

# Nghiên cứu điều kiện phân tích các sulfamid bằng phương pháp sắc ký

Bùi Minh Thái

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên;  
Khoa Hóa học; Chuyên ngành : Hóa phân tích; Mã số: 60 44 29;  
Người hướng dẫn: PGS.TS Nguyễn Văn Ri  
Năm bảo vệ: 2011

**Abstract:** Tối ưu hoá các điều kiện tách và định lượng đồng thời năm chất bằng HPLC: Chọn bước sóng của detector; Chọn pha tĩnh; Tối ưu hoá pha động: pH, thành phần, tốc độ...; Khảo sát khoảng tuyến tính, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng; Đánh giá độ lặp lại và độ đúng của phép đo. Tối ưu hoá các điều kiện xử lý mẫu phân tích: Chọn phương pháp xử lý mẫu và xác định hiệu suất thu hồi. Xây dựng quy trình phân tích và ứng dụng quy trình nghiên cứu để phân tích một số mẫu tôm.

**Keyword:** Phương pháp sắc ký; Hóa phân tích; Sulfamid; Chất kháng sinh; Tôm

## Content.

Dư lượng kháng sinh trong thực phẩm hiện là vấn đề quan ngại của hầu hết các cơ quan kiểm soát thực phẩm trên thế giới. Một số loại kháng sinh thông thường (chloramphenicol, malachite green, metronidazole...) bản thân nó có thể gây ra tác động có hại cho sức khỏe người tiêu dùng, một số loại khác như các kháng sinh nhóm nitrofurans qua quá trình trao đổi chất trong cơ thể động vật có thể sinh ra những hợp chất có độc tính cao đối với cơ thể sống. Họ thuốc kháng khuẩn Sulfamid (SAs) là nhóm kháng khuẩn có hoạt phổ rộng, được sử dụng nhiều trong nuôi trồng, chế biến nông thủy sản, v.v..

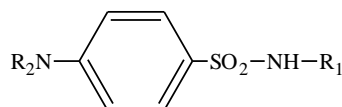
Dựa trên thực tế đó, trong luận văn này, chúng tôi tiến hành nghiên cứu các điều kiện tách và xác định đồng thời chất kháng sinh metronidazole và các sulfamid như sulfaguanidine, sulfamethoxazone, sulfamethoxypyridazine, sulfadoxin bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) ghép nối detector UV – Vis, phương pháp này có độ chọn lọc, độ nhạy tốt và được trang bị ở nhiều cơ sở kiểm nghiệm của nước ta, có tính khả thi và ứng dụng vào thực tế

## Chương 1 - TỔNG QUAN

### 1.1. Giới thiệu chung về sulfamid (SAs), metronidazole(MTD)

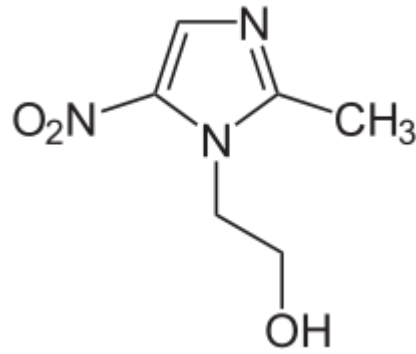
#### 1.1.1. Cấu trúc phân tử

Họ SAs có cấu trúc phân tử tổng quát:



Khi thay thế các nhóm  $R_1$ ,  $R_2$  bằng các gốc khác nhau, chúng ta có các SAs khác nhau. Vì thế có cả một họ SAs.

Cấu trúc Metronidazole(MTD):



Là một thuốc kháng sinh thuộc họ nitroimidazole sử dụng đặc biệt đối với vi khuẩn kỵ khí và động vật nguyên sinh. MTD là một trong những thành phần có mặt trong thức ăn chăn nuôi, thuốc kháng sinh trong nuôi trồng thủy sản (với tên thương mại là Enro DC).

### 1.1.2. Tính chất vật lý và hoá học của các Sulfamid, Metronidazole

#### 1.1.2.1. Tính chất vật lý

SAs ở dạng tinh thể màu trắng hoặc vàng nhạt, không mùi, thường ít tan trong nước, tan trong dung dịch axit, tan trong dung dịch kiềm (trừ sulfagu-anidin).

MTD là tinh thể hoặc bột kết tinh, hơi vàng, không mùi, bền ngoài không khí, sẫm màu dần khi tiếp xúc với ánh sáng. Nóng chảy ở khoảng 159°C – 163°C. Metronidazol khó tan trong nước, aceton.

#### 1.1.2.2. Tính chất hoá học

- SAs có tính chất lưỡng tính
- SAs tạo muối phức kết tủa với ion  $Ag^+$ , và tạo phức màu kết tủa với ion  $Cu^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ , ...
- Ở nhóm amin bậc một của SAs có đôi điện tử tự do, giúp SAs thực hiện phản ứng tạo phức chuyển điện tích với phenosafranine (PSF) cho phức màu tím có bước sóng hấp thụ cực đại ở 270-273 nm.

- Nhóm amin thơm tự do cho phản ứng diazo hoá, rồi ngưng tụ với       naphthol ~~chức năng~~ azoic màu đỏ cam hấp thụ ở bước sóng 460nm.

