

NGHIÊN CỨU ĐỊNH LƯỢNG HORMON RACTOPAMIN TỒN DƯ TRONG THỊT GÀ BẰNG PHƯƠNG PHÁP LC-MS/MS

TS. Lê Thị Hương Hoa¹
PGS.TS. Chử Văn Mến², ThS. Nguyễn Thị Hồng Vân²

¹ Khoa Dược, Trường Đại học Hòa Bình

² Học viện Quân Y

Tác giả liên hệ: lthhoa@daihochoabinh.edu.vn

Ngày nhận: 12/8/2021

Ngày nhận bản sửa: 27/8/2021

Ngày duyệt đăng: 08/9/2021

Tóm tắt

Một quy trình phân tích xác định dư lượng Ractopamin hydroclorid trong thịt gà bằng phương pháp LC-MS/MS đã được thiết lập với kỹ thuật chiết pha rắn và các điều kiện sắc ký lỏng và khối phổ phù hợp.

Chất cấm Ractopamin hydroclorid được chiết tách ra khỏi mẫu thịt gà bằng kỹ thuật chiết pha rắn (SPE). Phương pháp phân tích tiếp theo là LC-MS/MS với các điều kiện phân tích như sau: Cột sắc ký: ACQUITY UPLC® BEH C18 (2,1 x 50 mm, 1,7 μ m) được sử dụng làm pha tĩnh, pha động là hỗn hợp của acetonitrile và dung dịch acid formic 0,1% với tỷ lệ 85:15; tốc độ dòng là 0,2 ml/phút; detector khối phổ tứ cực chấp ba (ACQUITY UPLC H-Class's Quaternary Solvent Manager; Xevo TQD, Waters).

Kết quả thẩm định phương pháp cho thấy, phương pháp có độ đặc hiệu cao, có giới hạn định lượng dưới nhỏ (LLOQ = 48 ng/ml), khoảng tuyến tính khá rộng (48 ng/ml đến 7500 ng/ml), có độ đúng cao (từ 80,1-115,4%), độ lặp lại tốt với giá trị CV% nhỏ (9,25 đến 13,86%), thời gian phân tích sắc ký nhanh (3 phút cho 1 lần tiêm mẫu), chất phân tích ổn định trong nền mẫu thịt gà với một thời gian dài (30 ngày). Phương pháp đưa ra đã đáp ứng các yêu cầu của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học của EMA và US-FDA [6], [9].

Từ khóa: Ractopamin, hormone tồn dư, định lượng chất cấm, LC-MS/MS

Development and validation of an LC - MS/MS method for assay of Ractopamine hydrochloride in the kitchen

Abstract

A method using ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry was developed for determination of banned Ractopamine hydrochloride (RAC.HCl) substance in chicken. The RAC.HCl was separated from chicken by SPE technique and was dissolved in the mobile phase. The LC-MS/MS method with the chromatographic conditions as follows: A new column ACQUITY UPLC® BEH C18 (2.1 x 50 mm, 1.7 μ m) packed with octyl silyl silica gel for chromatography was used as stationary phase, a mixture of 85 volumes of acetonitrile and 15 volumes of 0.1% formic acid solution was used as the mobile phase with a flow rate of 0.2 ml per minute, using a tandem quadrupole mass detector (ACQUITY UPLC H-Class's Quaternary Solvent Manager; Xevo TQD, Waters). The experimental results proved that the assay was linear over the concentration from 48 ng/ml to 9500 ng/ml. The LLOQ was 48 ng/ml. The method was validated about the specificity, the intra-day and inter-day accuracy were within 80.1% - 115.4%. (CV = 9.25-13.86%). The validation results proved that this method was suitable for determination of Ractopamine in accuracy the chicken preparation.

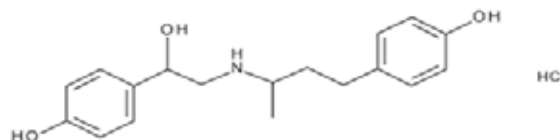
Keywords: Ractopamine, residue hormone, assay of banned substance, LC-MS/MS

1. Đặt vấn đề

Vệ sinh an toàn thực phẩm luôn là một trong các vấn đề được quan tâm hàng đầu trong toàn xã hội của mọi quốc gia vì nó liên quan trực tiếp đến sức khỏe của người dân. Các chất nhóm β - agonists đã và đang bị lạm dụng sử dụng (trộn vào thức ăn) như một loại hormon tăng trưởng, tạo nạc cho gia súc và gia cầm trong sản xuất và chăn nuôi, một trong số đó phải kể đến là Ractopamin hydrochlorid (RAC.HCl) (Hình 1) [1], [2], [3].

