

# 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

Nguyễn Thị Hà<sup>1</sup>, Nguyễn Văn Lượng<sup>1</sup>, Đỗ Khắc Hải<sup>2</sup>,  
Lê Thị Quỳnh<sup>1</sup>, Nguyễn Kiều Hưng<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN, 334 Nguyễn Trãi, Hà Nội, Việt Nam

<sup>2</sup>Cục Cảnh sát Phòng, chống Tội phạm về Môi trường, Bộ Công an

Nhận ngày 25 tháng 3 năm 2016

Chỉnh sửa ngày 28 tháng 4 năm 2016; Chấp nhận đăng ngày 12 tháng 9 năm 2016

**Tóm tắt:** Bài báo này giới thiệu phương pháp xác định đồng thời salbutamol, ractopamine và clenbuterol sử dụng thiết bị sắc ký lỏng siêu hiệu năng khối phổ hai lần (UPLC/MS/MS) đạt độ nhạy và độ chọn lọc cao, quy trình chiết mẫu đơn giản, thời gian phân tích nhanh. Mẫu được chiết bằng dung dịch đệm  $K_2HPO_4$ , làm sạch mẫu qua cột pha rắn SCX rồi định lượng trên UPLC/MS/MS. Kháng định chất nghiên cứu bằng 4 ion đặc trưng, phương pháp đã được phê duyệt theo quyết định 657/2002/EC của Cộng đồng chung Châu Âu, đáp ứng yêu cầu của Thông tư 01/2016/TT-BNNPTNT ngày 15/02/2016 của Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn quy định về kiểm tra, giám sát và xử lý vi phạm các chất cấm thuộc nhóm Beta-agonist trong chăn nuôi.

**Từ khóa:** Salbutamol, ractopamine, clenbuterol; UPLC/MS/MS; TACN.

## 1. Đặt vấn đề

Trong thời gian qua, tình trạng vi phạm pháp luật trong sản xuất, kinh doanh, lạm dụng kháng sinh, sử dụng chất cấm trong chăn nuôi gia súc, gia cầm diễn biến rất phức tạp, có chiều hướng gia tăng diện rộng ở các địa phương, đang là vấn đề nan giải thách thức cơ quan quản lý. Đặc biệt, việc sử dụng các chất cấm nhóm beta - agonist (salbutamol, clenbuterol, ractopamine) đang gây bức xúc dư luận, được người dân, các cơ quan quản lý, phương tiện

truyền thông rất quan tâm. Đây là những chất chỉ được dùng để chữa bệnh cho con người, cấm sử dụng trong thực phẩm. Mặc dù bị cấm như vậy nhưng vẫn được người dân sử dụng khá rộng rãi tại Việt Nam, dưới dạng pha trực tiếp vào thức ăn cho gia súc hoặc được trộn lẫn với thực phẩm chế biến. Khi ăn các thực phẩm có các chất này, có thể bị chóng mặt, ù tai, nhịp tim nhanh, mệt mỏi, về lâu dài có nguy cơ mắc bệnh ung thư, ảnh hưởng tới nòi giống, gây hệ lụy nặng nề cho tương lai sau này.

Việc nghiên cứu xây dựng phương pháp xác định nhóm beta-agonist trong thức ăn chăn nuôi đã được nhiều tác giả thực hiện [1-4]. Mỗi phương pháp nghiên cứu mà các tác giả đưa ra

