

Research Article**Simultaneous determination of some coccidiostat antibiotics in food by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)**

**Nguyen Thi Phuong Mai^{1*}, Nguyen Thi Thu Huong², Nguyen Viet Khiem²,
Luu Thi Huyen Trang¹, Dang Thi Ngoc Lan², Do Thi Trang³,
Nguyen Thi Ngan³, Pham Hoang Nguyen³**

¹National Institute for Food Control, Hanoi, Vietnam

²Hanoi University of Pharmacy, Hanoi, Vietnam

³Poison Control Center, Bach Mai Hospital, Hanoi, Vietnam

(Received: 31 Jul 2024; Revised: 30 Aug 2024; Accepted: 04 Sep 2024)

Abstract

Coccidiostats (anticoccidial antibiotics) are veterinary drugs widely used for the prevention and treatment of coccidiosis, especially in poultry farming. The illegal use of anticoccidial antibiotics, in the wrong dosage and duration, can lead to antibiotic residues in animal products and harm the health of consumers. In this study, a highly sensitive and accurate liquid chromatography-tandem mass spectrometry method was developed for the simultaneous analysis of anticoccidial antibiotics (diclazuril, nicarbazin, robenidin and salinomycin) in food. Samples were extracted using the QuEChERS method with acetonitrile (ACN) as the extraction solvent and cleaned with C18 adsorbent. The cleaned extracts were analyzed on an LC-MS/MS system with a C18 reversed-phase chromatography column (2.1 x 150 mm, 3.5 μ m) and corresponding pre-column. The mobile phase used was 0.1% HCOOH in water and methanol (MeOH), the flow rate was 0.5 mL/min. The method had good specificity, the linear range was established in the range of 10-100 ng/mL, the correlation coefficient $R^2 > 0.998$. The method recovery was in the range of 81-109% and the relative standard deviation (RSD%) was in the range of 1.77-10.13% for milk and meat samples. The limit of quantification and limit of detection of the method for four coccidiostat antibiotics were 3.0 μ g/kg and 10 μ g/kg, respectively. The method was applied to analyze the content of these four antibiotics in 31 food samples (meat and meat products, milk and dairy products) randomly purchased in Hanoi. The results did not detect four coccidiostat antibiotics in all 31 samples, initially showing that the residual contamination of coccidiostat antibiotics is basically safely controlled.

Keywords: diclazuril, nicarbazine, robenidine, salinomycin, LC-MS/MS, QuEChERS.

* Corresponding author: Nguyen Thi Phuong Mai (E-mail: phuongmainguyen051210@gmail.com)

Doi: <https://doi.org/10.47866/2615-9252/vjfc.4361>

Xác định đồng thời một số kháng sinh nhóm diệt cầu trùng trong thực phẩm bằng phương pháp sắc ký lỏng khối phổ hai lần (LC-MS/MS)

Nguyễn Thị Phương Mai*, Nguyễn Thị Thu Hương², Nguyễn Việt Khiêm²,
Luu Thị Huyền Trang¹, Đặng Thị Ngọc Lan², Đỗ Thị Trang³,
Nguyễn Thị Ngân³, Phạm Hoàng Nguyễn³

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

²*Trường Đại học Dược Hà Nội, Hà Nội, Việt Nam*

³*Trung tâm Chống độc, Bệnh viện Bạch Mai, Hà Nội, Việt Nam*

Tóm tắt

Coccidiostats (kháng sinh diệt cầu trùng) là loại thuốc thú y được sử dụng rộng rãi để phòng ngừa và điều trị bệnh cầu trùng, đặc biệt là trong chăn nuôi gia cầm. Việc sử dụng kháng sinh diệt cầu trùng trái phép, không đúng liều lượng và thời gian có thể dẫn tới việc tồn dư kháng sinh trong các sản phẩm có nguồn gốc động vật và gây hại tới sức khỏe người tiêu dùng. Trong nghiên cứu này, phương pháp sắc ký lỏng khối phổ hai lần với độ nhạy tốt và chính xác cao đã được phát triển để phân tích đồng thời các kháng sinh nhóm diệt cầu trùng (diclazuril, nicarbazin, robenidin và salinomycin) trong thực phẩm. Mẫu được chiết bằng phương pháp QuEChERS với dung môi chiết là acetonitrile (ACN) và làm sạch bằng chất hấp phụ C18. Dịch chiết sau khi làm sạch được phân tích trên hệ thống LC-MS/MS với cột sắc ký pha đảo C18 (2,1 x 150 mm, 3,5 μ m) và tiền cột tương ứng. Pha động được sử dụng là HCOOH 0,1% trong nước và methanol (MeOH), tốc độ dòng là 0,5 mL/phút. Phương pháp có độ đặc hiệu tốt, khoảng tuyến tính được xây dựng trong khoảng 10 - 100 ng/mL, hệ số tương quan $R^2 > 0,998$. Độ thu hồi của phương pháp nằm trong khoảng 81 - 109% và độ lệch chuẩn tương đối (RSD%) nằm trong khoảng 1,77 - 10,13% đối với nền mẫu sữa và thịt. Giới hạn định lượng và giới hạn phát hiện của phương pháp đối với 04 chất kháng sinh nhóm diệt cầu trùng tương ứng là 3,0 μ g/kg và 10 μ g/kg. Phương pháp được áp dụng để phân tích hàm lượng 04 chất kháng sinh này trong 31 mẫu thực phẩm (thịt và sản phẩm từ thịt, sữa và sản phẩm từ sữa) được mua ngẫu nhiên trên địa bàn Hà Nội. Kết quả không phát hiện 04 chất kháng sinh nhóm diệt cầu trùng trong tất cả 31 mẫu, bước đầu cho thấy việc tồn dư ô nhiễm kháng sinh nhóm cầu trùng cơ bản được kiểm soát an toàn.

