

# Xác định hàm lượng kháng sinh nhóm aminoglycoside trong thức ăn chăn nuôi bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao đầu dò tán xạ bay hơi

Nguyễn Văn Đông<sup>1</sup>, Đỗ Thị Tú Trinh<sup>1</sup>, Tô Thị Hồng Chuyên<sup>1,\*</sup>, Trịnh Thị Diệu Bình<sup>1</sup>, Nguyễn Minh Thịnh<sup>2</sup>



Use your smartphone to scan this QR code and download this article

## TÓM TẮT

Nghiên cứu thực hiện nhằm phát triển phương pháp phân tích đồng thời các 5-aminoglycoside là streptomycin (STR), neomycin (NEO), kanamycin (KAN), spectinomycin (SPE), amikacin (AMI) trên nền thức ăn chăn nuôi bằng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao đầu dò tán xạ bay hơi (HPLC – ELSD). Các kháng sinh 5-aminoglycoside trong mẫu thức ăn chăn nuôi được chiết với hệ dung môi chứa 20% ACN, 1% HCl (v/v). Dịch chiết được làm sạch bằng phương pháp chiết pha rắn (SPE) với pha tĩnh là PCX, trong môi trường pH 5 được điều chỉnh bằng dung dịch NH<sub>3</sub>. Các 5-aminoglycoside được rửa giải ra khỏi cột SPE bằng dung dịch NH<sub>3</sub> 10%. Mẫu sau rửa giải được thổi khô và hòa tan lại bằng dung dịch acid hepta fluorobutyric (HFBA) 20 mM, qua màng lọc 0,22 μm và phân tích bằng HPLC – ELSD. Các 5-aminoglycoside được tách trên cột Eclipse Plus C18, 1,8 μm, 4,6 × 100 mm, pha động được sử dụng là nước/acetonitrile chứa 15 mM HFBA với chế độ gradient pha động có tỉ lệ các kênh nước và acetonitril lần lượt là 0-1 phút cố định 75:25, 1-6 phút giảm 55:45, 6-7 cố định 55:45, 7-8 phút tăng 75:25. Đầu dò ELSD có tốc độ khí mang là 1 L/phút và nhiệt độ phun sương là 40°C. Phương pháp này đạt được giới hạn phát hiện (MDL) 4 mg/kg và hiệu suất thu hồi từ 87-92% đối với các kháng sinh 5-aminoglycoside. Phương pháp đã áp dụng phân tích hàm lượng các aminoglycoside trong nền mẫu thức ăn chăn nuôi với hệ thống HPLC – ELSD.

**Từ khoá:** aminoglycoside, HPLC – ELSD, thức ăn chăn nuôi

## MỞ ĐẦU

Thuốc kháng sinh là những chất hữu cơ có cấu tạo hóa học phức tạp, phần lớn trong số đó lúc đầu do xạ khuẩn, vi khuẩn và nấm sinh ra. Với nồng độ thấp đã có tác dụng ức chế hay tiêu diệt sự sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật gây bệnh, nhưng không hay rất ít gây bệnh cho người, gia súc, gia cầm. Aminoglycoside (AG) là một nhóm kháng sinh lớn đặc trưng bởi hai hoặc nhiều nhóm aminosugar liên kết với nhau bằng liên kết glycoside tạo nên thành phần aminocyclitol. Các AG can thiệp vào quá trình tổng hợp protein của vi khuẩn bằng cách ức chế đảo ngược ribosome dẫn đến phá hủy màng tế bào vi khuẩn. Do đó, nó có khả năng cho phổ kháng khuẩn rộng kể cả gram âm và gram dương. Nhóm AG gồm nhiều loại thuốc kháng sinh như: streptomycin (STR), neomycin (NEO), kanamycin (KAN), spectinomycin (SPE), amikacin (AMI), apramycin (APR), tobramycin (TOB), paronomycin (PAR)... là những thuốc diệt khuẩn được ứng dụng rộng rãi trong điều trị các bệnh nhiễm khuẩn. Các aminoglycoside (AG) có phổ kháng khuẩn rộng được ưa chuộng trong chăn nuôi và thuốc thú y như là chất kích thích tăng trưởng và các chất phụ gia thức ăn cải thiện tỷ lệ chuyển đổi

thức ăn và thúc đẩy khả năng hấp thu chất dinh dưỡng cho động vật. Tuy nhiên, việc sử dụng lâu dài các AG sẽ gây ra các phản ứng phụ, dẫn tới nguy hại tiềm tàng đối với sức khoẻ con người<sup>1,2</sup>.

Với kháng sinh AG, phương pháp vi sinh được sử dụng phổ biến trong kiểm nghiệm, tuy nhiên phương pháp này gặp phải một số hạn chế: tốn nhiều thời gian, độ chính xác chưa thật cao, và đặc biệt khó khăn khi định lượng chế phẩm kháng sinh là hỗn hợp nhiều thành phần<sup>3</sup>. Để khắc phục hạn chế này, một số các phương pháp phân tích hiện đại thay thế phương pháp vi sinh đã được ứng dụng trong phân tích các hợp chất nhóm aminoglycoside như: phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)<sup>4</sup>, phương pháp điện di mao quản (EC)<sup>5</sup> phương pháp sắc ký lớp mỏng<sup>6</sup>... Tuy nhiên, do đặc điểm cấu tạo phân tử không có khả năng hấp thu tử ngoại hoặc phát huỳnh quang, cho nên muốn sử dụng được các đầu dò thông thường (huỳnh quang, UV – VIS ...) thì kháng sinh AG cần phải được tạo dẫn xuất hoá trước cột hoặc sau cột. Như phân tích AMI trong nước tiểu bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao kết hợp đầu dò huỳnh quang sử dụng cột C18 LiChro-CART Purospher (125 mm × 3 mm, 5 μm), pha động

<sup>1</sup>Bộ môn Hóa phân tích, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

<sup>2</sup>Trung Tâm Kiểm Nghiệm Thuốc Thú Y TW II

### Liên hệ

**Tô Thị Hồng Chuyên**, Bộ môn Hóa phân tích, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

Email: tthchuyen@hcmus.edu.vn

### Lịch sử

- Ngày nhận: 19-8-2022
- Ngày chấp nhận: 07-12-2022
- Ngày đăng: 31-12-2022

DOI: 10.32508/stdjns.v6i4.1227



### Bản quyền

© ĐHQG Tp.HCM. Đây là bài báo công bố mở được phát hành theo các điều khoản của the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



**Trích dẫn bài báo này:** Đông N V, Trinh D T T, Chuyên T T H, Bình T T D, Thịnh N M. **Xác định hàm lượng kháng sinh nhóm aminoglycoside trong thức ăn chăn nuôi bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao đầu dò tán xạ bay hơi.** *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.*; 2022, 6(4):2356-2367.