\* Tác giả liên hệ. ĐT.: 84-904271277  
Email: hungnk@vnu.edu.vn

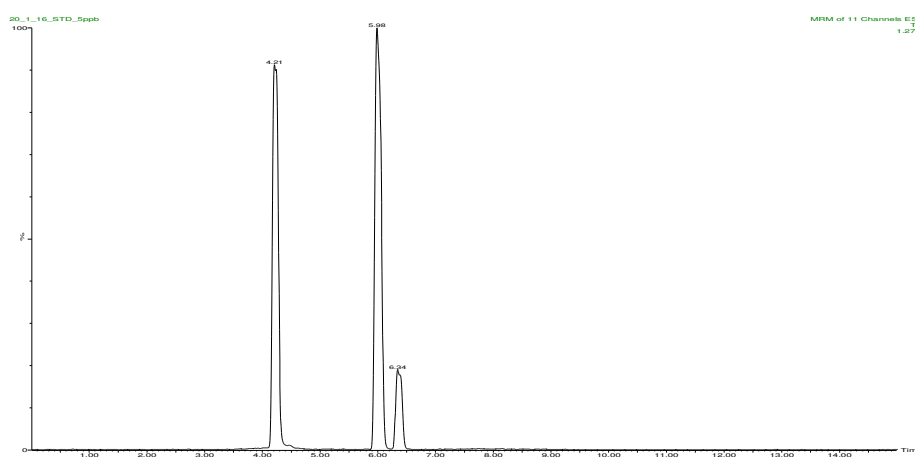
dựa trên những kỹ thuật khác nhau. Bài báo này giới thiệu phương pháp xác định đồng thời salbutamol, ractopamine và clenbuterol sử dụng thiết bị sắc ký lỏng siêu hiệu năng khối phổ hai lần (UPLC/MS/MS) đạt độ nhạy và độ chọn lọc cao, quy trình chiết mẫu đơn giản, thời gian phân tích nhanh. Mẫu được chiết bằng dung dịch đệm  $K_2HPO_4$ , làm sạch mẫu qua cột pha rắn SCX rồi định lượng trên UPLC/MS/MS. Kháng định chất nghiên cứu bằng 4 ion đặc trưng, phương pháp đã được phê duyệt theo quyết định 657/2002/EC của Cộng đồng chung Châu Âu [5], đáp ứng yêu cầu của Thông tư 01/2016/TT-BNNPTNT ngày 15/02/2016 của Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn quy định về kiểm tra, giám sát và xử lý vi phạm các chất cấm thuộc nhóm Beta-agonist trong chăn nuôi.

## 2. Thực nghiệm

**2.1. Hoá chất:** Acetonitril, metanol (MeOH),  $K_2HPO_4$ , fomic acid loại dùng cho HPLC (Merck, Đức);  $NH_4OH$  loại dùng cho phân tích (Trung Quốc); Nước tinh khiết dùng cho HPLC (Merck, Đức); Chuẩn salbutamol sulfate 99% (Dr.Ehrenstorfer GmbH, Đức); ractopamine hydrochloride 99,8% (Dr.Ehrenstorfer GmbH, Đức); Clenbuterol hydrochloride 99,8% (Dr.Ehrenstorfer GmbH, Đức). Dung dịch

chuẩn gốc hỗn hợp có nồng độ 400ng/ml được pha trong metanol, bảo quản  $-20^{\circ}C$ , sử dụng trong 3 tháng. Dung dịch chuẩn làm việc được pha từ chuẩn gốc hỗn hợp tại các nồng độ 1,0; 2,0; 3,0; 5,0 và 10ng/ml bằng metanol và nước với 0,1% axit fomic, pha trước khi sử dụng. Pha động A là metanol, pha động B là nước với 0,1% axit fomic.

**2.2. Thiết bị:** Thiết bị sắc ký lỏng khối phổ UPLC-MS/MS (Waters, Mỹ), gồm các bộ phận chính như bơm, bộ tiêm mẫu tự động, bộ điều nhiệt cột, bộ khử khí, bộ ghép nối khối phổ Waters Acquity TQ Detector và phần mềm xử lý Masslynx 4.1. Cột sắc ký Acquity UPLC<sup>(R)</sup>BEH C18 2.1x100mm, 1,7 $\mu$ m, (Waters, Mỹ). Chương trình pha động bắt đầu 95%B, giữ trong 1,3 phút, giảm xuống 65%B tại 7,3 phút và kết thúc tại điều kiện ban đầu, tổng thời gian chạy là 8 phút, tốc độ dòng 0,3ml/phút, thể tích tiêm 10 $\mu$ l. Nhiệt độ cột 30 $^{\circ}C$ . Chế độ phân tích đa kênh MRM, kiểu ion hóa dương, nhiệt độ nguồn 150 $^{\circ}C$ , nhiệt độ khử dung môi 350 $^{\circ}C$ , dòng khử khí 600L/Hr. Điện thế mao quản 0,5kV, điện thế cone 25V, áp suất chân không 3,8.e<sup>-3</sup>mbar. Thời gian lưu của salbutamol, ractopamine và clenbuterol lần lượt là 4,23; 5,99 và 6,34 phút (Hình 1). Năng lượng phân mảnh các ion đặc trưng được trình bày trong Bảng 1.

