

Xác định đồng thời một số chất kháng sinh diệt cầu trùng trong thức ăn chăn nuôi bằng phương pháp LC-MS/MS

Kiều Thị Lan Phương^{1*}, Nguyễn Thị Phương Mai¹,

Đặng Thu Hiền¹, Hoàng Thị Lan Anh², Nguyễn Thị Ánh Hương³

¹*Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm Quốc gia, Hà Nội, Việt Nam*

²*Viện Y học dự phòng Quân đội, Hà Nội, Việt Nam*

³*Trường Đại học Khoa học Tự Nhiên - Đại học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam*

(Ngày đến tòa soạn: 20/09/2022; Ngày chấp nhận đăng: 27/12/2022)

Tóm tắt

Kỹ thuật sắc ký lỏng khối phổ hai lần (LC-MS/MS) đã được ứng dụng nhằm phân tích đồng thời 4 kháng sinh có tác dụng diệt cầu trùng monensin, dimetridazole, sulfadimethoxin, sulfadimidin trên nền thức ăn chăn nuôi. Nghiên cứu sử dụng pha động gồm 2 kênh: Kênh A (dung dịch acid formic 0,1%; amoni format 10 mM) và kênh B (MeOH; acid formic 0,1%; amoni format 10 mM) với cột sắc ký pha đảo Agilent Eclipse Plus C18 (2,1 × 1,5 mm, ID 3,5 μm) cho thời gian phân tích ngắn, trong 10 phút xác định được đồng thời bốn kháng sinh có tác dụng diệt cầu trùng. Phương pháp có giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng cho cả 4 chất tương ứng là 15,0 và 45,0 μg/kg. Khoảng tuyến tính của phương pháp được xây dựng trong khoảng từ 45 - 1.500 μg/L. Phương pháp được thẩm định cho độ chính xác cao, hiệu quả và được áp dụng vào phân tích các mẫu thức ăn chăn nuôi đang được lưu hành trên thị trường Hà Nội.

Từ khóa: *Monensin, Dimetridazole, Sulfadimidin, Sulfadimethoxine, cầu trùng, LC-MS/MS.*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cầu trùng là một loại bệnh phổ biến trong chăn nuôi, đặc biệt là trong chăn nuôi gia cầm. Để phòng ngừa và điều trị bệnh này, các kháng sinh diệt cầu trùng đã được sử dụng như thuốc hoặc phụ gia trong thức ăn chăn nuôi [1]. Tuy nhiên, một số nhà sản xuất đã lạm dụng kháng sinh trong chăn nuôi dẫn đến vẫn còn dư lượng kháng sinh vượt mức cho phép trong các sản phẩm có nguồn gốc từ động vật như thịt, trứng, sữa... gây ảnh hưởng tới sức khỏe con người [2]. Vì vậy, việc xác định hàm lượng kháng sinh trong thức ăn chăn nuôi đóng vai trò quan trọng. Hiện nay, Việt Nam chưa có quy định về hàm lượng các kháng sinh trong thức ăn chăn nuôi, tuy nhiên hàm lượng kháng sinh tồn dư tối đa trong các sản phẩm từ động vật được quy định trong Thông tư 24/2013/TT-BYT [3] và Thông tư 10/2016/TT-BNNPTNT [4].

*Điện thoại: 0399374646

Email: kieulanphuong998@gmail.com

Hiện nay, nhiều phương pháp khác nhau đã được sử dụng để xác định riêng rẽ bốn kháng sinh monensin, dimetridazole, sulfadimethoxin, sulfadimidine trong nền mẫu thức ăn chăn nuôi gồm: phương pháp điện hóa [5], phương pháp điện di mao quản [6], phương pháp sắc kí [7-8]. Tại Việt Nam hiện nay chưa có nghiên cứu nào về xác định các kháng sinh này, đặc biệt bằng phương pháp sắc ký lỏng khối phổ hai lần (LC-MS/MS). Trong nghiên cứu này phương pháp LC-MS/MS đã được lựa chọn để xác định đồng thời bốn kháng sinh trong mẫu thức ăn chăn nuôi nhằm góp phần vào phát triển các quy trình định lượng kháng sinh diệt cầu trùng một cách nhanh chóng, hiệu quả.