MeOH hoặc ACN theo tỷ lệ phù hợp với nước có 0,05% acid trifluoroacetic<sup>7</sup>. AMI được tạo dẫn xuất trước cột với ortho-phthaldialdehyde-3-acid mercaptopropionic. Hay định lượng AMI trong dịch sinh học, AMI và chất chuẩn nội chuẩn TOB được tách ra khỏi huyết tương bằng phương pháp sắc ký gel trao đổi ion, AMI sau khi được tách ở cột sắc ký, phản ứng với thuốc thử o-phthalaldehyde (OPA) và mercaptoethanol trong đệm borate pH = 10,4 tại 50°C<sup>8</sup>. Kỹ thuật này phức tạp, quá trình phân tích trải qua nhiều giai đoạn và môi trường độc hại... Do đó cần thiết xây dựng một phương pháp định lượng trực tiếp định lượng các AG nhanh, trực tiếp, kỹ thuật đơn giản và có độ chính xác đảm bảo là cần thiết. Kháng sinh TOB trong thuốc, máu và nước tiểu được phân tích bằng HPLC-ELSD sử dụng cột Water ODS-2 C18 Spherisorb với nhiệt độ bay hơi là 45°C, sử dụng khí mang là nitrogen, pha động H<sub>2</sub>O/ACN (55:45) chứa 11,6 mM acid heptafluorobutyric (HFBA). Phương pháp cho LOD 0,3 mg/L với hiệu suất thu hồi từ 99-103%<sup>9</sup>.

Đầu dò tán xạ bay hơi (ELSD) ghi nhận các tín hiệu các hợp chất dựa trên sự tán xạ laser trên các hạt rắn. Như vậy tất cả các chất hóa học ít bay hơi, khi hiện diện ở lượng đủ lớn có thể được phân tích bằng đầu dò. Một đặc tính độc đáo của ELSD mà không có đầu dò nào có được là độ nhạy của các chất chỉ phụ thuộc vào nồng độ khối lượng (mg/L) chất đến đầu dò, tức là các chất có nồng độ như nhau thì cho tín hiệu bằng nhau<sup>10</sup>. Các hợp chất kháng sinh 5-aminoglycoside có nhiệt độ bay hơi cao, tồn tại trong mẫu thức ăn chăn nuôi ở hàm lượng lớn nên hoàn toàn phù hợp để phân tích trên đầu dò ELSD với chi phí thấp.

Nghiên cứu này nhằm phát triển phương pháp tin cậy nhằm phân tích các kháng sinh 5-aminoglycoside trong thức ăn chăn nuôi bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao với đầu dò tán xạ bay hơi (HPLC – ELSD). Phương pháp phân tích bao gồm tối ưu và các bước xử lý mẫu tách các kháng sinh 5-aminoglycoside từ nền thức ăn chăn nuôi, và tách và phát hiện trên hệ HPLC-ELSD. Phương pháp được phê duyệt trên các tiêu chí độ tuyến tính, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng, độ chính xác, hiệu suất thu hồi trên nền thức ăn chăn nuôi nhằm hướng tới áp dụng cho kiểm nghiệm các kháng sinh này trên các loại mẫu thức ăn chăn nuôi thực tế tại các trung tâm phân tích.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Hóa chất

Các chất chuẩn aminoglycoside (AG): neomycin sulfate (NEO) 80,0%, streptomycin sulfate (STR)

99,0%, kanamycin sulfate (KAN) 98,4% (Dr. Ehrenstorfer, Đức) pectinomycin hydrochloride (SPE) 78,1%, amikacin sulfate (AMI) 89,5% (Sigma, Đức); acid heptafluorobutyric (HFBA), acid trifluoroacetic (TFA) (Acros, Đức); acetonitrile (ACN), methanol (MeOH), ammonia 25% (NH<sub>3</sub>), acid acetic băng (Merck, Đức); nước khử ion.

### Thiết bị, dụng cụ

Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao UHPLC 1290 Infinity II LC (Agilent, Mỹ), đầu dò tán xạ bay hơi ELSD (Agilent, Mỹ), cột sắc ký InertSustain AQ C18 5 μm, 4,6 × 250 mm (GL Sciences, Nhật), cột Eclipse Plus C18, 1,8 μm, 4,6 × 100 mm (Agilent, Mỹ), cột chiết pha rắn Siliapred C18 500 mg/6 mL (Silicycle, Canada), cột chiết pha rắn Plexa 500 mg/6mL (Agilent, Mỹ), cột chiết pha rắn Plexa PCX 500 mg/6 mL (Agilent, Mỹ), hệ thống chiết SPE Sulpeco, hệ thống thổi khí nitrogen có gia nhiệt, máy ly tâm, vortex, và các dụng cụ khác.

### Khảo sát các điều kiện sắc ký

#### Cột phân tích

hàm mục tiêu lựa chọn cột sắc ký phù hợp cho quá trình tách các AG, tiến hành khảo sát trên 2 cột sắc ký: cột InertSustain AQ C18 5 μm, 4,6 × 250 mm và cột Eclipse Plus C18, 1,8 μm, 4,6 × 100 mm.

#### Điều kiện pha động

Acid trifluoroacetic (TFA) và acid heptafluorobutyric (HFBA) đều có khả năng làm pha động do vừa có khả năng ghép cặp ion với các AG vừa là chất dễ bay hơi phù hợp với đầu dò ELSD. Cần khảo sát nồng độ của acid và chương trình rửa giải pha động vì nó ảnh hưởng đến thời gian lưu của các AG trên cột cũng như khả năng đáp ứng trên đầu dò ELSD. Khảo sát chế độ isocratic: với pha động TFA sử dụng tỉ lệ hai kênh A:B = 98:2. Với pha động HFBA các tỉ lệ pha động giữa hai kênh A và B theo các tỉ lệ 65% A và 35% B; 70% A và 30% B; 75% A và 25% B. Chế độ gradient pha động của HFBA 15 mM, tỉ lệ của các kênh A:B lần lượt theo thời gian: 0-1 phút 75:25; 1-6 phút 55:45; 6-7 phút 55:45; 7-8 phút 75:25.

#### Các thông số của đầu dò ELSD

Dựa vào các thông số được thay đổi trên đầu dò như tốc độ khí mang, nhiệt độ phun sương, nhiệt độ bay hơi. Tiến hành khảo sát ảnh hưởng của các thông số đầu dò: (i) Thay đổi tốc độ khí mang từ 1,00 đến 2,50 SLM; (ii) Khảo sát nhiệt độ phun sương ở các nhiệt độ 30 đến 80°C; (iii) Nhiệt độ bay hơi được khảo sát ở 60 đến 85 °C.

### Quy trình xử lý mẫu

Cán 1 g mẫu thức ăn chăn nuôi vào ống ly tâm 15 mL, thêm 10 mL dung dịch chiết mẫu, lắc 1 phút, ly tâm trong 10 phút. Sau đó, mẫu được ly tâm 10.000 vòng/phút trong 10 phút tại 4°C. Phần dịch chiết được chuyển vào ống ly tâm mới, phần cặn được chiết thêm 1 lần nữa với 10 mL dịch chiết. Sau khi thu được dịch chiết, tiến hành làm sạch trên cột chiết SPE. Dung dịch sau rửa giải được thổi khô và hòa tan lại bằng dung dịch HFBA 20 mM, lọc qua màng 0,22 μm và phân tích bằng HPLC-ELSD. Dựa vào quy trình xử lý mẫu này, tiến hành khảo sát các yếu tố:

#### Dung môi chiết mẫu

Thành phần dung môi chiết mẫu được khảo sát với các tỉ lệ dung môi: H<sub>2</sub>O:ACN:HCl với các tỉ lệ 100:400:0, 250:250:0, 390:100:10, 395:100:5, và 400:100:0 (v/v/v).