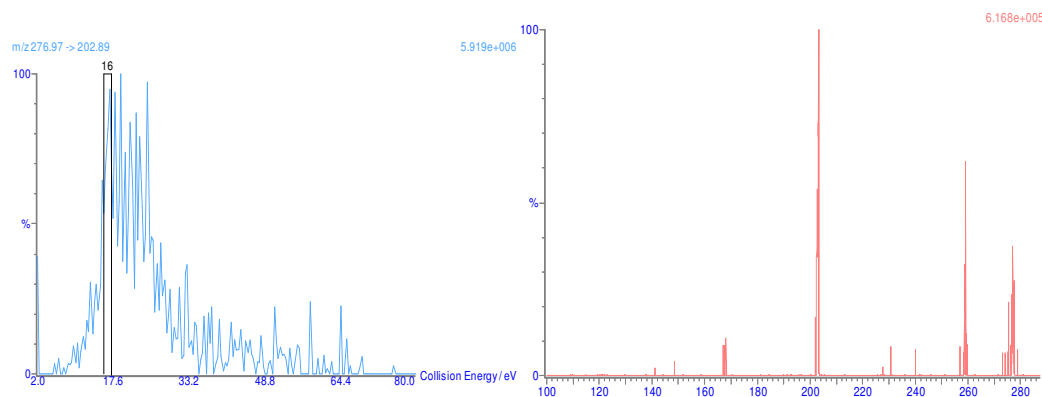


Hình 1. Sắc đồ chuẩn hỗn hợp salbutamol, ractopamine và clenbuterol ở nồng độ 5 $\mu$ g/l.

Bảng 1. Năng lượng phân mảnh của hỗn hợp salbutamol, ractopamine và clenbuterol

Tên chất	ion sơ cấp (m/z)	ion thứ cấp (m/z)	Thời gian Dwell (s)	Điện thế Cone (V)	Năng lượng Cone (eV)
Salbutamol	240,03	120,81	0,025	24	36
		130,05	0,025	24	32
		<u>147,95</u>	0,025	24	24
		165,98	0,025	24	16
Clenbuterol	276,96	131,87	0,025	22	40
		167,75	0,025	22	34
		<u>202,89</u>	0,025	22	16
Ractopamine	302,03	106,94	0,025	26	36
		120,93	0,025	26	24
		135,97	0,025	26	28
		<u>164,02</u>	0,025	26	20

Chi chú: ion gạch chân là ion dùng để định lượng



Hình 2. Collision Energy Optimization (m/z 276,97 -> 202,89).

2.3. Quy trình xử lý mẫu: Cân chính xác 1,0g phần mẫu thử đã được đồng nhất cho vào ống ly tâm 50ml. Thêm chính xác 10ml  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1M, vortex 2 phút cho đều mẫu, ly tâm 5000 vòng/phút trong 10 phút ( $t^\circ$  phòng), sau đó gạn lấy phần dịch trong. Tiếp tục chiết lặp lại lần nữa, gộp toàn bộ dịch chiết, ly tâm 5000 vòng/phút trong 10 phút, dung dịch đem đi làm sạch qua cột SCX, hoạt hóa bằng MeOH;  $\text{H}_2\text{O}$ , sau đó nạp hết mẫu qua cột, rửa tạp bằng 3ml  $\text{H}_2\text{O}$ , 3ml MeOH: $\text{H}_2\text{O}$  (10:90), rửa giải bằng  $\text{NH}_4\text{OH}$  5%. Thổi khô dung dịch bằng khí ni tơ, hòa cạn chính xác 1ml dung môi pha động, lọc qua màng lọc 0,22 $\mu\text{m}$ , khử khí và tiến hành đo trên máy UPLC/MS/MS.

