

Xác định lượng vết Auramine O trong thịt gà và thức ăn chăn nuôi bằng LC - MS/MS

Lê Thị Thu Trinh^{1,*}, Hồ Thị Phước², Nguyễn Ánh Mai², Nguyễn Phúc Thịnh², Lê Văn Duy², Trần Thị Yến Nhi²



Use your smartphone to scan this QR code and download this article

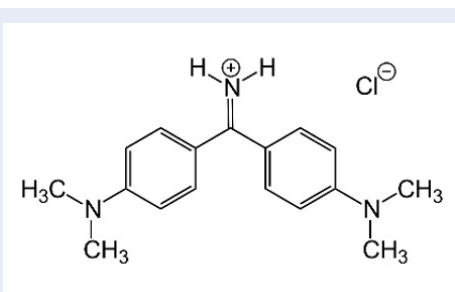
TÓM TẮT

Auramine O là một phẩm màu nằm trong danh mục cấm sử dụng trong thực phẩm và chăn nuôi nhưng hiện nay vẫn bị lạm dụng. Nghiên cứu này tập trung vào việc xây dựng phương pháp phân tích Auramine O bằng sắc ký lỏng ghép đầu dò khối phổ hai lần (LC-MS/MS) với các yêu cầu cao về độ nhạy, độ chính xác và tính đơn giản để giúp cho các cơ quan chức năng có thêm công cụ để xử phạt các cơ sở vi phạm, từ đó hạn chế việc sử dụng chất cấm trong chăn nuôi. Các mẫu bao gồm thức ăn chăn nuôi, thịt gà, da gà được chiết xuất bằng acetic acid 1% trong ACN, làm sạch và làm giàu bằng cột trao đổi cation và sau đó được phân tích ở chế độ MRM. Pha động là muối ammonium acetate 5 mM trong nước với formic acid 0,1% trong ACN. Trong các điều kiện được tối ưu hóa, khoảng tuyến tính của Auramine O là 0,1 ÷ 500 ppb với hệ số tương quan tuyến tính lớn hơn 0,998. Giới hạn định lượng của phương pháp là 0,2 ppb. Độ thu hồi của Auramine O dao động trong khoảng từ 77 ÷ 99% với độ lệch chuẩn tương đối (RSD) 1,00 ÷ 2,10%. Phương pháp này cho thấy độ chính xác, ổn định và độ nhạy cao, phù hợp để xác định và xác nhận Auramine O trong thức ăn chăn nuôi và các mẫu thực phẩm khác.

Từ khoá: Auramine O, SPE, SCX, LC-MS/MS, thức ăn chăn nuôi, thịt gà

MỞ ĐẦU

Bis[4-(dimethylamino)phenyl]methaniminium chloride hay thường được gọi là Auramine O (AO) là chất màu nhân tạo được sử dụng phổ biến trong công nghiệp để nhuộm da, giấy, màu trong sơn, thuốc nhuộm tóc, chất nhuộm huỳnh quang trong sinh học (Hình 1). Gần đây AO bị lạm dụng làm phẩm màu thực phẩm và thức ăn gia súc.



Hình 1: Cấu trúc hóa học của Auramine O

Auramine O trong thức ăn chăn nuôi gia súc và gia cầm². Tuy nhiên, vì lợi ích về kinh tế mà nó mang lại, AO vẫn được sử dụng trong một số thực phẩm ở nhiều nước đặc biệt là các nước đang phát triển.

Auramine O có thể được phân tích bằng HPLC với nhiều loại đầu dò UV, PDA và MS³⁻⁷. Do đây là chất cấm không được phép sử dụng trong thực phẩm nên đòi hỏi phương pháp phân tích phải có độ nhạy càng cao càng tốt. Vì thế HPLC-MS/MS có thể xem là kỹ thuật phân tích duy nhất đáp ứng được yêu cầu này. Ngoài ra để đáp ứng yêu cầu quản lý các loại hóa chất dùng trong chăn nuôi nên phương pháp cần phải đơn giản, nhanh, giá thành thấp để có thể đáp ứng việc phân tích số lượng mẫu lớn. Bên cạnh việc sử dụng thiết bị hiện đại như HPLC-MS/MS, việc xử lý mẫu cũng đóng vai trò rất quan trọng làm tăng độ nhạy và độ chính xác của phương pháp. Do người tiêu dùng thường quan tâm đến nguy hại của AO trên sức khỏe khi tiêu thụ thức ăn nhiễm bẩn, nên các công bố trước đây chủ yếu tập trung vào đối tượng thực phẩm như thịt gà, bột gia vị, khô bò, khô gà, măng, bánh trái... rất ít nghiên cứu về sự hiện diện AO trong thức ăn chăn nuôi⁷.

Trong quy trình xử lý mẫu, đầu tiên AO được chiết ra khỏi mẫu rắn bằng các dung môi phân cực như hỗn hợp methanol (MeOH) hay acetonitrile (ACN) với nước⁸ hay với một dung dịch acid^{6,7}. Việc chọn

¹Trung tâm Kiểm nghiệm thuốc Thú y Trung ương II - Tp. Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Khoa Hóa học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – ĐHQG Tp. Hồ Chí Minh, Việt Nam

Liên hệ

Lê Thị Thu Trinh, Trung tâm Kiểm nghiệm thuốc Thú y Trung ương II - Tp. Hồ Chí Minh, Việt Nam

Email: lettrinh88@gmail.com

Lịch sử

- Ngày nhận: 13-8-2022
- Ngày chấp nhận: 05-12-2022
- Ngày đăng: 31-12-2022

DOI: 10.32508/stdjns.v6i4.1222



Bản quyền

© ĐHQG Tp.HCM. Đây là bài báo công bố mở được phát hành theo các điều khoản của the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



Theo Cơ quan ghiên cứu Ung thư quốc tế IARC năm 2010, AO được xếp vào nhóm 2B – nhóm có khả năng gây ung thư đối với người¹. Năm 2015, Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn Việt Nam đã có công văn cấm nhập khẩu, sản xuất, kinh doanh và sử dụng

Trích dẫn bài báo này: Trinh L T T, Phước H T, Mai N A, Thịnh N P, Duy L V, Nhi T T Y. **Xác định lượng vết Auramine O trong thịt gà và thức ăn chăn nuôi bằng LC - MS/MS.** *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.*; 2022, 6(4):2378-2388.

lựa dung môi chiết sẽ quyết định các tạp chất cùng chiết từ nền mẫu, vì thế mỗi loại dung môi có thể phù hợp với mẫu này hơn mẫu khác. Trong nghiên cứu này, hỗn hợp MeOH hoặc ACN với các dung dịch acid có nồng độ thay đổi được khảo sát cho các đối tượng đang nhắm tới là thịt gà, da gà và thức ăn chăn nuôi. Da gà được phân tích thêm để xem sự nhiễm bẩn đi từ quá trình chăn nuôi hay sơ chế.