#### Loại cột SPE

Các hợp chất AG với phân tử có nhiều nhóm amino và các hydroxyl nên phân tử mang tính base yếu (pK<sub>a</sub> trong khoảng từ 7-9). Có nhiều loại cột SPE với các pha tĩnh khác nhau có thể được sử dụng để phân tích các AG. Do đó, cần phải khảo sát hiệu suất thu hồi của các AG khi chiết trên các loại cột này. Có 3 cột SPE được khảo sát: cột C18, PLEXA, và PCX.

#### Quy trình rửa giải trên cột PCX

Dựa vào kết quả khảo sát trên các loại cột chiết, tiến hành khảo sát quá trình rửa giải trên cột PCX. Đối với các phương pháp chiết bằng cơ chế trao đổi ion để đảm bảo cho quá trình chất phân tích hấp phụ lên bề mặt pha tĩnh thì pH của dung dịch mẫu cần phải điều chỉnh phù hợp. Dịch chiết mẫu chứa HCl dẫn đến pH của dung dịch rất thấp, cần sử dụng NH<sub>3</sub> để điều chỉnh pH về các giá trị pH 3, 5, và 7 để khảo sát hiệu suất thu hồi của các AG. Mẫu sau khi được đưa qua cột SPE sẽ được rửa giải bằng dung dịch NH<sub>3</sub>. Thay đổi nồng độ dung môi rửa giải NH<sub>3</sub> ảnh hưởng đến lực rửa giải của dung dịch từ đó thay đổi hiệu suất thu hồi của các AG trên cột chiết PCX và chọn một nồng độ NH<sub>3</sub> tối ưu. Các nồng độ NH<sub>3</sub> được khảo sát 5%, 10%, và 15%.

### Thẩm định phương pháp

#### Xác định giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng

hân tích các mẫu thêm chuẩn tại nồng độ thấp, thực hiện 6 lần song song. Dựa và tỉ số chiều cao của tín hiệu (S) và nhiễu nền (N) tương ứng để lựa chọn các dung dịch mẫu thêm chuẩn có kết quả  $3 \leq S/N \leq 10$  và các giá trị MDL = 3S/N, MQL = 3MDL.

#### Xác định khoảng làm việc

Xây dựng đường chuẩn của 5-aminoglycoside trong khoảng từ 5-140 mg/L. Đánh giá độ tuyến tính của đường chuẩn thông qua phương trình  $\log A = b \times \log C + \log a$  và hệ số tương quan R<sup>2</sup>.

### Đánh giá độ lặp lại và độ tái lập

Độ lặp lại được thực hiện dựa trên việc phân tích các mẫu trắng thêm chuẩn ở các nồng độ 10, 20, và 50 mg/L. Phân tích trên 3 mẫu thức ăn chăn nuôi khác nhau, mỗi mẫu thực hiện lặp 10 lần ở mỗi nồng độ thêm chuẩn. Độ tái lập được đánh giá qua việc thực hiện phân tích mẫu bởi 2 nhân viên khác nhau và tiến hành trong 10 ngày làm việc.

### Đánh giá hiệu suất thu hồi

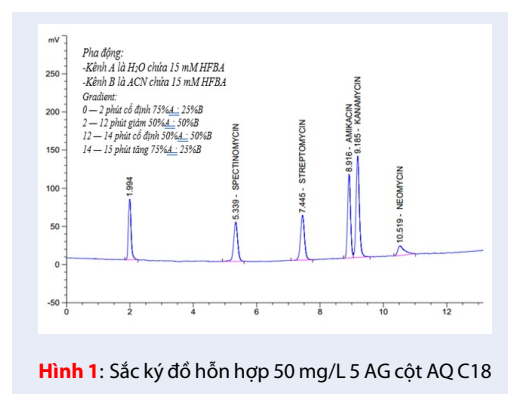
Hiệu suất thu hồi được thực hiện trên mẫu thức ăn chăn nuôi không chứa AG. Tiến hành phân tích đồng thời mẫu thêm chuẩn và mẫu không thêm chuẩn. Thực hiện phép thử trong thời gian 1 ngày và lặp lại 10 lần phép thử.

## KẾT QUẢ - THẢO LUẬN

### Điều kiện sắc ký

#### Tính chất hóa lý của cột sắc ký ảnh hưởng đến hiệu năng phân tích

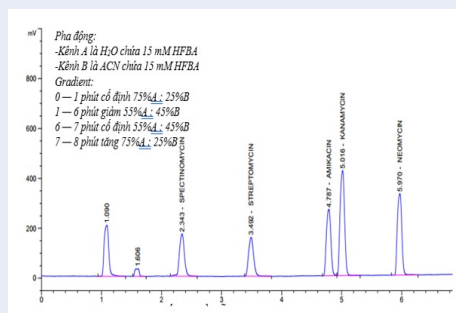
Cột Inertsustain AQ C18 5 μm, 4,6 × 250 mm được tối ưu hóa cho lưu giữ cho các chất có độ phân cực cao trong sắc ký pha đảo sử dụng các nhóm octadecyl và khóa đuôi cho tương tác kỵ nước mạnh và linh hoạt giữ được nhiều hợp chất. Mặc dù cột AQ cho các mũi sắc ký tương ứng với các chất phân tích được tách ra khá rõ rệt tuy nhiên vài mũi sắc ký vẫn còn dính chân và chất phân tích rửa giải sau cùng bị mất độ nhạy do sự kéo đuôi (Hình 1). Cột Eclipse Plus C18, 1,8 μm, 4,6 × 100 mm với kích thước hạt nhỏ nên làm tăng số đĩa lý thuyết nên tăng hiệu năng tách 5 AG. Thời gian phân tích ngắn chỉ khoảng 8 phút cho một mẫu (Hình 2) nhờ vào chiều dài chỉ 10 cm nên giúp tiết kiệm thời gian cũng như hóa chất.



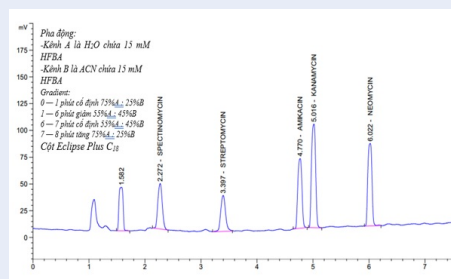
Hình 1: Sắc ký đồ hỗn hợp 50 mg/L 5 AG cột AQ C18

### Ảnh hưởng của tác chất ghép cận ion đến quá trình phân tích

TFA gặp nhiều hạn chế cho hiệu năng tách như bề rộng mũi sắc ký lớn, độ phân giải kém các mũi rửa giải



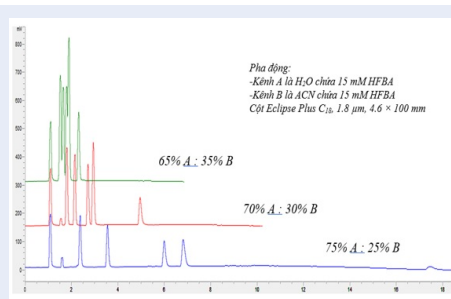
**Hình 2:** Sắc ký đồ hỗn hợp 50 mg/L 5 AG cột Eclipse C18