Nghiên cứu này tập trung nghiên cứu tối ưu quy trình phân tích đồng thời 4 kháng sinh gồm monensin, dimetridazole, sulfadimethoxin và sulfadimidin. Trong đó, các dung môi chiết và một số bước làm sạch được khảo sát để loại bỏ ảnh hưởng của nền mẫu đến quá trình phân tích. Các điều kiện phân tích được tối ưu hóa tự động trên hệ thống LC-MS/MS cho dữ liệu về mảnh phổ và điều kiện phân tích tương ứng.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng của nghiên cứu này gồm chất phân tích là 4 kháng sinh có tác dụng diệt cầu trùng monensin, dimetridazole, sulfadimethoxin, sulfadimidin và mẫu thức ăn chăn nuôi.

2.2. Hóa chất và chất chuẩn

Tất cả các hóa chất đều thuộc loại tinh khiết phân tích (PA) bao gồm: Chuẩn monensin, dimetridazole, sulfadimethoxin, sulfadimidin (LGC) với độ tinh khiết $\geq 98,0\%$. Một số hóa chất khác: Nước cất hai lần khử ion, methanol, acetonitril, acid formic, amoni format, bột làm sạch PSA, bột làm sạch C₁₈, MgSO₄, NaCl, CH₃COONa.

2.3. Thiết bị, dụng cụ và hóa chất

Hệ thống sắc ký lỏng SCIEX Exion LC 20AD ghép nối detector khối phổ AB SCIEX Triple Quad 6500+ với phần mềm Analysis version 1.7. Cột sắc ký pha đảo Agilent Eclipse Plus C18 (2,1 × 1,5 mm, ID 3,5 μm) và tiền cột tương ứng. Ngoài ra, nghiên cứu sử dụng một số thiết bị, dụng cụ thông thường trong phòng thí nghiệm.

2.4. Phương pháp phân tích

2.4.1. Mẫu nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu: 9 mẫu thức ăn chăn nuôi (5 mẫu dạng bột và 4 mẫu dạng viên) cho gia cầm và 4 mẫu phụ gia thức ăn chăn nuôi được mua ngẫu nhiên tại chợ Long Biên và chợ Phùng Khoang.

Mẫu trắng: Áp dụng quy trình phân tích đã được lựa chọn và tiến hành một số mẫu không chứa thành phần kháng sinh nghiên cứu. Chọn mẫu trắng là mẫu không có tín hiệu trùng với thời gian lưu của chất phân tích.

2.4.2. Quy trình phân tích

Khảo sát và tối ưu hóa quy trình phân tích trên khối phổ: Các điều kiện phân tích khối phổ được tối ưu hóa tự động trên thiết bị Triple Quad 6500+ của hãng AB SCIEX với dung dịch hỗn hợp chuẩn các chất phân tích có nồng độ 500 µg/L.

Trên cơ sở tham khảo tài liệu [7, 9], quy trình chiết và làm sạch mẫu được lựa chọn như sau: Mẫu được cân 2 g vào ống ly tâm 50 mL, thêm chuẩn ở nồng độ 500 µg/kg, sau đó bổ sung thêm 5 mL nước cất và 30 mL dung môi ACN. Sau khi rung siêu âm 15 phút, mẫu được thêm hỗn hợp muối chiết (1,5 g NaCl và 6,0 g MgSO₄), lắc đều và ly tâm trong 5 phút với tốc độ 6.000 vòng/phút. Lấy 1 mL dịch nổi phía trên cho vào ống d-SPE (gồm 0,05 g C₁₈, 0,2 g MgSO₄), tiến hành ly tâm trong 5 phút với tốc độ 13.000 vòng/phút. Dịch chiết nổi phía trên được phân tích trên thiết bị LC-MS/MS. Trong đó, loại và thể tích dung môi chiết, chất hấp phụ làm sạch sẽ được khảo sát để lựa chọn điều kiện tốt nhất.

2.4.3. Đánh giá phương pháp

Tiến hành đánh giá phương pháp đã tối ưu thông qua các thông số cơ bản gồm: độ đặc hiệu; đường chuẩn; giới hạn phát hiện và định lượng; độ chụm thông qua độ lặp lại, độ tái lập nội bộ và độ đúng thông qua độ thu hồi. Các kết quả được đánh giá so sánh với các quy định của AOAC [10].

