

# Tạo cột sắc ký ái lực miễn dịch gắn chloramphenicol

• **Nguyễn Đức Thịnh**

Viện Y tế Công cộng TP. HCM–Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG–HCM

• **Nguyễn Thị Nguyệt Thu**

• **Dương Ngọc Diễm**

Viện Pasteur TP.HCM

• **Chu Phạm Ngọc Sơn**

Trung tâm Sắc ký Hải đăng

• **Trần Linh Thuớc**

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG–HCM

( Bài nhận ngày 20 tháng 05 năm 2016, nhận đăng ngày 21 tháng 11 năm 2016)

## TÓM TẮT

Kháng thể thô kháng chloramphenicol (CAP) được gắn cộng hóa trị với gel Sepharose CL 4B-CNBr với các hàm lượng 5, 10 và 15 mg kháng thể/mL gel và được nhồi cột để tạo thành ba loại cột sắc ký ái lực miễn dịch gắn CAP tương ứng. Khảo sát khả năng gắn CAP của các cột sắc ký này với ba mức lượng CAP nạp vào cột là 0,5; 1 và 10 ng cho thấy cột chứa gel với hàm lượng 10 mg kháng thể/mL gel (cột IAC-CAP-10) có khả năng gắn trên 99 % lượng CAP trong mẫu ở 3 mức hàm lượng CAP khảo sát. Cột IAC-CAP-10 khi gắn kháng sinh CAP có độ biến thiên giữa các cột (CV %) là 5,18 % ở trường hợp lượng CAP nạp

cột là 1 ng và 1,98 % ở trường hợp lượng CAP nạp cột là 10 ng, dung lượng gắn CAP tối đa là  $153,37 \pm 10,32$  ng. Cột hoạt động ổn định trong thời gian hai năm bảo quản ở 4 °C. Việc kết hợp sử dụng cột IAC-CAP-10 với sắc ký lỏng ghép khối phổ LC MS/MS cho phép phân tích CAP với giới hạn phát hiện là 0,033 ng và giới hạn định lượng là 0,101 ng, đáp ứng yêu cầu về độ nhạy để kiểm tra tồn dư CAP trong thực phẩm. Cột IAC-CAP-10 cũng có thể gắn hai kháng sinh cùng nhóm với CAP là kháng sinh florfenicol và thiamphenicol với mức 90,73 % đối với florfenicol và 84,29 % đối với thiamphenicol.

**Từ khóa:** chloramphenicol, phương pháp phân tích chloramphenicol trong thực phẩm, cột sắc ký ái lực miễn dịch gắn chloramphenicol

## MỞ ĐẦU

Chloramphenicol (CAP) là kháng sinh có thể gây ung thư trên người thuộc Nhóm 2A theo phân loại của nhiều tổ chức quốc tế nên không được phép hiện diện trong thực phẩm [7]. Mặc dù vậy, hiện nay kháng sinh này vẫn được sử dụng trong chăn nuôi để điều trị và phòng ngừa các bệnh nhiễm trùng do vi khuẩn ở vật nuôi, dẫn đến nguy cơ về tồn dư CAP trong thực phẩm và là vấn đề đáng quan ngại đối với sức khỏe người tiêu dùng [3]. Hàm lượng CAP trong thực phẩm thường rất

thấp, cũng như nền mẫu cần phân tích là rất đa dạng, phức tạp. Vì vậy, bước tách chiết CAP từ mẫu có vai trò rất quan trọng đối với các phương pháp phân tích dư lượng kháng sinh CAP trong thực phẩm. Chiết tách pha rắn SPE (solid phase extraction) bằng cột C18 là phương pháp thường được sử dụng để chiết tách CAP trong các phương pháp phân tích CAP trong thực phẩm [8, 9, 11]. Bất lợi của cột C18 là độ chuyên biệt thấp do tính chất tương tác không chuyên biệt, nên chỉ cho kết

quả tốt trên một số nền mẫu như cá, tôm, thịt, sữa. Đối với các mẫu có chứa nhiều tạp chất như thức ăn gia súc hay chứa hàm lượng đường cao như mật ong, dịch tách chiết qua cột C18 còn chứa nhiều tạp chất trong mẫu gây khó khăn cho bước phân tích bằng sắc ký khối phổ tiếp theo. Để tăng tính chuyên biệt của pha rắn đối với CAP trong tách chiết pha rắn ứng dụng cho các mẫu thực phẩm phức tạp, cột polymer in dầu phân tử (MIP) chuyên biệt đối với CAP đã được phát triển và thương mại hóa trên thế giới, nhưng có giá thành cao [10].

