

NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG QUY TRÌNH PHÂN TÍCH
ĐỒNG THỜI DƯ LƯỢNG KHÁNG SINH SULFAQUINOXALIN,
SULFAMETHOXAZOL, SULFATHIAZOL VÀ TRIMETHOPRIM
THƯỜNG SỬ DỤNG TRONG THỊT GIA CẦM
BẰNG PHƯƠNG PHÁP LC-MS/MS

Lâm Đại Dương¹, Phạm Đoan Vĩ², Đỗ Châu Minh Vĩnh Thọ^{1*}

1. Trường Đại học Y Dược Cần Thơ

2. Trường Đại học Tây Đô

*Email: dcmvtho@ctump.edu.vn

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Việc kiểm soát các kháng sinh đang bị lạm dụng trong nông nghiệp, đặc biệt trên gia cầm là hết sức cần thiết. **Mục tiêu nghiên cứu:** Xây dựng, thẩm định quy trình định lượng đồng thời sulfaquinoxalin, sulfamethoxazol, sulfathiazol, trimethoprim trong mẫu thịt gà bằng LC-MS/MS theo hướng dẫn của AOAC, EC; ứng dụng phân tích dư lượng kháng sinh trong mẫu thịt gà tại tỉnh Kiên Giang. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** chất chuẩn sulfaquinoxalin, sulfamethoxazol, sulfathiazol, trimethoprim và các mẫu thịt gà thu thập tại tỉnh Kiên Giang, xây dựng quy trình định lượng bằng phương pháp sắc ký lỏng ghép khối phổ hai lần (LC-MS/MS). **Kết quả:** các thông số khối phổ phù hợp để xác định ion mẹ và ion phân mảnh của sulfaquinoxalin (301/92), sulfamethoxazol (254/92), sulfathiazol (256/156), trimethoprim (291/123). Thông số sắc ký phù hợp: cột Poroshell 120 Phenyl-Hexyl (4,6x150 mm, 2,7 μ m), chương trình rửa giải gradient, thể tích và thời gian tiêm mẫu là 10 μ L và 13 phút. Phương pháp được thẩm định với độ thu hồi (87,9–102,3%) và chính xác (RSD < 8,5%) tốt, khoảng tuyến tính lần lượt là 5-200 ppb và 2,5–100 ppb ($r^2 > 0,99$), giá trị LOD và LOQ lần lượt là 0,0625-0,125 ppb và 0,125-0,25 ppb, tương ứng cho các sulfonamid và trimethoprim. Kết quả kiểm 9 mẫu thịt gà thị trường chưa phát hiện dư lượng kháng sinh. **Kết luận:** đã phát triển quy trình phân tích có tính chọn lọc, chính xác, tin cậy cao để định lượng đồng thời 4 kháng sinh sulfaquinoxalin, sulfamethoxazol, sulfathiazol, trimethoprim trên mẫu thịt gia cầm với kết quả thẩm định đạt yêu cầu, kết quả ứng dụng quy trình trên mẫu thị trường chưa phát hiện dư lượng kháng sinh.

Từ khóa: Sulfonamid, trimethoprim, LC-MS/MS, gia cầm.

ABSTRACT

SIMULTANEOUS DETERMINATION OF SULFAQUINOXALINE,
SULFAMETHOXAZOLE, SULFATHIAZOLE
AND TRIMETHOPRIM ANTIBIOTIC RESIDUES FREQUENTLY
USED IN POULTRY MEAT BY LC-MS/MS

Lam Dai Duong¹, Pham Doan Vi², Do Chau Minh Vinh Tho^{1*}

1. Can Tho University of Medicine and Pharmacy

2. Tay Do University

Background: The control of antibiotics that are being abused in agriculture, especially in poultry, is essential. **Objectives:** To develop and validate a procedure for simultaneous quantitative analysis of sulfaquinoxaline, sulfamethoxazole, sulfathiazole, trimethoprim in chicken samples by LC-MS/MS according to AOAC, EC guidelines; procedure application for chicken samples in Kien Giang province. **Materials and methods:** Sulfaquinoxaline, sulfamethoxazole, sulfathiazole, trimethoprim standard substances and chicken samples collected in Kien Giang province, develop determination procedure using LC-MS/MS method. **Results:** The suitable mass spectrometry parameters to quantify the parent/fragment ion of sulfaquinoxaline (301/92), sulfamethoxazole

(254/92), sulfathiazole (256/156), trimethoprim (291/123). Suitable chromatographic parameters: Poroshell 120 Phenyl-Hexyl column (4.6x150 mm, 2.7 μ m), gradient elution program, sample injection volume and time of 10 μ L and 13 minutes, respectively. The method was validated with a good accuracy (87.9–102.3%) and precision (RSD < 8.5%), the linear range of 5-200 ppb and 2.5–100 ppb ($r^2 > 0.99$), LOD and LOQ values were 0.0625-0.125 ppb and 0.125-0.25 ppb for sulfonamides and trimethoprim, respectively. The application results on 9 chicken samples have not detect antibiotic residues. **Conclusion:** Developed a selective, accurate, and highly reliable analytical procedure for the simultaneous determination of 4 antibiotics sulfaquinolaxine, sulfamethoxazole, sulfathiazole, trimethoprim on poultry meat samples with satisfactory validation results, the application results on market samples have not detected antibiotic residues.