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Khảo sát điều kiện phân tích trên thiết bị sắc ký

Qua tham khảo các tài liệu [5-6] kết hợp với việc tiến hành khảo sát, điều kiện sắc ký để phân tích đồng thời bốn kháng sinh được lựa chọn như sau:

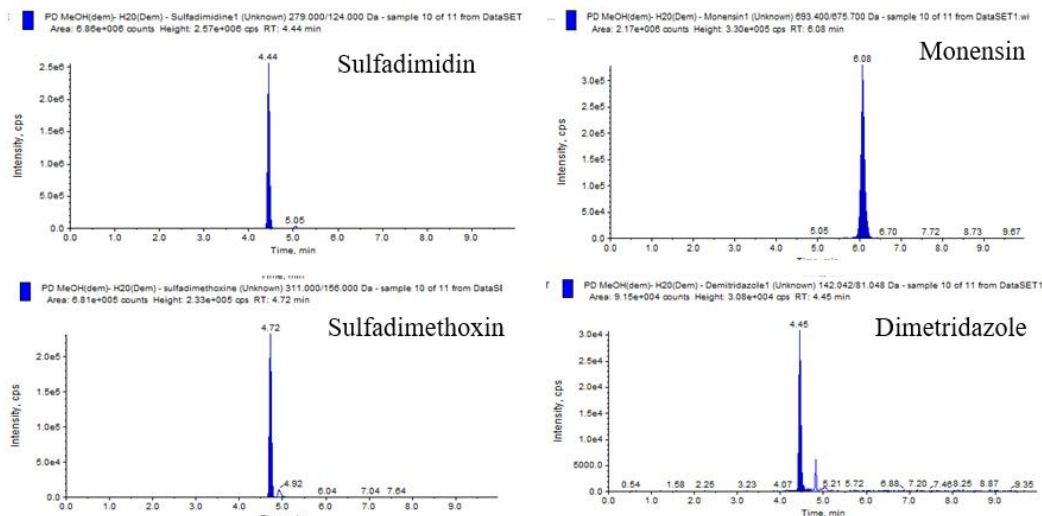
- Pha động gồm kênh A: acid formic 0,1%; amoni format 10 mM và kênh B: MeOH; acid formic 0,1%; amoni format 10 mM
- Tốc độ dòng: 0,5 mL/phút
- Thể tích tiêm mẫu: 10 µL
- Chương trình gradient (Bảng 1)

Bảng 1. Chương trình gradient phân tích các chất kháng sinh

Thời gian (phút)	Pha động	
	Kênh A	Kênh B
0,00	95%	5,0%
2,30	95%	5,0%
8,00	0%	100%
8,01	95%	5,0%
10,00	95%	5,0%

Xác định đồng thời một số chất kháng sinh diệt cầu trùng...

Kết quả sắc ký phân tách đồng thời 4 kháng sinh khi sử dụng hệ pha động tối ưu được thể hiện trong Hình 1 và các thông số tối ưu tự động trong phân tích được trình bày trong Bảng 2.



Hình 1. Sắc ký đồ của các chất phân tích tại nồng độ 40 µg/L

Bảng 2. Kết quả phân tích mảnh và điều kiện tối ưu của các chất phân tích

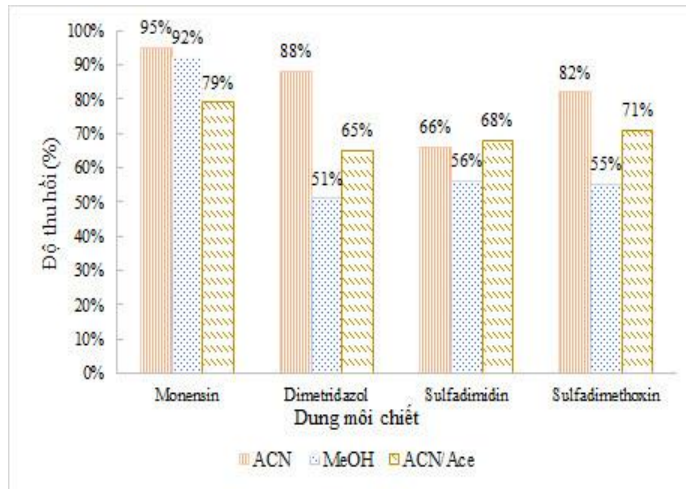
Chất phân tích	Mảnh mẹ (m/z)	Mảnh con (m/z)	CE (eV)
<i>Sulfadimethoxin</i>	311	156*	15,0
	311	218	15,0
<i>Sulfadimidin</i>	279	124*	29,0
	279	92,0	33,0
<i>Monensin</i>	693,4	675,7*	55,0
	693,4	461,3	69,0
<i>Dimetridazol</i>	142,1	95,1*	35,0
	142,1	81,0	31,0

(Ghi chú: “*” Mảnh định lượng)

3.2. Khảo sát điều kiện chiết mẫu

3.2.1. Khảo sát dung dịch chiết mẫu

Các mẫu trắng được thêm hỗn hợp chuẩn kháng sinh ở nồng độ 500 µg/kg. Sau đó, tiến hành khảo sát các dung môi chiết gồm acetonitril, methanol, acetonitril/acid acetic 2% và được thực hiện lặp lại 03 lần. Kết quả độ thu hồi trung bình được trình bày trong Hình 2.