Chúng tôi quan tâm đến việc phát triển một phương pháp chiết tách hiệu quả CAP từ các mẫu thực phẩm phức tạp dựa trên nguyên tắc miễn dịch sử dụng kháng thể kháng chuyên biệt CAP để kết hợp với phương pháp sắc ký lỏng ghép khối phổ LC/MS/MS nhằm phục vụ việc phân tích xác định tồn dư CAP trong thực phẩm đạt yêu cầu của các tiêu chuẩn quốc tế [2, 4]. Trong bài báo trước đây [13], chúng tôi đã báo cáo kết quả thực nghiệm tạo kháng thể thô kháng chuyên biệt CAP. Bài báo này, báo cáo kết quả chế tạo cột sắc ký ái lực miễn dịch phục vụ việc tách chiết chuyên biệt CAP bằng cách gắn kháng thể thô kháng CAP do chúng tôi chế tạo với gel Sepharose CL 4B-CNBr, khảo sát một số thông số kỹ thuật của cột sắc ký và bước đầu đánh giá giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng CAP ở hàm lượng thấp khi kết hợp sử dụng cột sắc ký này với sắc ký lỏng ghép khối phổ LC MS/MS.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Vật liệu

Các vật liệu, hóa chất chuẩn: chloramphenicol (Supelco-442513), thiamphenicol (Sigma-16715), florfenicol (Sigma-F1427), nhựa ái lực Sepharose CL-4B CNBr (GE Healthcare-17-043-01), Tris-HCl (Sigma-T3253),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Merck-1.06580),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck-104873), methanol (Merck-106007), cột SPE rỗng 1,5 mL (Grace-210001), miếng lọc cột SPE (Grace- 211401), nắp

đậy cột (Grace- 220000) và các hóa chất tinh khiết khác. Kháng thể thô kháng CAP tự chế tạo và tinh chế [13].

### Thiết bị thí nghiệm, phân tích

Hệ thống sắc ký lỏng ghép khối phổ LC MS/MS (bao gồm sắc ký lỏng Shimadzu UFLCXR kết nối với khối phổ Applied Biosystem API 5500), phần mềm Analyst phiên bản 1.5.1, các thiết bị cơ bản của phòng thí nghiệm.

### Tạo gel Sepharose cộng hợp kháng thể kháng CAP

1 gram Sepharose CL 4B-CNBr khô được làm trương nở trong 10 mL dung dịch HCl 0,001M; rửa gel lần lượt với 200 mL dung dịch HCl 1 mM và 200 mL dung dịch đệm 0,1 M  $\text{NaHCO}_3$ , pH 8,3. Bổ sung dung dịch kháng thể thô kháng CAP ở nồng độ nồng độ 5, 10, 15 mg/mL trong đệm 0,1 M  $\text{NaHCO}_3$ , pH 8,3 vào huyền phù gel Sepharose CL 4B-CNBr theo tỷ lệ thể tích 1:1; để 2 giờ ở nhiệt độ phòng. Rửa gel với lần lượt với 100 mL dung dịch đệm theo thứ tự 0,1 M  $\text{NaHCO}_3$ , pH 8,3; 0,1 M Tris-HCl pH 8,0 và 0,1 M Tris-HCl pH 8,0 có 0,5 M NaCl. Cuối cùng rửa và cân bằng gel với dung dịch đệm phosphate (PBS). Gel thu nhận được là gel Sepharose cộng hợp kháng thể kháng CAP (Sepharose-IgGCAP). Ba loại gel Sepharose-IgGCAP với hàm lượng kháng thể cộng hợp trên gel khác nhau là 5, 10, 15 mg kháng thể/mL gel được chế tạo và sử dụng trong nghiên cứu này [5].

### Tạo cột sắc ký ái lực miễn dịch gắn CAP

Gel Sepharose-IgGCAP được nhồi vào cột SPE rỗng 1,5 mL để tạo cột sắc ký ái lực miễn dịch gắn CAP. Tấm lọc cột SPE được rửa bằng ethanol và đặt vào đáy của ống. Huyền phù gel Sepharose-IgGCAP được nhồi vào cột với lượng 0,1 mL gel/cột, sau đó một tấm lọc khác được đặt lên trên mặt gel. Gel trong cột được cân bằng với đệm PBS. Cột sắc ký ái lực miễn dịch này gắn chuyên biệt CAP nên được đặt tên là cột IAC-CAP.

### Tách chiết CAP từ dung dịch mẫu bằng cột IAC-CAP và đánh giá khả năng gắn CAP của cột

Gắn cột IAC-CAP lên bộ chiết pha rắn, chỉnh áp suất hút của bơm chân không để tốc độ dòng qua cột khoảng 1 mL/ phút. Rửa cột IAC-CAP bằng 20 mL dung dịch đệm PBS. Nạp 20 mL dung dịch PBS chứa CAP vào cột với tốc độ dòng 1 mL/phút; rửa cột bằng 20 mL dung dịch PBS, sau đó tiếp tục rửa cột bằng 20 mL nước và tiếp tục hút chân không nhẹ cho cột khô hoàn toàn. Rửa giải CAP ra khỏi cột bằng cách nạp 0,5 mL methanol vào cột và lặp lại thao tác này thêm một lần nữa. Dung dịch methanol chứa CAP thu nhận được lọc qua màng lọc 0,45  $\mu$ m trước khi phân tích.