Keywords: Sulfonamide, trimethoprim, LC-MS/MS, poultry.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Kháng sinh không những là công cụ hiệu quả trong việc điều trị các bệnh nhiễm khuẩn cho con người mà hiện nay còn được sử dụng trong nông nghiệp với nhiều mục đích khác nhau. Kết quả một số nghiên cứu đã công bố cho thấy hiện tượng lạm dụng kháng sinh trong chăn nuôi, đặc biệt là trên gia cầm như: tỷ lệ kháng sinh trên mỗi kg thức ăn chăn nuôi cho gà tại Việt Nam là 25,7 mg [10], hay lượng kháng sinh sử dụng tính trên đầu gia cầm cao gấp 6 lần một số nước Châu Âu. Đặc biệt, sulfonamid/trimethoprim là một trong những kháng sinh được sử dụng nhiều nhất (2,78 mg/tuần/con) [9]. Một trong những hệ lụy của vấn đề này là sự đề kháng kháng sinh, minh chứng qua kết quả nghiên cứu tỷ lệ đề kháng trên 202 chủng *Campylobacter* phân lập từ 343 trang trại chăn nuôi gia cầm ở Đồng bằng sông Cửu Long đối với kháng sinh sulfamethoxazol-trimethoprim lên đến 99% [8]. Vì vậy, việc kiểm soát dư lượng kháng sinh sử dụng cho gia cầm là vấn đề hết sức cấp bách. Hiện nay, kỹ thuật sắc ký lỏng khối phổ hai lần (LC-MS/MS) với ưu điểm về độ nhạy, tính chính xác và tin cậy cao đang được áp dụng để phát triển phương pháp phân tích các kháng sinh trên nền mẫu thịt [1], [4], [5]. Tuy nhiên, cần thiết xây dựng một quy trình xử lý cải tiến đảm bảo tính hiệu quả, tiết kiệm, an toàn giúp phân tích đồng thời cả kháng sinh sulfonamid và trimethoprim trên nền mẫu gia cầm. Vì vậy, đề tài nghiên cứu được thực hiện nhằm mục tiêu xây dựng, thẩm định quy trình định lượng đồng thời dư lượng sulfaquinolaxin, sulfamethoxazol, sulfathiazol, trimethoprim có trong mẫu thịt gà bằng phương pháp LC-MS/MS theo hướng dẫn của AOAC, EC và ứng dụng quy trình trên mẫu thịt gà thu thập tại tỉnh Kiên Giang.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu: Bốn kháng sinh nhóm sulfathiazol (STZ), sulfamethoxazol (SMX), sulfaquinolaxin (SQX) và trimethoprim (TMP). Mẫu hỗn hợp chuẩn của 4 loại kháng sinh. Mẫu trắng: mẫu thịt gà không chứa 4 kháng sinh trên. Mẫu thử: 9 mẫu thịt gà được mã hóa từ TG1 đến TG9 mua ngẫu nhiên tại các siêu thị trên địa bàn tỉnh Kiên Giang.

Trang thiết bị, hóa chất: Hệ thống sắc ký lỏng WATERS ACQUITY UPLC H-Class system, đầu dò khối phổ ba lần tứ cực của Waters (Xevo TQD), cân phân tích ABT 220-5DM, bể siêu âm Wisd WUC-D22H, tủ lạnh sâu Sanyo MDF-236, máy đo pH Consort C1020, máy Vortex VM-10 DAIHAN Scientific, máy li tâm Hitech, máy khuấy từ IKAC-MAG HS 10, máy cô khí nitơ OA-HEAT™. Chất chuẩn STZ, SQX do công ty TRC (Canada) cung cấp và SMX, TMP do Viện Kiểm nghiệm thuốc Thành phố Hồ Chí Minh cung cấp với độ tinh khiết trên 96%.

Dung môi: Methanol (MeOH), acetonitril (ACN), axit formic (AF), isopropanol

(ISP) đạt tiêu chuẩn HPLC gradient, nước cất đạt tiêu chuẩn MS của Merck, Đức. Các hóa chất NaCl khan, Na₂SO₄ khan, MgSO₄ khan đạt tiêu chuẩn tinh khiết dùng cho sắc ký.

Chuẩn bị mẫu: Dung dịch hỗn hợp chuẩn làm việc: pha dung dịch chuẩn gốc của từng chất phân tích trong dung môi MeOH với nồng độ 400 ppm, từ dung dịch chuẩn gốc thực hiện pha loãng bằng hỗn hợp dung môi ACN:AF pH 3 (10:90) để thu được dung dịch hỗn hợp chuẩn làm việc có nồng độ từ 2,5–100 ppb đối với TMP và 5–200 ppb đối với 3 kháng sinh STZ, SMX, SQX để tiến hành thực hiện phát triển và thẩm định phương pháp phân tích. Mẫu trắng: mẫu thịt gà không chứa các kháng sinh cần phân tích STZ, SMX, SQX, TMP. Mẫu thử giả lập: mẫu hỗn hợp chuẩn của 4 kháng sinh phân tích được thêm vào mẫu trắng với nồng độ thích hợp để xây dựng và thẩm định phương pháp.