Ngoài ra, dịch chiết cần phải làm sạch trước khi phân tích bằng HPLC-MS/MS để tránh sự nhiễm bẩn của các tạp chất gây ra hiện tượng ức chế ion và làm dơ đầu dò. Về nguyên tắc AO có thể được làm sạch bằng cột chiết pha rắn theo cơ chế pha đảo như trường hợp malachite green⁹, tuy nhiên lợi dụng khả năng tích điện của các phẩm màu có tính acid và base, cột trao đổi ion cho độ chọn lọc cao hơn và thường được sử dụng để làm sạch và làm giàu nhóm hợp chất này^{6,10,11}. Tran-Lam và các cộng sự đã thu được kết quả rất khả quan với hiệu suất thu hồi và độ nhạy cao khi sử dụng cột MCX của Waters⁶, tuy nhiên do giá thành cao nên trong nghiên cứu này 2 loại cột trao đổi cation mạnh Strata@SCX (nền silica) và StrataTM X-C (nền polymer) được khảo sát để thay thế.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Tất cả các hóa chất sử dụng đều thuộc loại tinh khiết phân tích. Chuẩn AO dạng muối ($C_{17}H_{22}ClN_3$), $M=303,83$ g/mol (85%, Sigma-Aldrich, Mỹ); acetic acid, formic acid, ammonium acetate, acetone, và ammonia (Merck, Đức); methanol (MeOH) và acetonitrile (ACN) (loại HPLC, Fisher, Mỹ); nước khử ion (EasyPure II-Thermo Fisher Scientific). Các dung dịch chuẩn AO được pha trong MeOH.

Thiết bị và dụng cụ

Máy sắc ký HPLC 1260 (Agilent, Mỹ), đầu dò MS/MS 6420 (Agilent, Mỹ), cột sắc ký pha đảo C18 (15 x 2,1 mm, 3 μ m) và cột bảo vệ C18 (10 x 3 mm, 3 μ m) (GL Sciences, Nhật), cột chiết pha rắn trao đổi cation mạnh Strata@SCX 200 mg/3 mL (nền silica) và StrataTM X-C 200 mg/3 mL (nền polymer) của Phenomenex, hệ chiết pha rắn, hệ thổi khô bằng khí N_2 , và các dụng cụ thủy tinh thông dụng khác.

Quy trình ly trích AO từ mẫu

Cân 1 g mẫu, thịt gà hay thức ăn gia súc đã được xay nhuyễn và đồng nhất vào ống ly tâm 15 mL (đối với mẫu thêm chuẩn thêm tiếp 100 μ L chuẩn AO 10 và để yên 30 phút). Do mẫu bị vón cục khi tiếp xúc ngay với dung môi hữu cơ, mẫu được trộn lẫn với 1 – 2 mL nước khử ion trước khi thêm dung môi chiết (acetic

acid 1% trong ACN) sao cho tổng thể tích dung dịch là 10 mL, lắc 20 phút sau đó tiến hành ly tâm lạnh tại 5°C trong 5 phút để loại béo. Lấy 5 mL dịch chiết để làm sạch bằng cột chiết pha rắn.

Quá trình làm giàu trên cột chiết SCX

Hoạt hóa cột chiết pha rắn bằng 3 mL MeOH, 3 mL nước khử ion, sau đó tải 5 mL dịch chiết qua cột, tráng ống bằng 1 mL MeOH, tốc độ 1 mL/phút. Sau khi tải mẫu lên cột, rửa tạp với 3 mL nước và 3 mL HCOOH 2%, rút khô cột và rửa giải bằng 3 lần, mỗi lần với 3 mL 5% NH_3 trong MeOH. Cuối cùng thổi khô dịch chiết bằng khí N_2 , hòa tan lại trong 2 mL ACN:H₂O (1:9, v/v) và phân tích trên thiết bị HPLC-MS/MS.

Quy trình phân tích AO bằng HPLC-MS/MS

Pha động gồm 2 dung dịch: A (nước chứa 0,1% HCOOH, 5 mM HCOONH₄) và B (ACN chứa 0,1% HCOOH) và được chương trình hóa theo Bảng 1. Thể tích mẫu tiêm là 20 mL. Đầu dò MS/MS hoạt động ở chế độ MRM (+) với m/z của ion mẹ là 268, và hai ion con 147 và 252 tương ứng được sử dụng làm ion định lượng và định tính.

Bảng 1: Chương trình gradient pha động

Thời gian (phút)	Pha A (%)	Pha B (%)
0 – 1	90	10
3	5	95
3 – 9	5	95
10	90	10
10 – 19	90	10

Tối ưu các thông số của LC-MS/MS

Trước khi phân tích, các thông số kỹ thuật của đầu dò MS/MS sẽ được điều chỉnh với chế độ tune tự động để đảm bảo độ phân giải, độ nhạy và độ chính xác của giá trị khối (m/z) trong khoảng khối dùng để xác định AO, 100 ÷ 300 au (Bảng 2). Xác định tín hiệu mảnh định tính, mảnh định lượng cũng như việc chọn thể phân mảnh (fragmentor) và năng lượng va đập phù hợp được thực hiện bằng cách scan các ion mẹ, ion con khi phun trực tiếp dung dịch chuẩn AO 10 ppb vào đầu dò MS/MS ở chế độ ESI (+).

