

Nghiên cứu xây dựng quy trình định lượng đồng thời 4 chất cấm thường có trong thịt heo bằng phương pháp *UPLC-MS/MS*

Nguyễn Ngọc Trâm¹, Nguyễn Trường²
Phạm Thành Suôi¹, Nguyễn Thị Ngọc Vân^{1*}

¹Trường Đại học Y Dược Cần Thơ

²Công ty TNHH Công nghệ NHONHO

*E-mail: nguyenthingocvanct@gmail.com

Summary

An LC-MS/MS was developed for determination of the following 4 prohibited substances in pork: Acepromazine, atropin, salbutamol, clenbuterol. The residues of these 4 prohibited substances were extracted from the analyzed samples by QuEChERS. The chromatography was performed with: Column - C₁₈ (100 x 2.1 mm; 1.7 μm); mobile phase - acetonitrile/0.1 % formic acid and water with 0.1 % formic acid in gradient mode; detector - Triple quadrupole mass spectrometer system using positive and negative electrospray ionization and Multiple Reaction Monitoring mode. The method was validated. The recovery range was 75.8 - 110.1 % with RSD < 10 % and the limit of detection (LOD) ranged at 0.01 ppb - 0.1 ppb. The method proved desirably helpful for practical analysis of these prohibited substances in pork.

Keywords: Prohibited substances, UPLC-MS/MS, pork.

Đặt vấn đề

Thịt heo là một trong những nguồn thực phẩm thiết yếu, nguồn cung cấp đạm chính cho các bữa ăn hàng ngày. Trong chăn nuôi, salbutamol, clenbuterol được đưa vào trong thức ăn gia súc làm giảm lớp mỡ dưới da, tăng khối lượng cơ, tăng trọng lượng. Atropin, acepromazine thường tiêm trước khi vận chuyển, giết mổ chống căng thẳng, giúp heo trấn tĩnh và giảm lo lắng, chống ói mửa, giảm tử vong. Thuốc còn làm các mạch máu heo co lại khiến thịt hồng hào, bắt mắt hơn. Việc sử dụng bất hợp pháp chất cấm trong chăn nuôi ảnh hưởng xấu đến sức khỏe cộng đồng. Theo các nghiên cứu Y khoa, người tiêu dùng ăn phải thịt heo có nhiều chất thuộc nhóm beta-agonist sẽ bị các triệu chứng cấp tính của sự ngộ độc. Về lâu dài, các chất clenbuterol và salbutamol có thể làm tổn hại các hệ thần kinh, tuần hoàn, hô hấp, thậm chí có thể gây tử vong với người mắc bệnh mạn tính như tim mạch, cao huyết áp, ... Các chất cấm này thường tồn dư ở thận và gan của heo, việc sử dụng nội tạng heo làm tăng nguy cơ nhiễm các chất độc này [1]. Các nghiên cứu cho thấy clenbuterol ổn định trong mô động vật sau giết mổ và đã được chứng minh là không phân hủy trong nước sôi ở 100°C, do đó, có khả năng tồn tại lâu trong mô ngay cả khi xử lý nhiệt độ cao như chiên và luộc [2-3]. Hiện nay, mặc dù công tác kiểm soát đã và đang được tăng cường, có nhiều nghiên cứu mà mức phát hiện và định lượng khá thấp, tuy nhiên thực tế vẫn còn nhiều bất cập vì phần lớn nghiên cứu đều đề cập đến nhóm beta-agonist, ít nghiên cứu về định lượng các chất an thần

