

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC CẦN THƠ**

ĐỀ TÀI KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ CẤP BỘ

**QUY TRÌNH PHÂN TÍCH CLENBUTEROL BẰNG
SẮC KÝ LỎNG GHÉP KHỐI PHỔ (LC/MS/MS)**

TÊN ĐỀ TÀI

***ĐÁNH GIÁ HÀM LƯỢNG CLENBUTEROL TRONG THỨC ĂN
GIA CẦM VÀ DƯ LƯỢNG TRONG THỊT GIA CẦM BẰNG KỸ
THUẬT SẮC KÝ LỎNG GHÉP KHỐI PHỔ (LC/MS/MS)***

Mã số: B2008- 16 - 107

Chủ nhiệm đề tài: Ths. NGUYỄN THỊ THU THỦY

Cần Thơ, Tháng 7/ Năm 2010

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC CẦN THƠ

Đề tài Khoa học và Công nghệ cấp Bộ

Tên đề tài: ***Đánh giá hàm lượng Clenbuterol trong thức ăn gia cầm và dư lượng trong thịt gia cầm bằng kỹ thuật sắc ký lỏng ghép khối phổ (LC/MS/MS)***

Mã số: **B2008- 16 - 107**

Chủ nhiệm đề tài:

1. Nguyễn Thị Thu Thủy: Bộ môn Hóa Khoa Sư phạm Trường Đại Học Cần Thơ
2. Những cá nhân cùng tham gia thực hiện đề tài

TS Trần Kim Tính: Phòng thí nghiệm chuyên sâu – Đại học Cần Thơ

Ths Ngô Quốc Luân : Khoa sư phạm – Đại Học Cần Thơ

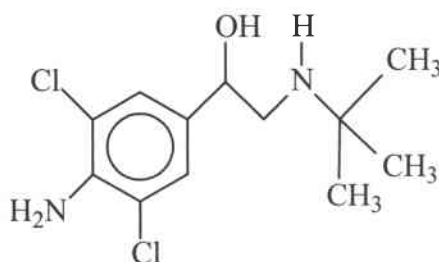
QUY TRÌNH PHÂN TÍCH CLENBUTEROL BẰNG SẮC KÝ
LỎNG GHÉP KHỐI PHỔ (LC/MS/MS)

I. GIỚI THIỆU

Trong những năm gần đây, không những ở Việt Nam mà cả thế giới quan tâm nhiều đến vấn đề vệ sinh an toàn thực phẩm. Những chất phụ gia, chất kích thích tăng trưởng càng ngày càng bị lạm dụng. Điều này ảnh hưởng không nhỏ đến sức khỏe người tiêu dùng. Việc áp dụng kỹ thuật Sắc ký lỏng ghép khối phổ (LC-MS/MS) để kiểm tra dư lượng chất tăng trọng cho gia súc, gia cầm đang dần dần được triển khai ở Việt Nam.

Clenbuterol: một hợp chất thuộc nhóm β -Agonist, là một trong những chất kích thích tăng trọng được xem như là “thần dược” trong lĩnh vực chăn nuôi, khi cho vào thức ăn chăn nuôi loại thuốc này sẽ làm tăng lượng thịt và làm giảm lớp mỡ dưới da. Tuy nhiên, chất này có thể gây hại cho sức khỏe người tiêu dùng như gây rối loạn nhịp đập tim, tăng huyết áp, run cơ, choáng váng, nôn mửa^[6]. Cũng như nhiều nước ở châu Âu và Mỹ, Clenbuterol đã bị cấm sử dụng ở Việt Nam từ năm 2002^[1]. Mặc dù vậy, Clenbuterol vẫn còn được cho vào thức ăn chăn nuôi vì mục đích lợi nhuận. Do hàm lượng Clenbuterol cho vào thức ăn chăn nuôi cũng như dư lượng trong thịt gia súc, gia cầm rất nhỏ (MRL trong thịt: 0,2 $\mu\text{g/kg}$), việc định lượng chính xác Clenbuterol

trong các nền mẫu nêu trên thường rất khó khăn. Một số phương pháp đã được áp dụng như ELISA, GC/MS, LC/MS [3]; [4] [5]. Gần đây, chúng tôi đã cải tiến phương pháp kiểm nghiệm, sử dụng kỹ thuật LC/MS/MS kết hợp với dùng nội chuẩn clenbuterol-d9 trong việc phân tích, xác định hàm lượng Clenbuterol¹ trong thức ăn chăn nuôi và trong thịt gia súc, gia cầm. Chúng tôi xin trình bày dưới đây phương pháp LC-MS/MS dùng để định lượng Clenbuterol trong thức ăn chăn nuôi và trong thịt heo, thịt gà.