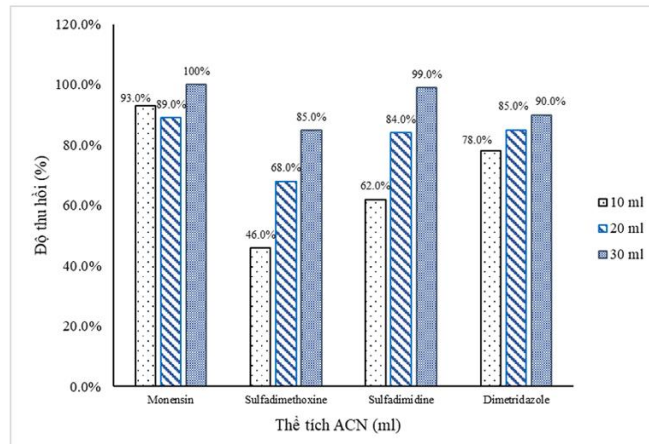


Hình 2. Kết quả khảo sát các loại dung môi chiết mẫu

Từ kết quả đồ thị Hình 2, quy trình chiết với dung môi ACN cho độ thu hồi cao nhất trong các dung môi chiết, độ thu hồi đối với dimetridazole (88%), monensin (95%), sulfadimidin (66%) và sulfadimethoxin (82%). Do vậy, dung môi ACN được lựa chọn cho khảo sát tiếp theo.

3.2.2. Khảo sát thể tích dung dịch chiết mẫu

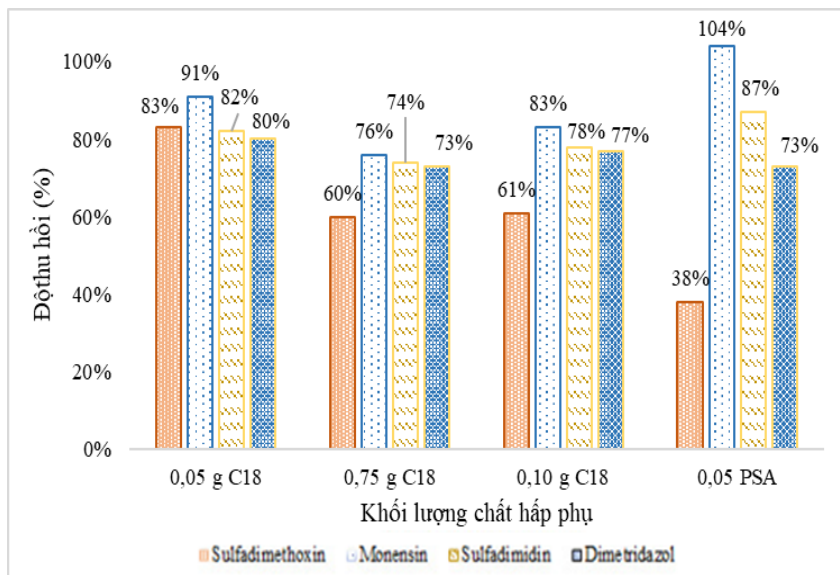
Tiến hành khảo sát thể tích dung môi ACN khác nhau tại 10,0; 20,0; 30,0 mL và được thực hiện lặp lại 03 lần thu được kết quả như trong Hình 3. Từ kết quả thu được, độ thu hồi đối với 10,0 và 20,0 mL đều thấp hơn thể tích chiết 30,0 mL (trên 80% với tất cả các chất kháng sinh). Vì vậy, thể tích chiết tối ưu là 30 mL ACN.