Thông thường, người chăn nuôi sẽ trộn thêm RAC.HCl vào giai đoạn gần xuất chuồng, điều này dẫn đến dư lượng của chúng trong thịt khi sử dụng, dư lượng này có thể gây nên nhiều tác hại xấu cho sức khỏe người tiêu dùng như: có thể gây triệu chứng ngộ độc cấp, buồn nôn, chóng mặt, run cơ, đánh trống ngực, tăng huyết áp, thúc đẩy bệnh tim mạch, thậm chí tử vong [3]. Nếu sử dụng trong thời gian kéo dài, có thể gây dậy thì sớm ở trẻ em, dẫn đến rối loạn hệ thống hormon...[3]. Ở Việt Nam, từ năm 2002 đến nay, Ractopamin vẫn được liệt kê trong danh sách những hóa chất, hormon cấm sử dụng trong sản xuất kinh doanh động vật trên cạn [1] [2]... Vì vậy, việc nghiên cứu tình trạng sử dụng cũng như xác định lượng tồn dư trong thực phẩm cần được quan tâm.

Với sự phát triển của khoa học công nghệ, có nhiều phương pháp có thể xác định sự có mặt của RAC.HCl như kỹ thuật miễn dịch Elisa, tuy nhiên, phương pháp này chỉ phù hợp cho sàng lọc do dễ gây phản ứng chéo, gây tỉ lệ dương tính giả hoặc âm tính giả. Sắc ký khí kết nối khối phổ là phương pháp phổ biến nhưng phải tạo dẫn xuất dễ gây tạp chất hoặc test Kit đánh giá cho kết quả nhanh nhưng độ chính xác và giới hạn phát hiện không cao. Hiện nay, sắc ký lỏng khối phổ (LC-MS/MS) được đánh giá là phương pháp có độ nhạy cao, phân tích nhanh, chính xác đang được ứng dụng nhiều trong phân tích, định lượng các chất trong dịch sinh học, trong đó, có phân tích Ractopamin.HCl trong thịt bò và thịt lợn [4] [5] [7] [8]. Trong bài viết này, chúng tôi xin giới thiệu kết quả nghiên cứu xây dựng phương pháp định lượng Ractopamin.HCl trong thịt gà bằng phương pháp LC-MS/MS.



Hình 1. Công thức hóa học của Ractopamin hydrochlorid

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

Hoá chất và chất chuẩn

Dung môi, hóa chất: Acetonitril, Methanol, acid hydrophosphoric, amoni hydroxyd, dikali hydrophosphat K_2HPO_4 đạt tiêu chuẩn tinh khiết dùng cho phân tích hoặc sắc ký.

Chất đối chiếu: Ractopamin hydrochlorid của Sigma-Aldrich, Mỹ, số lô: BCBT4623; hàm lượng 95,0 %.

Trang thiết bị

Máy sắc ký lỏng ACQUITY UPLC H-Class's Quaternary Solvent Manager, khối phổ: Xevo TQD Waters; cân kỹ thuật độ chính xác 0,01g, cân phân tích Mettler Toledo độ chính xác 0,01 mg; máy ly tâm; máy đo pH Metrohm 780 (Thụy Sĩ), máy lắc vortex, micropipet, cột chiết SPE MCX, dụng cụ thủy tinh cần thiết (bình định mức, pipet, ống đong, phễu lọc...).

Phương pháp nghiên cứu

Khảo sát phương pháp xử lý mẫu:

Mẫu trắng: mẫu thịt gà được lấy tại Ban Cung cấp Động vật của Học viện Quân y, không chứa chất RAC.HCl. **Mẫu chuẩn:** Cân chất chuẩn và pha trong methanol. Sau đó, thêm dịch chiết từ mẫu trắng để được các dung dịch chuẩn trong nền mẫu. **Mẫu tự tạo:** Thêm chất chuẩn RAC.HCl vào mẫu thịt gà đã xay nhuyễn. **Mẫu QC (quality control sample):** chuẩn bị độc lập với mẫu chuẩn. Phương pháp xử lý mẫu: Khảo sát, lựa chọn phương pháp xử lý mẫu phù hợp để chiết được tối đa hoạt chất và loại được các tạp chất.