Phương pháp nghiên cứu: *Khảo sát điều kiện khối phổ tối ưu:* Hỗn hợp chuẩn STZ, SMX, SQX, TMP được pha trong hỗn hợp dung môi ACN:AF pH 3 (10:90) đến nồng độ khoảng 200 ppb và bơm trực tiếp vào hệ thống khối phổ Xevo TQD, sử dụng chế độ auto tune trong phần mềm Masslynx 4.1 để xác định thông số khối phổ ban đầu, sau đó tiến hành tối ưu hóa điều kiện khối phổ bằng chế độ tune tay (manual tune) để thu được ion phân tử ban đầu và các ion phân mảnh đặc trưng ở chế độ MRM (multi-reaction monitoring) có cường độ tín hiệu tối ưu của các kháng sinh cần phân tích với các thông số khối phổ cần khảo sát: kiểu ion hóa (ES⁺/ES⁻), thế mao quản, thế cone, tốc độ dòng khí phun (source gas flow), nhiệt độ buồng ion hóa, nhiệt độ khí bay hơi (desolvation temp), tốc độ dòng khí bay hơi (desolvation gas flow), năng lượng va đập (collision energy). *Khảo sát điều kiện sắc ký thích hợp:* dựa vào cấu trúc hóa học của chất phân tích, kỹ thuật sắc ký pha đảo được áp dụng với hệ dung môi phân cực bao gồm acetonitril, methanol, nước có hoặc không có điều chỉnh pH bằng axit formic ở các mức pH khác nhau để khảo sát điều kiện sắc ký tối ưu phân tích đồng thời 4 kháng sinh trong mẫu thử giả lập. *Khảo sát quy trình chiết thích hợp và thẩm định phương pháp:* được thực hiện sau khi khảo sát điều kiện khối phổ tối ưu, điều kiện sắc ký thích hợp, dựa trên hướng dẫn của EC/2002 [6], AOAC [2] bao gồm khảo sát tính tương thích của hệ thống, tính đặc hiệu, khoảng tuyến tính, giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ), độ đúng, độ chính xác. Quy trình sau khi thẩm định sẽ được áp dụng để xác định dư lượng các kháng sinh trên có trong mẫu thịt gà mua tại các siêu thị trên địa bàn tỉnh Kiên Giang.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Xây dựng, thẩm định quy trình định lượng đồng thời sulfaquinoxalin, sulfamethoxazol, sulfathiazol, trimethoprim trong mẫu thịt gà bằng LC-MS/MS theo hướng dẫn của AOAC, EC

Điều kiện khối phổ tối ưu:

Chế độ MRM xác định hai ion sản phẩm ứng với mỗi chất. Ion có tín hiệu cao và ổn định hơn được chọn làm ion định lượng, ion còn lại được dùng để định tính. Các thông số khối phổ tối ưu được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Kết quả khảo sát điều kiện MS tối ưu các chất phân tích

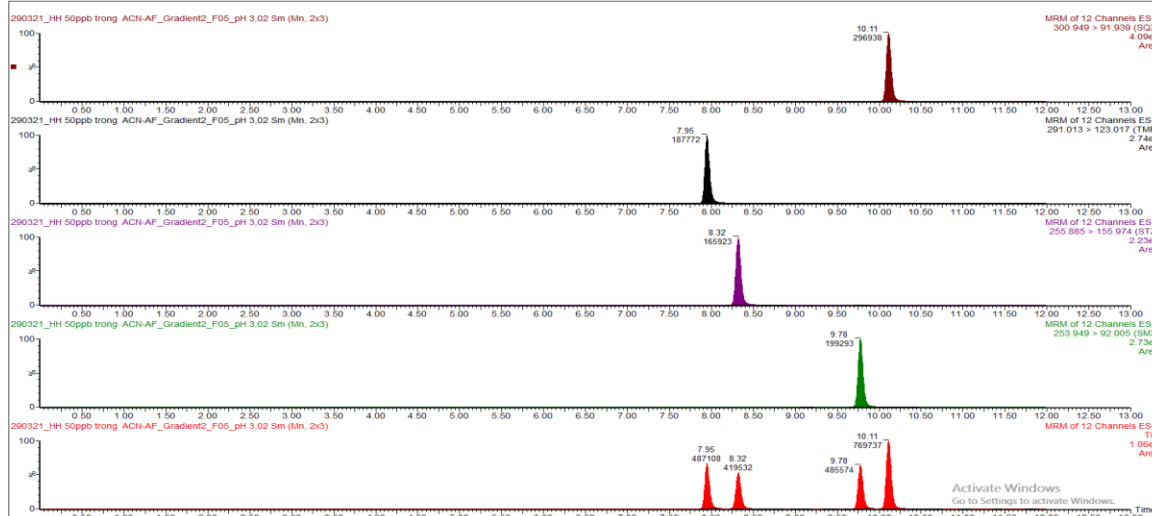
Chất phân tích	Kiểu ion hóa ESI	m/z ion phân tử ban đầu	m/z ion phân mảnh đặc trưng	Nhiệt độ khí bay hơi (°C)	Tốc độ dòng khí bay hơi (L/h)	Thế cone (V)	Thế mao quản (kV)	Năng lượng va đập (V)	Ghi chú
STZ	ES ⁺	255,9	91,9	500	1000	30	4,0	30	định tính
			155,9			30	4,0	15	định lượng
SMX		253,9	107,9			30	4,0	25	định tính
			92,0			30	4,0	30	định lượng
SQX		300,9	155,9			35	4,0	15	định tính
			91,9			35	4,0	30	định lượng
TMP		291,0	261,0			30	4,0	25	định tính
			123,0			30	4,0	25	định lượng