Từ khóa: diclazuril, nicarbazin, robenidin, salinomycin, LC-MS/MS, QuEChERS.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh cầu trùng (Coccidiosis) là một bệnh ký sinh ở đường ruột của động vật do kí sinh trùng đơn bào gây ra. Bệnh lây lan từ động vật này sang động vật khác do tiếp xúc với phân bị nhiễm bệnh hoặc ăn phải mô bị nhiễm bệnh. Triệu chứng chính của bệnh là tiêu chảy, có thể ra máu trong trường hợp bệnh nặng. Động vật còn non hoặc bị suy giảm miễn dịch có thể bị các triệu chứng nghiêm trọng và tử vong. Đối với gia cầm, bệnh thường xảy ra khi

nuôi trong môi trường ẩm ướt với mật độ cao và là nguyên nhân chính làm giảm năng suất chăn nuôi gia cầm (đặc biệt ở gà) [1]. Ở Việt Nam, bệnh cầu trùng là căn bệnh phổ biến ở gà, hầu như đàn gà nào cũng khó tránh khỏi, đặc biệt là trong chăn nuôi gà công nghiệp và gà được nuôi ở chuồng nền. Bệnh không gây tỉ lệ chết cao như các bệnh truyền nhiễm khác nhưng gây thiệt hại lớn về kinh tế do gà chậm lớn, tăng chi phí thức ăn, thuốc điều trị và làm suy giảm miễn dịch ở gà khiến gà dễ mắc các bệnh truyền nhiễm khác [2]. Để phòng tránh căn bệnh này, người chăn nuôi thường sử dụng kháng sinh diệt cầu trùng cho vật nuôi.

Kháng sinh diệt cầu trùng được chia làm hai nhóm: nhóm coccidiostats ionophore (lasalocid, maduramicin, monensin, salinomycin, semduramicin, narasin) - những hợp chất tự nhiên có nguồn gốc từ sản phẩm trao đổi chất của *Streptomyces* spp. và *Actinomadura* spp. [3] và nhóm coccidiostats tổng hợp (diclazuril, decoquinat, halofuginon, nicarbazin, robenidin) - những chất được tổng hợp nhờ phản ứng hóa học [4].

Tại Việt Nam, kháng sinh diệt cầu trùng thuộc nhóm thuốc thú y không phải kê đơn theo Quy định hiện hành về kê đơn, đơn thuốc thú y theo Thông tư số 12/2020/TT-BNNPTNT ngày 09/11/2020 [5] và Thông tư số 13/2022/TT-BNNPTNT ngày 28/9/2022 của Bộ Nông nghiệp và phát triển nông thôn [6]. Vì vậy, việc kiểm soát hàm lượng của các kháng sinh diệt cầu trùng là điều cần thiết, để đảm bảo chất lượng thực phẩm cũng như bảo vệ sức khỏe con người. Quy định của Việt Nam về dư lượng tối đa cho phép (MRLs) của nhóm cầu trùng theo thông tư số 24/2013/TT-BYT [7] được thể hiện tại Bảng 1.

Bảng 1. Mức tồn dư tối đa cho phép trong thực phẩm có nguồn gốc động vật của các chất kháng sinh diệt cầu trùng theo thông tư 24/2013/TT-BYT

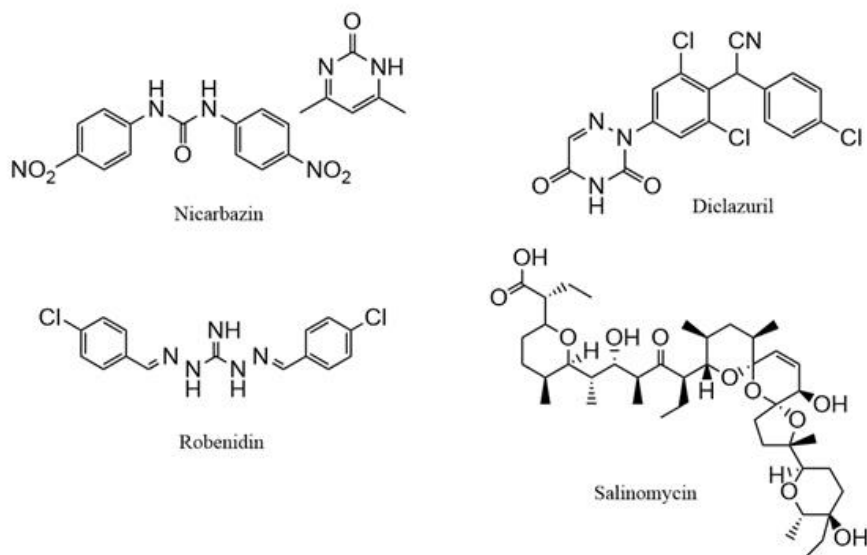
Tên kháng sinh	Loại sản phẩm	MRLs (µg/kg)	Ghi chú
Diclazuril	Thịt gia cầm, thịt thỏ, thịt cừu	500	
	Gan gia cầm, gan thỏ, gan cừu	3000	
	Thận gia cầm, thận thỏ, thận cừu	2000	
	Mỡ/da gia cầm, mỡ thỏ, mỡ cừu	1000	
Nicarbazin	Thịt gà, gan gà, thận gà, mỡ/da gà	200	Áp dụng với các loại gà thịt

Hiện nay có nhiều phương pháp khác nhau để phân tích riêng rẽ hoặc đồng thời các chất diclazuril, nicarbazin, robenidin, salinomycin trong thực phẩm. Một trong số các phương pháp có thể kể đến như phương pháp đo quang [8], phương pháp điện hóa [9] và phương pháp sắc ký lỏng [1, 2, 10-12]. Ở Việt Nam, hầu như chưa có công bố nào về nghiên cứu xác định đồng thời các kháng sinh này trong thực phẩm, 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 diệt cầu trùng (diclazuril, nicarbazin, robenidin, salinomycin) trong thực phẩm nhằm góp phần vào phát triển các quy trình định lượng kháng sinh diệt cầu trùng một cách nhanh chóng, hiệu quả.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng, vật liệu nghiên cứu

Bốn kháng sinh diệt cầu trùng gồm: 3 kháng sinh nhóm coccidiostats tổng hợp (diclazuril, nicarbazin, robenidin) và 1 kháng sinh nhóm coccidiostat ionophore (salinomycin) đã được lựa chọn là đối tượng phân tích trong nghiên cứu này. Công thức cấu tạo của diclazuril, nicarbazin, robenidin và salinomycin được thể hiện trong Hình 1.



Hình 1. Công thức cấu tạo của nicarbazin, diclazuril, robenidin và salinomycin

Đối tượng mẫu lựa chọn là các mẫu thực phẩm được mua ngẫu nhiên trên địa bàn Hà Nội vào tháng 2-3 năm 2024. Trong đó, 31 mẫu thu thập được bao gồm: 23 mẫu thịt và sản phẩm từ thịt: thịt lợn, thịt gà, thịt bò, giò, chả; 08 mẫu sữa và sản phẩm từ sữa: sữa chua, sữa bột, sữa nước.