Hình 3. Kết quả khảo sát thể tích dung môi chiết

3.2.3. Khảo sát điều kiện làm sạch mẫu

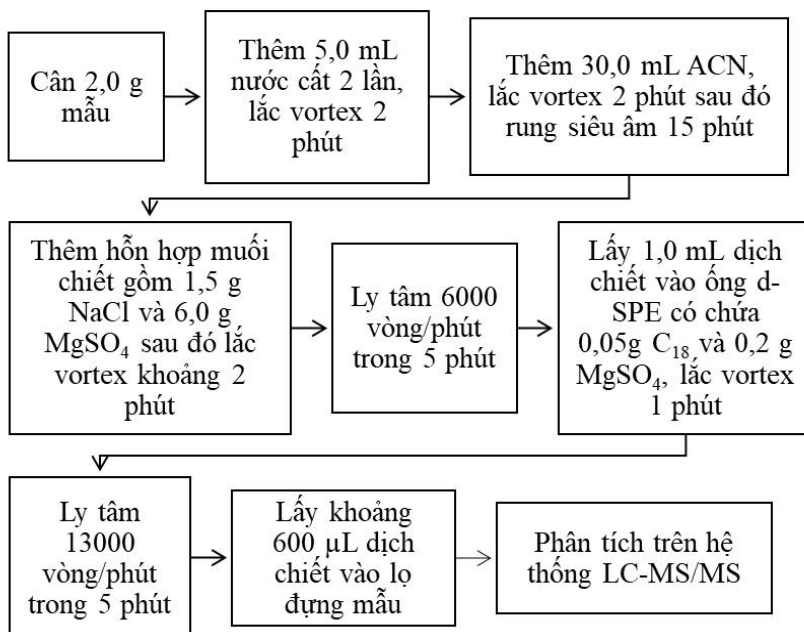
Chất hấp phụ có vai trò loại bỏ các tạp chất có trong nền mẫu, giúp giảm ảnh hưởng của nền mẫu đến quá trình phân tích các chất trên thiết bị. Chất hấp phụ C₁₈ và PSA được lựa chọn khảo sát với khối lượng khác nhau và 0,15 g MgSO₄. Kết quả thu hồi được thực hiện lặp lại 03 lần và thể hiện trong Hình 4.



Hình 4. Kết quả khảo sát các chất hấp phụ làm sạch mẫu

Từ kết quả khảo sát cho thấy, sau khi tiến hành làm sạch với PSA cho độ thu thấp với sulfadimethoxine (38%). Trong khi sử dụng 0,05 g C₁₈ đã cho độ thu hồi cao với hầu hết các chất kháng sinh (trên 80%). Chính vì vậy, chất hấp phụ C₁₈ được lựa chọn để làm sạch dịch chiết trước khi tiến hành phân tích trên thiết bị LC-MS/MS.

Trên cơ sở kết quả khảo sát, quy trình lựa chọn nhằm phân tích đồng thời 04 kháng sinh được trình bày trong Hình 5.



Hình 5. Quy trình xử lý mẫu lựa chọn trong nghiên cứu

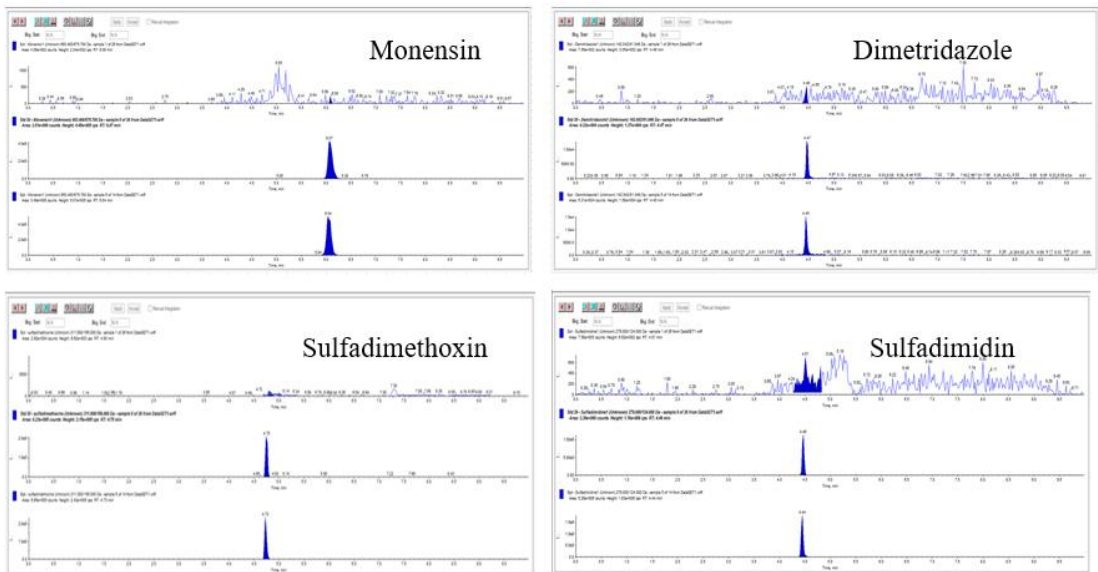
3.3 Đánh giá phương pháp

3.3.1. Độ đặc hiệu

Đánh giá độ đặc hiệu của phương pháp thông qua các tiêu chí sau:

- Tính số điểm IP: Qua Bảng 2 cho thấy, dựa trên mảnh mẹ và số mảnh con của các chất phân tích, số điểm IP của từng chất đều bằng 4, đạt yêu cầu phân tích khối phổ LC-MS/MS.