Công thức Clenbuterol (Mw = 277.2 g/mol)

II. NGUYÊN TẮC

Mẫu thức ăn hoặc mẫu thịt sau khi được chiết bằng đệm pH 6 sẽ được làm sạch bằng cột chiết pha rắn SPE Strata-SCX. Sau đó, clenbuterol được định tính và định lượng trên LC/MS/MS.

III. HÓA CHẤT THIẾT BỊ DỤNG CỤ

III.1 Hóa chất

- Nước cất 2 lần khử ion
- CH₃OH, HPLC (Merck)
- H₃PO₄, p.a
- HCOOH, HPLC (Merck)
- K₂HPO₄, p.a

Chất chuẩn và nội chuẩn gốc

- Chuẩn: Clenbuterol hydrochloride, 95 % của hãng Sigma Aldrich Pty. Ltd (New South Wales, Australia)
- Nội chuẩn: Clenbuterol – d9 (100 mg/L) Dr. Eheenstorfer

III.2 Thiết bị

-
- a. Cân phân tích, độ chính xác 0,01 mg
 - b. Máy ly tâm
 - c. Máy lắc Vortex.
 - d. Bộ lọc dung môi tương thích với màng lọc 0.45 μm
 - e. Màng lọc PTFE, 13 mm, 0,45 μm
 - f. Máy đo pH
 - g. Ống ly tâm 50mL, polypropylen, có nắp đậy
 - h. Cột SPE Strata SCX (Phenomenex), 500mg-3mL
 - i. Bộ chiết pha rắn
 - j. Bình định mức (CCX A): 10mL
 - k. Pipet vạch (CCX A): 0.1mL, 0.5mL, 1mL
 - l. Pipet bầu (CCX A): 1mL, 2mL, 5mL
 - m. Dụng cụ thủy tinh các loại: ống nghiệm 10 mL có nắp đậy, bình nón,...
 - n. Hệ thống thổi khô bằng khí nitơ

III.3 Hệ thống LC/MS/MS

- a. Hệ thống sắc ký lỏng: gồm bơm (MS pump plus) và hệ thống tiêm mẫu tự động (Surveyor Autosampler plus) kết nối với đầu dò khối phổ ba tứ cực (TSQ Quantum access).
- b. Cột sắc ký lỏng pha đảo C18, LichroCART 150 x 4 mm, 5 μm hay tương đương của hãng Merck
- c. Cột bảo vệ pha đảo C18

III. PHƯƠNG PHÁP

II.1. Chuẩn bị mẫu:

Chiết mẫu

Mẫu (2- 5g) được cắt nhỏ xay nhuyễn, làm đồng nhất và chiết với đệm phosphate (0,1M K_2HPO_4 , pH 6) sau khi đã cho vào một lượng không thay đổi nội chuẩn (từ 2 – 4 ng/g) clenbuterol-d9 và để yên trong 1 giờ.

Ly tâm và chiết lấy dung dịch lớp trên, lọc

Làm sạch mẫu

Dịch lọc sau khi chiết được làm sạch bằng cột chiết pha rắn SPE Strata-SCX của Phenomenex. Cột SPE đã được hoạt hóa lần lượt với MeOH, nước cất khử ion, đệm phosphate 0,1M K_2HPO_4 . Rửa giải với dung dịch 95:5 Acetonitrile/Ammoniac (30%). Cô cạn bằng khí N_2 và định mức 1ml bằng pha động ban đầu, sau đó cho vào Vial và đưa vào hệ thống phân tích bằng LC/MS/MS

III. 2. Kỹ thuật LC/MS/MS

III. 2.1. Điều kiện vận hành hệ thống sắc ký lỏng (LC):

Cột: Purospher Star C18, 125 mm x 4.6 mm x 5 μm với cột bảo vệ (Merck)

Pha động: A: MeOH (0,1% HCOOH); B: Nước khử ion (0,1% HCOOH)

Thời gian (phút)	A%	Tốc độ dòng (μL /phút)
0.0	15	500
1.0	15	500
2.0	60	500
2.5 -13	100	500
13 -14	15	500
15 -25	15	500

Thể tích bơm: 25 μL .