Để đánh giá khả năng gắn CAP của cột IAC-CAP, mỗi cột IAC-CAP được nạp 20 mL dung dịch đệm PBS chứa 0,5; 1 hoặc 10 ng CAP. Thực nghiệm được tiến hành với 2 cột trên mỗi nồng độ khảo sát. Thực hiện các bước chiết tách CAP và xử lý dung dịch methanol chứa CAP như trên. Chloramphenicol gắn trên cột IAC được rửa giải bằng dung dịch methanol và phân tích bằng sắc ký khối phổ LC MS/MS như được trình bày dưới đây. Khả năng gắn CAP được trình bày ở dạng % CAP định lượng được trong dung dịch methanol thu được từ quá trình rửa giải so với lượng CAP đã nạp vào cột.

Định lượng CAP bằng sắc ký lỏng khối phổ CAP được định lượng bằng hệ thống LC MS/MS với điều kiện phân tích gồm cột sắc ký Acclaim RSLC 150 x 2,1 mm đường kính hạt 2,2  $\mu$ m, pha động methanol:nước (50:50), tốc độ dòng 0,5 mL/phút, thể tích tiêm mẫu 5  $\mu$ L, chế độ chạy MRM cho CAP với các phân mảnh MRM 321 $\rightarrow$ 257 và phân mảnh 321 $\rightarrow$ 152 [1, 8, 12].

#### Đánh giá các thông số kỹ thuật của cột IAC-CAP-10

Độ lặp lại: chọn ngẫu nhiên 20 cột IAC-CAP-10, nạp vào 10 cột 20 mL dung dịch PBS chứa 1 ng CAP/cột và 10 cột còn lại 20 mL dung dịch

PBS chứa 10 ng CAP/cột. Tách chiết CAP, thu nhận CAP gắn vào cột và định lượng CAP bằng phương pháp LC MS/MS như trên. Độ biến thiên giữa các cột (CV %) được tính bằng cách lấy độ lệch chuẩn chia cho giá trị trung bình của 10 cột.

Dung lượng cột: khả năng gắn CAP tối đa của cột (dung lượng cột) được đánh giá bằng cách cho qua cột một lượng dư CAP (1000 ng/cột). Rửa hết phần CAP không gắn vào cột bằng 20 mL dung dịch PBS và tiếp theo là 20 mL nước. Dung ly và định lượng CAP gắn vào cột bằng phương pháp LC MS/MS. Tiến hành đánh giá trên 10 cột.

Độ ổn định: cột IAC-CAP-10 được bảo quản ở 4  $^{\circ}$ C trong hai năm. Trong thời gian này, định kỳ 3 tháng/lần chọn ngẫu nhiên 2 cột để đánh giá khả năng gắn CAP bằng cách nạp vào mỗi cột 20 mL dung dịch PBS chứa 100 ng CAP và đánh giá khả năng gắn CAP như được trình bày ở trên.

#### Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng CAP của phương pháp kết hợp cột IAC-CAP-10 với LC MS/MS

Nạp 20 mL dung dịch PBS chứa 0,5; 1; 2; 5; 10 ng CAP vào cột IAC-CAP-10. Thực hiện lặp lại 2 lần (hai cột) ở các trường hợp 1, 2, 5, 10 ng CAP; trường hợp 0,5 ng CAP thực hiện lặp lại 5 lần (năm cột). Rửa cột và dung ly CAP khỏi cột. Định lượng CAP bằng LC MS/MS. Vẽ đồ thị tương quan giữa lượng CAP nạp cột và diện tích đỉnh (peak) trên sắc ký đồ. Tính giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng theo phương pháp của Hubaux [6].

#### Khả năng gắn florfenicol và thiamphenicol của cột IAC-CAP-10

Nạp 20 mL dung dịch PBS chứa 100 ng florfenicol hoặc thiamphenicol vào mỗi cột IAC-CAP-10. Rửa cột, dung ly kháng sinh khỏi cột và định lượng kháng sinh bằng LC MS/MS. Tiến hành lặp lại với 5 cột ứng với mỗi loại kháng sinh.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Tạo gel Sepharose gắn kháng thể chống CAP và cột sắc ký ái lực miễn dịch gắn CAP

Kháng thể chống CAP (IgGCAP) được gắn cộng hóa trị vào gel Sepharose-CNBr thông qua nhóm amine bậc một trên phân tử kháng thể. Phản ứng cộng hợp được tiến hành ở pH 8,3 trong đệm bicarbonate để các nhóm NH<sub>2</sub> trên phân tử protein ở dạng không mang điện. Sau khi cộng hợp kháng thể lên gel, các nhóm phản ứng còn lại trên gel sẽ bị khóa bằng các phân tử có chứa nhóm NH<sub>2</sub> trong dung dịch đệm 0,1 M Tris-HCl pH 8 để tránh các phản ứng không đặc hiệu có thể xảy ra giữa gel và mẫu phân tích. Gel Sepharose-IgGCAP được bảo quản ở 4°C để giữ cho kháng thể có cấu hình tự nhiên. Lượng kháng thể IgGCAP gắn cộng hóa