trong thịt heo và các chế phẩm từ thịt heo. Ở Việt Nam và trên thế giới, các beta agonist bị cấm đưa vào thực phẩm và việc sử dụng nhóm thuốc an thần cho gia súc trước khi giết mổ là trái phép. Do đó, yêu cầu phương pháp phân tích cần có độ nhạy và độ đặc hiệu cao để dễ dàng phát hiện dư lượng của các chất này trong nền mẫu ở hàm lượng vết (vài phần tỉ - ppb). Phương pháp QuEChERS (viết tắt của Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged và Safe) được biết đến là một phương pháp tuy đơn giản nhưng hiệu quả, có thể ứng dụng trên nhiều nền mẫu nhưng vẫn đảm bảo độ sạch tương đối để tiến hành phân tích, khi kết hợp với thiết bị sắc ký lỏng ghép nối đầu dò khối phổ (*LC/MS*) đã tiến hành định lượng thành công dư lượng của các thuốc trừ sâu, kháng sinh, độc tố nấm trong rau củ, thịt, thủy sản, ngũ cốc, ... Do đó, nghiên cứu này được tiến hành với mục tiêu xây dựng được phương pháp xác định đồng thời dư lượng 4 chất thuộc 2 nhóm beta agonist và nhóm an thần trong thịt heo ở Thành phố Cần Thơ bằng phương pháp xử lý mẫu QuEChERS và tiến hành phân tích bằng thiết bị *UPLC-MS/MS*.

Nguyên vật liệu và phương pháp nghiên cứu Nguyên liệu

Các dung môi isopropanol, acetonitril, nước cất đạt chuẩn *HPLC* (Hãng Merck - Đức); các hóa chất acid formic, Na₂SO₄, NaCl khan, chất hấp phụ C18. Chất chuẩn gồm 4 chất cấm: acepromazin, atropin, salbutamol, clenbuterol của Đức và nội chuẩn sabutamol D9, clenbuterol D9 của Đức.

Thiết bị

Máy sắc ký lỏng **UPLC MS/MS** gồm: **UPLC-Hclass Plus** gồm hệ thống tiêm mẫu tự động, bơm và lò cột. Hệ thống khối phổ **MS/MS** Xevo TQD của hãng Waters (Mỹ).

Đối tượng

Mẫu trắng: Mẫu thịt heo không chứa các chất acepromazin, atropin, Sabutamol, Clenbuterol. Mẫu giả lập được chuẩn bị bằng cách thêm chất phân tích với nồng độ xác định vào mẫu trắng.

Phương pháp nghiên cứu

Quy trình xử lý mẫu: Dựa trên quy trình xử lý mẫu QuEChERS theo AOAC 2007.01 [4]. Cân 5 g mẫu cho vào ống ly tâm 50 ml và thêm vào 100 µl hỗn hợp dung dịch nội chuẩn salbutamol D9, clenbuterol D9 nồng độ 2 ppb vào mẫu. Thêm chính xác 1 ml dung dịch isopropanol, lắc kỹ bằng máy vortex 1 phút. Thêm vào hỗn hợp 4 ml MeCN, lắc trộn đều bằng máy vortex 1 phút và đưa vào máy lắc 15 phút đến khi đồng nhất. Thêm hỗn hợp muối gồm 4 g Na₂SO₄ và 1 g NaCl, lắc kỹ bằng máy vortex 1 phút. Ly tâm ở 4000 vòng/phút trong 5 phút. Hút 2 ml dịch chiết phía trên đem đi thổi khô. Thêm chính xác 0,5 ml MeCN:H₂O (10:90) và cho thêm vào 1 ml n-hexan.

Khảo sát, lựa chọn điều kiện khối phổ:

Khảo sát lựa chọn các thông số nguồn ion hóa (kiểu ion hóa ES+ hay ES-), thể cone, thể mao quản,

năng lượng va chạm (CE), thể phân mảnh (Fragmentor) để bắn phá ion mẹ thành ion con đặc trưng. Ion có tín hiệu lớn và ổn định hơn được sử dụng để làm ion định lượng, ion còn lại được dùng cho mục đích định tính.

Lựa chọn điều kiện sắc ký

Khảo sát các điều kiện bao gồm: Pha động, chương trình rửa giải, tốc độ dòng để thu được sắc ký đồ có pic cân xứng, cường độ tín hiệu cao và ổn định.