Khảo sát khả năng lưu giữ và rửa giải AO trên các loại cột trao đổi cation

Thức ăn chăn nuôi, thịt và da gà là những nền mẫu rất phức tạp, chứa nhiều protein, chất béo, khoáng chất... nên cần làm sạch trước khi phân tích bằng

Bảng 2: Các thông số vận hành đầu dò MS/MS

Thông số	Giá trị
Rough Vac	1,63E ³ torr
Hight Vac	2,81 x 10 ⁻⁵ torr
MS 1	100°C
MS 2	100°C
Gas Temp	350°C
Gas Flow	9 L/phút
Capillary	400 V
Chamber Current	1,89
Capillary Current	43 μ A
Nebulizer	40 psi

HPLC-MS/MS để tránh nhiễu nền và làm bền đầu dò. Sử dụng dung môi hữu cơ để chiết như acetonitrile (ACN) hay methanol (MeOH) loại được protein nhưng nhiễu tạp chất ít phân cực cũng bị chiết theo. Do AO có tính base (các giá trị pKa là 9,8 và 10,7) nên việc sử dụng cột trao đổi cation cho phép làm sạch tốt hơn cột C18. Cần lưu ý rằng bên cạnh nhóm amine mang điện tích dương, phân tử AO còn chứa các vòng thơm vì thế nó có thể tương tác với cột trao đổi cation bằng hai loại lực tĩnh điện và lực phân tán nếu bề mặt vật liệu nền không phân cực, thí dụ như trường hợp poly(styrene-co-divinylbenzene). Như vậy, bản chất vật liệu nền (trên đó có ghép nhóm trao đổi cation mạnh) có khả năng ảnh hưởng đến hiệu suất thu hồi. Trong thí nghiệm này, hai loại cột trao đổi cation mạnh có cùng dung lượng (1 meq/g) đã được khảo sát, một cột có nền silica và một cột nền polymer. Ở giai đoạn giải hấp dung môi MeOH có chứa NH₃ được sử dụng để vừa giảm điện tích dương của AO vừa tăng khả năng hòa tan AO và giảm tương tác với vật liệu nền theo lực phân tán (nếu có). Trong phần này, chủ yếu là khảo sát loại dung môi và thể tích dung môi rửa giải. Tốc độ tải mẫu lên cột và rửa giải được giữ ở mức 1 mL/phút mà không khảo sát để thay đổi do thể tích mẫu tải qua cột và thể tích dung dịch rửa giải ít, chỉ vài mL. Toàn bộ khảo sát đều thực hiện trên nền mẫu thực thêm chuẩn.

Khảo sát dung môi chiết

AO tan tốt trong các dung môi phân cực nên chúng tôi tiến hành khảo sát quá trình ly trích từ 1 g mẫu thực thêm chuẩn với các dung môi như MeOH và ACN có chứa 0, 1, 5 và 10 % acetic acid (AA) nhằm tạo môi trường acid để AO tồn tại dạng cation và được lưu giữ tốt trên cột SCX ở giai đoạn sau.

Thẩm định phương pháp

Quy trình phân tích sau khi tối ưu được thẩm định với các tiêu chí như giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ) trong các nền mẫu thực, khoảng tuyến tính, ảnh hưởng của nền mẫu, đánh giá độ lặp lại và độ tái lập, độ ổn định của phương pháp theo thời gian.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Xác định ion mẹ

Quét phổ dịch chuẩn AO (dạng muối của HCl) trong khoảng m/z từ 100 ÷ 300 ở chế độ ion hóa ESI (+) cho khối phổ đồ với sự xuất hiện của ion mẹ là phân tử AO được proton hóa $[M+H]^+$, 268) có cường độ vượt trội.

Xác định thế phân mảnh (fragmentor)

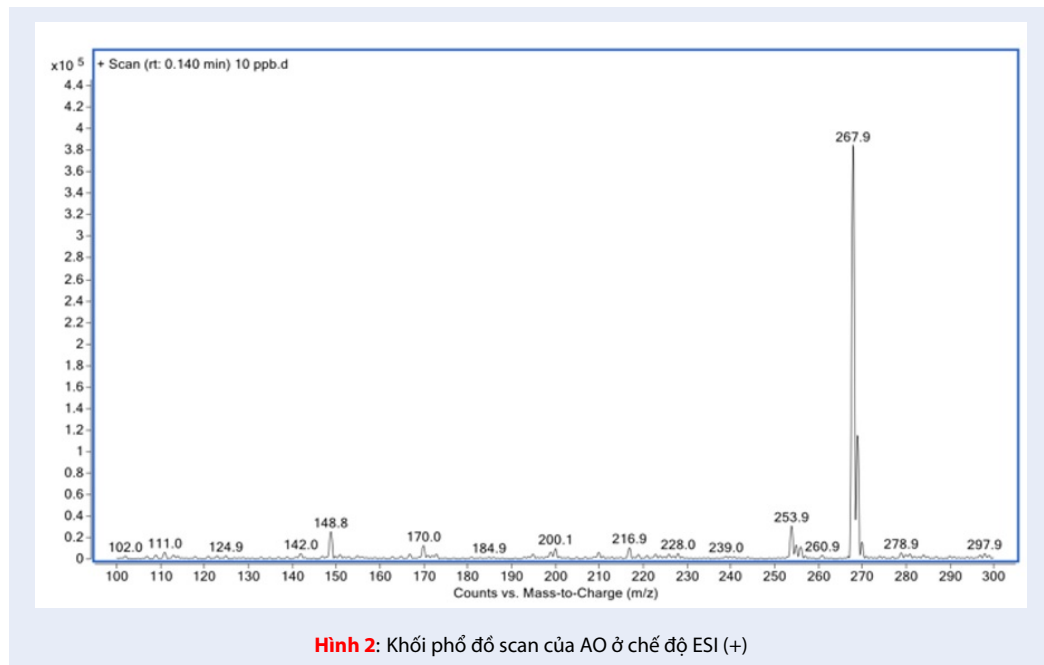
Chọn ion mẹ có m/z = 268 (Hình 2), các thế phân mảnh được khảo sát trong khoảng 50 ÷ 180V sao cho tín hiệu ion mẹ cao. Kết quả cho thấy tăng thế phân mảnh gia tăng tốc độ di chuyển, tăng lượng ion mẹ vào đầu dò khối phổ (số liệu không trình bày ở đây); tín hiệu ion mẹ đạt cực đại trong khoảng 100 ÷ 150 V và giảm sau đó do sự va chạm với các phân tử khác dẫn đến sự phân mảnh làm giảm tín hiệu ion mẹ. Vì thế, thế phân mảnh được cài đặt ở 120V.

