HỘI NGHỊ KHOA HỌC ANALYTICA VIETNAM 2022

Sàng lọc các chất ô nhiễm và các hóa chất trộn trái phép trong thực phẩm bằng sắc ký lỏng khối phổ phân giải cao (LC-HRMS)

Trần Cao Sơn

Viện Kiểm nghiệm ATVSTP Quốc gia

Nội dung

- Giới thiệu chung
- Phương pháp nghiên cứu
- Sàng lọc xác định nguyên nhân ngộ độc thực phẩm
- Sàng lọc chất trộn trái phép trong TPBVSK
- Kết luận

Ngộ độc thực phẩm

Tác nhân nào gây ngộ độc thực phẩm?

Những thách thức khi xác định tác nhân gây ngộ độc thực phẩm?

- Thực phẩm đã bị sử dụng hết
  - Dịch nôn, máu, nước tiểu… của bệnh nhân
- Máu, nước tiểu: Tác nhân gây ngộ độc có thể đã bị chuyển hóa
- Dịch nôn: Ảnh hưởng nền mẫu rất lớn
- Điều tra dịch tễ có vai trò quan trọng => đòi hỏi kiến thức về bệnh học
- Triệu chứng rất quan trọng để định hướng
  - Một triệu chứng có thể do nhiều tác nhân khác nhau

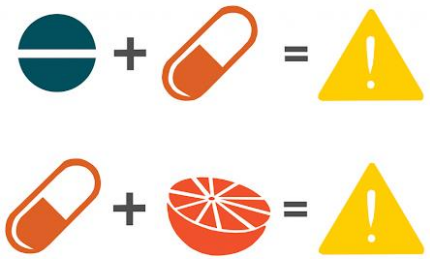
Chất trộn trái phép trong TPBVSK

Để tăng nhanh tác dụng => trộn hoạt chất tân dược

Tuy nhiên, …

Nhiều tác dụng không mong muốn

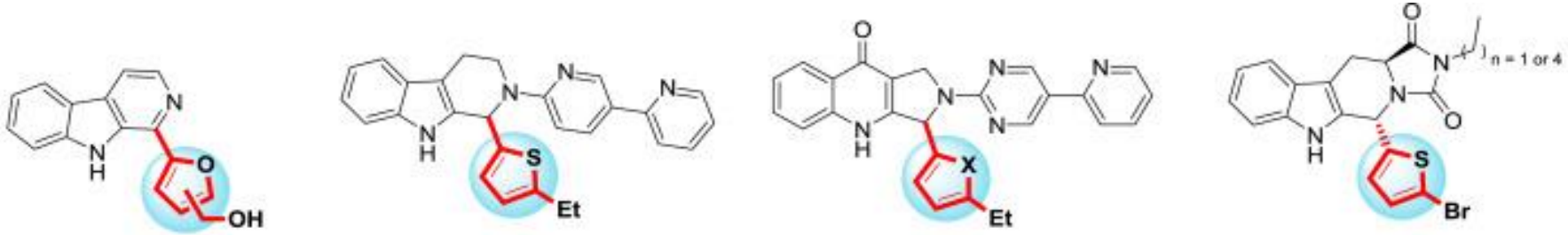
- Nhức đầu/ Chóng mặt
- Tổn thương cơ quan đích
- Tương tác thuốc – thuốc
- Rối loạn tim mạch, nội tiết, đường huyết
- Ngất, đột quỵ
- Nguy hiểm đến tính mạng



Hoạt chất tân dược nào được trộn?

Thách thức về phương pháp xác định?

Sự xuất hiện của những hoạt chất mới, giữ nguyên tác dụng của chất nguyên bản, chỉ thay đổi 1 hoặc 1 vài nhóm thế

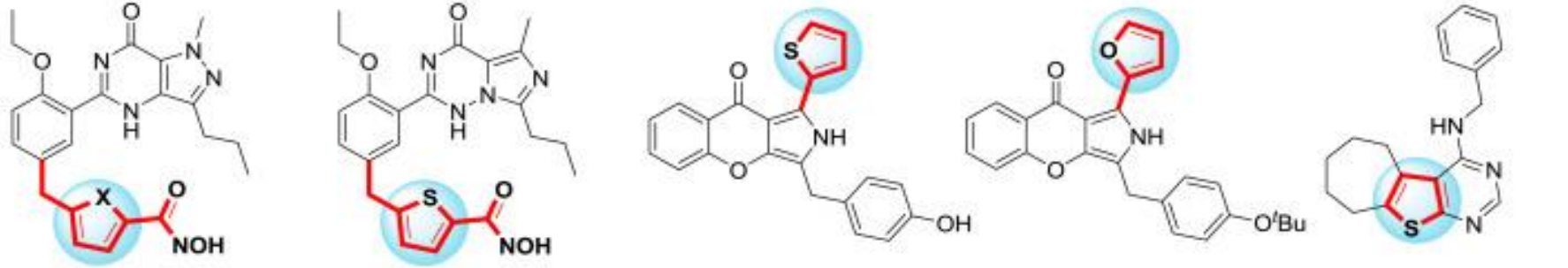


5a R = 5-hydroxymethyl, IC_{50} = 9.3 μM
5b R = 3-hydroxymethyl, IC_{50} = 4.9 μM

6 PDE 5 IC_{50} = 86 nM

7a X = S, PDE 5 IC_{50} = 0.60 nM, PDE6/5 =8-fold
7b X = O, PDE 5 IC_{50} = 0.53 nM, PDE6/5 =4-fold

8a n = 1, PDE 5 IC_{50} = 160 nM
8b n = 4, PDE 5 IC_{50} = 170 nM



9a X = O, PDE5 IC_{50} = 3 nM
9b X = S, PDE5 IC_{50} = 11 nM

10 PDE5 IC_{50} = 3 nM

11 PDE5 IC_{50} =17 nM

12 PDE5 IC_{50} =240 nM

13 PDE5 IC_{50} =190 nM

Zheng et. al. (2018). Discovery of furyl/thienyl β-carboline derivatives as potent and selective PDE5 inhibitors with excellent vasorelaxant effect

PP phân tích thông thường sẽ bỏ qua những hoạt chất mới

Các phương pháp phân tích sàng lọc?