Khảo sát, lựa chọn các điều kiện phân tích:

Sử dụng hệ thống sắc ký khối phổ UPLC- MS/MS loại tứ cực chấp 3 với nguồn ion hóa kiểu ESI. Khảo sát lựa chọn điều kiện sắc ký (cột sắc ký, pha động, tốc độ dòng, thể tích tiêm mẫu, điều kiện khối phổ...). Chọn chế độ khảo sát tự động để chọn ion mẹ, ion con dùng để định tính, định lượng. Các thông

số MS/MS được tự động tối ưu bằng chế độ MS tune của thiết bị.

Thẩm định các phương pháp đã chọn: Về độ đặc hiệu, khoảng tuyến tính, độ chính xác, độ đúng, giới hạn định lượng dưới (LLOQ), giới hạn định lượng (LOQ), giới hạn định lượng trên (ULOQ)... Đánh giá độ bền của Ractopamin trong dịch chiết mẫu đặt tại bộ phận tiêm mẫu tự động (autosample), trong mẫu thịt gà được bảo quản dài ngày... Các kết quả thực nghiệm được tính toán và xử lý thống kê trên Microsoft Excel với các hàm thống kê thông dụng. Kết quả thẩm định phải đạt các yêu cầu của phân tích các chất trong dịch sinh học [6], [9].

3. Kết quả nghiên cứu

Khảo sát điều kiện sắc ký

Thử nghiệm được tiến hành trên hệ thống sắc ký ACQUITY UPLC H-Class's Quaternary Solvent Manager, khối phổ: Xevo TQD Waters; cột sắc ký ACQUITY UPLC® BEH C18 (50 × 2,1mm; 1,7 μm), Nhiệt độ cột: 30°C; Thể tích tiêm: 2μl, Tốc độ dòng: 0,2 ml/phút với pha động: acetonitril - dung dịch acid formic 0,1% ở các tỷ lệ (95:5) và (85:15). Kết quả cho thấy pha động ở tỷ lệ acetonitril - dung dịch acid formic 0,1% (85:15) cho pic cân đối, được tách riêng biệt, thời gian lưu phù hợp nên được chọn cho nghiên cứu tiếp theo.

Lựa chọn điều kiện khối phổ

Bảng 1. Các thông số của detector khối phổ để định lượng Ractopamin hydroclorid

Thông số	Chất phân tích
Chế độ ion hóa	Ractopamin hydroclorid ESI (+)
Điện thế mao quản (kV)	1,5
Điện thế cone (V)	62
Nhiệt độ khử Solvat (°C)	550
Tốc độ khí khử Solvat (L/H)	900
Tốc độ khí cone (L/H)	25
Năng lượng va chạm (V)	16
Ion mẹ (Dalton)	302,07
Ion con (Dalton)	164,06

Bảng 1. Các thông số của detector khối phổ để định lượng Ractopamin hydroclorid

Phương pháp chuẩn bị mẫu

Mẫu trắng: Là mẫu dịch chiết từ thịt gà theo quy trình chiết mẫu thử.

Mẫu chuẩn: Các mẫu chuẩn được chuẩn bị bằng cách thêm chuẩn vào nền mẫu. Từ dung dịch chuẩn gốc 100 μg/ml RAC.HCl trong MeOH, pha thành dung dịch chuẩn trung gian trong MeOH có nồng độ 1000 ng/ml. Sau đó, từ các dung dịch này, chuẩn bị các dung dịch chuẩn có nồng độ từ 45 ng/ml đến 9500 ng/ml bằng cách phối hợp với nền mẫu trắng để được các dung dịch xây dựng đường chuẩn.