Xác định các ion định tính và định lượng

Để xác định các ion con dùng cho định tính và định lượng, tiến hành bắn phá ion mẹ m/z = 268 ở các mức năng lượng va đập (CE) từ 10 ÷ 50 eV. Hai ion có cường độ cao nhất trong các ion con là 147 và 252; và cường độ 2 ion này đạt cực đại khi CE = 30 eV. Ion 147 được lựa chọn làm ion định lượng và ion 252 làm ion định tính (Bảng 3).

Khảo sát khả năng lưu giữ và rửa giải AO khỏi cột chiết pha rắn SCX

Để có thể đánh giá quy trình chiết AO từ các nền mẫu khác nhau (thịt gà, da gà, TACN) bắt buộc các dịch chiết phải được làm sạch trước khi tiêm vào hệ thống HPLC-MS/MS. Vì thế việc đầu tiên là phải đảm bảo quá trình bắt giữ và rửa giải AO khỏi cột SPE mang tính định lượng. 5 mL dung dịch chiết từ mẫu trắng được thêm chuẩn AO với nồng độ 1 ppb được cho qua cột trao đổi cation mạnh Strata@SCX (nền silica) sau đó rửa giải bằng MeOH chứa thành phần NH₃ thay đổi để tìm ra dung dịch rửa giải tối ưu với thể tích dung dịch rửa giải cố định là 6 mL. Kết quả cho thấy khi % NH₃ trong hệ dung môi rửa giải tăng thì hiệu suất thu hồi tăng và đạt cực đại ở 5% với hiệu suất thu hồi trên 3 nền mẫu từ 83, 102% (Hình 3). Hiệu suất



Hình 2: Khối phổ đồ scan của AO ở chế độ ESI (+)

Bảng 3: Cường độ các ion con với các năng lượng bắn phá khác nhau tại buồng va chạm

CE (eV)	m/z	Cường độ peak	Tỉ lệ cường độ (%)
10	268	663795	100
	147	16649	2,5
20	107	13929	4,2
	122	49268	14,7
	147	142386	42,4
	252	13303	4
30	268	335784	100
	107	48233	17,5
	122	48599	17,6
	147	275462	100
	252	47772	17,3
50	268	29336	14,3
	79	19073	27,1
	91	16740	23,8
	107	38591	54,9
	122	15919	22,6
	131	70297	100
	147	41950	59,7
	252	8589	12,2

thu hồi thấp ở tỷ lệ NH₃ thấp là do độ kiềm chưa đủ để hạn chế tương tác tĩnh điện trong khi tỷ lệ NH₃ cao (hay dung môi hữu cơ thấp) có thể ảnh hưởng tới khả năng hòa tan AO vào dung dịch rửa giải. Lưu ý, NH₃ đậm đặc chỉ đạt 25%, phần còn lại là nước.

Khảo sát quá trình làm sạch mẫu trên cột trao đổi cation có nền polymer có cùng dung lượng 1 meq/g tương tự như đã làm với cột Strata@SCX (nền silica) thì hiệu suất thu hồi giảm chỉ còn vài % chứng tỏ tương tác của vật liệu polymer nền không phân cực với vòng benzene của AO rất mạnh khiến không thể rửa giải được. Điều này cũng hợp lý khi so sánh với kết quả của cột MCX của Waters⁶. Oasis MCX có nền là copolymer giữa monomer N-vinylpyrrolidone phân cực và divinylbenzene không phân cực, vì thế hạn chế đáng kể tương tác không phân cực với AO nhờ đó cho hiệu suất thu hồi cao.

Khảo sát thể tích rửa giải

Thể tích dung dịch rửa giải tối thiểu cần được xác định để tiết kiệm hóa chất và giảm bớt thời gian cô cạn mẫu trước khi hòa tan lại trong một dung môi thích hợp cho phân tích bằng HPLC – MS/MS. Tiến hành rửa giải 3 lần và phân tích riêng dung dịch rửa giải ở mỗi lần. Kết quả cho thấy AO vẫn hiện diện trong lần rửa thứ 3 (Bảng 4). Tuy nhiên để giảm bớt thời gian thổi khô, chúng tôi chỉ rửa giải 2 lần để có hiệu suất thu hồi từ 88,7 , 97,5%.

Khảo sát dung môi chiết

MeOH và ACN được sử dụng cùng với acetic acid để chiết AO ra khỏi 3 nền mẫu da gà, thịt gà và TACN. Nồng độ acetic acid được khảo sát từ 0 , 10%. Nhìn chung MeOH cho hiệu suất thu hồi đều thấp hơn khi dùng ACN ở tất cả các nồng độ acid (Hình 4). Bên cạnh đó ACN có khả năng kết tủa protein tốt hơn nên được ưu tiên sử dụng để chiết AO. Hiệu suất của các nền mẫu TACN, thịt gà và da gà cao nhất với acetic acid 1% trong ACN.

LOD và LOQ

Áp dụng quy trình chiết và làm sạch ở trên để xác định LOD và LOQ của phương pháp phân tích. Tiến hành thêm một lượng chất chuẩn (nồng độ gần với giá trị LOD ước lượng) vào mẫu trắng – mẫu không phát hiện chất phân tích. Phân tích các mẫu thêm chuẩn đó, làm 6 lần song song, thu được chiều cao tín hiệu và nhiễu nền tương ứng. Tính hệ số S/N, lựa chọn các dung dịch mẫu trắng thêm chuẩn cho tỷ lệ S/N trong khoảng 3 đến 10 để xác định LOD và LOQ. Kết quả ghi nhận được với giá trị trung bình LOD = 0,06 ppb và LOQ = 0,20 ppb với RSD < 10% so với yêu cầu là 30% cho thấy phương pháp có độ nhạy rất cao (Bảng 5).

