp chất PPCPs phục vụ cho quản lý nguồn ô nhiễm là rất cần thiết. Có nhiều phương pháp phân tích và xác định PPCPs trong nước, trong đó phương pháp sắc ký lỏng hai lần khối phổ là phương pháp phân tích hiệu quả cho phép tách, định tính và định lượng các PPCPs với độ nhạy cao (*Mira Petrovic et al., 2004 [4]*). Nghiên cứu này tập trung vào việc tối ưu hoá hệ thống sắc ký lỏng (LC) ghép nối khối phổ với đầu dò ba tứ cực (QQQ) Agilent 6420 LC/QQQ phục vụ phân tích nhóm 19 hợp chất PPCPs phổ biến trong nước mặt khu vực miền bắc Việt Nam. Các chất được tối ưu hoá với 2 thông số quan trọng nhất để định tính và định lượng là năng lượng phân mảnh (Fragmentor) ra Ion mẹ (Precursor ion) và năng lượng đập mảnh (Collision Energy) ra Ion con (Product ion) (*Imma Ferrer et al., 2008 [5]*). Sau đó điều kiện tách trên hệ thống LC được khảo sát.

Bảng 1: Danh sách các hợp chất PPCPs được nghiên cứu.

2-QCA	Carbamazepine	Diclofenac	Lincomycin
Sulfamonomethoxine	Theophylline	Trimethoprim	Roxithromycin
Acetaminophen	Clarithromycin	Disopyramide	Sulfadimethoxine
Azithromycin	Crotamiton	Griseofulvin	Sulfamethoxazole
Caffeine	DEET	Levofloxacin	

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Hóa chất, chất chuẩn

Các chất chuẩn PPCP Sigma Aldrich

đều có độ tinh khiết cao. Dung môi sử dụng loại dùng cho sắc ký, các hóa chất khác thuộc loại tinh khiết phân tích của hãng Merck. Các dung dịch chuẩn

PPCPs dùng để tối ưu hoá có nồng độ 1 mg/L. Nước deion có điện trở 18,2 MΩ.cm.

2.2. Thiết bị

Thiết bị sắc ký lỏng hai lần khối phổ gồm: máy sắc ký lỏng Agilent 1260 Infinity (LC) ghép nối khối phổ với đầu

- Chế độ ion hoá chùm điện tử dương (ESI+) sử dụng khối phổ đầu dò ba tứ cực Agilent 6420.

- Nebulizer: 35 psig.

- Gas flow: 11 L/phút.

- Capillary: 4000 V.

- Gas Temp: 350 °C.

- Fragmentor voltage: (30 ÷ 270) V.

- Collision Energy: (5 ÷ 40) V.

Các thông số MS cần tối ưu là năng lượng phân mảnh (Fragmentor) và năng lượng va chạm (Collision Energy).

2.3.2 Tối ưu hóa điều kiện chạy LC

2.3.2.1 Pha tĩnh

Theo bản chất của các chất cần phân tích, các chất PPCPs trong nghiên cứu này là các chất phân cực nên cột tách cần sử dụng là cột tách pha đảo (RP). Cột RP Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 (4,6 mm x 100 mm x 3,5µm) hãng Agilent được sử dụng trong nghiên cứu này.

2.3.2.2 Pha động

Hệ pha động thường được sử dụng là các dung môi phân cực hoặc phân cực trung bình như methanol, acetonitrile, nước với axit formic từ 0 đến 1%, hoặc amoni acetate từ 0 tới 1%. Khảo sát các thành phần pha động khác nhau gồm hệ A (acetonitrile / nước tinh khiết với 0,1% axit formic); và hệ B (methanol / nước tinh khiết với amoniacetat 2 mM) với tỷ lệ khác nhau. Cả các thành phần pha động này đều có thể sử dụng làm pha động để phân tích các chất PPCPs. Sau khi khảo sát các thông số hệ pha động và tốc độ dòng, chúng tôi thu được các điều kiện tối ưu sau:

Tối ưu hoá không dùng cột sắc ký:

- Pha động: 50% MeOH và 50% H₂O

dò ba tứ cực Agilent 6420 Triple Quad LC/MS (QQQ).