- Tiến hành phân tích mẫu trắng, mẫu thêm chuẩn tại mức 20 µg/L. Kết quả thu được cho thấy, trong sắc ký đồ của mẫu trắng (Hình 6) không xuất hiện pic trong khoảng thời gian lưu của chất phân tích như trong mẫu thêm chuẩn. Mẫu chuẩn và mẫu thêm chuẩn có pic của chất phân tích ở thời gian chênh lệch nhau không quá 5%, chứng tỏ phương pháp có độ đặc hiệu cao.



Hình 6. Một số sắc ký đồ của kết quả đánh giá độ đặc hiệu của các chất phân tích

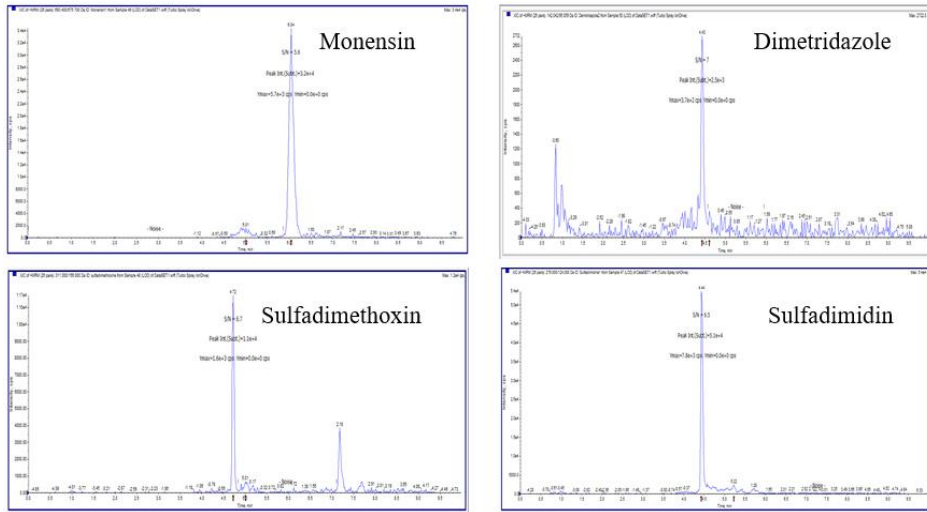
3.3.2. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng

Dựa trên tỷ số tín hiệu/ nhiễu nền của các dung dịch thêm chuẩn, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của các chất phân tích được thể hiện trong Bảng 3, Hình 7 và Hình 8.

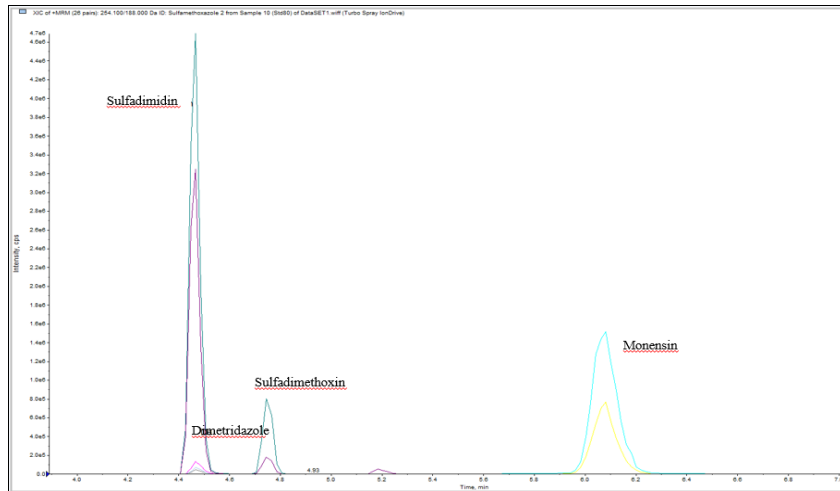
Bảng 3. Kết quả giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng

Chất phân tích	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)
<i>Sulfadimethoxin</i>	15,0	45,0
<i>Sulfadimidin</i>	15,0	45,0
<i>Monensin</i>	15,0	45,0
<i>Dimetridazole</i>	15,0	45,0

Xác định đồng thời một số chất kháng sinh diệt cầu trùng...



