

# ĐỊNH LƯỢNG ACEPROMAZINE VÀ ATROPINE TRONG THỊT LỢN BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG GHEP KHỐI PHỔ UPLC-MS/MS

Hoàng Ngọc Vinh, Nguyễn Thành Duy, Lý Tuấn Kiệt, Nguyễn Quốc Hùng, Chu Văn Hải.

*Trung tâm Dịch vụ Phân tích Thí nghiệm TP.HCM- 2 Nguyễn Văn Thủ-Q.1-TP.HCM*

## TÓM TẮT

Vấn đề sử dụng phụ gia không được phép trong chế biến thực phẩm ngày càng diễn biến phức tạp tại Việt Nam. Dược phẩm chứa hai hoạt chất chính acepromazine và atropine đã được phát hiện sử dụng trái phép trong quá trình giết mổ lợn. Phương pháp phân tích dư lượng các hợp chất này trong thịt lợn đã được phát triển dựa trên kỹ thuật sắc ký lỏng ghép khối (UPLC-MS/MS). Kỹ thuật QuEChERS cũng đã được áp dụng cho quá trình tách chiết và tinh sạch. Hiệu suất thu hồi ở nồng độ 10 ppb đối với acepromazine là 86,0 – 99,1 % (với độ lệch chuẩn  $RSD_R$  là 3,95 %) và atropine là 81,0 – 103,8 % (với độ lệch chuẩn  $RSD_R$  là 7,92 %). Giới hạn phát hiện của phương pháp (MDL) là 1 ppb cho cả acepromazine và atropine.

**Từ khóa:** acepromazine, atropine, FTIR, LCMS, UPLC-MS/MS, QuEChERS.

## 1. MỞ ĐẦU

Để đáp ứng thị hiếu người tiêu dùng mà người bán hàng đã sử dụng mọi cách thức, thủ đoạn trong chế biến thực phẩm: sulfite được sử dụng ngâm rau chuối bào, khoai môn, xà bào để sản phẩm không bị thâm, sậm màu. Nhuộm màu gia cầm, cải chua, măng bằng phẩm màu vàng auramine O –hợp chất có khả năng gây ung thư. Tạo độ sệt và màu trắng vệt bắc thảo bằng hỗn hợp đất sét và oxit chì. Biện củ khoai mì thành “đông dượng” củ khoai sơn bằng cách xông khói lưu huỳnh. Sử dụng thuốc ngủ cho con trùn, cua...để tránh sụt giảm trọng lượng trong quá trình vận chuyển. Gần đây, dược phẩm chứa hoạt chất acepromazine và atropine được phát hiện sử dụng trong quá trình giết mổ lợn. Các hợp chất này có thể gây tình trạng giãn nở mạch máu, hạ huyết áp, hô hấp chậm, rối loạn giấc ngủ v.v.

Việc định danh hóa chất ban đầu là rất cần thiết, và phụ thuộc nhiều vào kỹ thuật phân tích được lựa chọn. Một số phương pháp định danh hiệu quả có thể kể đến như phổ hồng ngoại (FTIR), phổ nhiễu xạ tia X (XRD), GCMS, LCMS...[1].

Nhiều tài liệu đã công bố phương pháp phân tích các hợp chất acepromazine và atropine chủ yếu bằng phương pháp LC-MS/MS. Với giai đoạn tách chiết và tinh sạch sử dụng kỹ thuật sử dụng dung môi và làm khô, hay kết hợp với SPE [2,3,4,5]. Hiện nay, thế giới vẫn chưa có công bố chung nào về giới hạn cho phép dư lượng acepromazine và atropine trong thịt, thận và gan lợn [6,7]. Tuy nhiên, tại Hà Lan thì nồng độ acepromazine trong thận lợn được chấp nhận là dưới 50 ppb [8].

Nội dung bài xoay vào một số kết quả định danh, định lượng acepromazine và atropine. Xây dựng quy trình phân tích dư lượng các hợp chất này trong thịt lợn dựa trên kỹ thuật UPLC-MS/MS, kết hợp kỹ thuật tách chiết và tinh sạch mẫu QuEChERS.

## 2. THỰC NGHIỆM

### 2.1 Hóa chất và nguyên liệu

Chất chuẩn acepromazine maleate  $\geq 98.3$  % của Sigma-Aldrich và atropine sulfate monohydrate  $\geq 99.0$  % của Merck. Dung môi acetonitrile (ACN) loại HPLC Grade của hãng Merck, nước cất loại ion bằng hệ thống Milipore-RX System,  $MgSO_4$  khan, NaCl loại dùng trong phân tích. Ống làm tin sạch mẫu d-SPE PSA/C18 của CNW technologies.