Khoảng tuyến tính

Thực hiện phân tích 8 dung dịch chuẩn nồng độ thay đổi từ 0,10 ppb – 500 ppb cho thấy đường chuẩn có độ tuyến tính cao với R²=0,9997 (Hình 5).

Đánh giá ảnh hưởng của nền mẫu

Trong quá trình xử lý mẫu, các chất đồng chiết có trong nền mẫu sẽ có thể làm tăng hoặc giảm tín hiệu của chất phân tích. Nếu ảnh hưởng của nền mẫu không đáng kể thì có thể sử dụng đường chuẩn pha trong dung môi khi định lượng, ngược lại thì phải tiến hành xây dựng đường chuẩn trên mỗi nền mẫu. Công việc này sẽ làm mất thêm thời gian. Việc đánh giá ảnh hưởng nền (matrix effect, ME %) được thực hiện bằng cách so sánh đường chuẩn pha trong MeOH với đường chuẩn xây dựng trên dịch chiết của các mẫu trắng ứng với 3 nền mẫu khảo sát theo công thức dưới đây. Bảng 6 cho thấy các giá trị |ME%| đều nhỏ hơn 7% nên xem như nền mẫu không ảnh hưởng đáng kể, có thể bỏ qua⁷.

$$ME \% = \left(\frac{a}{b} - 1 \right) \times 100$$

Trong đó:

a là hệ số góc đường chuẩn trong nền mẫu

b là hệ số góc đường chuẩn trong dung môi

Độ lặp lại và độ tái lập nội bộ

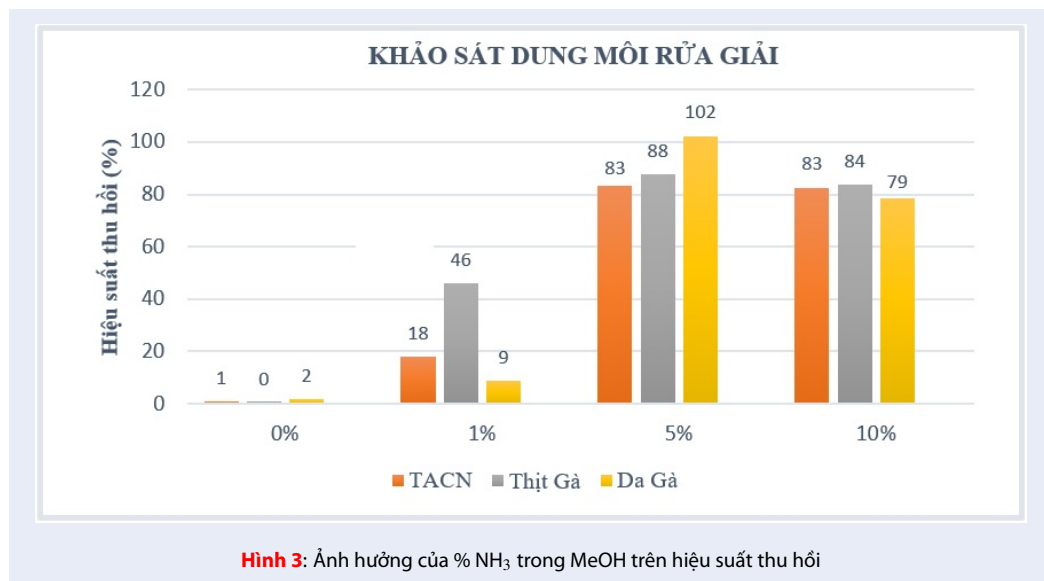
Phân tích mẫu trắng thêm chuẩn (1 ppb) trong 3 ngày, mỗi ngày thực hiện 6 lần cho mỗi nền mẫu. Dùng ANOVA để đánh giá độ lặp lại và tái lập nội bộ. Kết quả cho thấy phương pháp có độ lặp lại và tái lập cao, đạt tiêu chuẩn theo AOAC (Bảng 7)⁷.

Đánh giá hiệu suất thu hồi

Tiến hành thêm chất chuẩn ở ba mức nồng độ là mức thấp, trung bình và cao trong khoảng nồng độ làm việc (1, 5, và 10 ppb). TACN có hiệu suất hơi thấp hơn 80%, có thể do nền mẫu phức tạp, nhưng tất cả xem như đạt yêu cầu của AOAC ở hàm lượng dưới 10 ppb (Bảng 8).

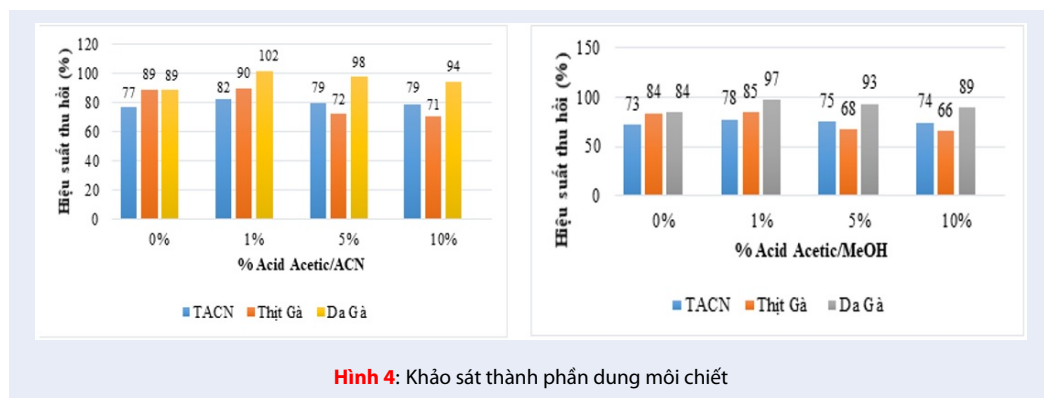
Độ ổn định của phương pháp

Dùng biểu đồ kiểm soát để đánh giá độ ổn định của phương pháp đồng thời cũng đánh giá được thời gian lưu mẫu bằng cách phân tích mẫu thêm chuẩn ở những mốc thời gian khác nhau. Tiến hành phân tích các mẫu thêm chuẩn ở nồng độ 1 ppb trong các mốc thời gian khác nhau: 30 phút sau khi thêm chuẩn, 1 ngày, 3 ngày, 1 tuần, 2 tuần, 3 tuần, 4 tuần sau khi thêm chuẩn. Kết quả cho thấy cả 4 nền mẫu đều đạt yêu cầu (Hình 6). Không có kết quả nào nằm ngoài giới hạn hành động. Không có quá 2 kết quả nằm giữa