2.3 Điều kiện tối ưu hóa

2.3.1 Tối ưu hóa điều kiện chạy MS

Các điều kiện cài đặt cho khối phổ (MS) để tối ưu hoá ở chế độ có cột và không dùng cột là giống nhau:

- Cell Accelerator Voltage: 7 V.

- Polarity: Positive.

- Scan Type: MRM.

- Dwell time: 200 msec.

- Delta EMV(+): 100.

- Delta EMV(-): 0.

với 2 mM NH₄COOH;

- Tốc độ dòng: 0,4 mL/phút;

- Thể tích bơm mẫu: 10µL.

Tối ưu hoá có dùng cột sắc ký:

- Cột sắc ký: Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 (4,6 mm x 100 mm x 3,5µm);

- Nhiệt độ cột: 40°C;

- Pha động: 95% MeOH và 5% H₂O với 2mM NH₄COOH;

- Tốc độ dòng: 0,5 mL/phút;

- Thể tích bơm mẫu: 10µL.

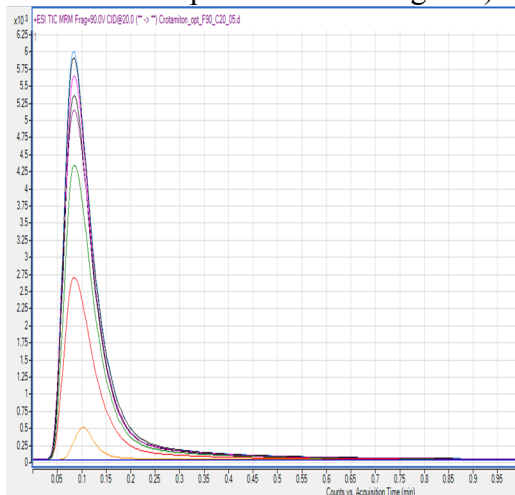
Các điều kiện tối ưu này được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Nghiên cứu này tập trung vào việc tối ưu hoá các điều kiện chạy khối phổ (MS) đặc biệt là tối ưu hai thông số quan trọng nhất trong việc định tính và định lượng các hợp chất PPCPs là năng lượng phân mảnh (Fragmentor) và năng lượng va chạm (Collision Energy), sau đây ký hiệu là năng lượng F và năng lượng CE. Năng lượng F là điện áp tối ưu đặt vào buồng va chạm khi các ion đi qua tứ cực thứ nhất (MS1) để tạo ra được Ion mẹ (Precursor Ion) tức là mảnh ion chính lớn nhất. Năng lượng CE là điện áp tối ưu đặt vào buồng va chạm khi các ion mẹ đi qua tứ cực thứ 2 và 3 (MS2) để tạo ra các ion con (Product Ion). Các ion mẹ và ion con

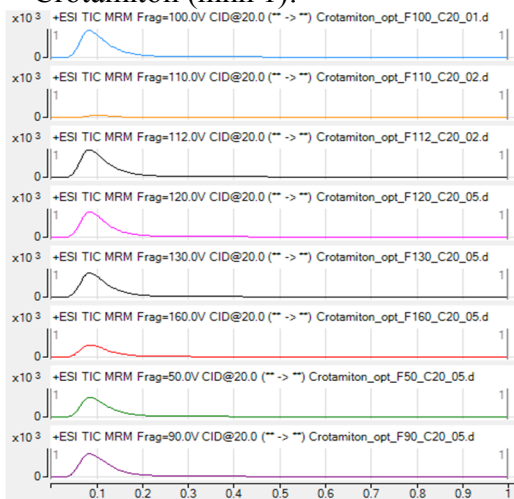
này có mảnh phổ đặc trưng với từng hợp chất nhằm giúp việc phân tích định tính và định lượng được chính xác.