### 2.2 Dung dịch chuẩn

Dung dịch chuẩn gốc nồng độ  $\geq 100$  ppm (mg/L) chuẩn bị từ chuẩn acepromazine maleate và atropine sulfate được pha trong dung môi acetonitrile. Dung dịch chuẩn gốc được lưu ở  $t^\circ < -18$  °C. Chuẩn hỗn hợp trung gian được pha từ dung dịch chuẩn gốc trong acetonitrile. Dây nồng độ hỗn hợp acepromazine và atropine được pha từ chuẩn trung gian có nồng độ khảo sát nằm trong khoảng 0,1 – 2,0 ppb ( $\mu\text{g/L}$ ).

### 2.3 Chuẩn bị mẫu với kỹ thuật QuEChERS

Mẫu được xay đồng nhất, cân chính xác khoảng 2 g cho vào ống ly tâm. Thêm 2 ml H<sub>2</sub>O để thấm ướt mẫu, đánh vortex. Thêm 5 ml ACN, đánh vortex, đánh siêu âm 15 phút. Thêm 0,8 g muối MgSO<sub>4</sub> + 0,2 g muối NaCl, đánh vortex 5 phút, ly tâm (9000 vòng/phút, 10 phút, 20 °C). Sau đó, rút 1 mL lớp trên cho vào ống làm sạch d-SPE PSA/C18 (150 mg MgSO<sub>4</sub>, 50 mg C18, 50 mg PSA). Đánh vortex, ly tâm, rút 200 µL cho vào vial chứa sẵn 200 µL nước, đánh vortex rồi cho qua siêu lọc, tiêm vào máy LC/MS.

## 2.4 Phổ hồng ngoại biến đổi Fourier với bộ ATR (FTIR-ATR)

Phổ FTIR được ghi ở nhiệt độ thường trên máy hồng ngoại Thermo iS50. Độ phân giải phổ là 0,4 cm<sup>-1</sup>, độ rộng phổ từ 4000 – 600 cm<sup>-1</sup>. Bộ ATR với tinh thể kim cương/ZnSe (32 scan).

## 2.5 Máy sắc ký lỏng ghép khối phổ UPLC-MS/MS

Thiết bị sử dụng là hệ UPLC Ultimate 3000 và đầu dò khối phổ TSQ Endura Triplequad của hãng Thermo Scientific kết hợp với cột phân tích sắc ký pha đảo (100 x 2,1 mm, 2,6 µm) Accucore aQ C18 và cột bảo vệ. Tốc độ dòng: 0,4 ml/phút; nhiệt độ cột: 40 °C; nhiệt độ bộ tiêm mẫu tự động là 20 °C, chương trình gradient của H<sub>2</sub>O (0,1 % axit formic) và ACN (100 %); thể tích tiêm mẫu: 1 µL.

Các thông số SRM khảo sát cho hai hợp chất được liệt kê trong bảng 1.

Bảng 1: Các thông số khối phổ ở chế độ SRM

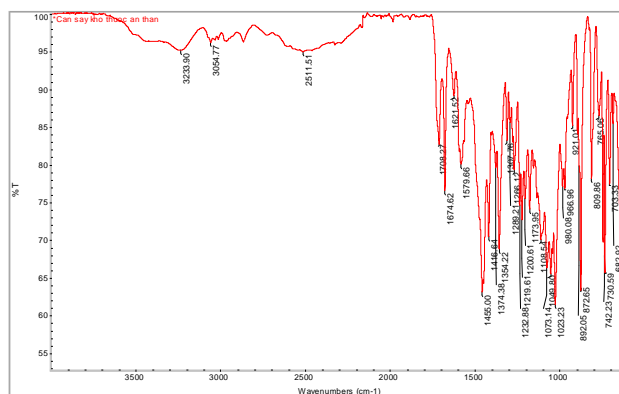
SRM Table							
Compound	Retention Time (min)	RT Window (min)	Polarity	Precursor (m/z)	Product (m/z)	Collision Energy (V)	RF Lens (V)
ATROPINE	6	12	Positive	290.2	77.2	48.4	135
ATROPINE	6	12	Positive	290.2	93.2	29.9	135
ATROPINE	6	12	Positive	290.2	124.2	23.3	135
ACEPROMAZINE	6	12	Positive	327.2	58.3	30.9	130
ACEPROMAZINE	6	12	Positive	327.2	86.3	19.8	130
ACEPROMAZINE	6	12	Positive	327.2	222.1	37.4	130