2.2. Hóa chất, chất chuẩn và mẫu nghiên cứu

Tất cả các hóa chất sử dụng trong nghiên cứu này đều thuộc loại tinh khiết phân tích dùng cho LC-MS/MS. Chất chuẩn: diclazuril (LGC, Anh), độ tinh khiết 97,65%, số lô G1103115; nicarbazin (LGC, Anh), độ tinh khiết 98,93%, số lô G1156363; salinomycin sodium (LGC, Anh), độ tinh khiết 79,60%, số lô 1224352; robenidin hydrochlorid (LGC, Anh), độ tinh khiết 93,43%, số lô G1208660 (LGC, Anh). Hóa chất: methanol (CH₃OH) (Merck, Đức), acetonitrile (C₂H₃N) (Merck, Đức), acid formic (HCOOH) (Merck, Đức), nước cất 2 lần lấy từ máy lọc nước siêu tinh khiết Milli-Q, magnesium sulfat khan (MgSO₄) (Xilong, Trung Quốc), natri chlorid khan (NaCl) (Xilong, Trung Quốc), chất hấp phụ sử dụng cho chiết pha rắn: Bondesil (octadecyl silica) - C18 (Aligent, Mỹ).

2.3. Thiết bị

Thiết bị chính sử dụng trong nghiên cứu là hệ thống sắc ký lỏng LC-MS/MS SCIEX Exion LC 20AD ghép nối detector khối phổ AB SCIEX Triple Quad 6500+, cột sắc ký pha đảo Symmetry C18 (2,1 x 150 mm, 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.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp phân tích

Phương pháp sắc ký lỏng kết nối detector khối phổ hai lần (LC-MS/MS) được sử dụng để phân tích đồng thời bốn kháng sinh diệt cầu trùng trong mẫu thực phẩm (thịt và các sản phẩm của thịt, sữa và các sản phẩm của sữa). Đây là phương pháp phân tích hiện đại, có độ nhạy, độ chính xác và độ chọn lọc cao, phù hợp cho mục tiêu nghiên cứu.

2.3.2. Phương pháp chuẩn bị mẫu

Quy trình đồng nhất mẫu được tiến hành như sau: đối với mẫu sữa, tiến hành đồng nhất 2 hộp/túi sữa và bảo quản ở 2-8°C đến khi sử dụng. Mẫu thịt được loại bỏ da, xương và mỡ sau đó cắt nhỏ và đồng nhất bằng máy đồng nhất mẫu, mẫu được bảo quản ở nhiệt độ -18°C đến khi sử dụng.

Trong nghiên cứu này, phương pháp QuEChERS được sử dụng để xử lý mẫu với ưu điểm nhanh, thực hiện dễ dàng, chi phí thấp, hiệu quả tốt, ổn định và an toàn. Qua tham khảo tài liệu [13, 14], quy trình xử lý mẫu dự kiến được thực hiện như sau: cân chính xác khoảng 5,0 g mẫu đã đồng nhất trên cân phân tích có độ chính xác 0,1 mg vào ống ly tâm 50 mL. Thêm 5,0 mL nước (mẫu lỏng không cần thêm nước), lắc xoáy 1 phút. Thêm 10,0 mL dung môi chiết (khảo sát các dung môi: ACN, HCOOH 0,1%/ACN và HCOOH 1%/ACN), lắc xoáy 3 phút. Thêm hỗn hợp muối chiết (khảo sát lượng muối NaCl kết hợp với 4 g MgSO₄ khan), lắc xoáy 1 phút và ly tâm 6000 vòng/phút trong 5 phút. Hút 1,0 mL dịch chiết vào ống d-SPE chứa 0,2 g MgSO₄ và C18 (khảo sát lượng C18 sử dụng), lắc xoáy 1 phút, sau đó ly tâm 13000 vòng/phút trong 5 phút. Hút 600 µL dịch chiết vào lọ đựng mẫu và tiến hành phân tích trên hệ thống LC-MS/MS.

Các mẫu trắng được sử dụng trong quá trình khảo sát gồm sữa lỏng và thịt gà đã được xác định bằng phương pháp LC-MS/MS cho kết quả không chứa các chất phân tích.

2.3.3. Đánh giá phương pháp phân tích

Việc thẩm định phương pháp phân tích được thực hiện theo hướng dẫn của Hiệp hội các nhà hóa học phân tích chính thống (AOAC 2016) [15], các thông số thẩm định bao gồm: độ đặc hiệu, giới hạn phát hiện (MDL), giới hạn định lượng (MQL) của phương pháp, khoảng nồng độ tuyến tính và đường chuẩn, độ đúng (được đánh giá thông qua độ thu hồi), độ chụm (được đánh giá thông qua độ lặp lại với giá trị độ lệch chuẩn tương đối (RSD%)).

2.3.4. Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu và kết quả được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2019.

Hàm lượng các chất phân tích (bốn kháng sinh diệt cầu trùng) trong mẫu thực phẩm được tính theo công thức:

$$X = \frac{C \times V \times k}{m}$$

Trong đó: X là hàm lượng chất phân tích trong mẫu (µg/kg); V là thể tích dịch chiết (mL), C là nồng độ chất phân tích tính được theo đường chuẩn (µg/mL); K là hệ số pha loãng; m là khối lượng mẫu (g).

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

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

Trên cơ sở tham khảo tài liệu [16] và cấu trúc của chất phân tích, điều kiện MS/MS được khảo sát với kỹ thuật ion hoá phun điện tử ESI bằng cách tiêm không qua cột vào hệ thống khối phổ lần lượt các dung dịch chuẩn của từng chất phân tích với nồng độ 50,0 ng/mL. Các ion con có tín hiệu cao nhất được lựa chọn để định lượng và ion con có tín hiệu lớn thứ hai dùng để định tính. Điều kiện mảnh ion mẹ, mảnh ion con và các thông số tối ưu cho từng mảnh được trình bày ở Bảng 2.

Bảng 2. Điều kiện phân tích các chất kháng sinh trên thiết bị LC-MS/MS

Chất phân tích	ESI	KLPT (g/mol)	Ion mẹ (m/z)	Ion con (m/z)	CE (V)	CXP (V)	Ứng dụng
Diclazuril	(-)	407,64	404,817	333,800	-28	-27	Định lượng
				335,898	-32	-29	Định tính
Nicarbazin	(+)	426,38	301,006	106,993	-52	-11	Định lượng
				136,940	-24	-17	Định tính
Salinomycin	(+)	750,1	773,500	431,200	48	10	Định lượng
				265,200	48	10	Định tính
Robenidin	(+)	334,1	334,100	138,000	25	10	Định lượng
				110,900	47	10	Định tính

Qua tham khảo các tài liệu [11] kết hợp với khảo sát trên hệ thiết bị LC-MS/MS, hệ pha động acid formic 0,1% và methanol theo chương trình gradient được lựa chọn nhằm phân tích đồng thời bốn kháng sinh diệt cầu trùng, cụ thể như sau: pha động gồm kênh A (acid formic 0,1% trong nước) và kênh B (MeOH); tốc độ dòng: 0,5 mL/phút; thể tích tiêm mẫu là 10 μ L.