Thẩm định quy trình phân tích

Thẩm định quy trình phân tích theo hướng dẫn của AOAC bao gồm các chỉ tiêu: Tính tương thích hệ thống, tính đặc hiệu, khoảng tuyến tính, giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ), độ chính xác và độ đúng.

Xử lý số liệu: Sử dụng phần mềm SPSS Inc, Microsoft Excel để tính toán và xử lý thống kê.

Kết quả nghiên cứu

Lựa chọn điều kiện khối phổ

Chế độ ion hóa ở chế độ ES+, nhiệt độ nguồn 150 °C, nhiệt độ khí phun 450 °C, tốc độ khí phun 900 L/giờ, thể áp vào ống mao quản 0,5 kV, thể cone 26 V.

Chế độ nhận phổ TIC. Qua quá trình khảo sát điều kiện khối phổ cho thấy đa số các chất cấm đều cho ion mẹ ở dạng [M+] có số khối lớn hơn 1 đơn vị so với khối lượng phân tử. Kết quả điều kiện phân mảnh của 4 chất cấm được thể hiện trong bảng 1.

Bảng 1. Kết quả khảo sát điều kiện khối phổ

STT	Chất phân tích	Ion mẹ (m/z)	Ion định lượng			Ion định tính
			Ion (m/z)	Cone (V)	Năng lượng va chạm (eV)	
1	Acepromazin	327,1	86	55	42	254,1
2	Atropin	290,1	124,1	60	23	93,1
3	Salbutamol	240	148	26	20	222,1
4	Clenbuterol	276,9	203	30	16	259,1
5	Salbutamol D9	249	148,1	26	20	-
6	Clenbuterol D9	286	204,1	30	20	-

Khảo sát, lựa chọn điều kiện sắc ký

Pha tĩnh: Cột sắc ký: Acquity UPLC®BEH C18 (100 x 2,1 mm x 1,7 µm), Pha động ACN 0,1 % FA : H₂O/0,1 % FA theo chương trình gradient được trình bày trong bảng 2. Thể tích tiêm mẫu 10 µl. Tốc độ dòng 0,25 ml/phút.

Bảng 2. Điều kiện sắc ký tách hỗn hợp 4 chất cấm và nội chuẩn

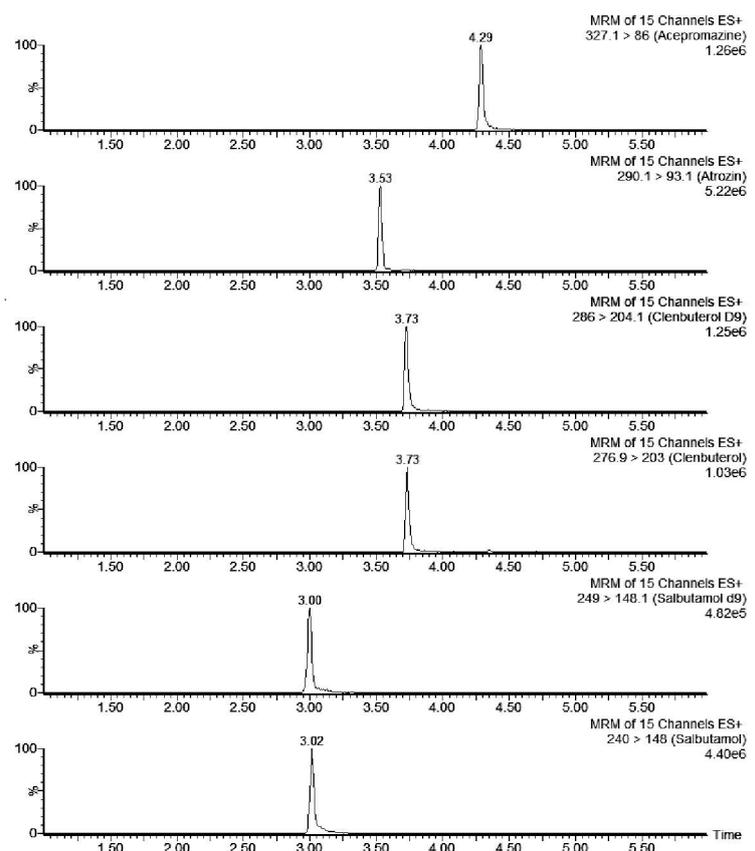
Thời gian (phút)	Tốc độ dòng (ml/phút)	ACN 0,1% FA	H ₂ O /0,1% FA
0	0,25	5	95
0,5	0,25	5	95
2	0,25	50	50