### 1.1.3. Tính chất dược lý và phổ tác dụng của Sulfamid, Metronidazole

Với liều điều trị, SAs không diệt vi khuẩn, chỉ làm vi khuẩn yếu đi, không phát triển và sinh sản được, dễ bị bạch cầu tiêu diệt.

SAs có phổ tác dụng và hoạt phổ rộng: tác dụng lên nhiều vi khuẩn than, vi khuẩn tả, Shigella, E.coli, trực khuẩn

Metronidazole cũng có hoạt phổ rộng bao gồm động vật nguyên sinh và các vi khuẩn yếm khí bao gồm: nhóm Bacteroides (gồm cả B. fragilis), Fusobacterium Veillonella, nhóm Clostridium (bao gồm cả C. difficile và C. perfringens), Eubacterium, Peptococcus, Peptostreptococcus. Nó là hiệu quả đối với B. fragilis phân lập kháng với clindamycin..

### 1.1.4. Cơ chế tác dụng kháng khuẩn của Sulfamid, Metronidazole

#### 1.1.4.1. Cơ chế kháng khuẩn của SAs

- Ức chế enzym chuyển hóa acid folic
- Ngăn cản tổng hợp axit folic của vi khuẩn

#### 1.1.4.2. Cơ chế kháng khuẩn của Metronidazole

Metronidazole tác dụng lên vi khuẩn kỵ khí như *Helicobacter pylori* và *Gardnerella vaginalis*, nhưng cơ chế của hành động này là chưa được hiểu rõ. Tuy nhiên, hoạt động của nó chống lại vi khuẩn kỵ khí bắt buộc xảy ra thông qua một quy trình bốn bước:

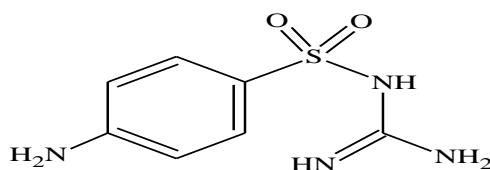
- Tấn công vào vi sinh vật
- Làm suy giảm hoạt hóa bởi sự vận chuyển protein trong tế bào:
- Giảm tương tác tiêu phân trung gian với tế bào - các tiêu phân trung gian độc tương tác với DNA chủ, dẫn đến vỡ sợi DNA và phá hủy chuỗi AND.
- Sự phá vỡ của các sản phẩm trung gian gây độc tế bào - các tiêu phân trung gian độc hại phân hủy thành sản phẩm cuối cùng không hoạt động.

### 1.1.5. Một số chế phẩm của Sulfamid tiêu biểu

Như ta đã biết, các SAs có cả một họ gồm hàng nghìn chất, với những tính chất và công dụng khác nhau. Vì vậy, chúng tôi chỉ đi sâu vào bốn SAs sẽ được nghiên cứu trong luận văn này.

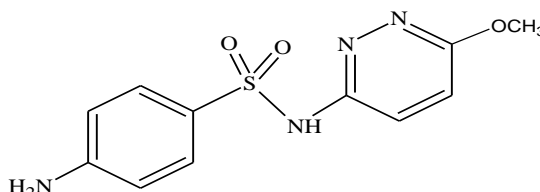
#### 1.1.5.1. Sulfaguanidin (SGU)

**Công thức:**



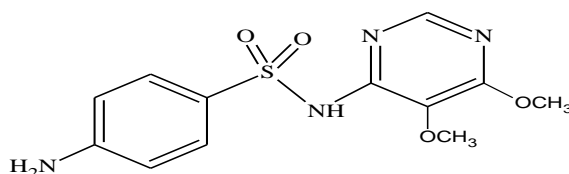
#### 1.1.5.2. Sulfamethoxypyridazin (SMP)

**Công thức:**



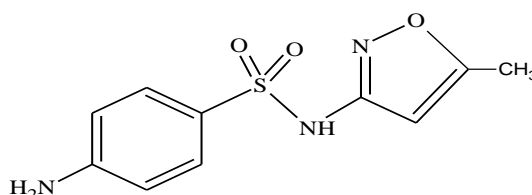
#### 1.1.5.3. Sulfadoxin (SDO)

**Công thức:**



#### 1.1.5.4. Sulfamethoxazol (SMX)

**Công thức:**



## **1.2. Phương pháp xác định**

### **1.2.1. Một số công trình nghiên cứu xác định SAs bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)**

Theo tiêu chuẩn ngành TCN 196: 2004 [8], qui định phương pháp xác định hàm lượng nhóm chất SAs (gồm: sulfadiazin, sulfathiazol, sulfamerazin, sulfamethazin, sulfamethoxypyridazine, sulfachloropyridazin, sulfadoxin, sulfamethoxazone, sulfadimethoxin và sulfa-chinoxalin) trong sản phẩm thủy sản bằng HPLC- detector huỳnh quang

Năm 2010 Cheong và cộng sự [12] đã xác định dư lượng 4 SAs (Sulfadiazine (SDZ), Sulfamethazine (SMZ), Sulfamethoxazole (SMX) và Sulfaquinoxaline (SQX)) trong gan gà sử dụng phương pháp HPLC pha đảo, detector UV tại bước sóng 266nm.