Chương trình gradient pha động được thể hiện tại Bảng 3.

Bảng 3. Chương trình gradient phân tích các chất kháng sinh

Thời gian (phút)	Kênh A (%)	Kênh B (%)
0 - 4,0	100,0	0
4,0 - 7,3	0	100,0
7,3 - 9,0	100,0	0

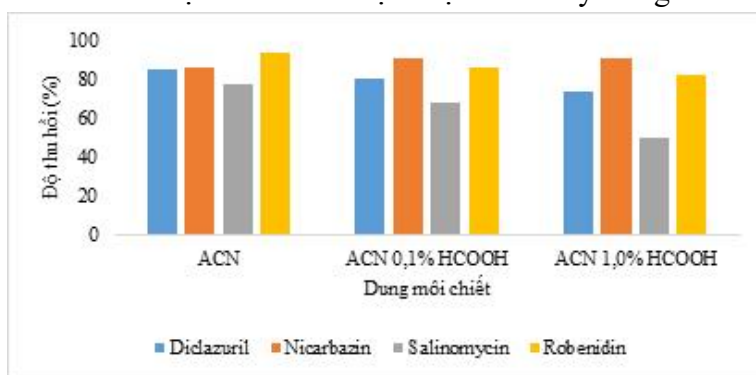
Đối với chương trình gradient như Bảng 3, 100% kênh A có vai trò cân bằng và ổn định cột, sau đó, % kênh B được tăng dần từ 0-100% để tách được các chất trong cột sắc ký bằng hỗn hợp dung môi của 2 kênh. Sau đó, % kênh B được giảm dần về 0% để cân bằng cột và loại bỏ hoàn toàn chất phân tích còn trong cột.

3.2. Khảo sát điều kiện xử lý mẫu

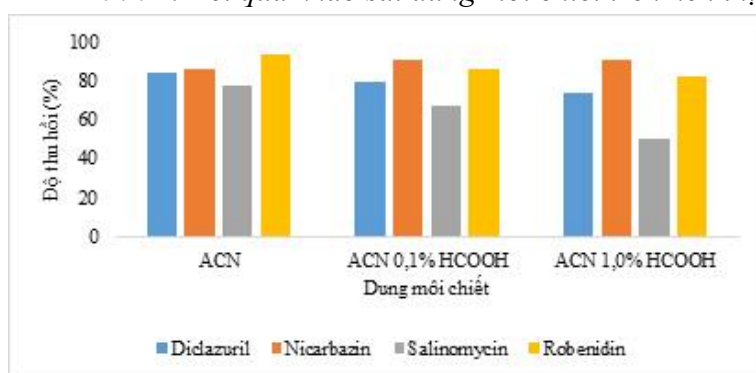
3.2.1. Khảo sát dung môi chiết mẫu

Nền mẫu được lựa chọn để khảo sát gồm nền sữa lỏng và thịt gà đã được đồng nhất. Các mẫu trắng được thêm hỗn hợp chuẩn kháng sinh ở hàm lượng 50 μ g/kg. Sau đó, tiến

hành khảo sát các dung môi chiết gồm ACN, HCOOH 0,1%/ACN và HCOOH 1%/ACN. Kết quả độ thu hồi trên nền thịt và sữa lần lượt được trình bày trong Hình 2 và 3.



Hình 2. Kết quả khảo sát dung môi chiết trên nền thịt

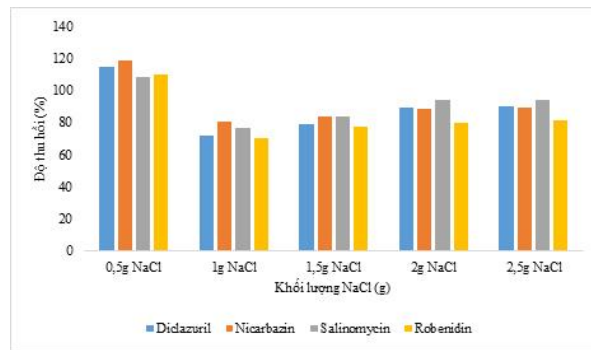


Hình 3. Kết quả khảo sát dung môi chiết trên nền sữa

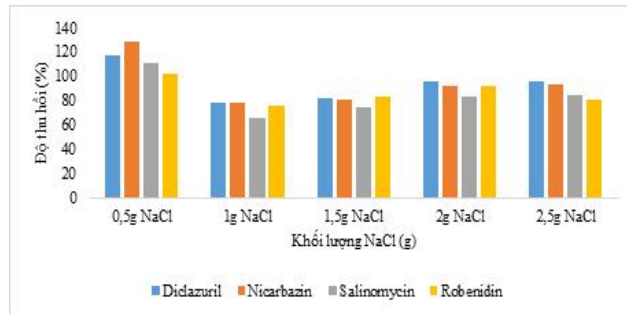
Từ kết quả thu được ở Hình 2 và 3 cho thấy, việc sử dụng dung môi chiết ACN, HCOOH 0,1%/ACN và HCOOH 1%/ACN cho hiệu suất cao (trên 80%) đối với 2 chất diclazuril và robenidin trên nền thịt và sữa. Khi sử dụng dung môi ACN, hiệu suất thu hồi của robenidin đạt cao nhất (> 90%) đối với cả nền sữa và thịt, với 2 dung môi còn lại cho hiệu suất thu hồi giảm dần khi tăng nồng độ acid formic trong mẫu. Hiệu suất thu hồi của salinomycin thấp nhất (< 80%) đối với cả 2 nền mẫu thịt và sữa. Điều này có thể giải thích là do nồng độ HCOOH càng tăng thì pH của dung môi chiết giảm trong khi các chất phân tích trong Hình 2 có tính kiềm. Thêm vào đó, salinomycin có công thức phân tử tương đối lớn, việc tách chất này ra khỏi nền mẫu phức tạp là tương đối khó khăn. Nhìn chung, trong 3 dung môi lựa chọn khảo sát thì ACN cho hiệu suất của bốn chất kháng sinh cao nhất. Vì vậy, dung môi chiết ACN được lựa chọn cho các khảo sát tiếp theo.