Mẫu kiểm tra (QC): Hòa tan chất chuẩn RAC.HCl trong methanol để thu được dung dịch chuẩn gốc có nồng độ RAC.HCl chính xác khoảng 100 μg/ml (QC-W). Chuẩn bị độc lập với mẫu chuẩn. Pha loãng với methanol thành chuẩn kiểm tra làm việc QC (cách pha tương tự pha mẫu chuẩn). Từ đó, pha với dịch nền mẫu trắng để tạo thành chuẩn LQC (giới hạn định lượng) = 3 LLOQ; MQC gần với nồng độ giữa trong dãy chuẩn; HQC (ở nồng độ cao trong dãy chuẩn) = 60-80 % ULOQ.

Mẫu thử: Cân 1 g thịt gà đã xay nhuyễn cho vào ống ly tâm 50 ml. Thêm 10 ml dung dịch K₂HPO₄ 0,1M, lắc vortex 10 phút. Ly tâm 15 phút ở tốc độ 4000 vòng/phút. Lấy 5 ml dịch chiết (sau ly tâm) cho qua cột SPE MCX (Cột SPE MCX đã được hoạt hóa bằng 5 ml MeOH, 5 ml nước cất, sau đó cho 5 ml đệm chiết mẫu K₂HPO₄ 0,1M). Tải mẫu lên

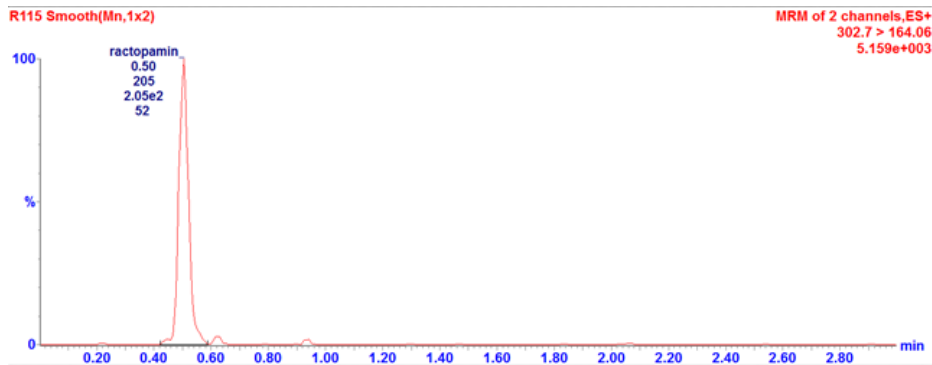
cột, tốc độ 1 ml/phút. (Không để khô cột giai đoạn cho mẫu lên cột và rửa cột). Rửa bằng 4 ml nước, rửa tiếp bằng 4 ml MeOH. Rửa giải bằng 4 ml dung dịch NH₄OH 5% trong MeOH. Lấy dung dịch rửa giải, thổi khô bằng khí nitơ ở 400C. Hòa tan cần khô bằng 1 ml hỗn hợp của acetonnitril và acid formic (85:15), lắc bằng máy vortex và lọc qua màng lọc 0,45µm, được dung dịch để tiêm sắc ký.

Thẩm định phương pháp phân tích
Tính tương thích của hệ thống

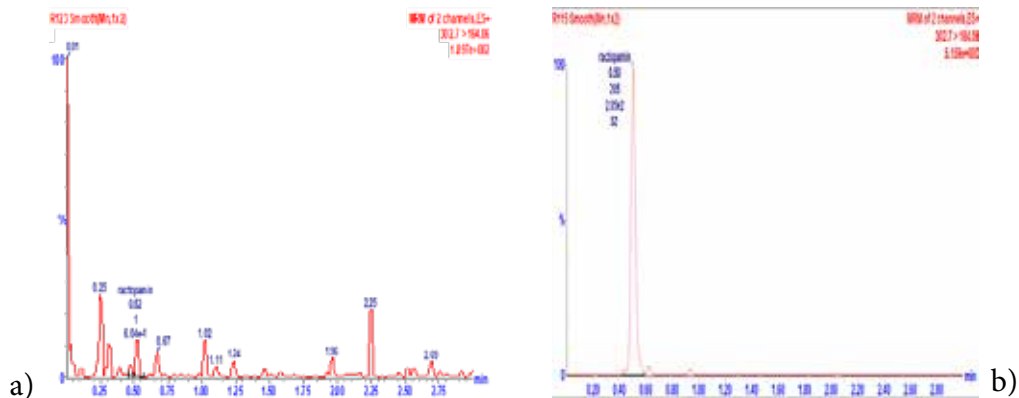
Phân tích sắc ký lặp lại 6 lần mẫu tự tạo (thêm chất chuẩn vào nền mẫu thịt gà), ghi lại sắc ký đồ, đáp ứng pic của 6 lần phân tích. Kết quả được nêu ra ở Bảng 2 và Hình 2.