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

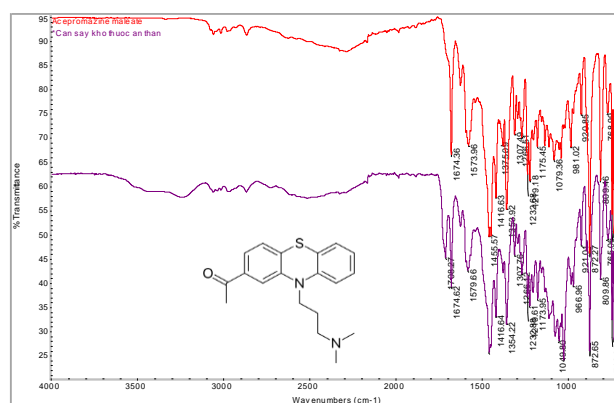
### 3.1 Định danh thuốc an thần bằng Phổ FTIR

Mẫu là dung dịch thuốc tiêm, được sấy khô ở nhiệt độ 105 °C cho đến khối lượng không đổi. Hình 1 giới thiệu Phổ FTIR của phần mẫu còn lại sau sấy. Kết quả tìm kiếm trực tiếp với thư viện Phổ FTIR cho thấy mẫu có chứa acepromazine maleate với các mũi đặc trưng: 1674, 1574, 1456, 872, 742 cm<sup>-1</sup>

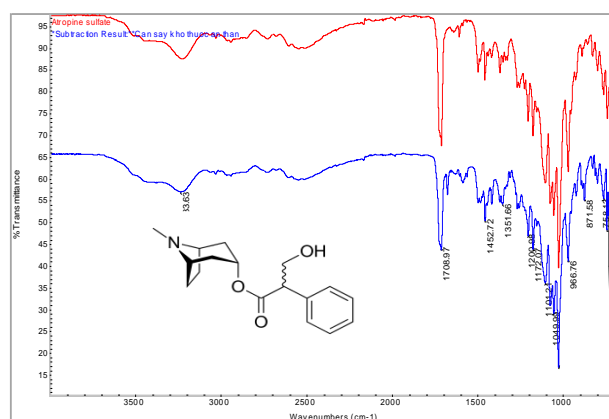
(hình 2). Tuy nhiên, có một mũi hấp thụ mạnh tại 1708 cm<sup>-1</sup> lại không thuộc về hợp chất trên. Dùng kỹ thuật trừ phổ từ phần mềm OMNIC, lấy Phổ FTIR của phần sau sấy, trừ đi Phổ FTIR của acepromazine maleate. Hình 3 là Phổ FTIR sau trừ phổ cho thấy các mũi hấp thụ đều trùng khớp với hợp chất atropine sulfate.



Hình 1: Phổ FTIR của thuốc an thần sau khi sấy khô.



Hình 2: Phổ FTIR của phần sấy khô của thuốc an thần (dưới) và Phổ FTIR của acepromazine maleate (trên).



Hình 3: Phổ FTIR sau khi trừ Phổ FTIR của chuẩn acepromazine maleate (dưới) và Phổ FTIR của atropine sulfate (trên).

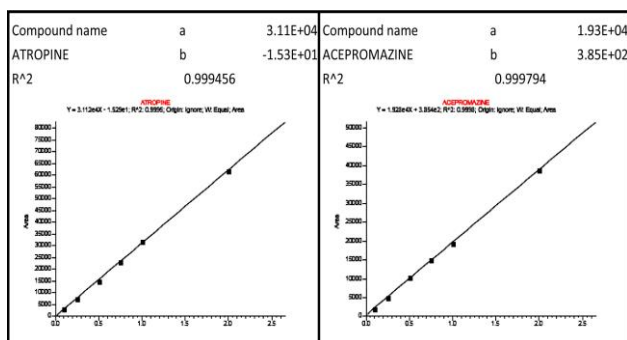
### 3.2 Định lượng đồng thời acepromazine và atropine trên nền thịt lợn bằng UPLC-MS/MS

#### 3.2.1 Xây dựng đường chuẩn của acepromazine và atropine

Đường chuẩn được xây dựng dựa vào các điểm có nồng độ nằm trong khoảng 0,1 – 2,0 ppb. Các dữ liệu cụ thể của đường chuẩn được tóm tắt trong bảng 2. Hình 4 thể hiện hai đường chuẩn tuyến tính của acepromazine và atropine. Hệ số tuyến tính đạt được rất cao và phù hợp cho phương pháp định lượng dư lượng vết,  $R^2 > 0,999$  cho cả hai hợp chất.