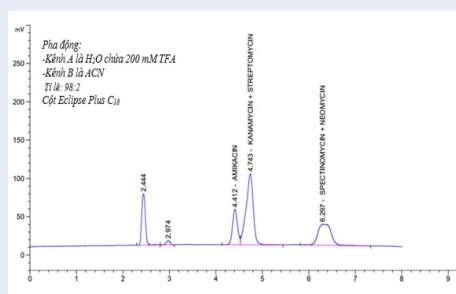
**Hình 4:** Sắc ký đồ hỗn hợp 200 mg/L AG với pha động chứa HFBA

gần nhau gây khó khăn cho việc tách, số đĩa lý thuyết thấp. Hơn nữa, pha động chạy là TFA 200 mM, nồng độ cao acid tức pH thấp ảnh hưởng đến tuổi thọ của cột sắc ký và ăn mòn thiết bị HPLC. Acid heptafluorobutyric (C<sub>3</sub>F<sub>7</sub>COOH - HFBA) là một acid hữu cơ tương tự như TFA nhưng có tính acid ( $pK_a = 3,8$ ) yếu hơn TFA ( $pK_a = 0,52$ ) nên ít làm hại cột hơn TFA. Ngoài ra phân tử có nhiều C hơn cho phép tạo cặp ion mạnh hơn so với TFA đảm bảo tách tốt các AG trên cột C<sub>18</sub>. Vì vậy nồng độ HFBA trong pha động mặc dù thấp hơn nhiều so với TFA (20 mM so với 200 mM) nhưng hiệu quả ghép cặp được chứng minh là cao hơn TFA (Hình 3 và Hình 4). Ngoài ra, HFBA có phân tử khối là 213 đvC lớn hơn so với TFA có phân tử khối 113 đvC dẫn đến làm tăng độ nhạy cho các AG do bản chất của hiện tượng tán xạ ánh sáng.

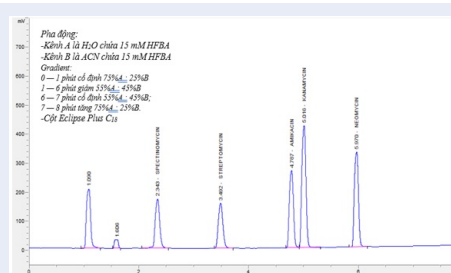
AG được tách ra nhưng mũi sắc ký bị bành rộng làm giảm độ nhạy cũng như kéo dài thời gian phân tích (Hình 5). Sử dụng chương trình rửa giải pha động để đảm bảo 5 hợp chất AG được tách hiệu quả tức vừa tốn ít thời gian vừa cho hệ số tốt nhất (Hình 6).



**Hình 5:** Sắc ký đồ hỗn hợp 5 AG 20 mg/L với các tỉ lệ pha động (chế độ pha động: isocratic)



**Hình 3:** Sắc ký đồ hỗn hợp 200 mg/L AG với pha động chứa TFA



**Hình 6:** Sắc ký đồ hỗn hợp 5 AG 20 mg/L (chế độ pha động: gradient)

**Gradient pha động**

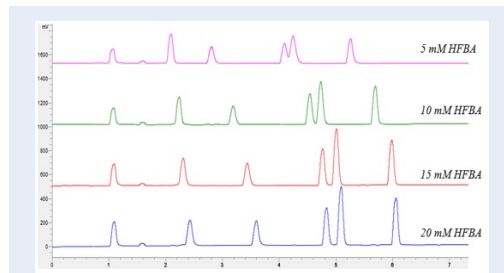
Quá trình tách 5 hợp chất AG phụ thuộc vào chương trình rửa giải pha động để đảm bảo quá trình tách được hiệu quả nhất. Khi thành phần kênh B là 35% thì các hợp chất AG được rửa giải ra sớm và có hiện tượng chập vào nhau, khi giảm xuống còn 25% thì các

**Tối ưu nồng độ HFBA**

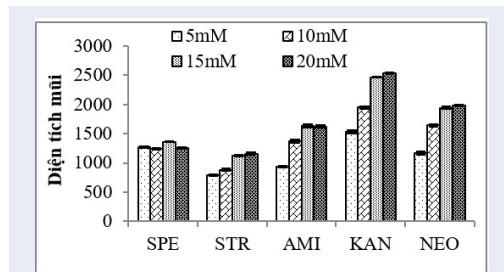
Khi nồng độ HFBA khoảng 5 mM thì AMI và KAN bị chập peak (Hình 7). Khi tăng nồng độ HFBA lên 10 mM thì hệ số rửa giải cải thiện hơn nhưng vẫn chưa tách nhau hoàn toàn. Tuy nhiên khi nồng độ HFBA

lên 15 mM thì 5 hợp chất AG được tách ra rõ rệt các mũi sắc ký tương ứng không còn hiện tượng chập. Tăng nồng độ HFBA lên 20 mM thì có sự khác biệt không đáng kể so với nồng độ 15 mM.

Khi tăng nồng độ HFBA từ 5 mM lên 20 mM thời gian lưu của cả 5 AG đều tăng do tương tác của pha tĩnh và cặp ion được hình thành tỉ lệ thuận với nồng độ tác chất tạo cặp ion. Khi tăng nồng độ tác chất HFBA thì độ nhạy của các AG đối với đầu dò ELSD cũng tăng (Hình 8), số lượng của những giọt hình thành trong buồng phun sương trên một đơn vị thời gian phụ thuộc tính chất pha động và tốc độ dòng chảy trong khi nó không phụ thuộc với nồng độ chất phân tích. Khi sử dụng HFBA ở nồng độ 15 mM thì cho hiệu quả tối ưu cả về thời gian tách trên cột và độ nhạy của đầu dò ELSD.



**Hình 7:** Sắc ký đồ hỗn hợp 5 AG 20 mg/L ở các nồng độ khác nhau



**Hình 8:** Độ đáp ứng của đầu dò ELSD với các nồng độ HFBA

### Tốc độ khí mang

Khi tốc độ dòng khí mang tăng từ 1,0 lít/phút lên 2,5 lít/phút thì độ đáp ứng của đầu dò ELSD đối với tất cả các AG đều có xu hướng giảm theo đường cong. Trong trường hợp tốc độ dòng pha động được cố định thì khi tăng tốc độ dòng khí mang, các AG khi được phun sương bị pha loãng do khí mang dẫn đến độ nhạy của chúng giảm (Hình 9).

### Nhiệt độ phun sương

Kiểm soát nhiệt độ buồng phun sương không chỉ góp phần giữ ổn định hình dạng các sol khí trước khi được gia nhiệt bay hơi mà còn giúp loại bỏ các hạt dung môi có kích thước lớn gây nhiễu. Nhiệt độ phun sương có ảnh hưởng thì độ nhạy của đầu dò ELSD đối với các AG. Độ nhạy cao nhất đạt được tại nhiệt độ phun sương là 40°C. Khi tăng nhiệt độ phun sương thì độ nhạy giảm nhẹ và không thay đổi trong khoảng nhiệt độ từ 60°C đến 80°C (Hình 10). Điều này đạt được do các hạt sương hình thành trong buồng phun được hoàn toàn.