3.2.2. Khảo sát thành phần muối chiết

Hỗn hợp muối chiết có vai trò ổn định pH và tăng độ phân cực của pha nước trong quy trình chiết QuEChERS. Hỗn hợp này bao gồm $MgSO_4$ có vai trò loại nước trong dịch chiết và NaCl giúp tăng khả năng điện ly của dung dịch, hỗ trợ cho các chất được chiết vào dung môi tốt hơn và tách ra khỏi pha nước. Trong nghiên cứu này, thành phần NaCl được khảo sát lần lượt là 0,5 g; 1,0 g; 1,5 g và 2 g kết hợp với 4 g $MgSO_4$ khan trong hỗn hợp muối chiết. Kết quả độ thu hồi của bốn kháng sinh diệt cầu trùng thực hiện trên hai nền mẫu trắng (thịt gà và sữa) được thể hiện trong Hình 4 và 5.



Hình 4. Kết quả khảo sát thành phần NaCl trong hỗn hợp muối chiết trên nền thịt



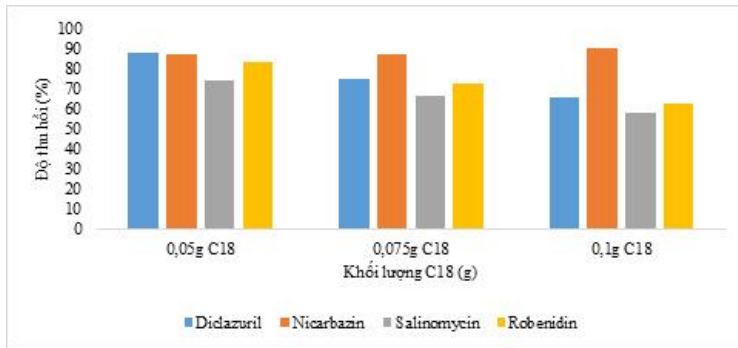
Hình 5. Kết quả khảo sát thành phần NaCl trong hỗn hợp muối chiết trên nền sữa

Từ kết quả thu được ở Hình 4 và Hình 5 cho thấy, đối với cả trên nền thịt và sữa, khi tăng lượng muối NaCl từ 0,5 g đến 2,5 g thì hiệu suất của các chất phân tích đều tăng dần, trong đó quy trình sử dụng 2 g và 2,5 g NaCl cho hiệu suất cao nhất với tất cả 4 chất (đều trên 80,0% và đạt theo yêu cầu của AOAC [15]). Điều này có thể giải thích là do NaCl giúp tăng khả năng điện ly, việc tăng dần lượng NaCl giúp chất phân tích được chiết sang dung môi ACN và tách khỏi pha nước tốt hơn. Tuy nhiên, khi tăng khối lượng NaCl từ 2 g lên 2,5 g thì hiệu suất thu hồi có tăng nhưng không đáng kể. Vì vậy, thành phần muối chiết 2 g NaCl kết hợp với 4 g MgSO₄ khan được lựa chọn cho các khảo sát tiếp theo nhằm giảm thiểu chi phí trong quá trình phân tích.

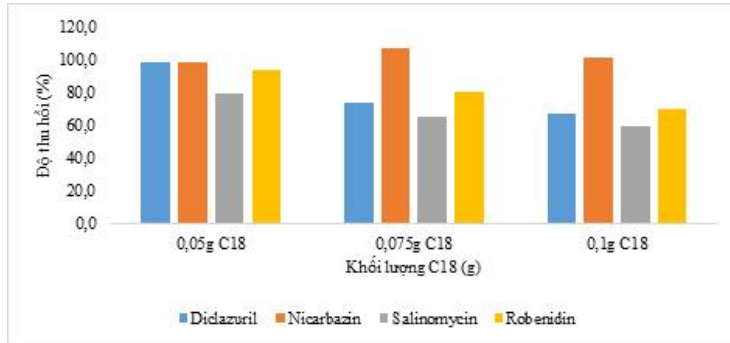
3.2.3. Khảo sát thành phần d-SPE

Thành phần d-SPE trong quy trình xử lý mẫu có vai trò loại bỏ các chất đồng tan với chất phân tích, tăng độ sạch của nền mẫu, giảm ảnh hưởng của các chất đồng tan đến sự phát hiện chất phân tích của thiết bị. Hỗn hợp d-SPE bao gồm MgSO₄ giúp loại nước lẫn trong lớp dung môi hữu cơ và bột C18 là chất hấp phụ pha đảo, kỵ nước, giúp loại bỏ chất không phân cực như lipid. Do đó, việc khảo sát lượng chất hấp phụ C18 và lượng MgSO₄ trong thành phần d-SPE là rất cần thiết nhằm thu được hiệu quả chiết tốt nhất.

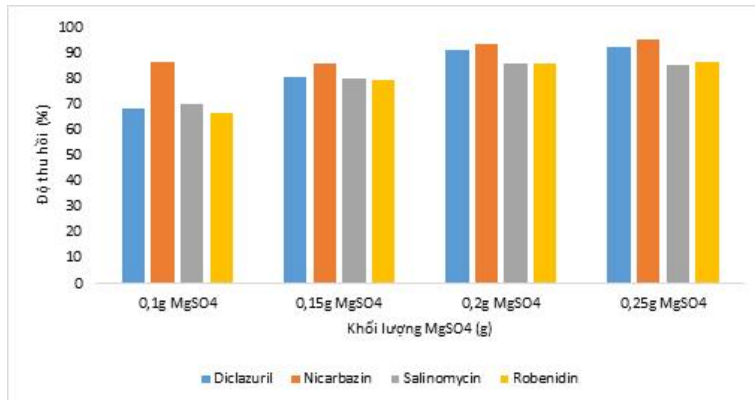
Trước hết, chất hấp phụ C18 được khảo sát với các lượng 0,05 g; 0,075 g; 0,1 g khi kết hợp cùng 0,15 g MgSO₄ trong hỗn hợp d-SPE. Kết quả hiệu suất thu hồi của các chất phân tích khi khảo sát các lượng C18 khác nhau được thể hiện trong Hình 6 và 7. Kết quả cho thấy, có sự thay đổi hiệu suất thu hồi của các chất đối với lượng C18. Khi tăng dần lượng chất hấp phụ C18 từ 0,05 g đến 0,1 g thì hiệu suất thu hồi của các chất giảm dần. Hiệu suất thu hồi của các chất cao nhất tại 0,05 g C18. Điều này có thể giải thích là do khi tăng dần lượng C18, chất phân tích có nguy cơ bị hấp phụ một phần trên vật liệu làm cho hiệu suất thu hồi giảm đi. Vì vậy, khối lượng 0,05 g C18 được lựa chọn các khảo sát tiếp theo.