PVinas, C.Lopez Erroz, N.Campillo, M.Hernandez xác định dư lượng sulfamid (sulfadiazine, sulfathiazole, sulfapyridine, sulfamerazine, sulfamethazine, sulfamethizole, sulfamethoxypyridazine, sulfachloropyridazine, sulfamonomethoxine, sulfamethoxazole, sulfadimethoxine) trong thực phẩm bằng phương pháp HPLC với dẫn xuất hóa huỳnh quang sau cột.

### **1.2.2. Một số công trình nghiên cứu xác định Metronidazole bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)**

HPLC là phương pháp mới được ứng dụng để xác định Metronidazole trong những năm gần đây.

Năm 2005, Ticiano Gomes Nascimento và cộng sự sử dụng HPLC – UV xác định đồng thời ranitidine và metronidazole trong huyết tương.

Năm 2007 Naser Tavakoli và cộng sự cũng đã sử dụng HPLC để xác định đồng thời metronidazole và amoxicillin.

Năm 2008 Hadir M. Maher và cộng sự [đã xác định dư lượng đồng thời metronidazole và spiamycin trong cá sử dụng phương pháp HPLC –UV.

### **1.2.3. Một số công trình nghiên cứu xác định đồng thời các sulfamid và metronidazole bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC**

Năm 2002, Richard Lindberg và cộng sự đã xác định đồng thời các chất kháng sinh thuộc các họ sau: fluoroquinolones, sulfamid, trimethoprim, - $\beta$  lactam (penicillin và cephalosporines), nitroimidazoles và tetracycline trong nước thải bệnh viện. Phương pháp phân tích là HPLC – MS.

Năm 2007, Wang P, Li J, Zheng H đã xác định đồng thời 7 sulfamid (sulfacetamide, sulfapyridine, sulfamerazine, sulfamethazine, sulfamater, sulfamonomethoxine, sulfamethoxazole) và metronidazole, chloramphenicol trong mỹ phẩm bằng sắc ký HPLC-PDA

## 2 - ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Đối tượng, mục tiêu và nhiệm vụ nghiên cứu

#### 2.1.1. Đối tượng và mục tiêu nghiên cứu

Ở Việt Nam nuôi tôm đã trở thành hoạt động quan trọng nhất và được xem là mục tiêu chủ yếu của kế hoạch phát triển nuôi trồng thủy sản. Sự phát triển nhanh chóng của nghề nuôi tôm dẫn đến tình hình sử dụng thuốc và hóa chất cũng gia tăng. Họ thuốc kháng khuẩn SAs, MTD là nhóm có hoạt phổ rộng, được sử dụng nhiều trong chăn nuôi tôm để phòng ngừa và chữa nhiều loại bệnh nhiễm khuẩn cho vật nuôi. Sau khi vật nuôi đã sử dụng các chất đó, nếu không đảm bảo thời gian cách ly để vật nuôi tự làm sạch thì sẽ có tồn dư chất kháng khuẩn có thể gây tổn hại cho sức khỏe người tiêu dùng.

Vì vậy đối tượng phân tích mà chúng tôi chọn để nghiên cứu là Metronidazole sulfaguanidin(SGU), sulfamethoxypyridazon(SMP), sulfadoxim(SDO), sulfamethoxazon (SMX), đều là các chất của họ kháng khuẩn SAs được sử dụng nhiều trong chăn nuôi. Xuất phát từ yêu cầu này, chúng tôi lựa chọn phương pháp nghiên cứu là phương pháp HPLC hấp phụ pha ngược, detector ghép nối là detector UV-Vis.

#### 2.1.2. Nhiệm vụ nghiên cứu

Với mục tiêu trên, trong luận văn này chúng tôi nghiên cứu tách và xác định đồng thời các SAs, MTD bằng HPLC sử dụng cột chiết pha ngược dùng detector UV-Vis.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

Trong luận văn này đối tượng phân tích là các mẫu tôm, có thành phần nền rất phức tạp. Vì vậy chúng tôi chọn phương pháp HPLC (High Performance Liquid Chromatography - Sắc ký lỏng hiệu năng cao) để khảo sát các điều kiện tách và định lượng các chất.

#### 2.2.1. Nguyên tắc chung và trang bị của phương pháp HPLC

Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) là một kỹ thuật tách chất trong đó xảy ra quá trình các chất tan chuyển dịch trong cột tách có chứa các chất nhồi kích thước nhỏ, chất tan chuyển dịch với vận tốc khác nhau phụ thuộc vào hệ số phân bố của nó.