### Nhiệt độ bay hơi

Để cho quá trình bay hơi pha động hoàn toàn và hạn chế mất mát của chất phân tích thì cần phải xác định nhiệt độ bay hơi thích hợp để pha động và chất phân tích bay hơi với tốc độ dòng pha động cho đầu dò ELSD. Khi lựa chọn nhiệt độ bay hơi nhiệt độ thấp, nhiều nền quá cao, mũi sắc ký nhọn hoặc trong trường hợp nhiệt độ quá cao độ nhạy giảm. Ngoài sự mất mát chất phân tích, nhiệt độ bay hơi quá cao gây bốc hơi dung môi quá nhiều làm phá hủy tính thống nhất của kích thước hạt và dẫn đến việc hình thành chất lỏng thay vì các hạt rắn. Khi tăng nhiệt độ bay hơi thì độ nhạy của các AG tăng do các AG là các kháng sinh có nhiệt độ bay hơi tương đối cao nên để đảm bảo quá trình bay hơi được hoàn toàn cũng như hạn chế nhiễu nền, nhiệt độ bay hơi nên trong khoảng 80°C (Hình 11).

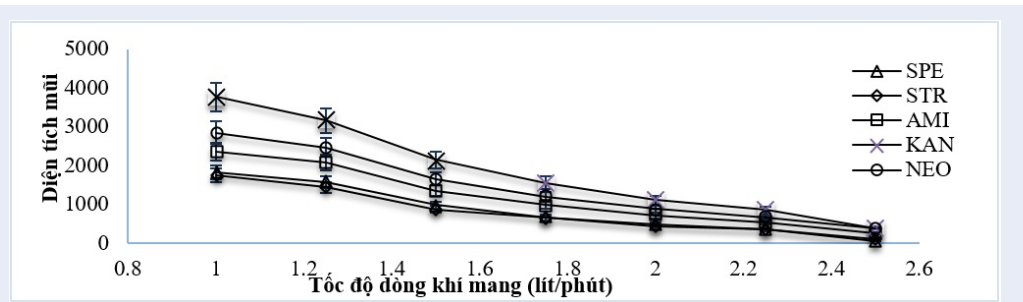
### Điều kiện chiết

#### Hiệu suất thu hồi trên các cột SPE

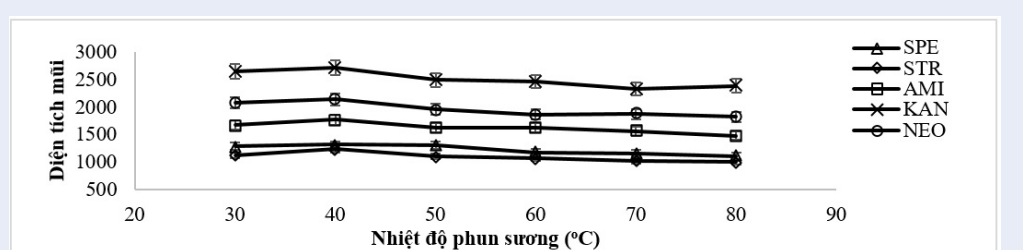
Các cột SPE đều có khả năng làm sạch đối với các AG. Tuy nhiên, đối với cột C18 thì cho hiệu suất thu hồi các AG thấp (SPE là 49%, STR là 54%, AMI là 43%, KAN là 60%, NEO là 55%). Đối với cột C18 thì cho hiệu suất thu hồi các AG thấp (SPE là 49%, STR là 54%, AMI là 43%, KAN là 60%, NEO cao nên để đảm bảo 55%). Đối với cột C18 thì cho hiệu suất thu hồi các AG thấp (SPE là 49%, STR là 54%, AMI là 43%, KAN là 60%, NEO cao nên để đảm bảo 18 nhưng hồi với cột C18 thì cho hiệu suất thu hồi các AG thấp (SPE là 49%, STR là 54%, AMI là 43%, KAN là 60%, NEO cao nên để đảm bảo 87% và NEO là 86%) (Hình 12).

#### Nồng độ dung môi ACN chiết mẫu

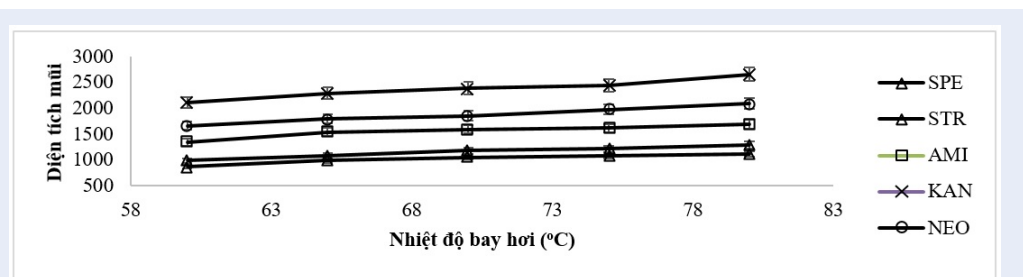
Nồng độ ACN ảnh hưởng đến hiệu suất thu hồi của các AG. Khi nồng độ ACN càng tăng thì hiệu suất thu hồi càng thấp. Khi nồng độ ACN là 20% thì vừa đủ để loại protein và cho hiệu suất thu hồi cao (Hình 13). Nếu nồng độ ACN thấp hơn có thể dẫn đến các quá



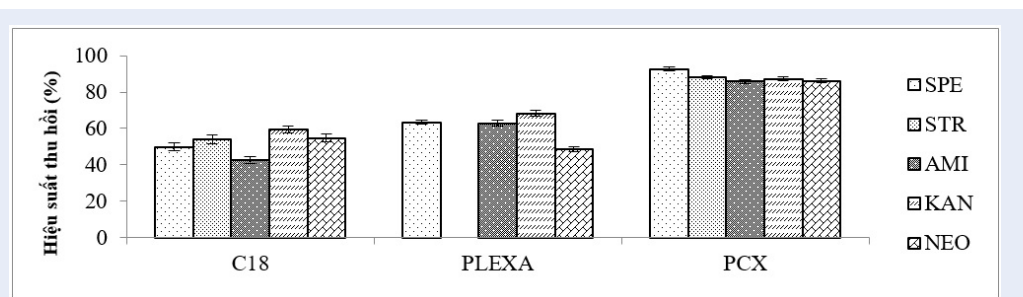
Hình 9: Ảnh hưởng của tốc độ khí mang



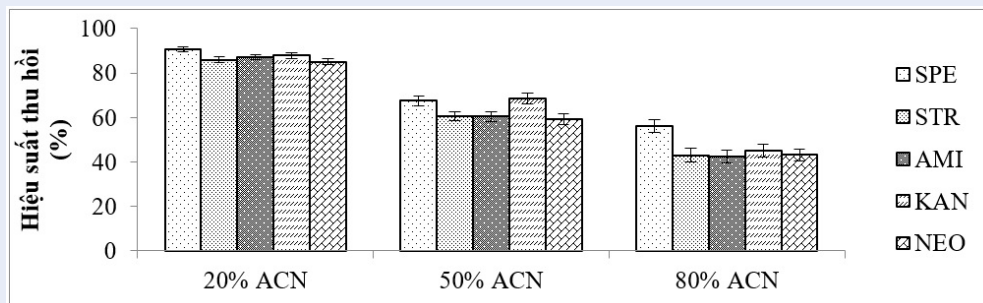
Hình 10: Ảnh hưởng của nhiệt độ phun sương



Hình 11: Ảnh hưởng của nhiệt độ bay hơi



Hình 12: Hiệu suất thu hồi của các AG 50 mgL<sup>-1</sup> trên các cột SPE



Hình 13: Hiệu suất thu hồi của các AG 20 mg/L ở các nồng độ ACN

trình loại protein không hiệu quả ảnh hưởng đến quá trình chiết các AG ra khỏi nền mẫu.