Nhận xét: Các kháng sinh đều được phân tích ở điều kiện khối phổ tối ưu, đảm bảo có 2 ion phân mảnh (1 mảnh định tính và 1 mảnh định lượng) đặc trưng cho chất phân tích, đáp ứng đủ 4 điểm IP theo yêu cầu của EC/2002.

Điều kiện sắc ký thích hợp: Cột Agilent Poroshell 120 Phenyl-Hexyl (4,6 mm x 150 mm x 2,7 μm). Pha động: acetonitril - nước axit formic pH 3 theo chương trình gradient được trình bày ở Bảng 2. Thể tích tiêm mẫu: 10 μL. Tốc độ dòng: 0,5 mL/phút.

Bảng 2. Điều kiện sắc ký thích hợp phân tích đồng thời 4 kháng sinh

Thời gian (phút)	Tốc độ dòng (mL/phút)	ACN (%)	Nước acid formic pH 3 (%)
0	0,5	10,0	90,0
2	0,5	10,0	90,0
9	0,5	80,0	20,0
10	0,5	80,0	20,0
10,1	0,5	10,0	90,0
13	0,5	10,0	90,0



Hình 1: Sắc ký đồ của hỗn hợp chuẩn 4 kháng sinh ở điều kiện tối ưu

Nhận xét: Kết quả sắc ký đồ ở điều kiện tối ưu thu được các pic nhọn, cân đối, cường độ tín hiệu cao và ổn định, thời gian phân tích ngắn, các chất phân tích tách ra hoàn toàn.

Quy trình xử lý mẫu thích hợp: Quy trình xử lý mẫu được khảo sát sao cho hiệu suất thu hồi của các kháng sinh đạt yêu cầu quy định, cường độ tín hiệu tốt, ổn định, hình dạng pic cân đối, quy trình đơn giản và thời gian xử lý mẫu nhanh (Hình 2).