3	0,25	50	50
3,1	0,25	5	95
6,5	0,25	5	95

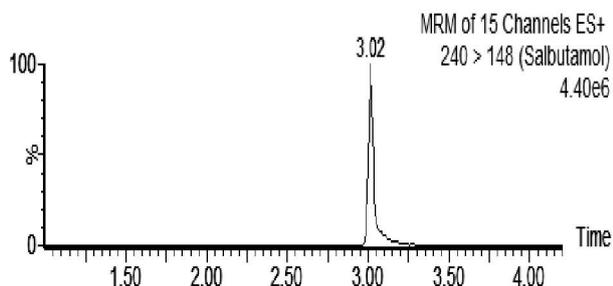
Thẩm định quy trình phân tích

Tính phù hợp hệ thống

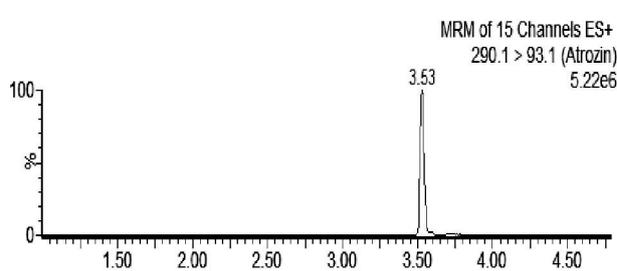
Tiêm 6 lần lặp lại hỗn hợp chuẩn các chất acepromazin, atropin, sabutamol, clenbuterol có cùng nồng độ 10 ppb và IS có nồng độ 2 ppb. Kết quả cho thấy RSD thời gian lưu là rất thấp (< 1 %) và RSD của tỉ lệ diện tích pic của các chất và nội chuẩn dưới 5 % cho 4 chất, đáp ứng yêu cầu theo AOAC (RSD < 15 %).



Hình 1. Sắc ký đồ hỗn hợp 4 chất cấm và nội chuẩn phân tích ở điều kiện lựa chọn



Hình 2. Sắc ký đồ salbutamol



Hình 3. Sắc ký đồ atropin

Tính đặc hiệu

Tiến hành phân tích mẫu trắng, mẫu dịch chiết, mẫu dung môi hòa tan lại trước khi chạy, mẫu dung môi pha động, mẫu chuẩn, mẫu trắng thêm chuẩn. Kết quả phân tích được trình bày trong hình 4 cho thấy ở sắc ký đồ mẫu trắng, mẫu dịch chiết, mẫu dung môi hòa tan lại trước khi chạy, mẫu dung môi pha động không xuất hiện pic trùng thời gian lưu với các chất cần phân tích so với sắc ký đồ của hỗn hợp các chất chuẩn. Trên sắc ký đồ của mẫu trắng thêm chuẩn có xuất hiện các pic có thời gian lưu trùng với các chất phân tích trong mẫu chuẩn. Hơn nữa, với mỗi chất phân tích đều có hai ion sản phẩm dùng để định tính và định lượng, phương pháp đạt yêu cầu số điểm xác nhận tối thiểu với hoạt chất là 4 điểm