STT	RAC.HCl (48 ng/ml)	
	tr	Đáp ứng
1	0,5	199,672
2	0,5	204,565
3	0,51	199,803
4	0,5	204,547
5	0,5	208,904
6	0,5	203,302
TB	0,5	203,466
CV (%)	0,81	1,69

Bảng 2. Sự phù hợp của hệ thống sắc ký



Hình 2. Sắc ký đồ mẫu kiểm tra sự tương thích của hệ thống sắc ký



Hình 3. Sắc ký đồ các mẫu: mẫu trắng a); mẫu thêm chuẩn RAC.HCl nồng độ ở LLOQ: b)

Như vậy, độ lệch về thời gian lưu của RAC.HCl là 0,81 % (< 2%), của diện tích pic là 1,69% (< 5%) đều đạt yêu cầu, phương pháp là phù hợp với hệ thống sắc ký đã chọn.

Độ chọn lọc và giới hạn định lượng dưới (LLOQ)

Phân tích các mẫu trắng với ít nhất 6 mẫu có nguồn gốc khác nhau, đồng thời với mẫu tự tạo có pha chuẩn RAC.HCl ở nồng độ LLOQ (≈ 48 ng/ml). Kết quả được trình bày ở Bảng 3 và Hình 3.

Kết quả cho thấy: Trên sắc ký đồ, pic của RAC.HCl được nhận diện rõ ràng, tách hoàn toàn khỏi pic tạp chất có trong mẫu. Tại thời điểm 0,51 phút (trùng với thời gian lưu của RAC.HCl): Tỷ lệ đáp ứng của mẫu trắng so với mẫu có hoạt chất tại nồng độ 48 ng/ml đều nhỏ hơn 20%, đạt yêu cầu. Phương pháp đạt yêu cầu về độ chọn lọc, đặc hiệu. Giá trị 48 ng/ml là giới hạn định lượng dưới của phương pháp (Độ đúng và độ lặp lại tại nồng độ này là 12,42% (<20%), đạt yêu cầu phương pháp phân tích trong dịch sinh học [6], [9].

Số TT	Đáp ứng mẫu trắng	Mẫu thêm chuẩn (48 ng/ml)			Tỷ lệ đáp ứng mẫu trắng/mẫu thêm chuẩn
		Đáp ứng pic	Nồng độ tìm thấy	Độ đúng (%)	
1	0,019	199,672	38,15	80,3	0,01
2	0,604	204,565	45,89	96,6	0,29
3	1,315	199,803	38,35	80,7	0,66
4	0,032	204,547	45,87	96,5	0,02
5	0,035	208,904	52,8	111,1	0,01
6	0,163	203,302	43,89	96,5	0,08
\bar{X}		203,466	44,15	93,6	
CV (%)		1,69	12,42	12,41	
Kết luận		Đạt	Đạt	Đạt	Đạt (<20%)

Bảng 3. Kết quả xác định độ chọn lọc và giới hạn định lượng dưới (LLOQ)

Đường chuẩn và khoảng tuyến tính

Phân tích các mẫu chuẩn RAC.HCl có nồng độ 47,5; 95; 190; 475; 950; 1900; 4750; 9500 ng/ml trong mẫu thịt gà theo quy trình đã xây dựng. Xác định sự tương quan giữa nồng độ RAC.HCl trong dịch chiết và đáp ứng đo được bằng phương pháp hồi quy tuyến tính. Kết quả được trình bày trong Bảng 4 và Hình 4.