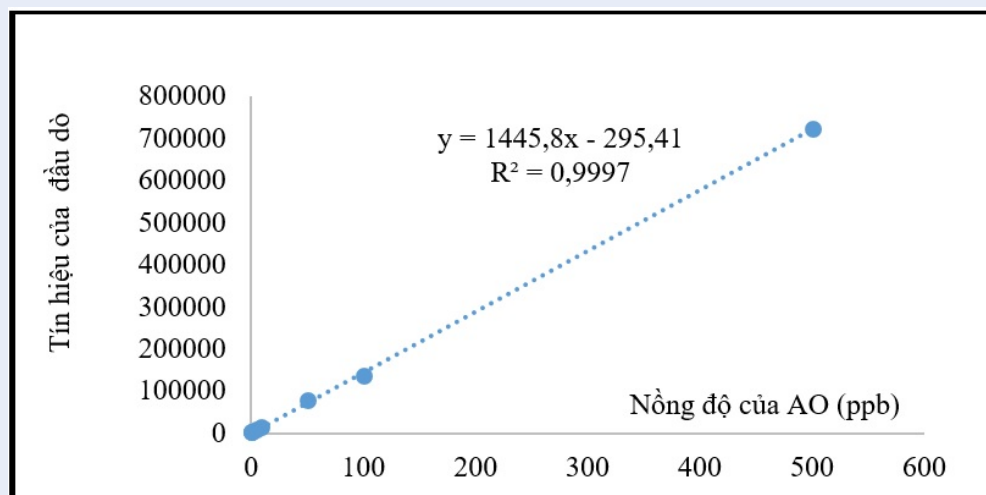
Bảng 4: Khảo sát số lần rửa giải

Số lần rửa giải (3mL/lần)	Hiệu suất thu hồi (%)		
	TACN	Thịt gà	Da gà
Lần 1	82,3	82,7	93,7
Lần 2	8,9	6,0	3,9
Lần 3	3,9	3,1	2,9



Bảng 5: Kết quả LOD, LOQ của phương pháp

Nền mẫu	LOD (μg/kg)	LOQ (μg/kg)
TACN	0,059	0,20
Da gà	0,062	0,21
Thịt gà	0,060	0,20



Hình 5: Đường chuẩn của AO

Bảng 6: Ảnh hưởng của nền mẫu (ME)

Nền mẫu	Đường chuẩn	R ²	ME (%)
Dung môi	$y = 2988x + 63,5$	0,9997	
TACN	$y = 2786x - 20,6$	0,9994	-6,8
Da gà	$y = 2953x + 29,5$	0,9982	-1,2
Thịt gà	$y = 2974x - 27,0$	0,9989	-0,5

Bảng 7: Độ tái lập và độ tái lập nội bộ

Nền mẫu	Độ lặp lại (RSD%)	Độ tái lập (RSD%)
TACN	1,6	2,1
Da gà	1,5	1,5
Thịt gà	1,7	1,9

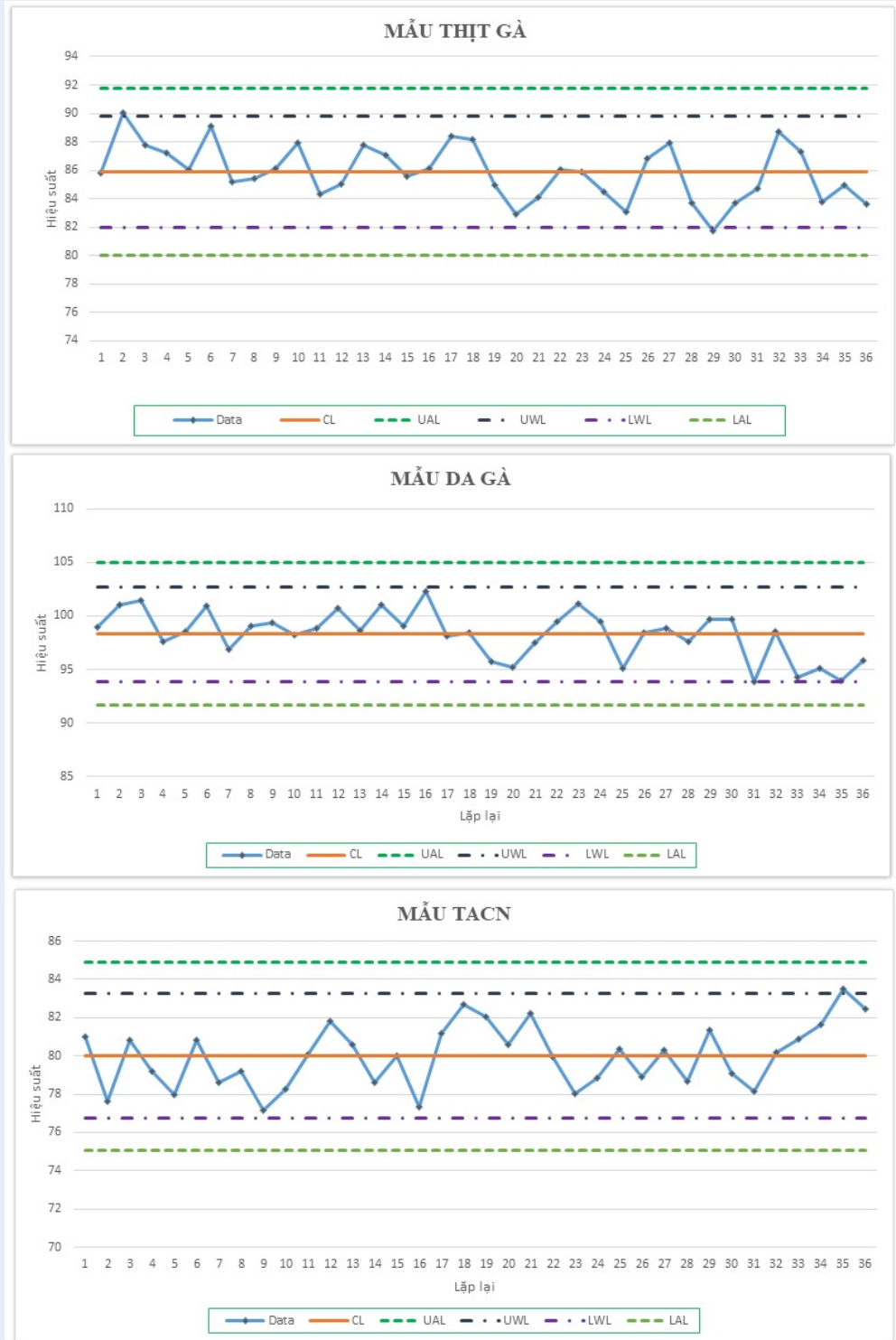
giới hạn hành động và giới hạn cảnh báo. Do đó, sau khi thêm chuẩn, thời gian chờ 30 phút là đủ để chuẩn thấm vào mẫu. 4 tuần sau khi thêm chuẩn, các mẫu phân tích vẫn đạt được độ ổn định về hiệu suất.