Quá trình tối ưu hoá được chia làm 2 bước. Bước đầu tiên là tối ưu hoá năng lượng phân mảnh (F) đối với từng hợp chất được nghiên cứu để tìm được tín hiệu lớn nhất cho ion mẹ mà đặc trưng là các phân tử proton hoá. Mỗi hợp chất được phân tích riêng bằng cách sử dụng phần mềm tối ưu hoá tự động (MassHunter Optimizer của Agilent)



kiểm tra năng lượng F tại mỗi điện thế trong khoảng từ 30V đến 250V, mỗi bước nhảy 5V với các điều kiện khác được giữ cố định trong suốt quá trình kiểm tra (Agilent Technologies, 2010 [6]). Các dữ liệu thu được lại được lựa chọn để tối ưu hoá bằng tay để lựa chọn được giá trị năng lượng F tối ưu nhất cho tín hiệu mẫu lớn nhất.

Dưới đây là kết quả việc tối ưu hóa năng lượng phân mảnh (F) của chất Crotamiton (hình 1):

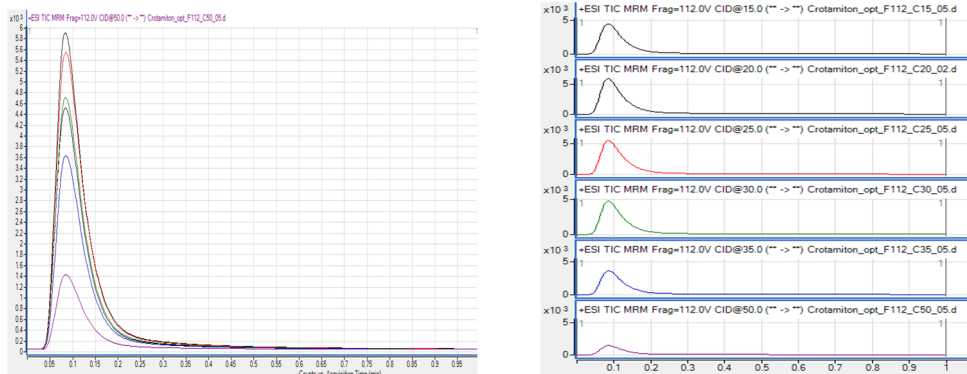


Hình 1: Các tín hiệu (peak) thu được của Crotamiton khi khảo sát năng lượng F từ 50V đến 130V.

Các peak thu được trong quá trình khảo sát năng lượng F của Crotamiton từ 50V đến 130V cho thấy tín hiệu thu được đạt cực đại tại 120V, sau đó nếu tiếp tục tăng năng lượng F thì cường độ tín hiệu lại giảm. Điều này cho thấy năng lượng F tối ưu để phân mảnh ion của Crotamiton là 120V.

Quá trình tối ưu hoá sau khi đã tìm được năng lượng phân mảnh tối ưu được tiếp tục bước thứ 2 là khảo sát

năng lượng va chạm CE. Tương tự như ở bước 1, để tìm được năng lượng CE tối ưu mỗi hợp chất được phân tích bằng phần mềm tối ưu hoá tự động tại mỗi điểm điện thế CE từ 5V đến 50V, mỗi bước nhảy 5V với các điều kiện khác được giữ cố định. Các dữ liệu thu được sau đó được tiếp tục tối ưu hoá bằng tay để tìm được năng lượng CE tối ưu nhất cho tín hiệu lớn nhất.



Hình 2: Các tín hiệu (peak) thu được của Crotamiton khi khảo sát năng lượng CE từ 5V đến 50V.

Các tín hiệu thu được từ quá trình khảo sát năng lượng CE của Crotamiton trong khoảng từ 5V đến 50V cho thấy tín hiệu thu được lớn nhất ứng với năng lượng CE là 20V.

Sau khi tối ưu hoá các hợp chất PPCPs và tìm được năng lượng F và năng lượng CE tối ưu. Các hợp chất này được phân tích lần lượt với hệ thống sắc ký lỏng ghép nối khối phổ LC/QQQ có dùng cột sắc ký Agilent Zorbax Eclipse

Plus C18 để kiểm tra lại các điều kiện chạy và năng lượng đã khảo sát có tối ưu khi dùng với cột sắc ký. Ngoài ra việc sử dụng cột sắc ký C18 cũng là để khảo sát khả năng tách chất và thời gian lưu của mỗi hợp chất khi đi qua cột sắc ký.

Tương tự như vậy, kết quả tối ưu hoá của các hợp chất PPCPs trong nghiên cứu này được thể hiện trong bảng 2.