Bảng 2: Bảng dữ liệu của đường chuẩn acepromazine và atropine

Hợp chất	Nồng độ (ppb)	Thời gian lưu (phút)	Ion định tính m/z	Ion xác nhận m/z	Hàm lượng
Acepromazine	0,1	4,93	86,3	58,3	0,09
	0,25				0,25
	0,5				0,52
	0,75				0,76
	1,0				0,99
	2,0				2,00
Atropine	0,1	3,42	124,2	93,2	0,11
	0,25				0,24
	0,5				0,49
	0,75				0,75
	1,0				1,03
	2,0				1,99



Hình 4: Đường chuẩn Atropine và đường chuẩn Acepromazine

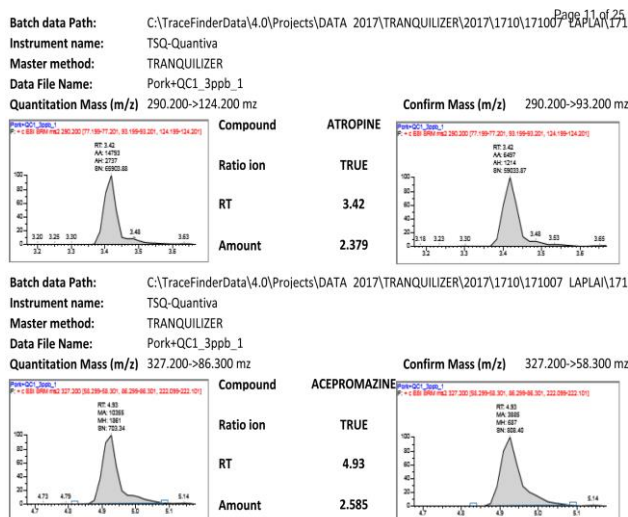
#### 3.2.2 Hiệu suất thu hồi

Chọn mẫu trắng thịt lợn là loại đã được phân tích theo quy trình mà không phát hiện thấy hai hợp chất cần định lượng. Hiệu suất thu hồi được xác định bằng cách thêm chuẩn ở các nồng độ 3,0 ppb, 5 ppb và 10 ppb vào mẫu trắng này, mỗi nồng độ lặp lại 7 lần (n=7). Giá trị hiệu suất thu hồi của phương pháp định lượng acepromazine và atropine được ghi

nhận trong bảng 3. Sắc ký đồ của mẫu thêm chuẩn ở nồng độ 3 ppb như trình bày trong hình 5.

Bảng 3: Hiệu suất thu hồi, độ lặp lại và độ tái lặp của phương pháp

Hợp chất	Nồng độ (ppb)	Hiệu suất thu hồi (%)	Độ lặp lại RSD <sub>r</sub> % (n=7)	Độ tái lặp RSD <sub>R</sub> % (n=14)
Acepromazine	3,0	86,2 – 102,7	6,36	5,98
	5,0	84,2 – 103,7	6,90	4,91
	10,0	86,0 – 99,1	3,72	3,95
Atropine	3,0	75,1 – 94,3	3,61	7,28
	5,0	75,3 – 104,9	10,18	10,34
	10,0	81,0 – 103,8	5,29	7,92



Hình 5: Sắc ký đồ chuẩn mẫu thêm chuẩn Acepromazine và Atropine ở nồng độ 3 ppb.

#### 3.2.3 Độ lặp lại và độ tái lặp

Độ lặp lại của phương pháp được thể hiện thông qua độ lệch chuẩn của 7 lần lặp lại (RSD<sub>r</sub>). Độ tái lặp nội bộ được đánh giá thông qua độ lệch chuẩn tái lặp (RSD<sub>R</sub>) của các kết quả nghiên cứu ở 2 ngày, với 2 kiểm nghiệm viên khác nhau. Kết quả được trình bày trong bảng 3. Kết quả đạt được về hiệu suất thu hồi, độ lặp lại và độ tái lặp cho thấy phù hợp với quy định của Châu Âu và AOAC đối với các phương pháp định lượng các chất dạng vết.