### Nồng độ HCl trong dịch chiết

Nồng độ HCl trong dung dịch chiết mẫu có ảnh hưởng đến hiệu suất thu hồi của các AG. Cụ thể là khi có HCl thì hiệu suất thu hồi có xu hướng tăng. Tại nồng độ HCl là 1% và 2% thì hiệu suất thu hồi gần như là không khác biệt đáng kể (Hình 14).

### Quá trình làm sạch

#### pH của dịch chiết trước khi lên cột PCX

Khi pH 7 thì hiệu suất thu hồi của các AG thấp (SPE là 63%, STR là 54%, AMI là 60%, KAN là 53%, NEO là 58%). Khi giảm pH xuống thì hiệu suất thu hồi tăng đáng kể, tại pH 5 có hiệu suất thu hồi cao hơn so với tại pH 3 (Hình 15). Cột chiết PCX hoạt động dựa trên cơ chế trao đổi cation của nhóm acid sulfonic nên nó có tính chọn lọc cao đối với các hợp chất mang tính kiềm. Các AG có tính kiềm yếu nên để có thể hấp phụ lên trên cột PCX thì chúng phải được cation hóa trước. Tuy nhiên nếu trong môi trường pH 3 thì các AG bị cạnh tranh dẫn đến hiệu suất thu hồi thấp hơn.

#### Nồng độ NH<sub>3</sub> trong dung dịch rửa giải cột PCX

Khi tăng nồng độ NH<sub>3</sub> trong dung dịch rửa giải thì hiệu suất thu hồi các AG tăng đáng kể (Hình 16). Cụ thể tại nồng độ NH<sub>3</sub> 10% thì hiệu suất thu hồi SPE là 91%, STR là 88%, AMI là 86%, KAN là 88%, NEO là 88%. Khi tăng thêm nồng độ NH<sub>3</sub> 15% thì hiệu suất thu hồi tăng không đáng kể mà lại gây khó khăn cho quá trình thổi khô làm giàu mẫu.

### Thẩm định phương pháp

#### Giới hạn phát hiện và độ chính xác của phương pháp

Phân tích các mẫu thêm chuẩn tại nồng độ thấp làm 6 lần song song, thu được chiều cao tín hiệu và nhiều

nền tương ứng. Tính hệ số S/N, lựa chọn các dung dịch mẫu trắng thêm chuẩn cho tỷ lệ  $3 \leq S/N \leq 10$ , giá trị MDL = 3S/N, MQL = 3S/N (Bảng 1).

### Khoảng làm việc

Đường chuẩn phân tích 5-aminoglycoside được xây dựng trong khoảng nồng độ từ 5-140 mg/L. Phương trình tuyến tính giữa nồng độ và tính hiệu chất phân tích (Bảng 2) có dạng:  $\log A = b \times \log C + \log a$ . Các giá trị  $R^2 > 0,995$ , đảm bảo yêu cầu của đường chuẩn.

### Độ lặp lại

Thực hiện phép thử trong thời gian 1 ngày và lặp lại 10 lần phép thử. Mỗi lần thực hiện phép thử đều trải qua các bước xử lý mẫu và tính toán kết quả độc lập nhau. Kết quả được trình bày trong Bảng 3.

### Độ tái lập

Tiến hành phân tích trong thời gian 10 ngày làm việc; kết quả được trình bày trên Bảng 4. Đối chiếu giá trị RSD độ lặp và tái lập với bảng giá trị chấp nhận của AOAC thì giá trị RSD nhỏ hơn 5,3%<sup>11</sup>.

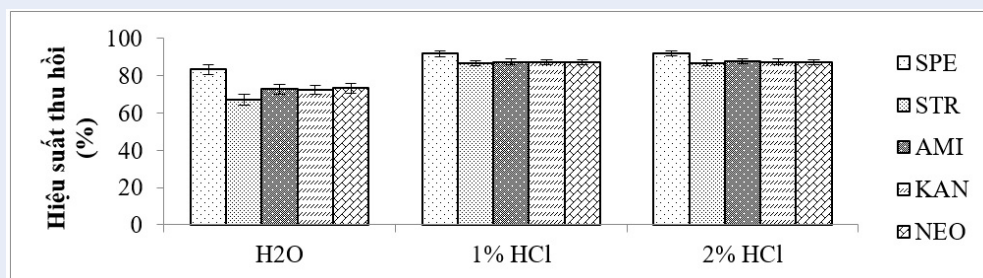
### Hiệu suất thu hồi

Thực hiện phép thử trong thời gian 1 ngày và lặp lại 10 lần phép thử. Mỗi lần thực hiện phép thử đều trải qua các bước xử lý mẫu và tính toán kết quả độc lập nhau, tính độ thu hồi theo công thức:

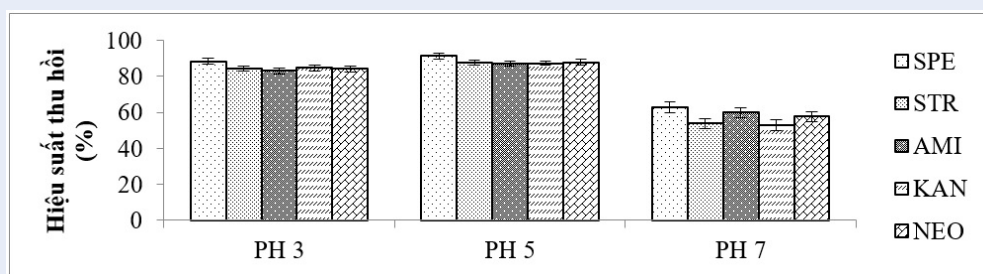
$$H = \frac{C_{obs}}{C_{spike}} \times 100\%$$

Trong đó,  $C_{obs}$ : hàm lượng chất phân tích đo được trong mẫu thêm chuẩn;  $C_{spike}$ : hàm lượng lý thuyết thêm vào trong mẫu trắng.

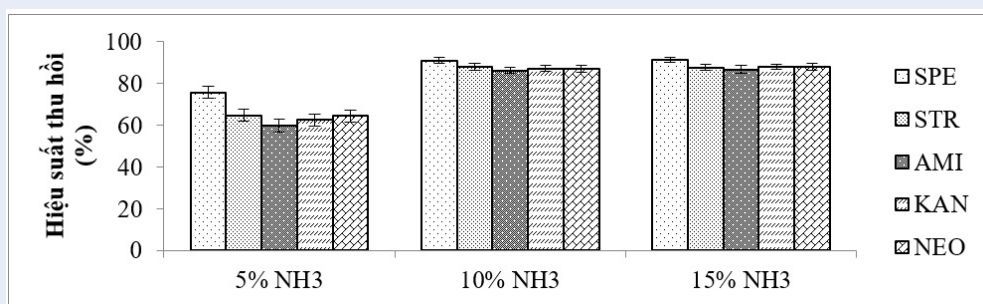
Đối chiếu kết quả (Bảng 5) với Bảng 4 giá trị hiệu suất thu hồi chấp nhận của AOAC thì giá trị hiệu suất thu hồi trong khoảng từ 80% đến 110%<sup>11</sup>.