Bảng 2: Năng lượng F và năng lượng CE đã tối ưu của các hợp chất PPCPs.

Hợp chất	ESI	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Fragmentor (V)	CE (V)
2-QCA	+	175.0	128.9	130	15
Acetaminophen	+	152.0	109.8	100	16
Azithromycin	+	749.5	591.4	130	30
Caffeine	+	195.0	137.7	130	10
Carbamazepine	+	237.1	194.0	100	20
Clarithromycin	+	748.9	157.9	150	30
Crotamiton	+	204.1	68.7	120	20
DEET	+	192.1	118.8	100	10
Diclofenac	+	296.1	214.2	100	28
Disopyramide	+	340.2	239.0	120	10
Griseofulvin	+	353.1	214.9	100	10
Levofloxacin	+	362.1	317.8	130	10
Lincomycin	+	407.2	125.8	130	28
Roxithromycin	+	837.8	158.1	150	35
Sulfadimethoxine	+	311.0	155.8	130	10
Sulfamethoxazole	+	254.0	155.9	100	10
Sulfamonomethoxine	+	281.0	155.7	250	18
Theophylline	+	181.5	123.9	250	10
Trimethoprim	+	291.0	229.8	130	20

4. KẾT LUẬN

Như vậy áp dụng phương pháp tối ưu hoá này cho tất cả các hợp chất PPCPs được nghiên cứu còn lại sẽ thu được những giá trị năng lượng F và năng lượng CE tối ưu cho từng hợp chất. Với các điều kiện tối ưu về năng lượng và phân tích, kết quả thu được là rất khả quan khi áp dụng cho tất cả các hợp chất PPCPs còn lại để xác định định tính và định lượng. Tín hiệu thu được có cường độ lớn và rõ nét ngay tại các nồng độ mẫu nhỏ giúp cho việc định lượng các chất đạt độ chính xác và tin cậy cao.

Việc tối ưu hoá được các điều kiện chạy hệ thống sắc ký lỏng ghép nối khối phổ để phân tích định tính và định lượng các hợp chất PPCPs cũng mở ra khả năng nghiên cứu và phân tích đối với các mẫu nước tại các sông ngòi, các nguồn nước đầu vào và đầu ra tại các nhà máy xử lý nước sinh hoạt, nước thải đầu ra tại các khu công nghiệp sản xuất các sản phẩm dược phẩm và các sản phẩm chăm sóc sức khỏe cá nhân tại Việt Nam... Kết quả phân tích các hợp chất PPCPs có thể dùng để xác định và quản lý nguồn phát thải nhằm tránh gây ô nhiễm nguồn nước và ảnh hưởng tới sức khỏe con người.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Managaki S, Murata A, Takada H, Tuyen BC, Chiem NH. *Distribution of macrolides, sulfonamides, and trimethoprim in tropical waters: ubiquitous occurrence of veterinary antibiotics in the Mekong Delta*. Environ Sci Technol

2007;41:8004–10.

- [2] Satoshi managaki., Environ. Sci. Technol. 2007. *Distribution of Macrolides, Sulfonamides, and Trimethoprim in Tropical Waters: Ubiquitous Occurrence of Veterinary Antibiotics in the Mekong Delta*.
- [3] Tuan Xuan Le, Yukihiko Munekage (2004), “Residues of selected antibiotics in water and mud from shrimp ponds in mangrove areas in Viet Nam”, Marine Pollution Bulletin 49 (2004) 922–929.
- [4] Mira Petrovic, Maria Dolores Hernando, M. Silvia Diaz-Cruz, Damia Barcelo, “Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: a review”, Journal of Chromatography A., 1067, 1-14, (2005).
- [5] Imma Ferrer, E. Michael Thurman, Jerry Zweigenbaum, “EPA Method 1694: Agilent’s 6410A LC/MS/MS solution for pharmaceuticals and personal care products in water, soil, sediment, and biosolids by HPLC/MS/MS”, Agilent Technologies Inc., 5989-9665EN (2008).
- [6] Agilent Technologies, “MassHunter optimizer software for automated MRM method development using the Agilent 6400 Series Triple Quadrupole Mass Spectrometers”, 5990-5011EN (2010).