#### 2.2.2. Phân tích định lượng bằng HPLC

Trong điều kiện phân tích đã chọn, đại lượng đặc trưng cho một chất là thời gian lưu  $t_{Ri}$  của chất đó trên cột tách. Chúng ta có thể dựa vào thời gian lưu này để định tính được chất đó thông qua mẫu chuẩn. Sau đó dựa vào các tín hiệu phân tích thu được (chiều cao pic hoặc diện tích pic) để định lượng các chất. Thông thường trong phương pháp HPLC người ta biểu diễn quan hệ nồng độ chất phụ thuộc vào chiều cao pic hoặc diện tích.

$$H = k.C^b$$
$$S = k.C^b$$

Trong đó:

H - chiều cao pic sắc ký của chất

S - diện tích pic sắc ký của chất

k - hằng số của điều kiện thực nghiệm tách sắc ký

b - hằng số bản chất, nó nhận giá trị trong vùng:  $0 < b \leq 1$

### **2.3. Giới thiệu chung về phương pháp chiết pha rắn**

Khi lượng chất phân tích có trong mẫu quá nhỏ, bước làm giàu chất phân tích qua cột chiết pha rắn là rất cần thiết. Hơn nữa, mẫu thực phẩm là loại mẫu có nền rất phức tạp, ngoài chất phân tích còn có rất nhiều các chất béo khác nên cần phải chiết pha rắn để lấy các chất phân tích một cách định lượng từ dung dịch, loại tạp chất và thu hồi toàn bộ nó.

### **2.4. Hoá chất và dụng cụ**

#### **2.4.1. Hoá chất**

Sulfadoxin (SDO), sulfaguanidin (SGU), sulfamethoxypyridazine (SMP), sulfamethoxazon(SMX), metronozazol(MTD) tinh khiết 99.9% của Viện Kiểm nghiệm Dược Bộ y tế - Hai Bà Trưng, Hà Nội.

Metanol (MeOH), axetonitril (ACN), axit axetic, muối natri axetat loại tinh khiết HPLC của hãng Meck, Đức.

#### **2.4.2. Dụng cụ**

Máy quang phổ UV-Vis 8453 của hãng Agilent - Mỹ, điều khiển bằng phần mềm Chemstation cho phép quét phổ từ 190 – 1100 nm.

Máy đo pH TIM 800 của hãng Radiometer – Đan Mạch với điện cực thuỷ tinh Red – Rod cho phép đo pH và bù chính nhiệt độ tự động.

## Chương 3 - KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Khảo sát các điều kiện sắc ký

#### 3.1.1. Chọn bước sóng của detector

Từ quang phổ, chúng tôi thấy rằng các chất hấp thụ cực đại tại bước sóng không khác nhau nhiều và nằm trong khoảng 260-275nm. Riêng MTD hấp thụ cực đại tại 320nm. Vì vậy, để có bước sóng chung cho 5 chất chúng tôi chọn bước sóng 270nm cho các thí nghiệm tiếp theo. Đồng thời để định lượng chất MTD nhạy hơn, Detecto để 2 kênh 320nm và 270nm.

#### 3.1.2. Thăm dò khả năng tách của các Sulfamid trên cột RP-C18

Thời gian lưu được tính từ lúc nạp mẫu vào cột tách sắc ký cho đến lúc chất tan được rửa giải ra khỏi cột ở điểm có nồng độ cực đại.

*Bảng 3.2: Thời gian lưu và thứ tự ra pic của các chất phân tích*

TT	Thời gian lưu $t_{Ri}$ (phút)	Chất phân tích
1	3,30	SGU
2	4,48	MTD
3	8,49	SMP
4	13,23	SDO
5	15,08	SMX

Dựa vào việc khảo sát thời gian lưu đối với các chất phân tích chúng tôi biết được thời gian lưu cụ thể của từng chất làm cơ sở cho quá trình phát hiện định tính rồi định lượng các sulfamid, metronidazole trong các đối tượng nghiên cứu sau này.

### 3.2. Chọn pha tĩnh

Để nghiên cứu tách và xác định các SAs, MTD đa phần là chất phân cực do đó chủ yếu các công trình công bố đều sử dụng cột tách chứa chất nhồi pha đảo như RP- C<sub>4</sub>, RP – C<sub>12</sub> ....Cột RP – C<sub>18</sub> với kích thước hạt nhồi 5 $\mu$ m của hãng Sulpenco- Australia được chọn để tách các chất trên.

### 3.3. Tối ưu hoá pha động

#### 3.3.1. Nồng độ đệm axetat của pha động

Các giá trị nồng độ dung dịch đệm được lựa chọn khảo sát trong khoảng 2 – 20mM. Khi thay đổi nồng độ dung dịch đệm thì hệ số dung tích của nó hầu như không thay đổi. Hơn nữa, nhìn trên sắc đồ thì nồng độ đệm không có sự ảnh hưởng rõ rệt tới khả năng tách và thời gian xuất hiện pic, diện tích pic sắc ký. Tại một nồng độ dung dịch đệm nhất định trong pha động hệ số dung tích của các chất phân tích có sự khác nhau rõ rệt, như vậy đã có sự tách tốt giữa các chất trong quá trình sắc ký. Với khoảng nồng độ đệm tiến hành khảo sát thì pic sắc ký đều rất sắc nét và riêng biệt. Dựa trên những nhận xét đó nồng độ dung dịch đệm thích hợp trong pha động được lựa chọn là 10mM.

#### 3.3.2. Độ pH cho dung dịch đệm axetat

pH càng cao thì khả năng tách 2 chất SMX và SDO kém (pH=5,5). pH thấp thì thời gian rửa giải lâu (pH=3,5). Tại giá trị pH = 4,5 các pic sắc ký có sự tách biệt rõ rệt hơn, pic cân đối và không mất nhiều thời gian xuất hiện pic sắc ký. Mặt khác, dựa trên đồ thị

nhận thấy ở pH này có sự khác nhau rõ rệt về hệ số dung tích của các chất phân tích. Như vậy, pH của pha động được chọn là 4,5 cho các thí nghiệm tiếp theo.