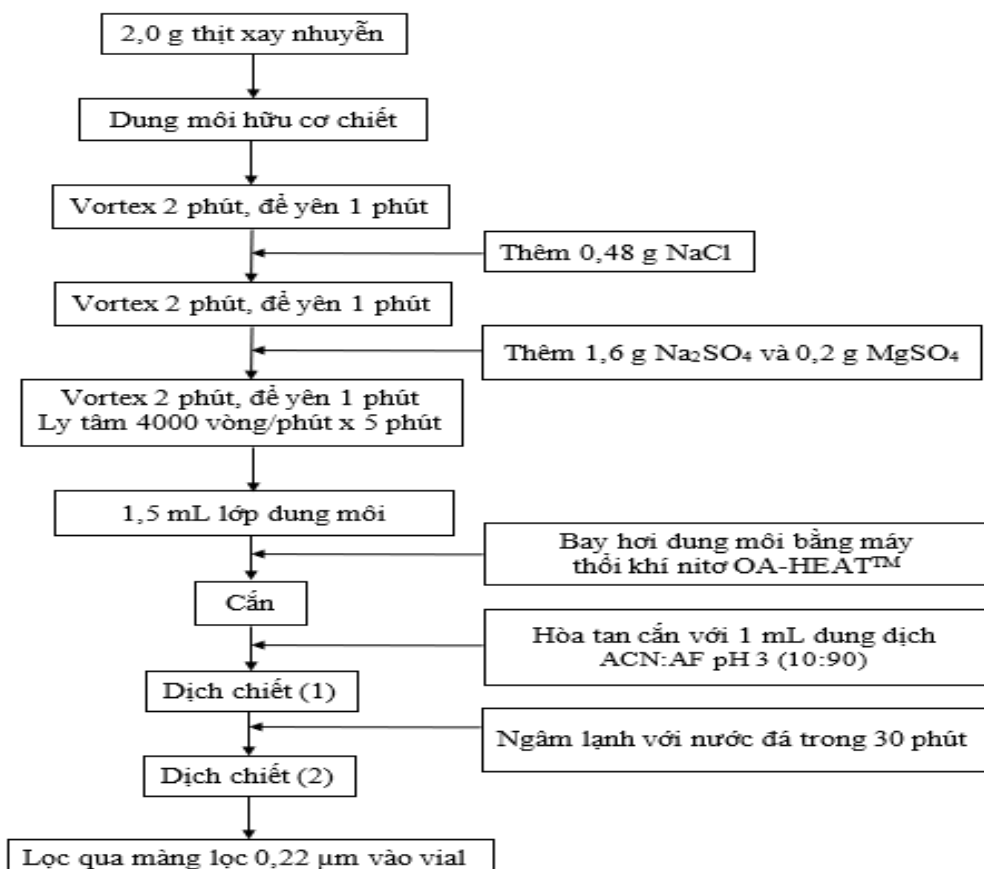
Thẩm định quy trình phân tích

Tính tương thích hệ thống: Kết quả được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Kết quả tính tương thích hệ thống

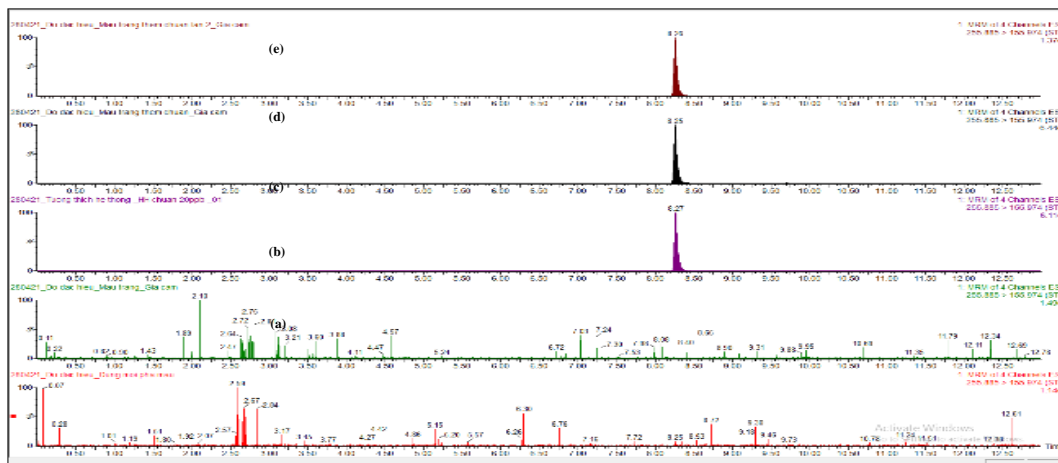
Chất phân tích		STZ	SMX	SQX	TMP
t _r (phút)	TB	8,25	9,70	10,07	8,11
	RSD%	0,00	0,00	0,04	0,14
S _{pic}	TB	58533,98	95526,87	101187,65	96621,14
	RSD%	1,63	1,82	1,91	1,20

Nhận xét: RSD của các thông số khảo sát đều nằm trong giới hạn cho phép (RSD ≤ 15%), do đó thiết bị có độ ổn định và độ chính xác cao, đáp ứng yêu cầu để phân tích [3].



Hình 2: Quy trình xử lý mẫu thích hợp

Tính đặc hiệu: Mẫu dung môi, mẫu trắng phải không được có tín hiệu chất phân tích, trong khi mẫu thử giả lập phải cho tín hiệu chất phân tích tại thời gian lưu trùng với thời gian lưu trên mẫu chuẩn. Khi ta thêm chuẩn vào mẫu thử giả lập, tín hiệu và diện tích pic tại thời gian lưu của các chất đều tăng lên rõ rệt (Hình 3).



Hình 3: Sắc ký đồ mẫu dung môi (a), mẫu trắng (b), mẫu chuẩn (c), mẫu trắng thêm chuẩn (d) và mẫu trắng thêm chuẩn lần 2 (e) của STZ

Khoảng tuyến tính - đường chuẩn và giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng, độ đúng, độ chính xác: Các đường chuẩn được xây dựng trên nền mẫu trắng và tính toán tự động trên phần mềm của thiết bị (Masslynx 4.1). Các kết quả được trình bày ở Bảng 4, Bảng 5, Hình 4 và Hình 5.

Bảng 4. Kết quả thẩm định khoảng tuyến tính, phương trình hồi quy, LOD, LOQ

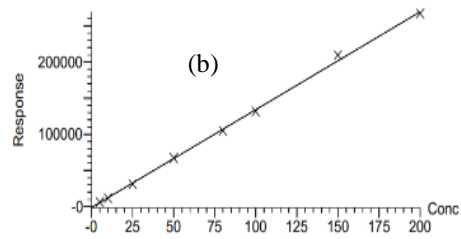
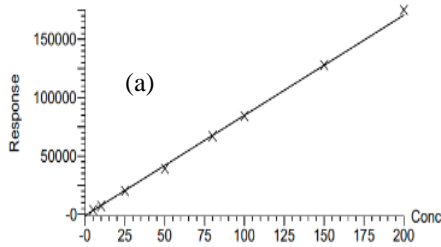
Chất phân tích	Khoảng tuyến tính (ppb)	Phương trình hồi quy	Hệ số tương quan (r^2)	LOD (ppb)	LOQ (ppb)
STZ	5-200	$y = 858,551 x - 1010,11$	0,999	0,125	0,25
SMX	5-200	$y = 1354,57 x - 1378,05$	0,999	0,125	0,25
SQX	5-200	$y = 1010,03 x - 1200,08$	0,993	0,0625	0,125
TMP	2,5-100	$y = 1131,79 x + 372,894$	0,994	0,0625	0,125