Hình 14: Hiệu suất thu hồi của các AG 20 mg/L ở các nồng độ HCl



Hình 15: Hiệu suất thu hồi của các AG 20 mg/L ở các giá trị pH



Hình 16: Hiệu suất thu hồi của các AG 20 mg/L ở các nồng độ NH<sub>3</sub>

Bảng 1: MDL và MQL phương pháp các AG theo S/N

	MDL theo S/N (mg/kg)	MQL theo S/N (mg/kg)	Hiệu suất thu hồi (%)
SPE	4,0	7,0	90,2
STR	4,0	7,0	86,5
AMI	4,0	7,0	85,6
KAN	4,0	7,0	86,8
NEO	4,0	7,0	86,6



**Bảng 2: Đường chuẩn của 5-aminoglycoside**

AG	Đường chuẩn (ppm)	Phương trình $y = ax + b$	$R^2$
SPE	5 - 140	$y = 1,470x + 0,485$	0,9988
STR	5 - 140	$y = 1,451x + 0,621$	0,9993
AMI	5 - 140	$y = 1,442x + 0,631$	0,9995
KAN	5 - 140	$y = 1,431x + 0,503$	0,9978
NEO	5 - 140	$y = 1,505x + 0,571$	0,9976

**Bảng 3: Độ lặp lại của phương pháp (n=10)**

Hàm lượng mẫu thêm chuẩn (mg/L)	Mẫu 1			Mẫu 2			Mẫu 3		
	10,0 (RSD)	20,0 (RSD)	50,0 (RSD)	10,0 (RSD)	20,0 (RSD)	50,0 (RSD)	10,0 (RSD)	20,0 (RSD)	50,0 (RSD)
SPE	9,3 (2,7)	18,4 (1,8)	46,2 (0,95)	9,2 (3,4)	18,1 (2,1)	45,8 (1,2)	9,2 (3,1)	18,5 (1,8)	45,9 (1,1)
STR	8,9 (2,5)	17,7 (2,2)	44,5 (1,4)	8,8 (3,1)	17,3 (2,5)	43,9 (1,4)	8,8 (3,1)	17,7 (2,4)	44,1 (1,3)
AMI	8,9 (2,2)	17,6 (2,3)	44,4 (1,7)	8,8 (2,9)	17,4 (2,3)	43,6 (2,1)	8,8 (2,9)	17,8 (2,3)	43,8 (2,2)
KAN	8,9 (2,2)	17,7 (2,3)	44,1 (2,1)	8,8 (2,4)	17,3 (2,7)	43,4 (2,4)	8,8 (2,7)	17,8 (2,1)	43,5 (2,7)
NEO	8,9 (3,3)	17,7 (2,6)	44,0 (1,8)	8,7 (3,0)	17,2 (3,2)	43,5 (2,1)	8,7 (2,3)	17,7 (2,5)	43,6 (2,2)

**Bảng 4: Độ tái lập của phương pháp ( $n_{tb} = 15$ )**

Hàm lượng mẫu thêm chuẩn (mg/L)	10,0 (RSD <sub>RW</sub> )	20,0 (RSD <sub>RW</sub> )	50,0 (RSD <sub>RW</sub> )
SPE	9,1 (3,7)	18,1 (2,2)	45,9 (1,4)
STR	8,8 (3,1)	17,0 (2,1)	43,9 (1,4)
AMI	8,7 (3,3)	16,7 (2,2)	43,6 (1,9)
KAN	8,6 (3,1)	16,6 (2,1)	44,3 (1,6)
NEO	8,5 (3,2)	16,8 (2,4)	44,8 (1,5)

**Bảng 5: Hiệu suất thu hồi của phương pháp (n=10)**

AG	Hiệu suất thu hồi (%)	RSD (%)
SPE	92,0	3,7
STR	88,2	3,1
AMI	88,0	3,3
KAN	87,8	3,1
NEO	87,4	3,2

## Kết quả phân tích mẫu thức ăn chăn nuôi

Dựa vào sắc ký đồ mẫu trắng và mẫu trắng thêm chuẩn tại giới hạn định lượng của các mẫu hỗn hợp cho gà, chim cút từ 1 đến 28 ngày tuổi, thức ăn chăn nuôi hỗn hợp cho gà, chim cút để trứng giống, thức ăn chăn nuôi hỗn hợp cho lợn nhỏ hơn 60 kg nhận thấy tại các thời gian của mẫu trắng không có tín hiệu của các AG.

## Mẫu thức ăn chăn nuôi được bổ sung neomycin (NEO)

Phương pháp đã được ứng dụng phân tích ổn định trên các nền mẫu thực chứa NEO (Bảng 6) trong khoảng hàm lượng từ 10 mg/kg đến 50 mg/kg với RSD phù hợp<sup>11</sup>.

## KẾT LUẬN

Phương pháp HPLC-ELSD dùng phân tích các kháng sinh họ 5-aminoglycoside trong nền thức ăn chăn nuôi đã được tối ưu và được phê duyệt. Các kháng sinh đã được ly trích định lượng với hệ dung môi ACN 20%, HCl 1% và đã được làm sạch trên cột SPE Plexa PCX. Các kháng sinh 5-aminoglycoside được tách tốt trên cột Eclipse Plus C18 1,8  $\mu$ m, 4,6  $\times$  100 mm với hệ pha động nước/acetone có chất ghép cặp ion acid heptafluorobutyric. Thẩm định phương pháp cho thấy các hợp chất kháng sinh trong nền thức ăn chăn nuôi 5-aminoglycoside phân tích bằng HPLC-ELSD có giới hạn phát hiện 4 mg/kg, khoảng làm việc từ 5-140 mg/L, hiệu suất thu hồi trong khoảng 87-92%. Như vậy phương pháp này có đủ điều kiện áp dụng cho phân tích các kháng sinh họ 5-aminoglycoside và có thể được triển khai áp dụng trong các phòng thí nghiệm ở các trung tâm dịch vụ phân tích.

## LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được tài trợ bởi Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM trong khuôn khổ đề tài **HH 2021-06**.

## DANH MỤC VIẾT TẮT

AG: aminoglycoside, NEO: neomycin sulfate, STR: streptomycin sulfate, KAN: kanamycin sulfate, SPE: spectinomycin hydrochloride, AMI: amikacin sulfate  
LOD: giới hạn phát hiện  
LOQ: giới hạn định lượng  
S/N: Signal/noise  
RSD%: Độ lệch chuẩn tương đối  
ELSD: đầu dò tán xạ bay hơi  
HPLC: sắc ký lỏng hiệu năng cao

## XUNG ĐỘT LỢI ÍCH

Các tác giả đồng ý không có bất kỳ xung đột lợi ích nào liên quan đến các kết quả đã công bố

## ĐÓNG GÓP CỦA TÁC GIẢ

Nguyễn Văn Đông: định hướng, lên kế hoạch nghiên cứu, thực hiện các thí nghiệm, thu thập, xử lý các dữ liệu, hoàn thiện bản thảo.