trị lên gel là một thông số quan trọng đối với khả năng gắn CAP sau này của gel; mặt khác, kháng thể và gel ái lực đều đắt tiền, do vậy, cần xác định hàm lượng kháng thể trên một đơn vị dung tích gel cho hiệu quả gắn CAP cao nhất. Tham khảo thông tin hàm lượng tối ưu của protein gắn với gel ái lực là từ 5–10 mg protein/mL gel, chúng tôi đã thực hiện các phản ứng cộng hợp với các hàm lượng kháng thể trên một đơn vị dung tích gel là 5, 10 và 15 mg IgGCAP/ml gel. Các gel Sepharose-IgGCAP này được sử dụng để nhồi cột để tạo thành 3 loại cột sắc ký ái lực miễn dịch (IAC) dùng để gắn CAP là IAC-CAP-5 (5 mg IgGCAP/mL gel), IAC-CAP-10 (10 mg IgGCAP/mL gel) và IAC-CAP-15 (15 mg IgGCAP/mL gel) (Hình 1).



**Hình 1.** Cột sắc ký ái lực miễn dịch gắn CAP (cột IAC-CAP) đã chế tạo

### Đánh giá khả năng gắn CAP của cột IAC-CAP

Khả năng gắn CAP của các cột IAC-CAP được đánh giá bằng cách nạp 20 mL dung dịch PBS chứa CAP hàm lượng thấp ở mức 0,5; 1 và 10 ng qua cột, dung ly để thu nhận lại CAP đã được gắn lên cột, định lượng CAP thu nhận được và tính % CAP trong dung dịch mẫu đã gắn lên cột. Kết quả khảo sát cho thấy với tất cả ba trường hợp chứa CAP là 0,5; 1 và 10 ng CAP, hai cột IAC-CAP-10 và IAC-CAP-15 có khả năng gắn trên 93 % CAP trong dung dịch PBS ban đầu (khi phân tích với cặp ion 321/152) hoặc trên 95 % (khi phân tích với cặp ion 321/257) (Bảng 1). Khả năng gắn

CAP của cột IAC-CAP-5 là thấp hơn: trường hợp chứa 0,5 và 1 ng CAP, khả năng gắn là ở mức 71 – 74 % (cặp ion  $m/z$  321/257) hoặc 75 % (cặp ion  $m/z$  321/257); trường hợp chứa 10 ng CAP, cột này chỉ có thể gắn 65–66 % CAP trong mẫu. So sánh khả năng gắn CAP của 3 loại cột, cột IAC-CAP-10 có khả năng gắn trên 99 % lượng CAP trong dung dịch PBS ở 3 mức hàm lượng khảo sát. Do vậy cột IAC-CAP-10 được chọn cho các thí nghiệm tiếp theo để đánh giá các thông số kỹ thuật cần cho việc sử dụng để tách chiết CAP từ mẫu phục vụ mục đích phân tích CAP trong thực phẩm bằng sắc ký ghép khối phổ LC MS.

**Bảng 1.** Kết quả đánh giá khả năng gắn CAP của các cột IAC-CAP

Lượng CAP nạp vào cột (ng)	% CAP được gắn lên cột					
	Cặp ion $m/z$ 321/257			Cặp ion $m/z$ 321/152		
	Cột IAC-CAP-5	Cột IAC-CAP-10	Cột IAC-CAP-15	Cột IAC-CAP-5	Cột IAC-CAP-10	Cột IAC-CAP-15
0,5	74,5	103,0	95,9	71,0	98,7	95,0
1	74,8	103,0	95,4	73,7	103,0	93,8
10	65,4	98,7	96,8	66,3	99,8	97,2

**Đánh giá các thông số kỹ thuật của cột IAC-CAP-10.**

*Độ lặp lại*

Độ lặp lại của cột IAC-CAP-10 được đánh giá bằng cách sử dụng ngẫu nhiên 10 cột trong lô sản xuất cho mỗi trường hợp dung dịch PBS chứa 1 và 10 ng CAP. Kết quả (Bảng 2) cho thấy khả năng CAP của các cột tương đối đồng nhất: ở trường

hợp 10 ng CAP, lượng CAP được gắn lên cột thay đổi trong khoảng 8,89 - 9,51 ng, trung bình là  $9,24 \pm 0,18$  ng với độ biến thiên giữa các cột là CV % là 1,98; ở trường hợp 1 ng CAP, lượng CAP được gắn lên cột thay đổi trong khoảng 0,82–0,92 ng, trung bình là  $0,87 \pm 0,05$  ng, với độ biến thiên giữa các cột là CV % là 5,18 %. Ở mức lượng CAP là 1 và 10 ng, khả năng gắn CAP của các cột IAC-CAP-10 đều có biến thiên thấp hơn 10 %.