Bảng 5. Độ thu hồi và độ lặp lại của bốn kháng sinh tại 3 mức nồng độ

Mức nồng độ	Ngày	TMP		SQX		STZ		SMX	
		R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)
0,5 MRL	1	98,7	3,9	98,4	4,1	98,4	5,4	99,4	4,7
	2	99,1	6,1	93,7	5,6	87,9	4,1	90,7	3,7
	3	100,7	2,9	98,5	4,2	88,7	3,8	90,3	3,9
MRL	1	98,5	4,9	98,5	6,0	100,2	4,9	101,4	4,2
	2	99,0	3,2	100,1	6,5	98,7	3,7	100,5	3,8
	3	100,9	4,5	101,8	4,7	99,6	4,8	102,3	4,4
1,5 MRL	1	96,2	8,1	99,2	6,1	95,9	6,4	94,6	5,8
	2	99,5	6,2	99,9	3,3	92,2	3,3	95,1	4,0
	3	98,7	4,4	101,4	4,6	93,9	4,1	96,1	3,9

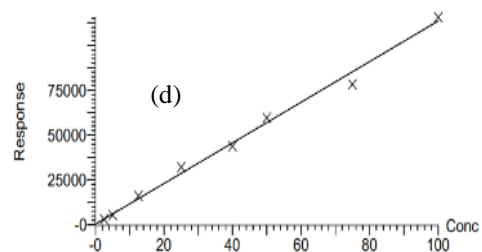
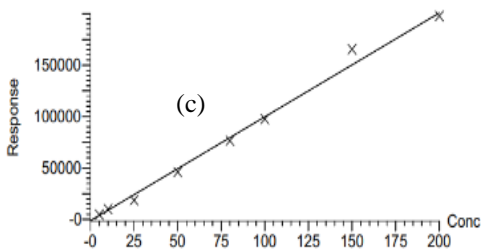
Compound name: STZ
 Correlation coefficient: $r = 0.999458$, $r^2 = 0.998917$
 Calibration curve: $858.511 * x + -1010.11$
 Response type: External Std, Area
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

Compound name: SMX
 Correlation coefficient: $r = 0.999543$, $r^2 = 0.999086$
 Calibration curve: $1354.57 * x + -1378.05$
 Response type: External Std, Area
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

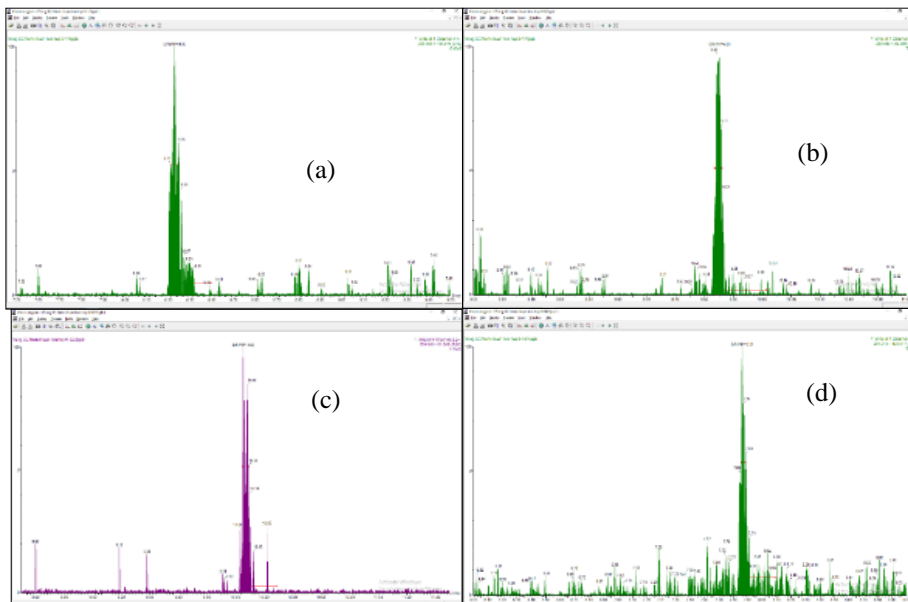


Compound name: SQX
 Correlation coefficient: $r = 0.996437$, $r^2 = 0.992886$
 Calibration curve: $1010.03 * x + -1200.08$
 Response type: External Std, Area
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

Compound name: TMP
 Correlation coefficient: $r = 0.997082$, $r^2 = 0.994173$
 Calibration curve: $1131.79 * x + 372.894$
 Response type: External Std, Area
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