Đỗ Thị Tú Trinh: hỗ trợ xử lý dữ liệu

Tô Thị Hồng Chuyên: hỗ trợ hoàn thiện bản thảo

Nguyễn Minh Thịnh: lên kế hoạch, thực hiện thí nghiệm, thu thập, xử lý số liệu, viết bản thảo.

Trịnh Thị Diệu Bình: hỗ trợ định hướng nghiên cứu, lên kế hoạch nghiên cứu.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Stead DA. Current methodologies for the analysis of aminoglycosides. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences Applications*. 2000;747(1-2):69-93;PMID: 11103900. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)00133-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)00133-X).
2. Watanabe T, Ohashi K, Matsui K, Kubota T. Comparative studies of the bactericidal, morphological and post-antibiotic effects of arbekacin and vancomycin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 1997;39(4):471-6;PMID: 9145819. Available from: <https://doi.org/10.1093/jac/39.4.471>.
3. Nouws J, van Egmond H, Smulders I, Loeffen G, Schouten J, Stegeman H. A microbiological assay system for assessment of raw milk exceeding EU maximum residue levels. *International Dairy Journal*. 1999;9(2):85-90; Available from: [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(99\)00026-6](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(99)00026-6).
4. Wichert BS, Hans Derendorf, Hartmut Sensitive liquid chromatography assay for the determination of amikacin in human plasma. *Journal of pharmaceutical biomedical analysis*. 1991;9(3):251-4;PMID: 1873321. Available from: [https://doi.org/10.1016/0731-7085\(91\)80154-2](https://doi.org/10.1016/0731-7085(91)80154-2).
5. Ackermans ME, FM Beckers, JL. Determination of aminoglycoside antibiotics in pharmaceuticals by capillary zone electrophoresis with indirect UV detection coupled with micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1992;606(2):228-35;PMID: 1430014. Available from: [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(92\)87029-8](https://doi.org/10.1016/0021-9673(92)87029-8).
6. Argekar AR, SV Kapadia, SU Determination of amikacin in parenteral dosage forms by high-performance thin-layer chromatography. *JPC Journal of planar chromatography, modern TLC*. 1996;9(6):459-61;.
7. Baranowska I, Markowski P, Baranowski J. Simultaneous determination of 11 drugs belonging to four different groups in human urine samples by reversed-phase high-performance liquid chromatography method. *Analytica Chimica Acta*. 2006;570(1):46-58; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.04.002>.
8. Wichert B, Schreier H, Derendorf H. Sensitive liquid chromatography assay for the determination of amikacin in human plasma. *Journal of pharmaceutical biomedical analysis*. 1991;9(3):251-4;PMID: 1873321. Available from: [https://doi.org/10.1016/0731-7085\(91\)80154-2](https://doi.org/10.1016/0731-7085(91)80154-2).
9. Megoulas NC, Koupparis MA. Development and validation of a novel HPLC/ELSD method for the direct determination of tobramycin in pharmaceuticals, plasma, and urine. *Analytical Bioanalytical Chemistry*. 2005;382(2):290-6;PMID: 15723226. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00216-004-2948-8>.
10. Megoulas NCK, Michael A Twenty years of evaporative light scattering detection. *Critical reviews in analytical chemistry*. 2005;35(4):301-16; Available from: <https://doi.org/10.1080/10408340500431306>.
11. Analysis AOMo. Appendix F: guidelines for standard method performance requirements. AOAC International Gaithersburg, MD; 2016;.

**Bảng 6:** Kết quả phân tích mẫu thực NEO

Mẫu NEO	Mẫu 1	Mẫu 2	Mẫu 3	Mẫu 4	Mẫu 5	Mẫu 6	Mẫu 7	Mẫu 8
Hàm lượng (mg/kg)	10,2 ±0,5	20,4 ±0,8	52,5 ±1,3	20,4 ±0,8	10,0 ±0,5	52,6 ±1,4	19,9 ±0,8	< 7,0
RSD	3,4	3,6	2,4	2,9	4,8	1,6	3,9	-

# Determination of aminoglycoside antibiotics in animal feed by high performance liquid chromatography using evaporative light scattering detector

Nguyen Van Dong<sup>1</sup>, Do Thi Tu Trinh<sup>1</sup>, To Thi Hong Chuyen<sup>1,\*</sup>, Trinh Thi Dieu Binh<sup>1</sup>, Nguyen Minh Thinh<sup>2</sup>



Use your smartphone to scan this QR code and download this article

## ABSTRACT

This study was carried out to develop a method for the simultaneous analysis of 5-aminoglycosides such as streptomycin (STR), neomycin (NEO), kanamycin (KAN), spectinomycin (SPE), and amikacin (AMI) in animal feedstuffs using the (HPLC-ELSD) high performance liquid chromatography with Evaporative Light Scattering Detector detection. The 5-aminoglycoside antibiotics in animal feed samples were extracted with a solvent containing 20% ACN, 1% HCl (v/v). The extract was purified by solid-phase extraction (SPE) with the stationary phase of PCX, at pH 5 which was adjusted by NH<sub>3</sub> solution. The 5-aminoglycosides were eluted from the SPR column with 10% NH<sub>3</sub> solution. The eluted sample was evaporated to dryness and the residue was dissolved in 20 mM hepta fluorobutyric acid (HFBA) solution followed by filtering through a 0.22 μm membrane prior to analyze by HPLC – ELSD. The 5-aminoglycosides were separated on an Eclipse Plus C18, 1.8 μm, 4.6 × 100 mm column, an aqueous/acetonitrile containing 15 mM HFBA in gradient mode with ratio of H<sub>2</sub>O/ACN: 0-1 min fix at 76:25, 1-6 min reduce 55:45, 6-7 min fix at 55-45, 7-8 min increase to 75:25. A carrier gas velocity of the ELSD detector was 1 L/min and the misting temperature was 40°C. This method achieved a detection limit (MDL) of 4 mg/kg and a recovery yield of 87-92% for 5-aminoglycosides in feed sample with the HPLC – ELSD system.

**Key words:** aminoglycoside, HPLC – ELSD, animal feed

<sup>1</sup>Department of Analytical Chemistry, University of Science, Vietnam National University Ho Chi Minh City

<sup>2</sup>National Center for Veterinary Drugs and Bio-Products Control No 2

## Correspondence

**To Thi Hong Chuyen**, Department of Analytical Chemistry, University of Science, Vietnam National University Ho Chi Minh City

Email: tthchuyen@hcmus.edu.vn

## History

- Received: 19-8-2022
- Accepted: 07-12-2022
- Published: 31-12-2022

DOI : 10.32508/stdjns.v6i4.1227



## Copyright

© VNUHCM Press. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



**Cite this article :** Dong N V, Trinh D T T, Chuyen T T H, Binh T T D, Thinh N M. **Determination of aminoglycoside antibiotics in animal feed by high performance liquid chromatography using evaporative light scattering detector.** *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.*; 2022, 6(4):2356-2367.