**Bảng 2.** Kết quả khảo sát độ lặp lại của khả năng gắn CAP của các cột IAC-CAP-10 (phân tích bằng cặp ion  $m/z$  321/152)

Cột số	Lượng CAP gắn lên cột (ng)		Cột số	Lượng CAP gắn lên cột (ng)	
	Mẫu 10 ng CAP	Mẫu 1 ng CAP		Mẫu 10 ng CAP	Mẫu 1 ng CAP
1	9,36	0,82	6	8,89	0,85
2	9,12	0,91	7	9,34	0,83
3	9,40	0,87	8	9,05	0,78
4	9,27	0,89	9	9,18	0,89
5	9,51	0,92	10	9,28	0,90
Trung bình (CV %), trường hợp 10 ng CAP			$9,24 \pm 0,18$ (1,98)		
Trung bình (CV %), trường hợp 1 ng CAP			$0,87 \pm 0,05$ (5,18)		

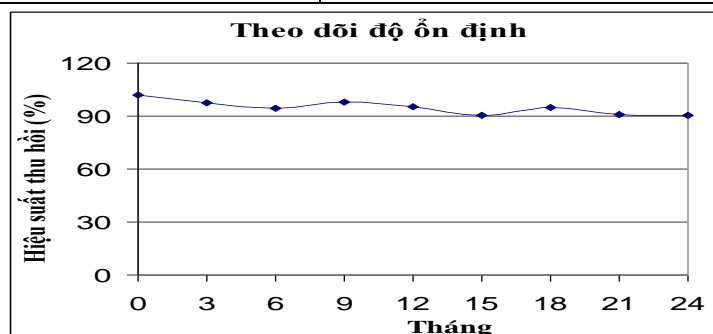
*Dung lượng gắn CAP*

Dung lượng gắn CAP của cột IAC-CAP là lượng CAP tối đa được gắn vào cột. Dung lượng gắn CAP của cột IAC-CAP-10 được xác định bằng cách cho nạp vào cột 1000 ng CAP và định lượng lượng CAP được gắn vào cột. Kết quả thực nghiệm

với 10 cột IAC-CAP-10 cho thấy cột IAC-CAP-10 gắn được tối đa  $153,37 \pm 10,32$  ng CAP (Bảng 3). Dung lượng này đảm bảo cho việc sử dụng cột IAC-chloramphenicol phân tích dư lượng chloramphenicol trong thực phẩm vì hàm lượng chloramphenicol tồn dư trong các mẫu kiểm tra thường thấp.

**Bảng 3.** Kết quả xác định dung lượng cột IAC-CAP-10

Cột số	Lượng CAP gắn lên cột (ng)	Cột số	Lượng CAP gắn lên cột (ng)
1	160,25	6	170,16
2	151,83	7	134,61
3	154,84	8	146,75
4	146,24	9	156,09
5	147,76	10	165,17
Trung bình lượng CAP gắn lên cột (ng)		153,37 ± 10,32	

**Hình 2.** Mức độ ổn định về khả năng gắn CAP của cột IAC-CAP-10 trong 2 năm bảo quản

#### Độ ổn định của cột

Khảo sát định kỳ 3 tháng/lần độ ổn định của khả năng gắn CAP của các cột IAC-CAP-10 được bảo quản trong thời gian 2 năm cho thấy khả năng gắn CAP (hiệu suất thu hồi) của cột là trên 90 %, chứng tỏ cột vẫn hoạt động tốt sau 2 năm bảo quản (Hình 2).

Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của phương pháp phân tích CAP kết hợp cột IAC-CAP-10 với sắc ký lỏng ghép khối phổ LC MS/MS

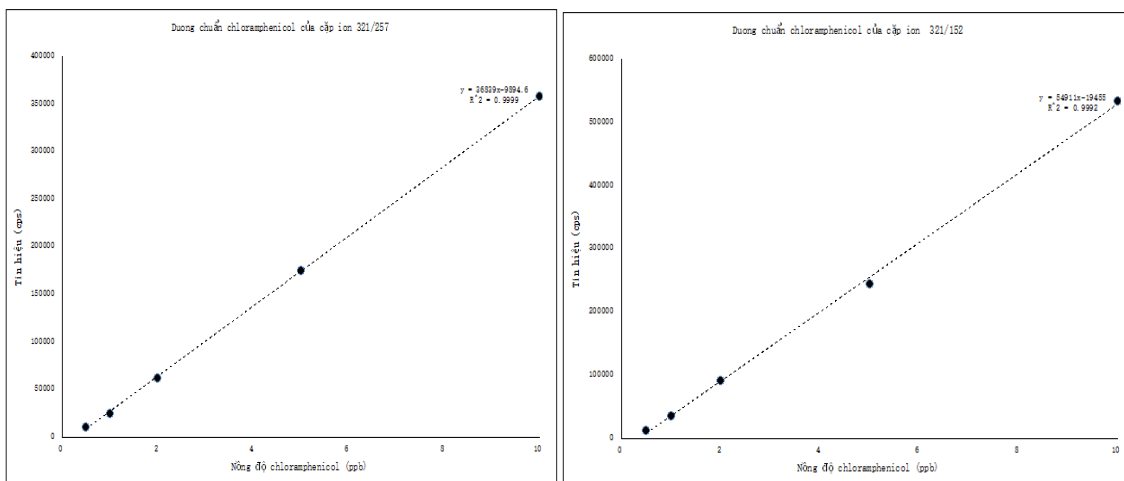
Cột IAC-CAP-10 được sử dụng kết hợp với sắc ký lỏng ghép khối phổ LC MS/MS để đánh giá giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của phương pháp kết hợp này theo yêu cầu của mục đích phân tích tồn dư CAP trong thực phẩm bằng sắc ký ghép khối phổ LC MS. Bảng 4, Hình 3 và Hình 4 trình bày kết quả phân tích dung dịch PBS chứa lượng CAP ở các mức 0,5; 1; 2; 5; 10 ng. Dung dịch mẫu được nạp lên cột IAC-CAP-10 để thu nhận CAP và CAP được phân tích bằng sắc ký lỏng ghép khối phổ LC MS/M.