### 3. Kết quả và thảo luận

#### 3.1. Khảo sát kết quả ảnh hưởng của nền mẫu trong quá trình phân tích

Trong phân tích LC/MS/MS, nền mẫu có thể ảnh hưởng rất lớn đến độ chính xác của kết quả phân tích, từ giai đoạn chuẩn bị mẫu đến giai đoạn định lượng trên đầu dò khối phổ (hiệu suất tạo ion). Vì vậy, việc khảo sát ảnh hưởng nền mẫu trong quá trình phân tích là rất quan trọng. Kết quả bảng 2 cho thấy các diện tích pic của mỗi ion lần lượt trong dung dịch chuẩn và dung dịch thêm chuẩn vào nền mẫu sau xử lý tương tự nhau, điều này chứng tỏ không có hiệu ứng nền trong giai đoạn tạo ion ở đầu dò khối phổ.

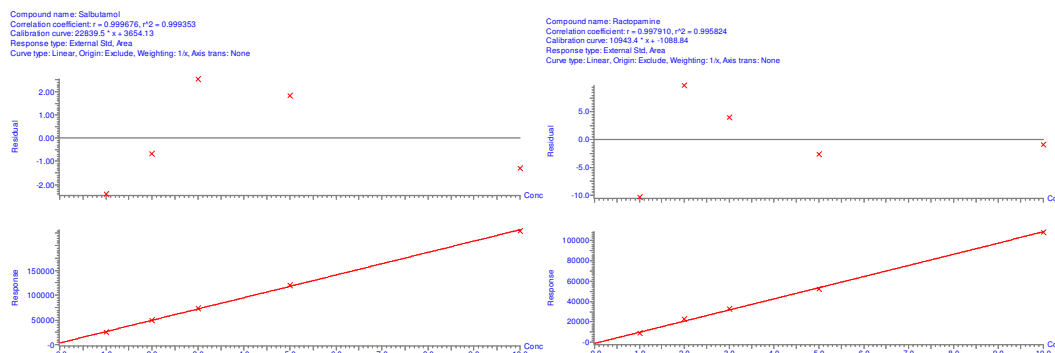
Bảng 2. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nền mẫu trong quá trình phân tích

Chất phân tích	Nồng độ (µg/kg)		2	3	5
Salbutamol	Dung dịch chuẩn	A <sub>148</sub>	33942	51196	82995
	Thêm vào mẫu	A <sub>166</sub>	15089	22718	36956
	Thêm vào mẫu sau xử lý	A <sub>148</sub>	31692	51012	80763
	Thêm vào mẫu sau xử lý	A <sub>166</sub>	14457	23304	35204
Ractopamine	Dung dịch chuẩn	A <sub>164</sub>	22948	33052	52218
	Thêm vào mẫu	A <sub>121</sub>	16936	26574	40506
	Thêm vào mẫu sau xử lý	A <sub>164</sub>	24166	32413	50124
	Thêm vào mẫu sau xử lý	A <sub>121</sub>	18233	25391	40574
Clenbuterol	Dung dịch chuẩn	A <sub>203</sub>	8309	14073	22206
	Thêm vào mẫu	A <sub>167</sub>	1792	3185	5089
	Thêm vào mẫu sau xử lý	A <sub>203</sub>	8025	12589	23187
	Thêm vào mẫu sau xử lý	A <sub>167</sub>	1674	3290	5263

3.2. *Khảo sát khoảng tuyến tính và đường chuẩn:* Đường chuẩn được thực hiện trên nền mẫu trắng thêm chuẩn (phương pháp thêm chuẩn) tại các nồng độ 1,0; 2,0; 3,0; 5,0 và 10µg/kg. Kết quả cho thấy đường chuẩn salbutamol, ractopamine và clenbuterol tuyến tính trong khoảng từ 1,0 - 10µg/kg. Giá trị R<sup>2</sup>>

0,999, độ thu hồi ở các điểm chuẩn thỏa mãn yêu cầu (≤ 10%).

3.3. *Khảo sát hiệu suất thu hồi:* Đánh giá độ thu hồi dựa vào mẫu thêm chuẩn tại 3 mức nồng độ là 3,0µg/kg; 5,0µg/kg và 7,0µg/kg. Sử dụng đường chuẩn để tính toán. Tại mỗi nồng độ, thực hiện chiết độc lập, mỗi nồng độ phân tích 3 lần, trong 3 ngày khác nhau.



Hình 3. Đường chuẩn định lượng salbutamol và ractopamine.