Hình 7. Sắc ký đồ tại mức LOD của các chất phân tích (15,0 µg/kg)



Hình 8. Sắc ký đồ tổng của các chất phân tích tại 45,0 µg/kg

3.3.3. Đường chuẩn và độ tuyến tính

Tiến hành xây dựng đường chuẩn với các điểm chuẩn khoảng từ 45 - 1.500 µg/L. Theo kết quả (Bảng 4), các đường chuẩn đều có hệ số tương quan tuyến tính (R^2) > 0,995 và độ chệch < 15%.

Bảng 4. Phương trình đường chuẩn của các chất phân tích

Chất phân tích	Phương trình đường chuẩn	R^2
Sulfadimethoxin	$y = 2,0 \cdot 10^4 x + 3,5 \cdot 10^4$	0,9998
Sulfadimidin	$y = 1,8 \cdot 10^5 x + 1,5 \cdot 10^5$	1,0000
Monensin	$y = 1,3 \cdot 10^5 x + 1,5 \cdot 10^5$	0,9996
Dimetridazole	$y = 2,3 \cdot 10^3 x + 7,4 \cdot 10^3$	0,9995

3.3.4. Độ thu hồi

Nghiên cứu tiến hành phân tích trên nền mẫu trắng thêm chuẩn tại 3 mức hàm lượng 0,15; 0,75; 1,2 mg/kg. Mỗi mức hàm lượng được tiến hành làm lặp lại 06 lần. Kết quả độ thu hồi được tóm tắt trong Bảng 5.

Bảng 5. Kết quả đánh giá độ thu hồi trên mẫu trắng

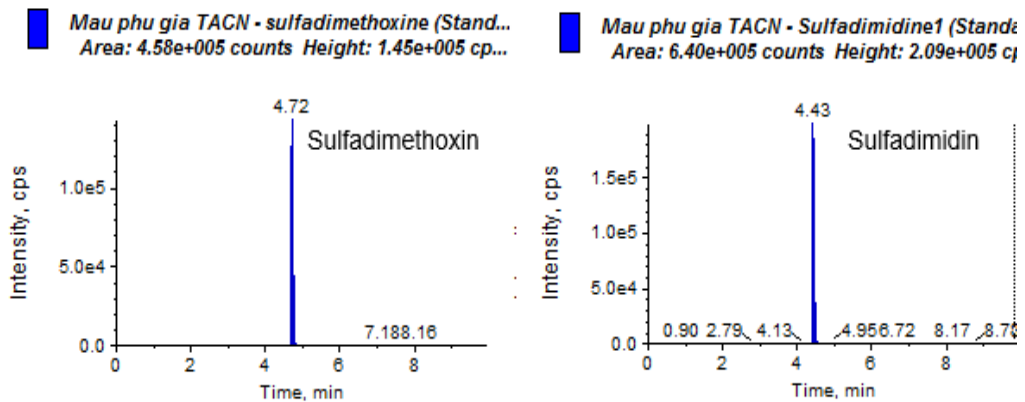
Chất phân tích	Mức thêm (mg/kg)	Độ thu hồi (%)	RSD (%)
<i>Sulfadimethoxin</i>	0,15	84,2	1,6
	0,75	88,8	4,4
	1,20	85,6	2,4
<i>Sulfadimidin</i>	0,15	81,7	1,0
	0,75	93,3	2,5
	1,20	86,5	1,9
<i>Monensin</i>	0,15	94,7	4,4
	0,75	106,5	2,7
	1,20	104,3	2,4
<i>Dimetridazole</i>	0,15	101,3	3,2
	0,75	96,8	1,8
	1,20	87,6	4,4

Các kết quả thu được từ Bảng 5 cho thấy độ thu hồi của bốn kháng sinh tương đối cao (> 80%) và đáp ứng yêu cầu theo AOAC [8].

3.4. Phân tích mẫu thực tế

Quy trình phân tích tối ưu đã được áp dụng để phân tích đồng thời 04 kháng sinh trong 13 mẫu được mua ngẫu nhiên trên thị trường Hà Nội.

Kết quả phân tích cho thấy 12/13 mẫu thức ăn chăn nuôi đều không phát hiện chất phân tích và 1 mẫu phụ gia thức ăn chăn nuôi phát hiện chất phân tích sulfadimidin (2,3 µg/kg) và sulfadimethoxin (7,05 × 10⁴ µg/kg). Kết quả cho sự sai khác so với trên nhãn là 12,8%. Sắc đồ của mẫu phụ gia thức ăn chăn nuôi được trình bày trong Hình 9.