**Bảng 4.** Thời gian lưu và diện tích đỉnh của sắc ký đồ LC MS/MS phân tích CAP thu nhận từ cột IAC-CAP-10 được nạp lượng CAP khác nhau.

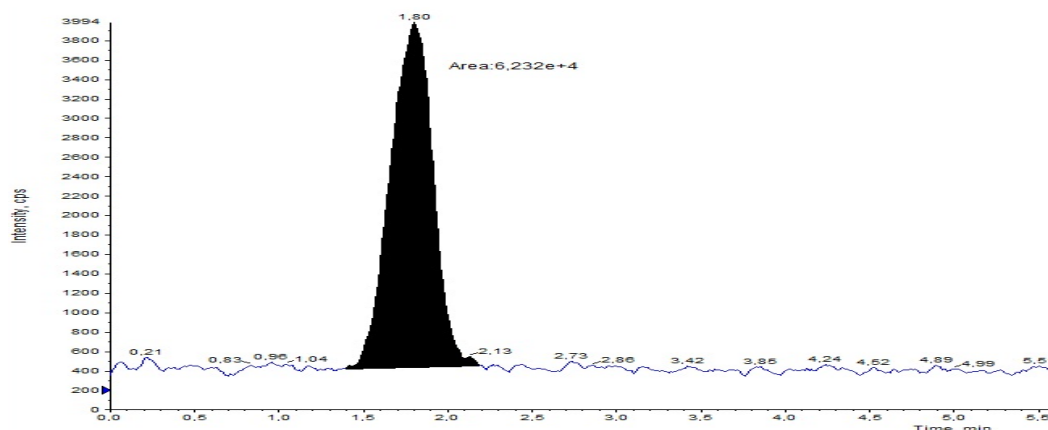
Lượng CAP nạp vào cột (ng)	Thời gian lưu (RT)	Diện tích peak thu được	
		Cặp ion 321/257	Cặp ion 321/152
0,5	1,86	0,978 x 10 <sup>4</sup>	1,417 x 10 <sup>4</sup>
1	1,86	2,514 x 10 <sup>4</sup>	3,645 x 10 <sup>4</sup>
2	1,80	6,232 x 10 <sup>4</sup>	9,086 x 10 <sup>4</sup>
5	1,83	1,756 x 10 <sup>5</sup>	2,446 x 10 <sup>5</sup>
10	1,83	3,582 x 10 <sup>5</sup>	5,345 x 10 <sup>5</sup>

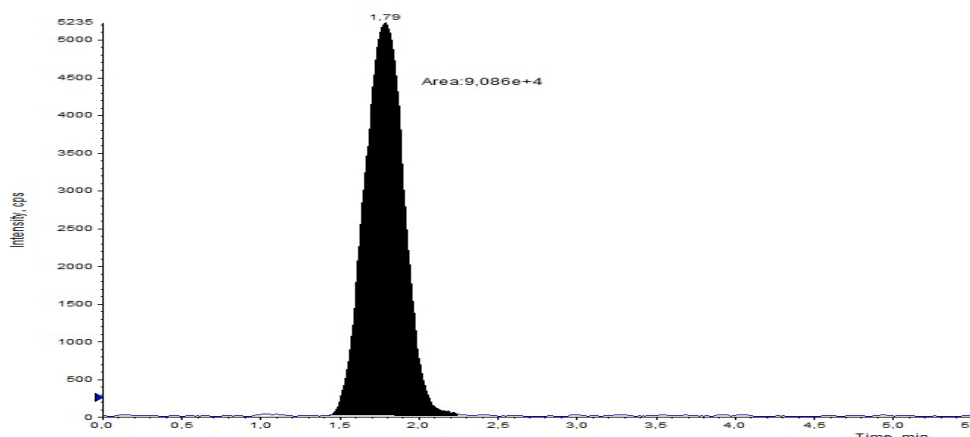
Bảng 4 cho thấy cột IAC-CAP-10 cho đáp ứng tốt với lượng CAP nạp vào cột trong dãy từ 0,5 tới 10 ng. Kết quả phân tích LC MS/MS cho thấy có mối quan hệ tuyến tính giữa lượng CAP với tín hiệu của cặp ion có  $m/z$  321/257 cũng như

cặp ion có  $m/z$  321/152 trong khoảng dãy 0,5 - 10 ng CAP (Hình 3). Tuy nhiên, phân tích sử dụng cặp ion có  $m/z$  321/152 cho tín hiệu tốt hơn cũng như có nhiều nền thấp hơn là trường hợp sử dụng cặp ion có  $m/z$  321/257 (Hình 4).