Từ bảng 4 ta thấy, tỷ lệ diện tích pic và nồng độ RAC.HCl phụ thuộc tuyến tính chặt chẽ với hệ số tương quan cao, $R^2 = 0,9975$. Nồng độ RAC.HCl tính lại theo đường chuẩn so với lý thuyết nằm trong khoảng 92,7-114,8 %, đều nằm trong khoảng giới hạn cho

phép là 85-115 % và 80-120 % đối với điểm LLOQ. Duy nhất tại điểm nồng độ S6 là nằm ngoài khoảng 85-115 % (116,1 %) nhưng vẫn trong yêu cầu cho phép (75 % số điểm nằm trong khoảng tuyến tính). Khoảng nồng độ 47,5 ng/ml-9500 ng/ml là khá rộng, đảm bảo phương pháp có độ tin cậy khi định lượng RAC.HCl ở nhiều mức nồng độ khác nhau, đáp ứng quy định của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học [6], [9].

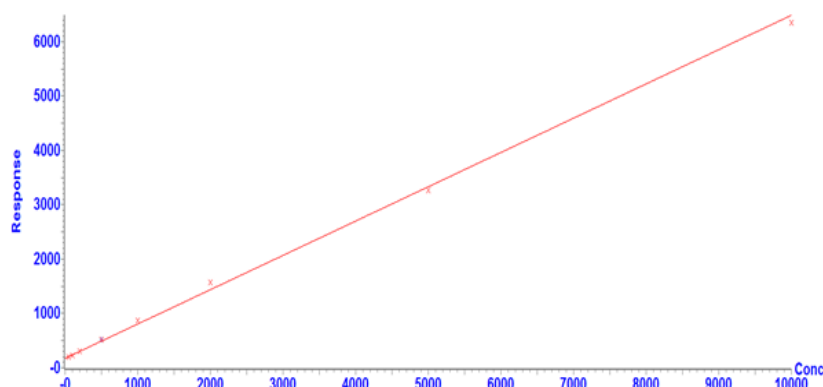
Độ đúng và độ chính xác của phương pháp

Thẩm định độ đúng và độ lặp lại trên 4 loại mẫu: LLOQ, LQC, MQC và HQC chứa RAC.HCl có nồng độ tương ứng là 50 ng/ml; 150 ng/ml; 750 ng/ml và 7500 ng/ml. Kết

Tên mẫu	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
Nồng độ thực (ng/mL)	47,5	95	190	475	950	1900	4750	9500
Đáp ứng pic	203,395	229,234	308,190	512,760	864,366	1568,774	3267,401	6350,792
Phương trình hồi quy	$Y = 0,631256 X + 175,592; R^2 = 0,9975$							
Nồng độ xác định từ đường chuẩn	44,05	89,45	210,05	534,12	1091,11	2207,00	4897,87	9782,40
Nồng độ xác định từ đường chuẩn so với giá trị thực (%)	92,7	109,7	110,5	112,4	114,8	116,1	103,1	102,9

Bảng 4. Sự tương quan giữa nồng độ và diện tích pic RAC.HCl trong mẫu thịt gà

Compound name: ractopamin
 Correlation coefficient: $r = 0.998780$, $r^2 = 0.997561$
 Calibration curve: $0.631256 \cdot x + 175.592$
 Response type: External Std, Area
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



Hình 4. Đường chuẩn của Ractopamin hydroclorid

quả được trình bày ở Bảng 5.

Kết quả khảo sát ở Bảng 5 cho thấy: Phương pháp định lượng ở mức nồng độ LLOQ có độ đúng trong ngày (từ 80,1-111,1 %) và khác ngày (từ 80,1-115,4 %), là trong khoảng cho phép 80-120 %. Ở 3 mức nồng độ còn lại (từ 85,0-113,2 %) nằm trong giới hạn

cho phép 85-115 %. Độ chính xác có giá trị CV % từ 9,25-13,86 % (đạt yêu cầu < 15%). Như vậy, độ đúng, độ chính xác trong ngày và khác ngày phù hợp với phương pháp phân tích trong mẫu thịt gà (dịch sinh học) [6], [9].