### 3.3.3. Tỷ lệ thành phần pha động

Khi tăng dần tỷ lệ thành phần trong pha động thì thời gian rửa giải chất ra khỏi cột nhanh hơn, hệ số dung tích gần nhau hơn, trên sắc đồ các chân pic sắc ký lại không tách biệt rõ ràng, ảnh hưởng đến diện tích pic sắc ký (ví dụ như tỷ lệ 30% ACN – 70% đệm). Tuy nhiên, nếu tỷ ACN thấp quá thì sẽ mất rất nhiều thời gian để rửa giải chất phân tích. Vì vậy, chúng ta nên chọn tỷ lệ sao cho thời gian rửa giải không quá nhanh, không quá chậm, pic rõ ràng. Với những nhận xét như vậy chúng tôi lựa chọn tỷ lệ pha động gồm 20% ACN – 80% là tỷ lệ phù hợp cho các thí nghiệm tiếp theo.

### 3.3.4. Tốc độ pha động

Khi tăng tốc độ pha động qua cột tách thì thời gian lưu của các SAs giảm, pic sắc ký xuất hiện gần nhau hơn. Tại tốc độ 1ml/phút cho khả năng tách khá tốt và không mất nhiều thời gian tách chất ra khỏi cột. Do đó tốc độ pha động là 1ml/phút được chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.

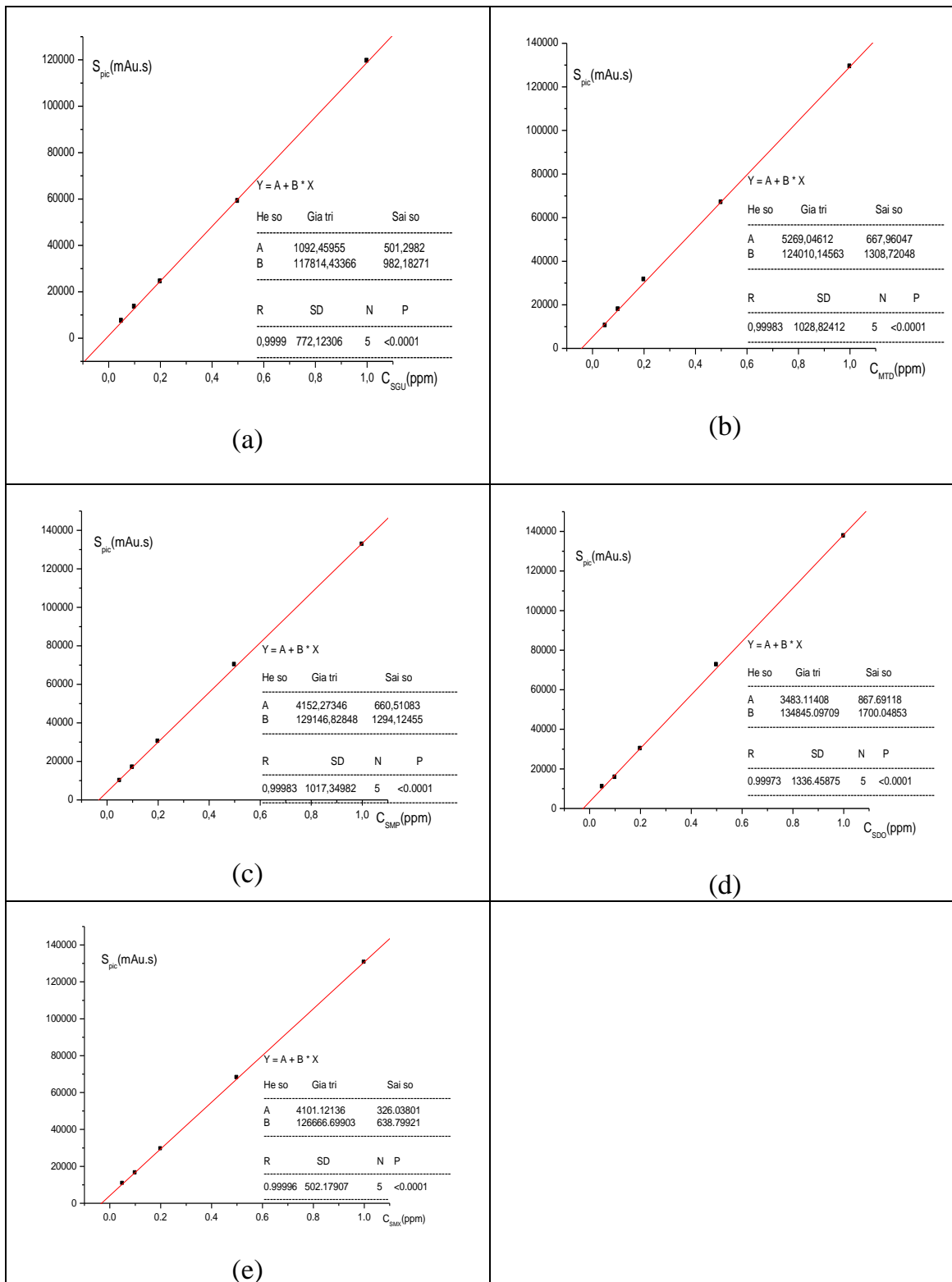
## 3.4. Đánh giá phương pháp phân tích

### 3.4.1. Khảo sát lập đường chuẩn trong khoảng nồng độ 0,05 – 1,000ppm

Từ các điều kiện đã tối ưu ở trên, tiến hành khảo sát khoảng tuyến tính của phép đo với các điều kiện sau:

Pha tĩnh:	RP – C <sub>18</sub> (25cm×4,6cm; 5μm)
Pha động:	20% ACN- 80% đệm axetat 10mM (pH=4,5)
Tốc độ pha động:	1 ml/phút
Nhiệt độ cột tách:	30 <sup>0</sup> C
Detector:	UV: 270 nm, 320nm
Khoảng nồng độ	0,05ppm – 1,00 ppm
Phương pháp định lượng	Diện tích pic





Hình 3.12: Đường chuẩn của chất phân tích trong khoảng nồng độ 0,05 – 1,00ppm

- Đường chuẩn của Sulfaguanidine (SGU)
- Đường chuẩn của Metronizazol(MTD)
- Đường chuẩn của Sulfamethoxypyridazine (SMP)
- Đường chuẩn của Sulfadoxine (SDO)
- Đường chuẩn của Sulfamethoxazone (SMX)

### 3.4.2. Giới hạn phát hiện (LOD); Giới hạn định lượng (LOQ)

Bảng 3.9: LOD, LOQ tính theo phương trình hồi quy

Chất	Hệ số góc b	Độ lệch chuẩn	LOD (ppm)	LOQ (ppm)
SGU	117814,44	772,12	0,020	0,066
MTD	124010,14	1028,82	0,025	0,083
SMP	129146,83	1017,35	0,024	0,079
SDO	139792,32	1336,46	0,029	0,096
SMX	126666,70	502,18	0,012	0,040

### 3.4.3. Độ đúng, độ lặp lại của phép đo

Để đánh giá sai số của phép đo, chọn các mẫu phân tích có nồng độ nằm trong khoảng tuyến tính tại điểm đầu, điểm giữa và điểm cuối của khoảng tuyến tính đã khảo sát. Chúng tôi tiến hành chuẩn bị ba mẫu chuẩn có nồng độ 0,08; 0,4 và 0,8ppm với điều kiện tương tự như điều kiện khảo sát khoảng tuyến tính.

Qua bảng kết quả, phân tích và tính toán trên nhận thấy đối với dải nồng độ cao thì sai số nhỏ đối với các mẫu phân tích có nồng độ nhỏ thì sai số lớn. Theo lý thuyết thống kê thì sai số cho phép nằm trong khoảng 15%, như vậy với khoảng nồng độ khảo sát thì độ chính xác của phép đo này được tin cậy.

## 3.5. Mẫu thực, quy trình xử lý và kết quả phân tích

### 3.5.1. Quy trình xử lý mẫu, xác định hiệu suất thu hồi

Trên cơ sở nghiên cứu những tài liệu liên quan đã công bố chúng tôi đã chọn được một phương pháp thích hợp để xác định hiệu suất thu hồi.

Trong khoảng nồng độ 0,2 – 0,4ppm, hiệu suất thu hồi metronidazole và các chất kháng khuẩn SAs đạt từ 71 – 90 %, hiệu suất thu hồi như vậy là đạt yêu cầu.

### 3.5.2. Phân tích mẫu thực

Các mẫu tôm (bò đầu, vỏ, chân, đuôi) chỉ lấy phần thịt, sau đó đông khô và được xử lý theo quy trình 3.19. Sau khi được dung dịch cuối cùng tiến hành phân tích theo phương pháp thêm chuẩn.

Với kết quả xác định trên cho thấy trong các mẫu tôm đều xuất hiện chất dư lượng kháng khuẩn SGU. Với giới hạn dư lượng sulfamid trong thịt thủy sản cho phép là 0,1ppm (theo thông tư số:29/2010/TT-BNNPTNT) thì các mẫu tôm mà chúng tôi phân tích đều vượt mức giới hạn. Với mẫu tôm sú, tôm lột dư lượng gấp 2 lần lượng cho phép. Không phát hiện thấy MTD, SMX, SDO, SMP (trừ tôm sú) trong các mẫu tôm.

## KẾT LUẬN

Trên cơ sở nghiên cứu các điều kiện thực nghiệm, nhằm ứng dụng kỹ thuật phân tích HPLC – UV-Vis để tách, xác định đồng thời metronidazole và một số sulfamid (SGU, SMP, SDO, SMX) trong một số loại tôm, chúng tôi thu được một số kết quả sau đây:

1. Đã chọn được các điều kiện tối ưu cho quá trình sắc ký:

- Cột tách RP - C18: 25 cm × 4,6 mm; 5 μm
- Detector UV-VIS: 2 kênh λ = 270 nm; λ = 320nm. Rise time = 0,1 s; Range = 0,01 AUFS

- Máy ghi: tốc độ giấy = 1 mm/phút; thế ghi = 10 mV
- Thành phần pha động: dung dịch đệm axetat (pH = 4,5) 10mM /aceto-nitril: 80/20 (v/v)
- Tốc độ pha động: 1 ml/phút.