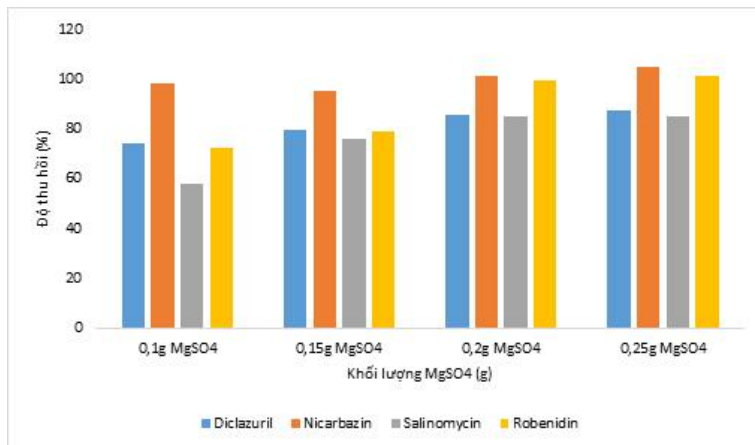
Hình 6. Kết quả khảo sát thành phần C18 trong d-SPE trên nền thịt



Hình 7. Kết quả khảo sát thành phần C18 trong d-SPE trên nền sữa



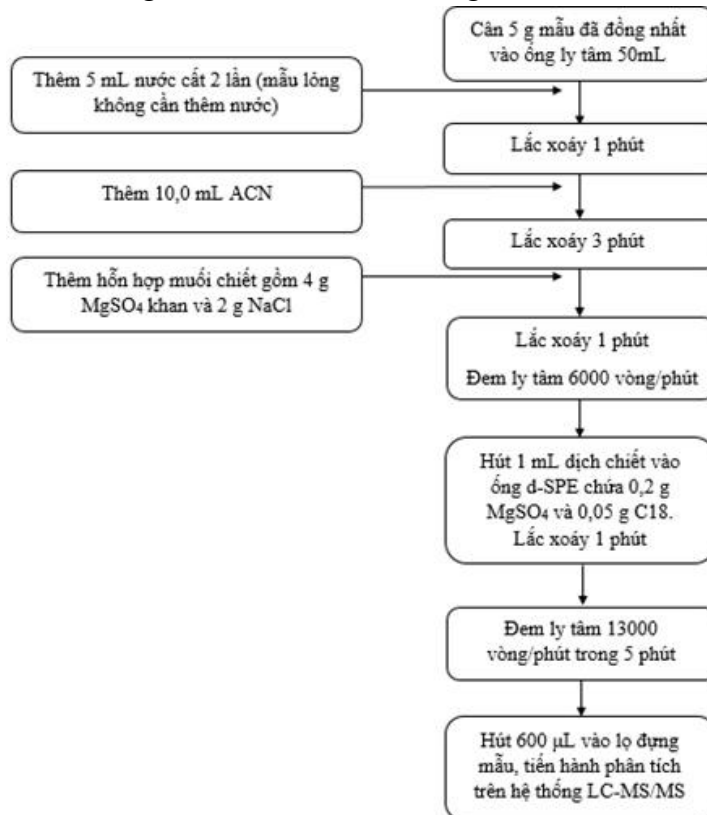
Hình 8. Kết quả khảo sát thành phần MgSO₄ trong d-SPE trên nền thịt



Hình 9. Kết quả khảo sát thành phần MgSO₄ trong d-SPE trên nền sữa

Kết quả ở Hình 8 và 9 cho thấy ở cả nền thịt và sữa, quy trình sử dụng 0,2 g MgSO₄ và 0,25 g MgSO₄ đều cho độ thu hồi cao nhất đối với tất cả 4 chất phân tích (đều trên 80%). Điều này có thể giải thích là do khi tăng lượng MgSO₄ sẽ giúp loại bỏ thành phần nước lẫn trong lớp dung môi hữu cơ tốt hơn, tăng độ sạch của nền mẫu. Tuy nhiên, khi tăng lượng MgSO₄ từ 0,2 g lên 0,25 g thì hiệu suất tăng lên không đáng kể. Vì vậy, lượng MgSO₄ 0,2 g kết hợp với 0,05 g C18 trong thành phần d-SPE được lựa chọn trong nghiên cứu này nhằm giảm thiểu chi phí trong quá trình phân tích.

Trên cơ sở kết quả khảo sát thu được, quy trình xử lý mẫu nhằm phân tích đồng thời bốn kháng sinh diệt cầu trùng được lựa chọn như trong Hình 10.



Hình 10. Quy trình xử lý mẫu tối ưu

3.3. Đánh giá phương pháp phân tích

3.3.1. Độ đặc hiệu

Trong phương pháp sắc ký sử dụng detector khối phổ (MS), số điểm IP (identification point) là một giá trị quan trọng để đánh giá độ đặc hiệu. Cách tính số điểm IP trong phương pháp LC-MS/MS như sau: 1 điểm với kỹ thuật tách LC, 1 điểm với mỗi ion mẹ và 1,5 điểm với mỗi ion con. Theo kết quả trong Bảng 2, mỗi chất phân tích đều có 1 ion mẹ và 2 ion con. Vì vậy, tất cả các chất đều có điểm IP ≥ 5 , đáp ứng được yêu cầu về điểm IP (IP ≥ 5).

Ngoài ra, độ đặc hiệu của phương pháp còn được xác nhận qua việc phân tích mẫu trắng, mẫu chuẩn và mẫu thêm chuẩn. Từ kết quả thu được cho thấy, mẫu trắng không xuất hiện tín hiệu các chất phân tích, thời gian lưu của 4 chất phân tích trong chuẩn và mẫu thêm chuẩn khác nhau không có ý nghĩa thống kê ($< 1\%$). Do đó, phương pháp có độ đặc hiệu tốt, đáp ứng yêu cầu.

3.3.2. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng

Giới hạn phát hiện (MDL) và giới hạn định lượng (MQL) của phương pháp được xác định dựa trên tỷ số tín hiệu/nhiều (S/N). MDL được xác định bằng cách đo các mẫu trắng thêm chuẩn với các nồng độ nhỏ dần của hỗn hợp bốn chất phân tích cho đến khi thu được tỷ số tín hiệu/nhiều (S/N) bằng 3. MQL được xác định sau khi xác định được MDL, bằng cách lấy MDL nhân với 10/3 ($MQL = 10 \times MDL/3$). Kết quả thu được của bốn chất phân tích đều là MDL= 3 µg/kg, MQL= 10 µg/kg. Giới hạn phát hiện này nhỏ, phù hợp để xác định hàm lượng bốn chất kháng sinh diệt cầu trùng trong mẫu thực tế.