Phân tích mẫu thật

Áp dụng quy trình đã tối ưu để phân tích các mẫu thịt gà, da gà, và TACN lưu hành trên thị trường. 11 mẫu thịt gà và 59 mẫu thức ăn chăn nuôi. Đối với mẫu thịt phần thịt và da gà được phân tích riêng để xem nguyên nhân nhiễm AO đi từ TACN hay do nhuôm màu khi sơ chế gà. Đã phát hiện sự hiện diện của chất cấm trong một số mẫu, chủ yếu là thức ăn chăn nuôi, rất ít trong da gà và không thấy trong thịt gà, có thể số lượng mẫu thịt gà gỏi tới cơ quan không nhiều so với TACN (Bảng 9).

KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã đưa ra được một quy trình phân tích AO trong thức ăn chăn nuôi, thịt gà và da gà bao gồm điều kiện vận hành thiết bị HPLC-MS/MS và quy trình chiết bằng ACN chứa 1% HCOOH và làm sạch trên cột trao đổi cation mạnh nền silica. Phương pháp có khoảng tuyến tính rộng (0,10 ÷ 500 ppb) với hệ số tương quan $R^2 > 0,998$, giới hạn phát hiện là 0,06 ppb, độ lặp lại, độ tái lập trên nền mẫu thực cao (< 10%); hiệu suất thu hồi trên nền mẫu thêm chuẩn đạt từ 77 ÷ 99% và ổn định theo thời gian. Dịch chiết sau khi xử lý bằng cột SCX trên nền silica đã loại khá sạch tạp nên ảnh hưởng của nền mẫu không đáng kể, kể cả những mẫu phức tạp như TACN. So với các công bố trước đây quy trình có độ lặp lại trên mẫu phân tích tương đương nhưng có độ nhạy cao hơn đáng kể, LOQ là



Hình 6: Biểu đồ kiểm soát kết quả phân tích AO

Bảng 8: Hiệu suất thu hồi trên các nền mẫu

Nền mẫu	Hiệu suất thu hồi (%)			
	1 ppb	5 ppb	10 ppb	Trung bình
TACN	79,9	76,1	76,0	77,3
Thịt gà	85,1	93,3	92,0	90,1
Da gà	101,1	98,9	96,7	98,9
Quy định của AOAC ⁷	40-120	60-115	60-115	

Bảng 9: Kết quả phân tích mẫu thức ăn chăn nuôi và da gà có chứa AO

Mẫu	Kết quả	% RSD
	(ppb)	(n=3)
TACN 1	1,2	8,5
TACN 2	109	5,5
TACN 3	98	6,1
TACN 4	62	8,0
TACN 5	35	4,5
TACN 6	21	9,7
TACN 7	84	5,0
DG 1	6,1	3,2

TACN: thức ăn chăn nuôi; DG: da gà

0,2 ppb so với 0,5 ÷ 340 ppb⁶⁻⁸, đặc biệt đối với nền mẫu phức tạp như thức ăn chăn nuôi. Vì thế phương pháp thích hợp để kiểm soát chất cấm AO trong công nghiệp chăn nuôi và thực phẩm. Quy trình được áp dụng thành công vào việc phân tích 59 mẫu TACN và 11 mẫu thịt gà trên thị trường.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được tài trợ bởi Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM trong khuôn khổ Đề tài mã số HH 2021-08.

DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT

SCX: Cột chiết cation mạnh (Strong cation exchanger)

MeOH: Methanol

ACN: Acetonitril

LOQ: Giới hạn định lượng (Limit Of Quantitation)

LOD: Giới hạn phát hiện (Limit Of Detection)

SPE: Chiết pha rắn (Solid Phase Extraction)

CE: Năng lượng bắn phá (Collision Energy)

AF: Formic acid

TCA: Trichloroacetic acid

AA: Acetic acid

HPLC: Sắc ký lỏng hiệu năng cao (High Performance Liquid Chromatography).

MS: Khối phổ (Mass Spectrometry).

GC: Sắc ký khí (Gas Chromatography).

HPLC-MS/MS: Sắc ký lỏng hiệu năng cao ghép đầu dò khối phổ 2 lần.

TACN: Thức ăn chăn nuôi.

ĐKĐBĐ: Độ không đảm bảo đo.

AO: Auramine O

XUNG ĐỘT LỢI ÍCH

Các tác giả đồng ý không có bất kỳ xung đột lợi ích nào liên quan đến các kết quả đã công bố.

ĐÓNG GÓP CỦA TÁC GIẢ

Lê Thị Thu Trinh thực hiện các thí nghiệm, thu thập, xử lý các dữ liệu và góp phần viết bản thảo.