### 3.2.4 Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của phương pháp

Giới hạn phát hiện của phương pháp (MDL) và giới hạn định lượng của phương pháp (MQL) được xác định là hàm lượng chất phân tích thấp nhất có trong mẫu mà phương pháp có thể phát hiện và định lượng được. Trong trường hợp này cả hai hợp chất acepromazine và atropine đều được tiêm trên nền mẫu với nồng độ là 1 ppb.

Giới hạn phát hiện (MDL) được tính dựa vào công thức (1):

$$MDL = 3 \times SD \quad (1)$$

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (xi - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (2)$$

Với SD: Độ lệch chuẩn của 10 mẫu thêm chuẩn ở nồng độ thấp nhất (1 ppb).

xi: Nồng độ của 10 mẫu thêm chuẩn

$\bar{x}$ : nồng độ trung bình của 10 mẫu thêm chuẩn

Giới hạn định lượng của phương pháp (MQL) được tính dựa vào công thức (3):

$$MQL = 10 \times SD \quad (3)$$

Bảng 4 cho thấy giới hạn phát hiện lý thuyết (MDL) tương đối thấp là 0,24 và 0,15 ppb, lần lượt đối với acepromazine và atropine. Tuy nhiên, chúng tôi chọn MDL = 1 ppb làm ngưỡng phát hiện của phương pháp vì thỏa yêu cầu về độ lặp lại, và thấp hơn ngưỡng yêu cầu để kiểm soát chất cấm là 10 ppb.

*Bảng 4:* Hiệu suất thu hồi, độ lệch chuẩn, MDL, MQL (lý thuyết) của phương pháp

Hợp chất	Nồng độ tiêm (ppb)	SD	MDL	MQL
Acepromazine	1	0,07878	0,236	0,788
Atropine	1	0,04920	0,148	0,492

## 4. KẾT LUẬN

Phương pháp định lượng acepromazine và atropine trong thịt bằng kỹ thuật UPLC/MS/MS kết hợp với việc xử lý mẫu bằng kỹ thuật QuEChERS đạt được độ nhạy, độ chọn lọc và độ chính xác cao, phù hợp theo các tiêu chuẩn đối với việc kiểm soát chất cấm, dư lượng các chất hạn chế sử dụng.

Sự kết hợp hài hòa giữa các phương pháp định danh và định lượng sẽ giúp cho việc kiểm soát an toàn phụ gia thực phẩm đạt hiệu quả cao hơn.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. N. Q. Hùng, V. H. Thái, L. T. Hòa, V. H. Giang, C. V. Hải, Ứng dụng các kỹ thuật phân tích hiện đại trong định danh thành phần để kiểm soát an toàn thực phẩm, Hội thảo “chất lượng, tính xác thực và truy xuất nguồn gốc thực phẩm”, Đại học Khoa học Tự nhiên Đại học Quốc gia TP HCM, 2018.
2. G. Choudhary, W. Skinner, S. Stanley, Determination of Acepromazine and its Major Metabolite in Equine Serum by LC-MS/MS using the Finnigan LCQ Deca XP Plus Ion Trap Mass Spectrometer, Application Note: 318, 8-03 / AR318-1406.
3. T. Anumol, J.M. Stevens, J. Weigenbaum, analysis of veterinary drugs in meat with the agilent 6495 Triple quadruple LC/MS, Agilent technologies application note, publication number 5991-7895EN (2017).
4. P. Delahaut, P.-Y. Brasseur und M. Dubois, Multiresidue method for the detection of tranquillisers, xylazine, and a beta-blocker in animal production by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, Journal of Chromatography A, 2004, 373-378.
5. K. Mitrowska, A. Posyniak und J. Zmudzki, Rapid method for the determination of tranquilizers and a beta-blocker in porcine and bovine kidney by liquid chromatography with tandem mass spectrometry, Analytica Chimica Acta 637, 2009, 185-192.
6. The committee for veterinary medicinal products.
7. Commission regulation (EU) No 37/2010.
8. CRL Guidance paper (7 December 2007).

Tác giả: Nguyễn Quốc Hùng

Trung tâm Dịch vụ Phân tích Thí Nghiệm TP HCM

2 Nguyễn Văn Thủ, Đakao, quận I, TP HCM  
[Hungnq@case.vn](mailto:Hungnq@case.vn)

Điện thoại: (028) 39103256