Hình 3. Đường chuẩn của CAP trong khoảng 0,5 ng đến 10 ng phân tích bằng LC MS/MS phân tích bằng cặp ion có  $m/z$  321/257 (A) và ion có  $m/z$  321/152(B)





**Hình 4.** Sắc ký đồ LC MS/MS phân tích lượng CAP được gắn lên cột IAC-CAP-10 (trường hợp nạp 2 ng CAP) phân tích bằng cặp ion có  $m/z$  321/257(A) và bằng cặp ion có  $m/z$  321/152 (B).

Từ phương trình đường chuẩn cũng như độ lệch tín hiệu tại lượng thử nghiệm thấp nhất (0,5 ng) có thể tính được giới hạn phát hiện (LOD) đối với CAP khi sử dụng cặp ion có  $m/z$  321/257 là 0,044 ng và sử dụng cặp ion có  $m/z$  321/152 là 0,033 ng. Giới hạn định lượng (LOQ) của CAP khi sử dụng cặp ion có  $m/z$  321/257 là 0,132 ng và trên cặp ion có  $m/z$  321/152 là 0,101 ng. Kết quả này cho thấy phương pháp sử dụng cột IAC-CAP-10 kết nối với sắc ký lỏng ghép khối phổ MS/MS cho phép định lượng CAP ở lượng  $\geq 0,1$  ng, hoàn toàn đáp ứng yêu cầu về kiểm tra tồn dư CAP trong thực phẩm.

#### Khả năng gắn các phenicol khác của cột IAC-CAP-10

Trong nhóm kháng sinh phenicol, ngoài chloramphenicol, florfenicol và thiamphenicol cũng là những kháng sinh thường được sử dụng trong chăn nuôi và nuôi trồng thủy sản. Do vậy chúng tôi kiểm tra khả năng bắt chéo của kháng thể kháng CAP trong cột IAC-CAP-10 với kháng nguyên là hai kháng sinh cùng nhóm nêu trên. Kết quả trên Bảng 5 cho thấy kháng thể kháng CAP trong cột IAC-CAP-10 có thể gắn kháng sinh florfenicol và thiamphenicol với mức 90,73 % đối với florfenicol và 84,29 % đối với thiamphenicol.

**Bảng 5.** Khả năng gắn của kháng thể kháng CAP trong cột IAC-CAP-10 với kháng sinh cùng nhóm

Kháng sinh	Lượng kháng sinh nạp cột (ng)	Khả năng gắn (%)
Chloramphenicol	100	96,23 $\pm$ 2,64
Florfenicol	100	90,73 $\pm$ 1,65
Thiamphenicol	100	84,29 $\pm$ 1,72

#### KẾT LUẬN

Chúng tôi đã cộng hợp thành công kháng thể thô kháng CAP với gel Sepharose CL 4B-CNBr và sử dụng gel này để tạo cột sắc ký ái lực miễn dịch gắn CAP. Gel Sepharose-IgGCAP được chế tạo

thành ba loại chứa lượng kháng thể trên một đơn vị dung tích gel khác nhau là 5, 10 và 15 mg kháng thể/mL gel và được nhồi cột để tạo ba loại cột sắc ký ái lực miễn dịch gắn CAP tương ứng. Khảo sát



khả năng gắn CAP của các cột sắc ký này với ba mức lượng CAP nạp vào cột là 0,5; 1 và 10 ng cho thấy cột chứa gel với hàm lượng 10 mg kháng thể/mL gel (cột IAC-CAP-10) có khả năng gắn trên 99 % lượng CAP trong mẫu ở 3 mức hàm lượng khảo sát. Cột IAC-CAP-10 được chọn để đánh giá các thông số kỹ thuật cần cho việc sử dụng để tách chiết CAP từ mẫu phục vụ mục đích phân tích CAP trong thực phẩm với kết quả: các cột có độ lặp lại tốt với độ lệch biến thiên giữa các cột thấp hơn 10 % (5,18 % ở trường hợp lượng CAP nạp cột là 1 ng và 1,98 % ở trường hợp lượng CAP nạp cột là 10 ng), dung lượng gắn CAP tối đa

là  $153,37 \pm 10,32$  ng), hoạt động ổn định trong thời gian hai năm được bảo quản ở 4 °C. Khi cột IAC-CAP-10 được dùng kết hợp với sắc ký lỏng ghép khối phổ LC MS/MS để phân tích CAP ở hàm lượng thấp trong dãy 0,5-10 ng, phương pháp kết hợp này có giới hạn phát hiện CAP là 0,033 ng và giới hạn định lượng là 0,101 ng, hoàn toàn đáp ứng yêu cầu về độ nhạy để kiểm tra tồn dư CAP trong thực phẩm. Ngoài CAP, cột IAC-CAP-10 cũng có thể gắn hai kháng sinh cùng nhóm với CAP là kháng sinh florfenicol và thiamphenicol với mức 90,73 % đối với florfenicol và 84,29 % đối với thiamphenicol.