3.3.3. Đường chuẩn và độ tuyến tính

Trên cơ sở các điều kiện phân tích đã lựa chọn, đường chuẩn của bốn chất kháng sinh diệt cầu trùng đã được xây dựng với sự phụ thuộc tuyến tính giữa diện tích pic và nồng độ của các chất phân tích trong khoảng từ 10 đến 100 µg/kg.

Nền mẫu có ảnh hưởng lớn đến kết quả phân tích, đặc biệt là khi mẫu không được xử lý tốt. Nền mẫu có thể làm tăng hoặc làm giảm tín hiệu phân tích. Do đó, đường chuẩn của bốn chất phân tích được xây dựng trên nền mẫu trắng (thịt và sữa) để giảm thiểu ảnh hưởng này. Kết quả các phương trình đường chuẩn của bốn chất trên các nền mẫu trắng cùng với hệ số tương quan được thể hiện trong Bảng 4. Trong đó, x là diện tích pic và y là nồng độ chất phân tích.

Bảng 4. Phương trình đường chuẩn và hệ số tương quan trên nền mẫu thịt và sữa

Nền mẫu	Chất phân tích	Phương trình đường chuẩn	Hệ số tương quan (R^2)
Sữa	Diclazuril	$y = 30200x + 429000$	0,9998
Thịt		$y = 20200x + 234000$	0,9995
Sữa	Nicarbazin	$y = 44700x + 34400$	0,9993
Thịt		$y = 48200x - 45800$	0,9975
Sữa	Salinomycin	$y = 12600x - 11000$	0,9986
Thịt		$y = 7170x + 2790$	0,9982
Sữa	Robenidin	$y = 31900x + 237000$	0,9998
Thịt		$y = 44800x + 73300$	0,9985

Kết quả ở Bảng 4 cho thấy phương trình đường chuẩn của bốn chất đều có hệ số tương quan $R^2 > 0,995$. Do đó, trong khoảng nồng độ đã khảo sát có sự phụ thuộc tuyến tính giữa diện tích pic và nồng độ tương ứng. Độ chệch tại tất cả các điểm nồng độ đều không vượt quá $\pm 15\%$, đáp ứng yêu cầu AOAC [15].

3.3.4. Độ chụm và độ đúng của phương pháp

Độ đúng (được đánh giá thông qua độ thu hồi (H%)) và độ chụm (được đánh giá thông qua độ lặp lại với giá trị độ lệch chuẩn tương đối (RSD%)) trên cơ sở phân tích mẫu trắng thêm chuẩn tại 3 mức hàm lượng 10,0; 20,0 và 100 µg/kg. Mỗi mức hàm lượng được phân tích lặp lại 06 lần theo quy trình xử lý mẫu ở Hình 10. Kết quả phân tích độ chụm và độ đúng được thể hiện tóm tắt trong Bảng 5.

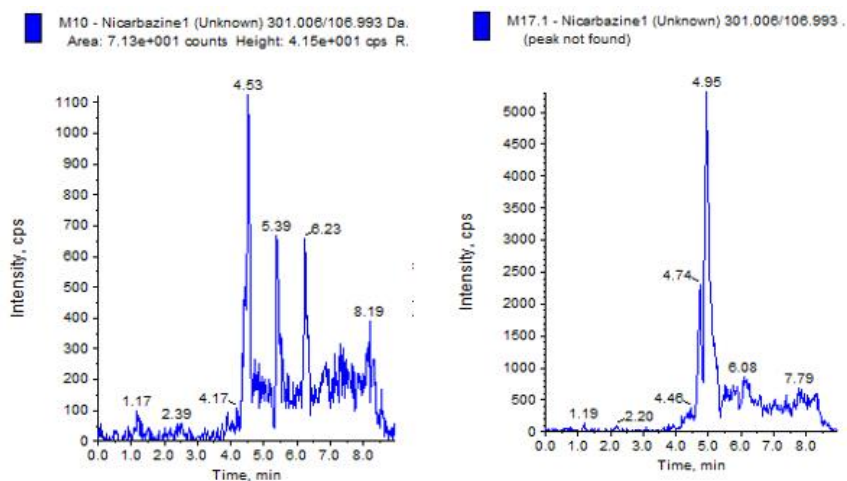
Bảng 5. Kết quả độ chụm và độ đúng trên nền mẫu thịt và sữa

Chất phân tích	Thông số	Nền mẫu	
		Thịt	Sữa
Diclazuril	RSD	4,01 - 9,77	5,29 - 10,13
Nicarbazine	(%)	1,89 - 4,98	1,77 - 4,56
Salinomycin		4,32 - 7,90	5,06 - 5,93
Robenidin		2,99 - 6,71	3,95 - 9,04
Diclazuril	H	81,5 - 104	83,7 - 106
Nicarbazine	(%)	87,5 - 104	96,7 - 109
Salinomycin		84,4 - 107	83,2 - 102
Robenidin		85,7 - 102	81,2 - 103

Kết quả thu được trong Bảng 5 cho thấy, độ thu hồi của các chất trong khoảng 81,5 - 107,0% và RSD trong khoảng 1,89 - 9,77% trên nền mẫu thịt. Độ thu hồi của các chất trong khoảng 81,2 - 109% và RSD trong khoảng 1,77 - 10,13% trên nền mẫu sữa. Theo quy định của AOAC 2016 [15], ở mức nồng độ 10 - 100 ppb thì độ thu hồi yêu cầu là 80 - 110% và độ lặp lại yêu cầu RSD nhỏ hơn 15%. Vì vậy, phương pháp phân tích đáp ứng được yêu cầu về độ đúng và độ chụm theo quy định của AOAC 2016 [15]. Phương pháp có thể áp dụng để phân tích dư lượng kháng sinh nhóm diệt cầu trùng trong mẫu thực tế.

3.4. Phân tích mẫu thực tế

Phương pháp sau khi thẩm định đáp ứng yêu cầu đã được áp dụng để phân tích hàm lượng bốn kháng sinh nhóm diệt cầu trùng trong 23 mẫu thịt và sản phẩm thịt (bao gồm: thịt gà, lợn, bò và giò chả) và 8 mẫu sữa và sản phẩm sữa (gồm: sữa lỏng, sữa bột và sữa chua) được thu thập trên địa bàn Hà Nội. Kết quả cho thấy không phát hiện cả bốn chất phân tích trong tất cả các mẫu (với MDL là 3,0 µg/kg). Để minh chứng khả năng áp dụng của phương pháp đối với các mẫu thực tế, tất cả 31 mẫu này đều được thêm chuẩn hỗn hợp bốn kháng sinh diệt cầu trùng ở mức hàm lượng 20 µg/kg để phân tích và đánh giá hiệu suất thu hồi. Một số sắc đồ minh họa được thể hiện ở Hình 11.