Bảng 3. Kết quả khảo sát hiệu suất thu hồi tính trên nền mẫu thức ăn chăn nuôi

Nồng độ mẫu (µg/kg)	Salbutamol		Ractopamine		Clenbuterol	
	H <sub>TB</sub> (%)	RSD% (n = 6)	H <sub>TB</sub> (%)	RSD% (n = 6)	H <sub>TB</sub> (%)	RSD% (n = 6)
3	72,70	4,22	73,31	5,44	70,27	6,02
5	87,24	2,56	75,22	4,18	76,42	1,66
7	89,33	3,32	83,12	2,05	85,70	2,34

Bảng 3 cho thấy hiệu suất thu hồi khá cao, salbutamol dao động trong khoảng 72,70 đến 89,33%; ractopamine dao động khoảng 75,22 - 83,12%; clenbuterol dao động từ 70,27 đến 85,70%. Đáp ứng được yêu cầu của Quyết định 2002/657/EC (Khoảng chấp nhận từ 70 đến 110%).

3.4. Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ)

Tại Việt Nam hiện nay, mẫu thức ăn chăn nuôi được coi là dương tính với salbutamol, ractopamine và clenbuterol khi có kết quả phân tích định lượng cao hơn hoặc bằng 10µg/kg. Vì vậy, đề tài tiến hành khảo sát LOD tại nồng độ 2µg/kg. Chuẩn bị 10 mẫu trắng thêm chuẩn hỗn hợp salbutamol, ractopamine và clenbuterol ở nồng độ trên. Xử lý mẫu và phân tích theo các điều kiện đã chọn, kết quả như bảng 4.

Đánh giá tình hợp lý: Từ giá trị LOD đã tính được, tính  $R_{\text{tính toán}} = x/\text{LOD} = 4,79$  (salbutamol), 6,0 (ractopamine) và 4,49 (clenbuterol), trong đó x là giá trị trung bình. Theo lý thuyết,  $R_{\text{tính toán}}$  phải nằm trong khoảng  $4 < R_{\text{tính toán}} < 10$  nên nồng độ dung dịch của mẫu trắng thức ăn chăn nuôi thêm chuẩn là phù hợp, LOD tính được là đáng tin cậy, do điều kiện thiết bị theo thời gian có thể giảm độ nhạy nên lấy giá trị LOQ lần lượt đối với salbutamol,

ractopamine và clenbuterol là 1,0µg/kg; 1,0 µg/kg và 1,07µg/kg tương ứng.

3.5. Độ dao động tỷ lệ cường độ ion của các mảnh ion

Kết quả từ bảng 5 cho thấy tỷ lệ cường độ ion của salbutamol, ractopamine và clenbuterol trong dung dịch mẫu đều nằm trong khoảng cho phép, phù hợp với quyết định của Hội đồng Châu Âu 2002/657/EC.

Bảng 4. Kết quả khảo sát giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng của phương pháp

Mẫu	Nồng độ (µg/kg)		
	Salbutamol	Ractopamine	Clenbuterol
SPK 2-1	1,62	1,34	1,41
SPK 2-2	1,40	1,52	1,57
SPK 2-3	1,52	1,44	1,51
SPK 2-4	1,50	1,40	1,43
SPK 2-5	1,47	1,50	1,57
SPK 2-6	1,32	1,52	1,46
SPK 2-7	1,41	1,43	1,70
SPK 2-8	1,34	1,61	1,62
SPK 2-9	1,56	1,48	1,55
SPK 2-10	1,40	1,55	1,34
Trung bình	1,45	1,48	1,51
SD	0,10	0,08	0,11
LOD	0,30	0,27	0,36
LOQ	0,97	0,79	1,07
$R_{\text{Tính toán}}$	4,79	6,00	4,49

Bảng 5. Kết quả khảo sát cường độ ion định lượng và ion xác nhận

Chất phân tích	Nồng độ (µg/l)		Cường độ ion			Khoảng dao động cho phép
			2	3	5	
Salbutamol	Tỷ lệ ion trên dung dịch chuẩn	$A_{166}/A_{148}$	0,44	0,44	0,44	0,42 - 0,44
	Tỷ lệ ion trên nền mẫu	$A_{166}/A_{148}$	0,45	0,45	0,43	
Ractopamine	Tỷ lệ ion trên dung dịch chuẩn	$A_{121}/A_{164}$	0,73	0,80	0,77	0,62 - 0,93
	Tỷ lệ ion trên nền mẫu	$A_{121}/A_{164}$	0,75	0,78	0,81	
Clenbuterol	Tỷ lệ ion trên dung dịch chuẩn	$A_{167}/A_{203}$	0,21	0,22	0,22	0,21 - 0,24
	Tỷ lệ ion trên nền mẫu	$A_{167}/A_{203}$	0,20	0,22	0,22	