Hình 4: Đường tuyến tính của STZ (a), SMX (b), SQX (c) và TMP (d) truy xuất từ phần mềm Masslynx 4.1



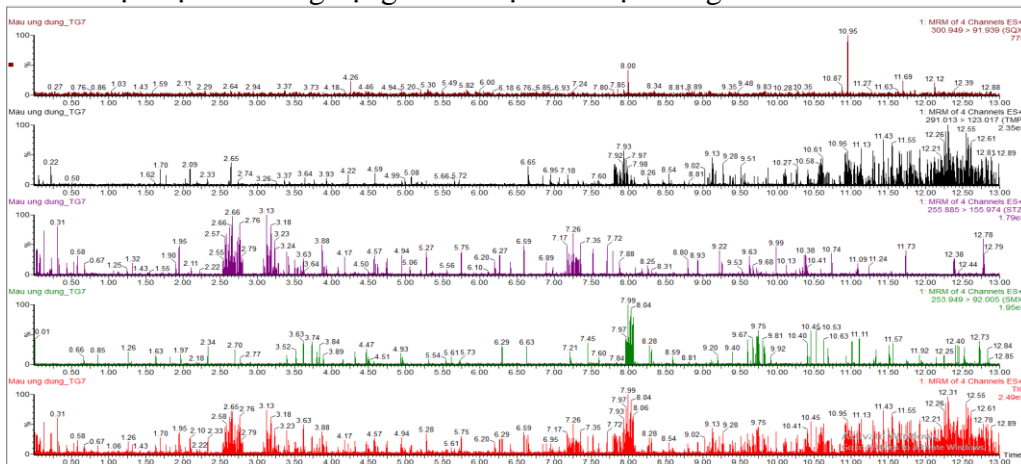
Hình 5: LOD của STZ tại 0,125ppb (S/N = 3,35) (a), SMX tại 0,125ppb (S/N = 4,80) (b), SQX tại 0,0625 ppb (S/N = 3,60) (c), TMP tại 0,0625 ppb (S/N = 3,37) (d)

Nhận xét: Trong khoảng nồng độ khảo sát của các kháng sinh đều đạt tính tuyến tính (giá trị $r^2 > 0,99$), khoảng tuyến tính rộng, bao trùm giá trị MRL của các kháng sinh nhóm

sulfonamid (100 ppb) và trimethoprim (50 ppb) [7], giá trị LOD (0,0625-0,125 ppb) và LOQ (0,125-0,25 ppb) thấp đặc trưng cho phân tích khối phổ. Các giá trị độ thu hồi trung bình của cả 4 chất STZ, SMX, SQX và TMP đều nằm trong khoảng 80-110% và giá trị RSD < 23%, đáp ứng yêu cầu của EC/2002. Do đó phương pháp đạt độ đúng, độ chính xác cao. Vì vậy, có thể áp dụng quy trình này để xác định dư lượng của 4 kháng sinh phân tích có trong các mẫu thịt gà trên thị trường.

3.2. Ứng dụng phân tích dư lượng kháng sinh trong mẫu thịt gà tại tỉnh Kiên Giang

Kết quả phân tích 9 mẫu thịt gà được thu thập tại siêu thị trên địa bàn tỉnh Kiên Giang cho thấy chưa phát hiện dư lượng 4 kháng sinh STZ, SMX, SQX và TMP. Sắc ký đồ phân tích đại diện mẫu ứng dụng TG7 được thể hiện trong Hình 6.



Hình 6: Kết quả phân tích mẫu ứng dụng TG7

IV. BÀN LUẬN

Điều kiện khối phổ: Kết quả auto tune và tune tay xác định được các mảnh ion phân mảnh của 4 chất phân tích là đặc trưng và phù hợp với các nghiên cứu đã công bố [4], [5]. Tiến hành khảo sát các thông số khối phổ để thu nhận tín hiệu ion tối ưu bao gồm nhiệt độ khí bay hơi ở mức 500 °C, tốc độ dòng khí bay hơi 1000 L/h, thế cone ở mức 30 hoặc 35 V và thế mao quản 4,0 kV. Các thông số này không khác biệt nhiều do các chất phân tích có giá trị khối lượng/điện tích (m/z) gần tương tự nhau (khoảng 250-300). Tuy nhiên, mức năng lượng va đập áp dụng cho mỗi chất phân tích là khác nhau, dao động trong khoảng từ 15-30 V tùy thuộc vào mục tiêu tạo phân mảnh có m/z lớn hay nhỏ, đặc trưng riêng cho từng chất.

Điều kiện sắc ký: Khảo sát pha động sử dụng dung môi hữu cơ bao gồm methanol hoặc acetonitril với chất điều chỉnh pH là nước axit formic ở các mức pH khác nhau giúp chất phân tích chuyển dạng hoàn toàn, cho hình dáng pic cân đối, tín hiệu cao, chân pic gọn hơn so với một số nghiên cứu đã công bố [4], [5]. Thêm vào đó, chương trình rửa giải gradient được áp dụng nhằm tách hoàn toàn chất phân tích khỏi nhau và khỏi tạp trong nền mẫu, cho thời gian phân tích phù hợp.