Ảnh hưởng của nền mẫu

Ngày	Mẫu	LLOQ (50 ng/mL)		LQC (150 ng/mL)		MQC (750 ng/mL)		HQC (7500 ng/mL)	
		Nồng độ ^(a) (ng/mL)	Độ đúng ^(b) (%)	Nồng độ ^(a) (ng/mL)	Độ đúng ^(b) (%)	Nồng độ ^(a) (ng/mL)	Độ đúng ^(b) (%)	Nồng độ ^(a) (ng/mL)	Độ đúng ^(b) (%)
I	1	38,14	80,3	123,13	86,4	605,7	85,1	7864,91	110,4
	2	45,89	96,6	133,20	93,4	750,6	105,3	7209,00	101,1
	3	37,97	80,1	142,67	100,1	632,7	88,9	6056,31	85,0
	4	45,88	96,6	159,90	112,2	818,56	114,8	8009,72	112,4
	5	52,77	111,1	151,67	106,4	714,32	100,2	6219,23	87,3
II	1	44,41	93,5	125,09	87,7	713,92	100,2	7046,63	98,9
	2	40,37	85,0	126,76	88,9	654,07	91,8	7609,50	106,8
	3	54,29	114,3	148,68	88,5	607,76	85,3	7987,12	112,1
	4	47,40	99,8	159,87	112,2	672,60	94,9	7174,87	100,7
	5	52,53	110,6	136,94	96,1	806,55	113,2	8065,51	113,2
III	1	38,61	81,3	124,38	87,3	688,98	96,7	7481,05	105,0
	2	44,98	94,7	145,52	102,1	652,65	91,6	7146,37	100,3
	3	56,71	115,4	125,81	88,2	681,15	95,6	7659,37	107,5
	4	55,05	115,3	146,94	103,1	788,73	110,7	7310,25	102,6
	5	42,37	89,2	132,23	91,0	665,95	93,6	6426,75	90,2
\bar{X}		46,49	97,8	138,85	96,2	696,95	97,8	7284,44	101,8
CV (%)		13,86	13,84	9,25	9,50	9,75	9,70	8,77	8,81

Bảng 5. Kết quả khảo sát độ đúng, độ lặp lại trong ngày và khác ngày
 (a): tính từ phương trình hồi qui; (b): % so với nồng độ thực.

STT	Đáp ứng mẫu LQC (150 ng/mL)		Đáp ứng mẫu HQC (7500 ng/mL)		MF	
	Dung môi	Nền mẫu	Dung môi	Nền mẫu	LQC	HQC
1	869,519	713,006	11540,633	10963,602	0,82	0,95
2	750,725	600,580	12249,135	11391,696	0,80	0,93
3	755,701	597,004	11091,993	10648,314	0,79	0,96
4	848,042	712,356	12654,029	11515,167	0,84	0,91
5	772,353	625,606	13046,069	12263,305	0,81	0,94
6	759,805	607,844	13702,376	12058,091	0,80	0,88
TB	792,691	642,899	12380,705	11473,362	0,81	0,92
CV (%)	6,57	8,56	7,78	5,39	2,20	3,15

Bảng 6. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của nền mẫu

Độ ổn định	Mẫu	Nồng độ ban đầu (ng/ml; n = 6)		Nồng độ sau bảo quản (ng/ml; n = 6)		Độ lệch (%)
		Nồng độ TB	CV (%)	Nồng độ TB	CV (%)	
Sau 3 chu kỳ đông - rã	LQC	147,6	7,1	159,9	7,6	8,3
	HQC	7234,0	6,7	7594,8	4,9	5
Ở nhiệt độ phòng trong thời gian ngắn (6 giờ)	LQC	147,6	7,1	153,8	6,1	4,2
	HQC	7234,0	6,7	7505,3	6,0	3,7
Độ ổn định trong autosampler (24 giờ, 20°C)	LQC	147,6	7,1	150,0	6,0	2,7
	HQC	7234,0	1,6	7210,2	6,7	-0,3
Độ ổn định dài ngày (-35°C ± 5 °C, 30 ngày)	LQC	147,6	7,1	157,8	8,4	6,9
	HQC	7234,0	6,7	7529,4	5,1	4,1

Bảng 7. Kết quả độ ổn định của RAC.HCl trong mẫu thịt gà

Chuẩn bị các mẫu và tiến hành như quy trình đã nêu, kết quả đánh giá sự ảnh hưởng của nền mẫu được trình bày ở Bảng 6 (trong đó MF là hệ số ảnh hưởng của nền mẫu).

Ta thấy, các giá trị CV (%) của MF ở cả mẫu LQC là 2,2 % và HQC là 3,15 %, đều đạt yêu cầu ≤ 15%.