## Preparation of an immunoaffinity chromatography column for chloramphenicol binding

- **Nguyen Duc Thinh**

Institute of Hygiene and Public Health – University of Science, VNU-HCM

- **Nguyen Thi Nguyet Thu**

- **Duong Ngoc Diem**

Pasteur Institute of Ho Chi Minh City

- **Chu Pham Ngoc Son**

Sac Ky Hai Dang Scientific Services Joint Stock Company

- **Tran Linh Thuoc**

University of Science, VNU-HCM

### ABSTRACT

*Anti-chloramphenicol rabbit antibody was covalently bound to Sepharose CL 4B-CNBr gel at 5, 10 and 15 mg antibody per mL gel and was fed into columns to prepare three respective immunoaffinity chromatography columns for chloramphenicol (CAP) binding. Examination of CAP-binding efficiency of these columns being fed with 0.5, 1 and 10 ng CAP showed that the column with 10 mg antibody per ml gel (IAC-CAP-10 column) could bind more than 90 % of the CAP amount having been fed into the column at all*

*three examined CAP amounts. This IAC-CAP-10 column showed a coefficient of variants (CV) between columns upon CAP binding of 5.18 % for 1 ng fed CAP and 1.98 % for 10 ng, respectively, a loading capacity of  $153,37 \pm 10,32$  ng CAP, stable CAP-binding performance during at least 2 years of preservation at 4 °C. The coupling of this IAC-CAP-10 column with liquid chromatography - tandem mass spectrometry LC MS/MS could make CAP analysis become possible with a limit of detection LOD of 0.033 ng and a limit of*

quantification LOQ of 0.101 ng. The column could also bind to the other two phenicol antibiotics: florfenicol and thiamphenicol with a binding

efficiency of 90.73 % for florfenicol and 84.29 % for thiamphenicol.

**Keywords:** chloramphenicol, method for analysis of chloramphenicol in food, immunoaffinity chromatography columns for binding chloramphenicol

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Agilent Technologies, Determination of chloramphenicol, florfenicol, and thiamphenicol in honey using Agilent SampliQ OPT solid - phase extraction cartridges and liquid chromatography - tandem mass spectrometry - Application note (2009).
- [2]. A.C Moser, D.S Hage, Immunoaffinity chromatography: an introduction to applications and recent developments, *Bioanalysis*, 2, 4, 769–790 (2010).
- [3]. FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization), Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food. Chloramphenicol. WHO Food Additives, Series 33 (1995).
- [4]. A. Farjam, G.J. De Jong, R.W. Frei, Immunoaffinity precolumn for selective sample pretreatment in column liquid chromatography: immunoselective desorption, *Chromatographia*, 31, 469–477 (1991).
- [5]. GE Healthcare, CNBr-activated Sepharose™ 4B, Instructions (1996).
- [6]. A. Hubaux, G. Vos, Decision and detection limits for linear calibration curves, *Analytical Chemistry*, 48, 849–855 (1970).
- [7]. IARC (International Agency for Research on Cancer), Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, 50 (1990).
- [8]. J. Storey, A.L. Pfenning, S. Turnipseed, G. Nandrea, R. Lee, C. Burns, M.Madson, Determination of chloramphenicol residues in shrimp and crab tissues by electrospray triple quadrupole LC/MS/MS, Denver District Laboratory and Animal Drugs Research Center, Food and Drug Administration (2003).
- [9]. S. Impens, W. Reybroeck, J. Vercammen, D. Courtheyn, S. Ooghe, K. De Wasch, W. Smedts, H. De Brabander, Screening and confirmation of chloramphenicol in shrimp tissue using ELISA in combination with GC–MS2 and LC–MS2, *Analytica Chimica Acta*. 483, 153–163 (2003).
- [10]. Supelco, Supelco MIP Solid Phase Extraction, (2009).
- [11]. United States Department of Agriculture, Determination and Confirmation of Chloramphenicol, Service, Food Safety and Inspection, 1–22 (2013).
- [12]. W. Hammack, M.C. Carson, B.K. Neuhaus, J.A. Hurlbut, C. Nochetto, J.S. Stuart, A. Brown, D. Kilpatrick, K. Youngs, K. Ferbos, D.N. Heller, Multilaboratory validation of a method to confirm chloramphenicol in shrimp and crabmeat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of AOAC International*, 86, 1135–1143 (2003).
- [13]. N.Đ. Thịnh, N.T.N. Thu, D.N. Diễm, C.P.N. Sơn, T.L. Thuớc, Tạo kháng thể thô kháng chuyên biệt chloramphenicol, *Tạp chí Phát triển Khoa học Công nghệ*, Đại học Quốc gia TP.HCM (2016) (được nhận đăng).