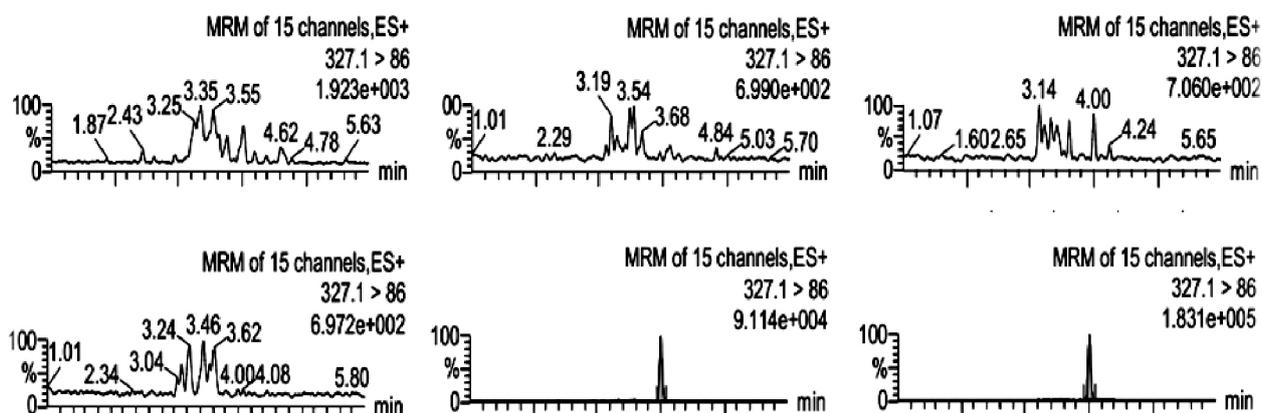
(1 ion mẹ và 1 ion con như bảng 1). Như vậy, phương pháp có tính đặc hiệu đạt yêu cầu.

Khoảng tuyến tính

Mẫu trắng được chiết theo quy trình xử lý mẫu đã xây dựng để thu lấy dịch chiết, dung dịch hỗn hợp chuẩn được pha trên nền dịch chiết ở 6 nồng độ từ 1 – 50 ppb, nồng độ nội chuẩn cố định là 2 ppb.

LOD và LOQ

Mẫu trắng được chiết theo quy trình xử lý mẫu đã xây dựng để thu lấy dịch chiết, thêm một lượng hỗn hợp 4 chất chuẩn vào, rồi tiến hành pha loãng dần để đạt nồng độ xác định. LOD và LOQ được xác định dựa vào giá trị số tín hiệu/ nhiễu (S/N) tại nồng độ thấp nhất mà S/N lần lượt 3 và 10.



Hình 4. Sắc ký đồ thẩm định tính đặc hiệu của acepromazin

Độ đúng và độ lặp lại

Tiến hành trên mẫu giả lập. Thêm một lượng hỗn hợp 4 chất chuẩn vào mẫu trắng và chiết. Thực hiện ở 3 nồng độ 1 ppb, 2 ppb và 5 ppb. Độ đúng

được xác định dựa trên % lượng chất thu hồi so với lượng chuẩn đã thêm vào. Độ lặp lại được đánh giá dựa vào RSD của 6 lần làm lại ở cùng nồng độ. Kết quả thẩm định được thể hiện trong bảng 3 và 4.

Bảng 3. Kết quả thẩm định phương pháp phân tích

Chất phân tích	Khoảng tuyến tính (ppb)	Phương trình hồi quy	Hệ số tương quan r^2	LOD (ppb)	LOQ (ppb)
Acepromazin		$y = 1350,7x + 2186,5$	0,992	0,1	0,33
Atropin	1 - 50	$y = 7738,2x + 1529$	0,996	0,01	0,03
Sabutamol		$y = 7469,7x + 5651,5$	0,991	0,01	0,03
Clenbuterol	0,1 - 5	$y = 3025,8x + 28,647$	1	0,01	0,03