Hồ Thị Phước viết bản thảo.

Nguyễn Ánh Mai đóng vai trò định hướng, lên kế hoạch nghiên cứu.

Nguyễn Phúc Thịnh góp phần thảo luận kết quả nghiên cứu, hoàn chỉnh bài báo.

Lê Văn Duy góp phần viết bản thảo.

Trần Thị Yến Nhi góp phần thảo luận các kết quả nghiên cứu, hoàn chỉnh bài báo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Parodi S, Santi L, Russo P, Albini A, Vecchio D, Pala M, et al. DNA damage induced by auramine O in liver, kidney, and bone marrow of rats and mice, and in a human cell line (alkaline elution assay and SCE induction). *J Toxicol Environ Health*. 1982, 9, 941-52; PMID: 7120520. Available from: <https://doi.org/10.1080/15287398209530216>.
2. Bộ nông nghiệp phát triển nông thôn. Thông tư Ban hành danh mục bổ sung hóa chất, kháng sinh cấm nhập khẩu, sản xuất, kinh doanh và sử dụng trong thức ăn chăn nuôi gia súc, gia cầm tại Việt Nam, 42/2015/TT-BNNPTNT. 2015;.
3. Tatebe C, Zhong X, Ohtsuki T, Kubota H, Sato K, Akiyama H. A simple and rapid chromatographic method to determine unauthorized basic colorants (rhodamine B, auramine O, and pararosaniline) in processed foods. *Food Sci Nutr*. 2014; 2(5), 547-56 ; PMID: 25473512. Available from: <https://doi.org/10.1002/fsn3.127>.
4. Gray KM., Walker MJ., Burn MJS., Mazur M., Niedzwiedzka K., Liszka K., et al. Illegal Dyes in Food and Spices - A 2006 LGC LC-UV/Visible Method Reviewed and Updated for 19 Dyes. *J Assoc Public Anal*. 2016, 44:18-39;.
5. Li J, Ding X, Zheng J, Liu D, Guo F, Liu H, et al. Determination of synthetic dyes in bean and meat products by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J Sep Sci*. 2014;37(17), 2439-45 ; PMID: 24916422. Available from: <https://doi.org/10.1002/jssc.201400349>.
6. Tran-Lam TT, Hong MBT, Le GT, Luu PD. Auramine O in foods and spices determined by an UPLC-MS/MS method. *Food Addit Contam Part B Surveill* [Internet]. 2020;13(3):171-6 ; PMID: 32238061. Available from: <https://doi.org/10.1080/19393210.2020.1742208>.
7. Ha NT, Nu NB, Thao LP. Determination of Auramine O in animal feedstuffs using ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Tạp chí Khoa học & Công nghệ*, số 6, 2019, 53-58;.
8. Phương VL, Bình NTH, Huyền DT. Nghiên cứu xác định đồng thời một số chất màu trộn trái phép trong thực phẩm bằng sắc ký lỏng khối phổ hai lần, *Tạp chí Kiểm nghiệm và An toàn thực phẩm*, Tập 3, Số 1, 2020, 1-10 ; Available from: <https://doi.org/10.47866/2615-9252/vjfc.1765>.
9. Gagliardi L, et al. *Chromatographia*;1996, 43, 76-78 ; Available from: <https://doi.org/10.1007/BF02272825>.
10. Rejczak T, Tuzimski T. Application of High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector for Simultaneous Determination of 11 Synthetic Dyes in Selected Beverages and Foodstuffs, 2017, 10, 3572-3588 ; Available from: <https://doi.org/10.1007/s12161-017-0905-3>.
11. Brown PN, Chan M, Paley L, Betz JM. Determination of Major Phenolic Compounds in Echinacea spp. Raw Materials and Finished Products by High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection: Single-Laboratory Validation Matrix Extension, *JAOAC International*, Vol 4, 2011, 1519-1530;.

Auramine O quantitation in chicken meat and animal feedstuffs by LC – MS/MS

Le Thi Thu Trinh^{1,*}, Ho Thi Phuoc², Nguyen Anh Mai², Nguyen Phuc Thinh², Le Van Duy², Tran Thi Yen Nhi²



Use your smartphone to scan this QR code and download this article

ABSTRACT

Auramine O is a dye on the list of prohibited substances for use in food and livestock (animal feed) but is still widely used. The main objective of this study is to develop a LC-MS/MS method with high requirements of high sensitivity, accuracy and simple to provide the authorities with an effective tool to control the use of this banned substance. The target samples are animal feed, chicken meat, and chicken skin. The samples were extracted by acetic acid 1% in ACN, and then the extracts were cleaned up and concentrated using strong cation exchange cartridges (with silica as support material) before chromatographic analysis. The mobile phase was ammonium acetate 5 mM in H₂O with formic acid 0.1% in ACN. Under the optimized detection conditions, the linear range for Auramine O was 0.10 ÷ 500 ppb, and the linear correlation coefficients were found to be more than 0.998. The limit of quantification of Auramine O was 0.2 ppb. The recoveries of Auramine O ranged from 77 ÷ 99% with relative standard deviations (RSD) of 1.00 ÷ 2.10%. This method is simple, effective, sensitive, and suitable for determining and confirming Auramine O in animal feeds and other food samples.

Key words: Auramine O, SPE, SCX, LC-MS/MS, feedstuffs, chicken meat

¹National Center for Veterinary Drugs and Bio-Products Control No.2, Vietnam

²Faculty of Chemistry, University of Science, Vietnam National University Ho Chi Minh City, Vietnam

Correspondence

Le Thi Thu Trinh, National Center for Veterinary Drugs and Bio-Products Control No.2, Vietnam

Email: lettrinh88@gmail.com

History

- Received: 13-8-2022
- Accepted: 05-12-2022
- Published: 31-12-2022

DOI : 10.32508/stdjns.v6i4.1222



Copyright

© VNUHCM Press. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



Cite this article : Trinh L T T, Phuoc H T, Mai N A, Thinh N P, Duy L V, Nhi T T Y. **Auramine O quantitation in chicken meat and animal feedstuffs by LC – MS/MS.** *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.*; 2022, 6(4):2378-2388.