#### 4. Kết luận

Đã tiến hành nghiên cứu và xây dựng thành công phương pháp xác định đồng thời salbutamol, ractopamine và clenbuterol trong thức ăn chăn nuôi sử dụng thiết bị sắc ký lỏng siêu hiệu năng UPLC/MS/MS đạt độ nhạy và độ chọn lọc cao, quy trình chiết mẫu đơn giản, thời gian phân tích nhanh. Phương pháp đã được phê duyệt theo quyết định 657/2002/EC của Cộng đồng chung Châu Âu. Phương pháp là phù hợp để xác định dư lượng nhóm beta - agonist trong thức ăn chăn nuôi ở ngưỡng đòi hỏi của thị trường hiện nay. Phương pháp đã được áp dụng phân tích 93 mẫu thực tế trên khu vực miền Bắc Việt Nam.

#### Tài liệu tham khảo

- [1] In Kyungsung, Seo Jung Park, Kyutae Kang, Min Young Kim and Seongbeom Cho, Development and Application of a method for Rapid and Simultaneous determination of three  $\beta$  - agonist (Clenbuterol, ractopamine and Zilpaterol) using Liquid Chromatography - tandem Mass Spectrometry, Korean J. Food Scie. An, vol 35, No 1, pp 212 - 129 (2015).
- [2] United States Department of Agriculture. Food safety and Inspection Service, Office of Public Health Science, Determination and Confirmation of Beta-Agonists by HPLC/MS/MS, Revision 07 (2016).
- [3] Dickson LC, MacNeil JD, Lee S, Fesser AC, Determination of beta-agonist residues in bovine urine using liquid chromatography-tandem mass spectrometry, J AOAC Int. Vol. 88(1), pp.46-56 (2005).
- [4] Jirapa Setjintanin, Nuntana Klinsunthorn, Wantana Onpirom, Mongkol Chenchittikul, Determination of Beta-agonist Residues in Pork at the South-Middle Region, Medical Journal, Vol.25 No.4 (2006)
- [5] Commission Decision 2002/657/EC implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results.
- [1] In Kyungsung, Seo Jung Park, Kyutae Kang, Min Young Kim and Seongbeom Cho, Development and Application of a method for Rapid and

## Simultaneous Determination of Beta-agonists (Salbutamol, Ractopamine and Clenbuterol) in Animal Feed Using Ultra Performance Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry

Nguyen Thi Ha<sup>1</sup>, Nguyen Van Luong<sup>1</sup>, Do Khac Hai<sup>2</sup>,  
Le Thi Quynh, Nguyen Kieu Hung<sup>2</sup>

<sup>1</sup>VNU University of Science, 334 Nguyen Trai, Hanoi, Vietnam

<sup>2</sup>Environment Police Department, Ministry of Public Security

**Abstract:** A method based on ultra high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (UPLC/MS/MS) as development for simply and rapid determination of the residues of three beta-agonist (salbutamol, ractopamine and clenbuterol) in animal feed. The sample were extracted by kalidihydrophosphat and then analyzed in multiple reaction monitoring (MRM) mode. Mobile phase was ultrapure water (containing 0,1% formic acid). Under the optimized detection conditions, the linear range for salbutamol, ractopamine and clenbuterol are 1,0 - 10 $\mu$ g/L, the linear correlation coefficients are all more than 0,999. The limits of quantification of salbutamol, ractopamine and clenbuterol are 1,0; 1,0 and 1,07 $\mu$ g/kg respectively. The recoveries of three beta-agonists range from 70,27 - 89,33 with relative standard deviations (RSD) of 1.66 - 6.02%. This method is simply, effective, sensitive, which is suitable for the determination and confirmation of three beta-agonists in animal feed.

**Keywords:** Salbutamol, ractopamine, clenbuterol; UPLC/MS/MS; Animal feed stuffs.