Bảng 4. Kết quả độ đúng và độ lặp lại

Chất phân tích	Độ đúng và độ lặp lại					
	1 ppb		2 ppb		5 ppb	
	R%	RSD%	R%	RSD%	R%	RSD%
Acepromazin	75,8	7,9	110,1	4,7	95,9	5,1
Atropin	94	2,3	108,8	3,8	101,3	2,4
Sabutamol	102	2,7	87,8	2,7	89,9	1,7
Clenbuterol	91,7	7,7	96,7	5,4	98,3	3,5

Nhận xét: Kết quả thẩm định cho thấy trong khoảng nồng độ 1 - 50 ppb có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ các chất cấm với tỉ lệ diện tích pic của chất phân tích và nội chuẩn với hệ số tương quan $r^2 > 0,99$. LOD và LOQ của 4 chất cần phân tích giá trị tương đối thấp trong khoảng LOD (0,01 - 0,1 ppb), LOQ được xác định (0,03 - 0,33 ppb). Độ thu hồi trong khoảng 75,8 - 110,1 % và RSD nhỏ hơn 10 %. Như vậy, phương pháp đã xây dựng có độ thu hồi và độ lặp lại đạt yêu cầu theo quy định AOAC

Bàn luận

Với đặc thù nền mẫu phức tạp, dư lượng các chất cấm ở nồng độ rất nhỏ nên việc lựa chọn quy trình xử lý mẫu và thiết bị phân tích phải đòi hỏi có khả năng làm sạch mẫu, phân tích đồng thời

đa dư lượng với độ nhạy và độ đặc hiệu cao. Phương pháp QuEChERS được ứng dụng, dịch chiết được làm sạch chất phân cực bằng hỗn hợp muối Na_2SO_4 và NaCl với tỷ lệ thích hợp, dùng dung môi hữu cơ để loại các chất hữu cơ kém phân cực. Kết quả cho thấy phương pháp xử lý mẫu tuy đơn giản nhưng cho hiệu suất thu hồi khá cao, độ lặp lại ổn định. Kết quả khảo sát điều kiện khối phổ cho thấy sự phù hợp với các tác giả đã công bố [5-6]. So với các detector thông thường thì **LC-MS/MS** có ưu thế về độ đặc hiệu, độ nhạy và khả năng phân tích đa thành phần trong nền mẫu phức tạp. Ở Việt Nam đã có các nghiên cứu định lượng dư lượng các chất cấm trong thức ăn chăn nuôi, thịt, nước tiểu gia súc các tác giả chủ yếu cũng sử dụng đầu dò **MS** để phân tích mẫu [5,7].

Nghiên cứu này được xây dựng trên hệ thống khối phổ 3 tứ cực dòng Xevo-TQD, làm tăng độ nhạy và thời gian phân tích nhanh (< 6 phút). Kết quả thẩm định phương pháp cho thấy độ đặc hiệu đạt yêu cầu với số điểm nhận dạng (IP) của các chất phân tích là 4. Phương pháp đã xây dựng có khả năng định tính và định lượng được đồng thời 4 chất nghiên cứu với LOD trong khoảng từ 0,01 - 0,1 ppb. Như vậy, giá trị LOD của phương pháp đã xây dựng tương đương hoặc thấp hơn so với các nghiên cứu về các chất cấm đã thực hiện [5-7]. Chuẩn nội dùng trong nghiên cứu là salbutamol D9, clenbuterol D9 đồng vị của salbutamol, clenbuterol đáp ứng yêu cầu phân tích do có tính chất tương tự chất phân tích nên loại bỏ được ảnh hưởng tới quá trình xử lý và phân tích mẫu. Việc lựa chọn chất nội chuẩn đồng vị cũng là xu thế chung của các nghiên cứu hiện nay trên thế giới [6, 8].