## 2. Đã đánh giá phương pháp phân tích:

- Khoảng tuyến tính của các sulfamid: 0,05 – 1,00ppm
- Giới hạn phát hiện: 0,012 – 0,029 ppm
- Giới hạn định lượng: 0,040 - 0,096 ppm
- Hệ số biến thiên: 0,2% – 5% trong khoảng nồng độ 0,08- 0,8ppm.

## 3. Khảo sát mẫu thực

- Chọn quy trình xử lý mẫu thích hợp, hiệu suất thu hồi các chất phân tích trong mẫu tôm đạt từ 71 -90%.
- Xác định được dư lượng SGU trong mẫu tôm chân trắng:  $0,16 \pm 0,01$ ppm, tôm lột:  $0,21 \pm 0,03$ ppm, tôm rảo:  $0,12 \pm 0,02$ ppm, tôm sú :  $0,26 \pm 0,02$ ppm, dư lượng SMP trong tôm sú  $0,09 \pm 0,01$ ppm .
- Không phát hiện thấy MTD, SDO, SMX, SMP( trừ tôm sú) trong các mẫu tôm.

Từ các kết quả thu được, chúng tôi thấy phương pháp HPLC – Detector UV-Vis có độ nhạy cao, thích hợp cho phân tích đồng thời metronidazole và các chất kháng khuẩn SGU, SMP, SDO và SMX trong tôm.

Chúng tôi hy vọng những nghiên cứu trên sẽ góp phần vào việc ứng dụng kỹ thuật HPLC – UV-Vis nói riêng và các kỹ thuật HPLC nói chung để xác định metronidazole và các hợp chất thuộc họ sulfamid trong thực phẩm, nhằm phục vụ đắc lực cho các ngành khoa học và đặc biệt trong lĩnh vực vệ sinh an toàn thực phẩm, giúp bảo vệ sức khỏe cho con người.

## References :

### Tiếng việt

1. Chu Đình Bính, Phạm Luận, Nguyễn Thị Ánh Nguyệt, Nguyễn Phương Thanh (2007), “Xác định dư lượng các chất kháng khuẩn họ sulfamid trong thực phẩm bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 45(1B), tr 33 – 41.
2. Nguyễn Thị Kim Dung (2004), *Xác định sulfonamide trong thuốc bằng phương pháp hấp thụ nguyên tử*, Luận văn Thạc sĩ khoa học, Đại học Quốc gia Hà Nội.
3. Trần Đức Hậu, Nguyễn Đình Hiền, Thái Duy Thìn, Huỳnh Kim Thoa, Nguyễn Văn Thực (2006), *Hoá dược tập 2*, Bộ môn hoá dược, Đại học Dược, Hà Nội.
4. Nguyễn Thị Phương Linh (2006), *Xác định gián tiếp hàm lượng sulfamethoxazole trong thuốc bằng phép đo F-AAS*, Luận văn thạc sĩ khoa học, Đại học Quốc gia Hà Nội.
5. Phạm Luận (1998), *Cơ sở lý thuyết phân tích sắc ký lỏng hiệu năng cao*, Đại học Quốc gia Hà Nội.
6. Nguyễn Thị Ánh Nguyệt (2007), *Nghiên cứu tách và xác định đồng thời một số sulfamid trong thức ăn chăn nuôi và thực phẩm bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)*, Luận văn thạc sĩ khoa học, Đại học Quốc gia Hà Nội.

7. Nguyễn Văn Ri, Nguyễn Xuân Trung, Trần Tú Hiếu, Từ Vọng Nghi(2003), *Hóa học phân tích- Phần 2(Các phương pháp phân tích công cụ)*, Đại học Quốc Gia Hà Nội.
8. Tạ Thị Thảo (2005), *Thống kê trong hoá phân tích*, Đại học Quốc gia Hà Nội.
9. Tiêu chuẩn ngành (2004), *Sulfonamit trong sản phẩm thuỷ sản-Phương pháp định lượng bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao*, 28 TCN 196:2004
10. Vũ Cẩm Tú (2009), *Xác định các sulfamit trong mẫu Dược phẩm và thực phẩm bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao(HPLC)*, Khóa luận tốt nghiệp, Đại học Khoa học Tự nhiên.