III.2.2. Điều kiện vận hành hệ thống khối phổ:

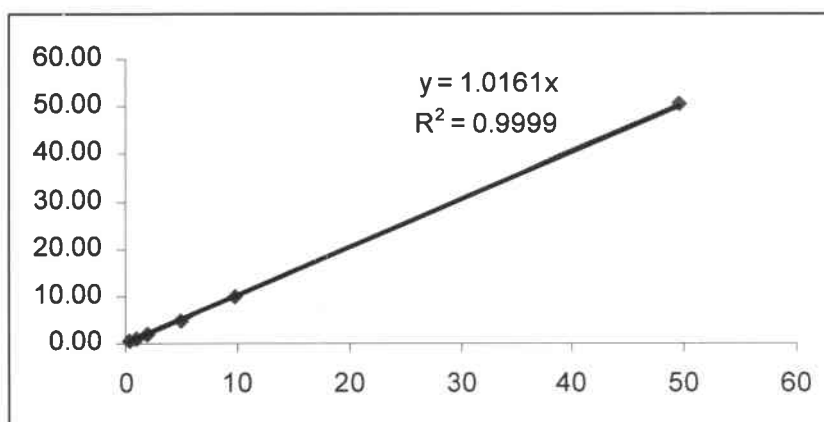
Nguồn tạo ion:	ESI (+) 4000 V	
Khí phun/bổ trợ N_2 :	40/10 đơn vị	
Nhiệt độ ống mao quản:	350 $^{\circ}C$	
CID:	6 V	
Khí phun:	Argon (1.5 mTorr)	
Bề rộng mũi Q_1 & Q_3 :	0.7 Da	
SRM & Năng lượng CE:	m/z 277>203 (định lượng)	CE: 22 V
	m/z 277>132 (xác nhận)	CE: 36 V
	m/z 286>204 (nội chuẩn)	CE: 22 V
Thời gian quét:	0,1 giây/chuyển tiếp SRM	

IV YÊU CẦU VỀ ĐỘ TIN CẬY CỦA PHÉP PHÂN TÍCH

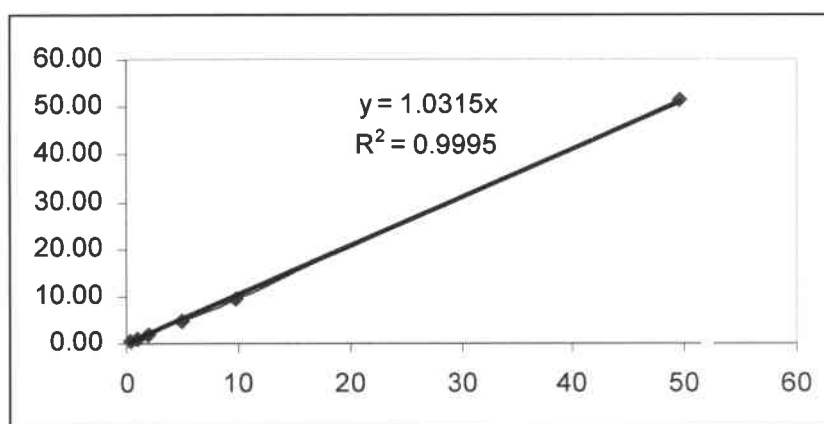
IV.1. Xây dựng đường chuẩn

Xây dựng đường chuẩn biểu thị mối quan hệ giữa tỉ lệ diện tích pic ion định lượng clenbuterol (m/z 203) và clenbuterol – d_9 (m/z 204) thu được với nồng độ chuẩn clenbuterol tương ứng. Lưu ý: Cần quy đổi nồng độ theo độ tinh khiết của chuẩn.

Yêu cầu đường chuẩn phải có độ tuyến tính tốt (từ 5 – 6 điểm chuẩn, bao gồm cả điểm 0), hệ số tương quan hồi qui tuyến tính (R^2) phải lớn hơn hoặc bằng 0.99. Nếu đường chuẩn được xây dựng từ 4 điểm chuẩn (bao gồm cả điểm 0) thì hệ số tương quan hồi qui tuyến tính (R^2) phải lớn hơn hoặc bằng 0.999. Đường chuẩn được xây dựng trên nền mẫu trắng (mẫu không phát hiện clenbuterol) với nội chuẩn clenbuterol- d_9 nhằm loại bỏ ảnh hưởng nền trong giai đoạn chuẩn bị mẫu cũng như trong giai đoạn tạo ion ở đầu dò khối phổ (Hình a và b).