Kết luận

Nghiên cứu đã ứng dụng kỹ thuật QuEChERS kết hợp sắc ký lỏng khối phổ 3 lần tứ cực dòng Xevo-TQD để xây dựng quy trình định lượng đồng thời dư lượng của acepromazin, atropin, salbutamol, clenbuterol trong nền mẫu thịt heo. Phương pháp đáp ứng yêu cầu phân tích dư lượng với độ chọn lọc cao, độ thu hồi trong khoảng 75,8 – 110,1 % và RSD nhỏ hơn 10 %. Đặc biệt, độ nhạy của phương pháp có thể phát hiện ở mức 0,01 - 0,1 ppb (tương đương 0,01 - 0,1 µg/kg thịt heo). Do đó, phương pháp có thể ứng dụng để xác định các mẫu thịt heo nhiễm dư lượng trên thị trường.

Tài liệu tham khảo

1. Phạm Đức Bình (2012), “Bê bối thịt heo có chất tạo nạc: Người tiêu dùng Việt Nam tẩy chay”, *Tạp chí khoa học RFI*, tr. 1-2.

2. Dr. Michael HWANG (2016), “Prohibited veterinary drug residues (Salbutamol) in pigs”, pp. 1-3.

3. Tran Huu Trang, Tran Thi Hanh (2019), “Situation of violations of the law on food safety on animal husbandry and aquaculture in Vietnam”, *Science Journal Hanoi Open University*, 51, pp.1-12.

4. AOAC International (2012), AOAC Official Method 2007.01 - Pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate, AOAC.

5. Nguyễn Thị Hà, Nguyễn Văn Lượng, Đỗ Khắc Hải, Lê Thị Quỳnh, Nguyễn Kiều Hưng (2016), “Nghiên cứu xây dựng phương pháp xác định đồng thời Salbutamol, Ractopamine và Clenbuterol trong thức ăn chăn nuôi bằng kỹ thuật sắc ký lỏng siêu hiệu năng hai lần khối phổ”, *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN: Các Khoa học Trái đất và Môi trường*, 32 (3), tr. 1-6.

6. Preechaya Yodrasing¹, Narin Boontanon², Suwanna Kitpati Boontanon³, and Chongrak Polprasert⁴ (2016), “Analysis of Beta-agonists in Animal Feeds by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry and Health Risk Assessment”, *Inter. Conference on Agricultural, Ecological and Medical Sci.*, pp. 58-61.

7. Trần Nguyễn An Sa, Nguyễn Trang Vi Hậu (2017), “Xác định salbutamol trong mẫu thịt bằng phương pháp sắc ký khí ghép khối phổ (GC MS)”, *Tạp chí Khoa học Công nghệ và Thực phẩm*, tr. 73-80.

8. Huỳnh Thị Hồng Ngọc, Võ Thị Bạch Huệ, Nguyễn Thị Kiều Anh, Nguyễn Thị Ngọc Vân (2018), “Xây dựng quy trình xác định dư lượng 9 thuốc bảo vệ thực vật thường phun trên rau bằng phương pháp UPLC-MS/MS Xevo TQ-S Micro”, *Tạp chí Dược học*, 508, tr. 55-60.

(Ngày nhận bài: 21/7/2020 - Ngày phản biện: 08/8/2020 - Ngày duyệt đăng: 14/9/2020)

Nghiên cứu bào chế kem dưỡng ẩm da

Nguyễn Thị Mai Anh*, Phạm Thu Hương

Trường Đại học Dược Hà Nội

*E-mail: anhnmtm@hup.edu.vn

Summary

Taking skin moisturization as essential for reinforcement of the skin's barrier properties protecting the body against exogenous harmful agents, from excessive water loss and skin-aging in general, an aqueous oil emulsion was formulated for skin moisturizing creams with some experimented humectants, occlusives and emollients. The cream of chosen formulation proved desirable in stable physical structure, smooth texture and rapid percutaneous penetration. Experimental tests on rabbit skin (both in vitro and in vivo), the hydration potential of the cream was assessed, proving the obtained creams retaining water quite well in rabbit skin in 4 hours. No allergic signs were observed on the rabbit skin after 72 hrs of applying the cream.

Keywords: Moisturizing cream.