Quy trình xử lý mẫu: Sau khi tham khảo các nghiên cứu trước đó [1], [4] nhóm nghiên cứu tiến hành khảo sát quy trình xử lý mẫu với dung môi chiết/ rửa protein là ACN có hoặc không có kết hợp AF pH 3, ISP ở các tỷ lệ khác nhau, tỷ lệ lượng muối/ dịch chiết so với lượng thịt, thời gian ngâm lạnh loại tạp kém phân cực. Các thông số trên được xác định nhằm giải quyết các vấn đề đặc trưng của nền mẫu phức tạp như thực phẩm là tỷ lệ thu hồi mẫu kém, việc loại bỏ các tạp kém phân cực và chất béo tránh ảnh hưởng tín hiệu chất phân tích và làm hỏng

cột pha tĩnh sử dụng trong sắc ký pha đảo. Quá trình xử lý mẫu qua các bước kết tủa protein, chiết tách chất phân tích bằng ACN kết hợp ISP và các muối vô cơ có ưu điểm tiết kiệm chi phí và đơn giản, tránh việc mất mẫu, giúp nâng cao hiệu suất chiết, với kết quả độ thu hồi của 4 kháng sinh đều nằm trong khoảng quy định (80-110%). Ngoài ra, việc áp dụng phương pháp ngâm lạnh để loại tạp kém phân cực và chất béo thay cho các dung môi chiết lỏng lỏng độc hại thường sử dụng như n-hexan giúp bảo vệ môi trường và sức khỏe kiểm nghiệm viên.

Ứng dụng quy trình đã thẩm định: Kết quả phân tích 9 mẫu thịt gà thu thập tại các siêu thị trên địa bàn tỉnh Kiên Giang chưa phát hiện dư lượng các kháng sinh STZ, SMX, SQX và TMP. Tuy nhiên, lượng mẫu ứng dụng còn khá nhỏ chỉ mang tính tham khảo, cần mở rộng cỡ mẫu để cho tính đại diện tình hình thực tế tại địa bàn.

V. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xây dựng thành công quy trình định lượng đồng thời 4 kháng sinh STZ, SMX, SQX và TMP trong thịt gà bằng phương pháp LC-MS/MS và thẩm định quy trình đạt theo hướng dẫn của AOAC, EC 2002. Quy trình phân tích có tính chọn lọc, chính xác, tin cậy cao. Quy trình đã được ứng dụng vào thực tiễn để kiểm tra 9 mẫu thịt gà tại Kiên Giang. Kết quả phân tích chưa phát hiện dư lượng kháng sinh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Khoa học và Công nghệ (2017), Tiêu chuẩn Việt Nam (TCVN 11838:2017) – Thịt – phương pháp xác định dư lượng sulfonamid bằng sắc ký lỏng khối phổ hai lần.
2. AOAC International (2002), “AOAC Guidelines for Single Laborator Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals”, Section 3.3, 3.4.1, 3.4.2, 3.4.6, pp.18-22.
3. Chad J. Briscoe, Mark R. Stiles, David S. Hage (2007), “System suitability in bioanalytical LC-MS/MS”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 44, pp.484-491.
4. Dasenake Marilena (2015), “Development of methods for the determination of veterinary drugs in food matrices by Liquid Chromatography – Mass Spectrometry”, *National and Kapodistrian University of Athens*, 2015.
5. Diego G. Rocha, Flavio A. Santos, Aline A. Gomes, Adriana F. Faria (2016), “Validation of a LC-MS/MS Multiresidue Methodology Based on a QuEChERS Approach for the Determination of Fluoroquinolones, Sulfonamids and Trimethoprim in Poultry and Porcine Kidney According to the Normative Instruction 24/2009-MAPA”, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 28, pp.76-86.
6. European Union (2002), Commission decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results.
7. European Union (2010), Commission regulation (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin.
8. J. J. Carrique-Mas, J. E. Bryant, N. V. Cuong, N. V. M. Hoang, J. Campbell, *et al.* (2013), “An epidemiological investigation of *Campylobacter* in pig and poultry farms in the Mekong delta of Vietnam”, *Epidemiol. Infect.* (2014), 142, 1425-1436.
9. Juan J Carrique-Mas, Nguyen V. Trung, Ngo T. Hoa, Ho Huynh Mai, Tuyen H. Thanh, *et al.* (2015), “Antimicrobial Usage in Chicken Production in the Mekong Delta of Vietnam”, *Zoonoses and Public Health* (2015), 70-78.
10. Nguyen Van Cuong, Nguyen Thi Nhung, Nguyen Huu Nghia, Nguyen Thi Hoa, Nguyen Vinh Trung, *et al.* (2016), “Antimicrobial consumption in Medicated Feeds in Vietnamese Pig and Poultry Production”, *EcoHealth*.

(Ngày nhận bài: 21/8/2021 - Ngày duyệt đăng: 07/10/2021)