Hình 9. Sắc ký đồ phân tích mẫu phụ gia thức ăn chăn nuôi

Kết quả phân tích cho thấy 12/13 mẫu thức ăn chăn nuôi đều không phát hiện chất phân tích và 1 mẫu phụ gia thức ăn chăn nuôi phát hiện chất phân tích sulfadimidin ($2,3 \mu\text{g}/\text{kg}$) và sulfadimethoxin ($7,05 \times 10^4 \mu\text{g}/\text{kg}$). Kết quả cho sự sai khác so với trên nhãn là 12,8%.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã thành công trong việc xây dựng quy trình xác định đồng thời 4 kháng sinh có tác dụng diệt cầu trùng monensin, dimetridazole, sulfadimethoxin, sulfadimidin trên nền thức ăn chăn nuôi một cách nhanh chóng, hiệu quả và áp dụng để phân tích 13 mẫu thức ăn chăn nuôi được lưu hành trên thị trường Hà Nội. Nghiên cứu là cơ sở và tiền đề để định hướng phát triển phương pháp xác định lượng tồn dư các kháng sinh có tác dụng diệt cầu trùng trên gia súc, gia cầm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. M. J. Rybicki, "Coccidiostats in treating coccidiosis," *Technologia*, vol.27, no.4, pp. 127-137, 2020.
- [2]. R. Companyó, "Antibiotics in food: Legislation and validation of analytical methodologies," *Analytical and bioanalytical chemistry*, vol. 395, no. 4, pp. 877-891, 2009.
- [3]. Ministry of Health, "Circular 24/2013/TT-BYT regulated the maximum limit of veterinary drug residues in food," 2013 (in Vietnamese).
- [4]. Ministry of Agriculture and Rural Development, "Circular 10/2016/TT-BNNPTNT promulgating list of veterinary drugs permitted to be marketed and banned from use in vietnam, and announcement of HS codes of imported veterinary drugs permitted to be marketed in Vietnam," 2016 (in Vietnamese).
- [5]. A. Ait Lahcen, "Voltammetric determination of sulfonamides using paste electrodes based on various carbon nanomaterials," *Microchimica Acta*, vol. 183, no. 7, pp. 2169-2176, 2016.
- [6]. Y. Lin, "Determination of five nitroimidazole residues in artificial porcine muscle tissue samples by capillary electrophoresis," *Talanta*, vol. 88, pp. 646-652, 2012.
- [7]. R. P. Lopes, "Development and validation of a method for the determination of sulfonamides in animal feed by modified QuEChERS and LC-MS/MS analysis," *Food Control*, vol. 28, no. 1, pp. 192-198, 2012.
- [8]. S. Nász, "Development and validation of a liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method for determination of eleven coccidiostats in milk," *Food chemistry*, vol. 133, no. 2, pp. 536-543, 2012.

- [9]. De la Huebra, "Determination of semduramicin in poultry feed at authorized level by liquid chromatography single quadrupole mass spectrometry," *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, vol. 53, no. 4, pp. 860-868, 2010.
- [10]. AOAC, "Appendix F: Guidelines for standard method performance requirements," AOAC official methods of Analysis, 2012.

Simultaneous determination of some antibiotics with coccidiosis effect in feed by LC-MS/MS

Kieu Thi Lan Phuong¹, Nguyen Thi Phuong Mai¹,
Dang Thu Hien¹, Hoàng Thị Lan Anh², Nguyen Thi Anh Huong³

¹National Institute for Food Control, Hanoi, Vietnam

²Military Institute of Preventive Medicine, Hanoi, Vietnam

³University of Science, Vietnam National University, Hanoi, Vietnam

Abstract

Liquid chromatography tandem mass spectrophotometry (LC-MS/MS) has been developed for simultaneous determination of four antibiotics which have coccidiocidal effects including monensin, dimetridazole, sulfadimethoxin, and sulfadimidine in feed samples. The research conducted by using mobile phase A (0.1% formic acid solution; 10 mM ammonium formate) and phase B (MeOH; 0.1% formic acid; 10 mM ammonium formate) with C18 reversed-phase chromatography column (2.1 × 1.5 mm, ID 3.5 μm) simultaneously and successfully identified these four antibiotics in a short time about 10 minutes. The method detection limits and quantification limits for all analytes were 15.0 and 45.0 μg/kg, respectively. The calibration curve of the method was in the range of 45 - 1,500 μg/L. The method was validated for high accuracy, efficiency and applied to analyze the feed samples on the Hanoi market.

Keywords: *Monensin, Dimetridazole, Sulfadimidine, Sulfadimethoxine, coccidiosis, LC-MS/MS.*