1. Sắc ký đồ mẫu thịt gà

2. Sắc ký đồ mẫu sữa bột

Hình 11. Sắc đồ phân tích mẫu thực và mẫu thêm chuẩn trên nền mẫu sữa bột và thịt gà

Kết quả cho thấy, hiệu suất thu hồi của tất cả các chất trong các mẫu thêm chuẩn đạt được trong khoảng từ 81,1 - 95,8%, đáp ứng theo yêu cầu của AOAC 2016 [15]. Kết quả này đã minh chứng được khả năng áp dụng của phương pháp trên nền mẫu thực tế.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã thành công trong việc xây dựng quy trình xác định đồng thời 04 kháng sinh có tác dụng diệt cầu trùng (diclazuril, salinomycin, nicarbazin và robenidine) trên nền thực phẩm một cách nhanh chóng, hiệu quả. Phương pháp đã được áp dụng để phân tích hàm lượng 04 kháng sinh này trong 31 mẫu thực phẩm (thịt và các sản phẩm từ thịt, sữa và các sản phẩm sữa) được thu thập ngẫu nhiên trên thị trường Hà Nội. Kết quả bước đầu cho thấy không phát hiện bốn chất kháng sinh này tồn dư trong tất cả các mẫu ở mức MDL là 3 µg/kg. Hiệu suất thu hồi của bốn chất trong tất cả các mẫu thêm chuẩn ở mức hàm lượng 10 µg/kg đạt được trong khoảng 81,1 - 95,8%, cho thấy phương pháp hoàn toàn có thể áp dụng để phân tích các đối tượng mẫu này. Thịt và sữa là hai loại thực phẩm có nhu cầu tiêu thụ rất lớn và phổ biến tại thị trường Việt Nam. Vì vậy, việc kiểm soát dư lượng kháng sinh diệt cầu trùng giúp đảm bảo chất lượng của các thực phẩm này và bảo vệ sức khỏe người tiêu dùng, đặc biệt là khi những loại thuốc thú y này không thuộc danh mục thuốc phải kê đơn và được sử dụng rộng rãi như hiện nay.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. S.-H. Chang, Y.-H. Lai, C.-N. Huang, G.-J. Peng, C.-D. Liao, Y.-M. Kao, *et al.*, "Multi-residue analysis using liquid chromatography tandem mass spectrometry for detection of 20 coccidiostats in poultry, livestock, and aquatic tissues," *Journal of food and drug analysis*, vol. 27, pp. 703-716, 2019.
- [2]. B. Shao, X. Wu, J. Zhang, H. Duan, X. Chu, and Y. Wu, "Development of a rapid LC-MS-MS method for multi-class determination of 14 coccidiostat residues in eggs and chicken," *Chromatographia*, vol. 69, pp. 1083-1088, 2009.
- [3]. A. Bello, J. Henri, A. Viel, J. P. Mochel, and B. Poźniak, "Ionophore coccidiostats-disposition kinetics in laying hens and residues transfer to eggs," *Poultry Science*, vol. 102, p. 102280, 2023.
- [4]. L. Clarke, T. L. Fodey, S. R. Crooks, M. Moloney, J. O'Mahony, P. Delahaut, *et al.*, "A review of coccidiostats and the analysis of their residues in meat and other food," *Meat science*, vol. 97, pp. 358-374, 2014.
- [5]. Ministry of Agriculture and Rural Development, "Circular No.12/2020/TT-BNNPTNT on Amendments to Circulars on Management of Veterinary drugs," 2020 (in Vietnamese).
- [6]. Ministry of Agriculture and Rural Development, "Circular No.13/2022/TT-BNNPTNT providing for Management of Veterinary drugs containing narcotic substances and precursors; veterinary prescribing," 2022 (in Vietnamese).

- [7]. Ministry of Health, "Circular No.24/2013/TT-BYT on the Promulgation of the Regulation on Maximum limits on residues of Veterinary medicines in food," 2013 (in Vietnamese).
- [8]. G. Bories, "Simple determination of the coccidiostat robenidine in poultry feed," *Analyst*, vol. 100, pp. 567-569, 1975.
- [9]. S. Ivakh, L. Dubenska, M. Rydchuk, and S. Plotycya, "Voltammetric Behavior and Reliable Method for the Determination of Coccidiostat Robenidine in Animal Feed and Poultry Meat," *Electroanalysis*, vol. 33, pp. 256-267, 2021.
- [10]. M. E. Dasenaki and N. S. Thomaidis, "Multi-residue methodology for the determination of 16 coccidiostats in animal tissues and eggs by hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectrometry," *Food chemistry*, vol. 275, pp. 668-680, 2019.
- [11]. M. Olejnik, T. Szprengier-Juszkiewicz, and P. Jedziniak, "Multi-residue confirmatory method for the determination of twelve coccidiostats in chicken liver using liquid chromatography tandem mass spectrometry," *Journal of Chromatography A*, vol. 1216, pp. 8141-8148, 2009.
- [12]. F. Barreto, C. Ribeiro, R. B. Hoff, and T. Dalla Costa, "A simple and high-throughput method for determination and confirmation of 14 coccidiostats in poultry muscle and eggs using liquid chromatography–quadrupole linear ion trap-tandem mass spectrometry (HPLC–QqLIT-MS/MS): Validation according to European Union 2002/657/EC," *Talanta*, vol. 168, pp. 43-51, 2017.
- [13]. S. J. Lehotay, A. R. Lightfield, L. Geis-Asteggiane, M. J. Schneider, T. Dutko, C. Ng, *et al.*, "Development and validation of a streamlined method designed to detect residues of 62 veterinary drugs in bovine kidney using ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry," *Drug Testing and Analysis*, vol. 4, pp. 75-90, 2012.
- [14]. G. Stubbings and T. Bigwood, "The development and validation of a multiclass liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) procedure for the determination of veterinary drug residues in animal tissue using a QuEChERS (QUick, Easy, CHEap, Effective, Rugged and Safe) approach," *Analytica Chimica Acta*, vol. 637, pp. 68-78, 2009.
- [15]. G. Latimer Jr, "Guidelines for standard method performance requirements: official methods of analysis," *AOAC International*, pp. 1-18, 2016.
- [16]. L. Clarke, M. Moloney, J. O'mahony, R. O'kenedy, and M. Danaher, "Determination of 20 coccidiostats in milk, duck muscle and non-avian muscle tissue using UHPLC-MS/MS," *Food Additives & Contaminants: Part A*, vol. 30, pp. 958-969, 2013.