Độ ổn định của RAC.HCl trong mẫu thịt gà

Nghiên cứu độ ổn định của RAC.HCl trong mẫu thịt gà trên các lô LQC (150 ng/ml) và HQC (7500 ng/ml). Đánh giá độ ổn định của RAC.HCl bằng cách so sánh nồng độ RAC.HCl có trong các mẫu được bảo quản và các mẫu có nồng độ tương ứng được phân tích ngay sau khi hòa tan chuẩn RAC.HCl vào dịch chiết từ thịt gà. Kết quả được

trình bày ở Bảng 7.

Từ kết quả của bảng trên ta thấy: Độ lệch % của nồng độ mẫu thịt gà so với ban đầu sau 3 chu kì đông - rã ở 2 mức nồng độ LQC và HQC với độ lệch lần lượt là 8,3 và 5 % đều < 15 %. Độ chính xác CV % dao động từ 4,9-7,6 % đều < 15 %.

- Độ ổn định của mẫu thịt gà ở nhiệt độ phòng: độ lệch (%) nồng độ của mẫu thịt gà ở nồng độ LQC và HQC lần lượt là 4,2 % và 3,7 % đều < 15 % và giá trị CV % giữa các lần định lượng đều < 15 %. Độ ổn định của mẫu sau xử lý (auto sampler): Độ lệch nồng độ của mẫu thịt gà sau xử lý sau 24h xử lý ở 2 mức nồng độ LQC và HQC lần lượt là 1,6 và - 0,3 % đều < 15 %, đạt. Và độ chính xác CV % của các lần đo đều < 15 %.

- Độ lệch % của nồng độ mẫu thịt gà so với ban đầu sau thời gian bảo quản dài ngày (30 ngày) ở 2 mức nồng độ LQC và HQC là 6,9% và 4,1%, đều < 15 %.

4. Kết luận

Qua khảo sát nghiên cứu, một quy trình phân tích xác định dư lượng Ractopamin hydroclorid trong thịt gà bằng phương pháp LC-MS/MS đã được thiết lập với kỹ thuật chiết pha rắn và các điều kiện sắc ký và khối phổ phù hợp. Kết quả thẩm định cho thấy, phương pháp có độ đặc hiệu cao, có giới hạn định lượng dưới nhỏ (LLOQ = 48 ng/ml), khoảng tuyến tính khá rộng (48 ng/ml

đến 7500 ng/ml), có độ đúng cao (từ 80,1-115,4%) và độ lặp lại tốt với giá trị CV% nhỏ (9,25 đến 13,86%), thời gian phân tích sắc ký nhanh (3 phút cho 1 lần tiêm mẫu), chất phân tích ổn định trong nền mẫu thịt gà với một thời gian dài (30 ngày). Phương pháp đưa ra đã đáp ứng các yêu cầu của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học của EMA và US-FDA [6], [9]. Chúng tôi hy vọng phương pháp này có thể áp dụng để định lượng Ractopamin hydroclorid trong các mẫu để xem xét sự nhiễm chất cấm này trong các chế phẩm từ thịt gà.

Tài liệu tham khảo

- [1]. Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, *Quyết định số 54/2002/QĐ-BNN, ngày 20 tháng 6 năm 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.*
- [2]. Nguyễn Xuân Dương (2018), *Nghiên cứu kiểm soát chất cấm nhóm Beta-agonists (Clenbuterol, Salbutamol, Ractopamin) trong chăn nuôi lợn.*
- [3]. American academy of allergy, *Asthma and Immunology.*
- [4]. B.Lin (2012), *Immunoaffinity chromatography purification and ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination of four β -agonists in beef.*
- [5]. E.A. Zvereva (2017), *Highly Sensitive Immunochromatographic Assay for Qualitative and Quantitative Control of Beta-Agonist Ractopamine in Foods.*
- [6]. European Medicines Agency, Committee for Medicinal Product for Human Use (2011), *Guideline on Bioanalytical Method Validation.*
- [7]. In Kyung Sung (2015), *Development and Application of a Method for Rapid and Simultaneous Determination of Three β -agonists (Clenbuterol, Ractopamine, and Zilpaterol) using Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry.*
- [8]. Kunping Yan (2016), *Rapid screening of toxic salbutamol, ractopamin and clenbuterol in pork sample high-performance liquid chromatography-UV method.*
- [9]. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration (2013), *Guideline for Industry- Bioanalytical Method Validation.*