Hình a. Đường chuẩn xây dựng trên nền TACN



Hình b Đường chuẩn xây dựng trên nền thật

IV.2 Giới hạn phát hiện :

<i>Nền mẫu</i>	<i>LOD</i>	<i>LOQ</i>	<i>Đơn vị</i>
<i>Thịt</i>	0,017	0,051	µg/Kg
<i>Thức ăn chăn nuôi</i>	0,12	0,36	µg/Kg

Bảng 1. Giới hạn phát hiện clenbuterol

IV.3 Tỷ lệ cường độ ion

Theo quyết định 2002/657/EC của Châu Âu,^{[1] [2]} để xác nhận chất phân tích, hai mảnh ion con và ion ban đầu phải hội đúng 4 điểm cần thiết, tỷ lệ cường độ ion của hai mảnh ion con phải có trị số xác định và chỉ được thay đổi trong khoảng cho phép. Trong trường hợp này, tỷ lệ (cường độ ion 132/cường độ ion 203) có trị số $28\% \pm 3\%$ so với trị số có thể cho phép $28\% \pm 7\%$ theo quyết định 2002/657/EC. Kết quả của quá trình tối ưu, dựa trên cường độ của các ion, ion định lượng và định tính được trình bày trong bảng 2

<i>Ion chính</i>	<i>Ion định lượng</i>	<i>Ion xác nhận</i>
277.0	203,0	203,0; 132,1
286.1	204,0	-

Bảng 2. Ion định lượng và ion xác nhận

V. TÍNH KẾT QUẢ

Lượng chất cần phân tích có mặt trong mẫu kiểm được tính theo công thức sau:

$$X = \frac{C_0 \times 1}{m, (V)}$$

- Trong đó: - X: lượng chất cần phân tích có trong mẫu kiểm, µg/kg hoặc µg/L
- C_0 : nồng độ chất cần phân tích tính từ đường chuẩn, µg/L
(sử dụng phần mềm Excel, dùng hàm forecast để tính dựa theo tỉ lệ diện tích pic của dãy chuẩn và nội chuẩn).
 - 1: Thể tích định mức 1 mL, mL
 - m: khối lượng mẫu phân tích (gam)
 - hoặc V thể tích mẫu phân tích (mL)

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Commission Decision 2002/657/EC. 12/08/2002, *implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results*, Official J. of the European Union , L 221/8-21.17-80, 2002.
- [2] Commission Decision 2004/25/EC, *amending Decision 2002/657/EC as regards the setting of minimum required performance limits (MRPLs) for certain residues in food of animal origin*, Official J. of the European Union, L6/38-39. 10-1, 2004
- [3] *Confirmation and quantitative determination of Clenbuterol in equine serum*, SOP developed for testing integrity program by Equine Pharmacology Laboratory, Gluck Equine Research Center, University of Kentucky, 2001.
- [4] R.P. Kootstra, C.J.P.F. Kuijpers, K.L. Wubs, D. Van Doorn, S.S. Sterk, L.A. van Ginkel, R.W. Stephany, *The analysis of beta-agonist in bovine muscle using molecular imprinted polymers with ion trap LCMS screening*, Analytica Chimica Acta, 529 75 – 81, 2005.
- [5] Lee D. Williams, Mona I. Churchwell, Daniel R. Doerge, *Multiresidue confirmation of β -agonists in bovine retina and liver using LC-ES/MS/MS*, Journal of Chromatography B, 813 35-45, 2004.
- [6]http://www.chicucthuyhcm.org.vn/?act=XemChiTiet&Cat_ID=34&News_ID=205&LinksFrom=http://www.chicucthuyhcm.org.vn/default.aspx
- Bài viết của tác giả Nguyễn Lê Kiều Thu Bộ môn Dược lý
Trạm Chẩn đoán, xét nghiệm và Điều trị Chi Cục Thú y
- [7] Quyết định số 54/QĐ- BNN ngày 20/06/2002 về việc cấm sản xuất, nhập khẩu, lưu thông và sử dụng một số loại kháng sinh, hóa chất trong sản xuất và kinh doanh thức ăn chăn nuôi.