## Tiếng Anh

11. A. V. Pereira, Q. B. Cass(2005), “High- performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in bovine milk using an on-line clean-up column”, *Journal of chromatography B*, 826, pp. 139- 146.
12. Cheong, C.K., Hajeb, P.Jinap, S. and Ismail-Fitry, M.R(2010), “Sulfonamides determination in chicken meat products from Malaysia”, *International Food Research Journal*,17, pp. 885-892.
13. Craig D.C. Salisbury, Jason C. Sweet, Roger Munro(2004), “ Determination of sulfonamide residues in the Tissues of food animals using automated precolumn derivatization and liquid chromatography with fluorescence detection”, *Journal of AOAC international*, 87( 5), pp.1264-1268.
14. D.G. Kennedy, R.J.McCracken, A.Cannavan, S.A.Hewitt (1998),“Use of liquid chromatography-mass spectrometry in the analysis of residues of antibiotics on meat and milk”. *Journal of chromatography A*, 812, pp.77-98.
15. Gertraud Suhren and W Heeschen(1993) “Detection of eight sulphonamides and dapsone in milk by a liquid chromatographic method”, *Analytica Chimica Acta*, 275, pp. 329-333.
16. Hadir M. Maher, Rasha M. Youssef, Riad H. Khalil and Sabry M. El-Bahr(2008), “ Simultaneous multiresidue determination of metronidazole and spiramycin in fish muscle using high performance liquid chromatography with UV detection ”, *Journal of Chromatography B*, 876(2), pp.175-181.
17. Han-Wen Sun, Feng-Chi Wang and Lian-Feng Ai(2007), “ Simultaneous determination of seven nitroimidazole residues in meat by using HPLC-UV detection with solid-phase extraction”, *Journal of Chromatography B*, 857(2), pp. 296-300.
18. Ivan Pecorelli, Rita Bibi, Laura Fioroni, Roberta Galarini (2004) ,“Validation of a confirmatory method for the determination of sulphonamides in muscle according to the European Union regulation 2002/657/EC”, *Journal of chromatography A*, 1032(1-2),pp. 23-29.
19. M. Brandtner, W. Hela, R. Widek, R. Suhuh (2003), “Determination of sulfonamides in animal tissues using cation exchange reversed phase sorbent for sample cleanup and HPLC-DAD for detection”, *Food Chemistry*, 83, pp 601-608.
20. Naser Tavakoli, Jaleh Varshosaz, Farid Dorkoosh and Mohammad R. Zargarzadeh (2007), “Development and validation of a simple HPLC method for simultaneous in vitro determination of amoxicillin and metronidazole at single wavelength”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 43(1), pp.325- 329

21. Naoto Furusawa(2000), “Simplified determining procedure for routine residue monitoring of sulphamethazine and sulphadimethoxine in milk”. *Journal of chromatography A*, 898, pp.185 – 191.
22. P.Vinas, C.Lopez Erroz,N.Campillo, M.Hernandez(1996), “ Determination of sulphonamides in foods by liquid chromatography with postcolumn fluorescence derivatization”, *Journal of Chromatography A*, 726(1-2), pp.125-131.
23. Qiong-Hui Zou, Xiang-Feng Wang,Yuan Liu, Jin Wang, Jia Song, Hui Gao, Jie Han(2007), “ Determination of sulphonamides in animal tissues by high performance liquid chromatography with pre-column derivatization of 9-fluorenylmethyl chloroformate”, *Journal of Separation Science* ,[30\(16\)](#), pp. 2647–2655.
24. Richard Lindberg, Per-Åke Jarnheimer, Björn Olsen, Magnus Johansson and Mats Tysklind (2004), “Determination of antibiotic substances in hospital sewage water using solid phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry and group analogue internal standards”, *Chemosphere*,57(10) ,pp.1479 -1488.
25. Rodrigo H.M.M. Granja, Alfredo M. Montes Niño, Fernanda Rabone and Alessandro Gonzalez Salerno(2008), “A reliable high-performance liquid chromatograph with ultraviolet detection for the determination of sulfonamides in honey” , *Analytica Chimica Acta* , 613(1), pp. 116-119.
26. Ticiano Gomes do Nascimento, Eduardo de Jesus Oliveira and Rui Oliveira Macêdo(2005),” Simultaneous determination of ranitidine and metronidazole in human plasma using high performance liquid chromatography with diode array detection” , *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, [37\( 4\)](#), pp. 777-783.
27. Theresa A. Gehring, Bill Griffinb, Rod Williams , Charles Geiseker ,Larry G. Rushing , Paul H. Siitonen(2006), “ Multiresidue determination of sulfonamides in edible catfish, shrimp and salmon tissues by high-performance liquid chromatography with postcolumn derivatization and fluorescence detection”, *Journal of Chromatography B*, 840,pp.132–138.
28. W.M.A. Niessen(1998), “Analysis of antibiotics by liquid chromatography – mass spectrometry”. *Journal of chromatography A*, 812, pp. 53 – 75.
29. W. Hela’ , M. Brandtner, R. Widek and R. Schuh(2003), “ Determination of sulfonamides in animal tissues using cation exchange reversed phase sorbent for sample cleanup and HPLC–DAD for detection”, *Food Chemistry*,[83\(4\)](#), pp.601-608.
30. Xiaojia Huang, Dongxing Yuan, Benli Huang (2007) ,“Simple and rapid determination of sulfonamides in milk using Ether- type column liquid chromatography”, *Talanta* ,72 ,pp.1298 -1301.
31. Wang P, Li J, Zheng H.(2007), “ Simultaneous determination of seven sulfonamides and metronidazole and chloramphenicol in cosmetics by high performance liquid chromatography” , *Chineses journal of chromatography*, 25(5), pp.743-746.
32. Wikipedia, “the free encyclopedia (2005), sulfonamide (medicine)”. [http://en.wikipedia.org/wiki/Sulfonamide\\_\(medicine\)](http://en.wikipedia.org/wiki/Sulfonamide_(medicine)).
33. [Http://www.uptodate.com/contents/metronidazole-an-overview](http://www.uptodate.com/contents/metronidazole-an-overview).