- **Targeted analysis?**
  - Có chất X ở trong mẫu không?
  - Hàm lượng chất X là bao nhiêu?

- **Non-targeted analysis?**
  - Có chất gì trong mẫu?
  - **KNOWN UNKNOWN**
  - **UNKNOWN UNKNOWN**

Nội dung

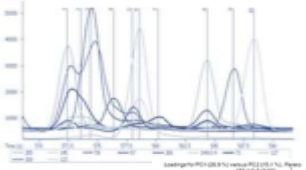
- Giới thiệu chung
- Phương pháp nghiên cứu
- Sàng lọc xác định nguyên nhân ngộ độc thực phẩm
- Sàng lọc chất trộn trái phép trong TPBVSK
- Kết luận

Phân tích sàng lọc - workflow

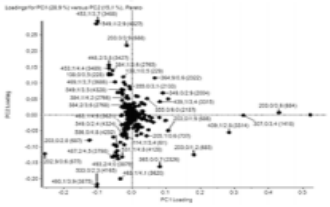
Chuẩn bị mẫu
- Đơn giản, ít hoặc không có bước làm sạch

Phân tích LC-MS
- RP/NP (HILIC)
- ESI (+/-)
- HRMS

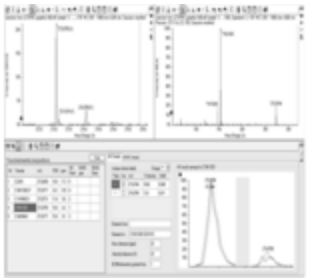
Xử lý số liệu
- Pic, khối,...
- Phần mềm



Phân tích số liệu
- Các kỹ thuật thống kê



Xác định chất
- Thư viện
- Các kỹ thuật khác
- Chất chuẩn



Chuẩn bị mẫu

Mẫu đồng nhất (5 g)
+ 10 mL MeOH:H_2O (1:1)
Trộn đều, ly tâm
+ 5 mL Hexane
Trộn đều, ly tâm
Loại lớp Hexane
Lọc qua màng 0,22 µm
LC-HRMS

Các hoạt chất tân dược
Phụ gia thực phẩm

Mẫu đồng nhất (5 g)
+ 25 mL EtOAc
Trộn đều, siêu âm
Cô chân không EtOAc đến cạn
+ 2 mL MeOH
Trộn, chuyển ống 15 mL
+ 2 mL Hexane
Ly tâm, lọc qua màng 0,22 µm
LC-HRMS

Các hợp chất tự nhiên

Mẫu đồng nhất (5)
+ 5 mL H2O
+ 10 mL MeCN
Vortex
+ 4 g $MgSO_4$
+ 1 g NaCl
Vortex, ly tâm. Hút 1 mL.
+ 150 mg $MgSO_4$
+ 50 mg C18
Ly tâm, lọc qua màng 0,22 µm
LC-HRMS

Hóa chất bảo vệ thực vật

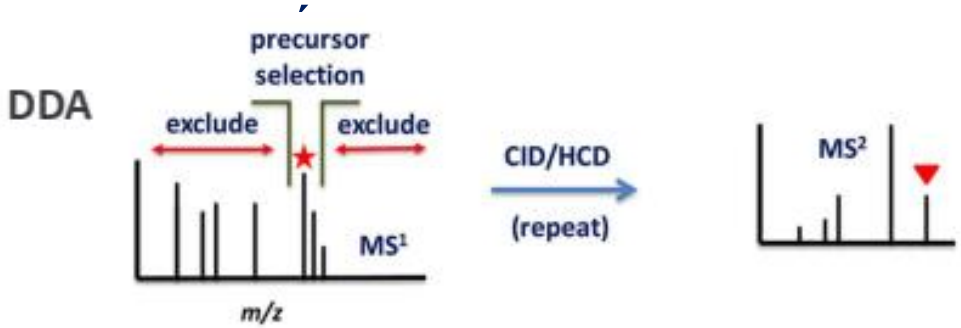
Điều kiện sắc ký

Thông số	RP	HILIC
Cột	Acquity UPLC BEH C18 (50 x 2,1 mm ID, 1,7µm)	Acquity UPLC BEH HILIC (50 x 2,1 mm ID, 1,7 µm)
Nhiệt độ cột	40°C	
Tốc độ dòng	0,3 mL/phút	
Pha động A	10 mM amoni format, 0.1 % of acid formic trong H2O	
Pha động B	10 mM amoni format trong MeOH:MeCN (1:1)	

Time (min)	C18		HILIC	
	A (%)	B (%)	A (%)	B (%)
0	98	2	2	98
1	98	2	2	98
12	40	60	60	40
20	5	95	95	5
22	5	95	95	5
23	98	2	2	98
25	98	2	2	98

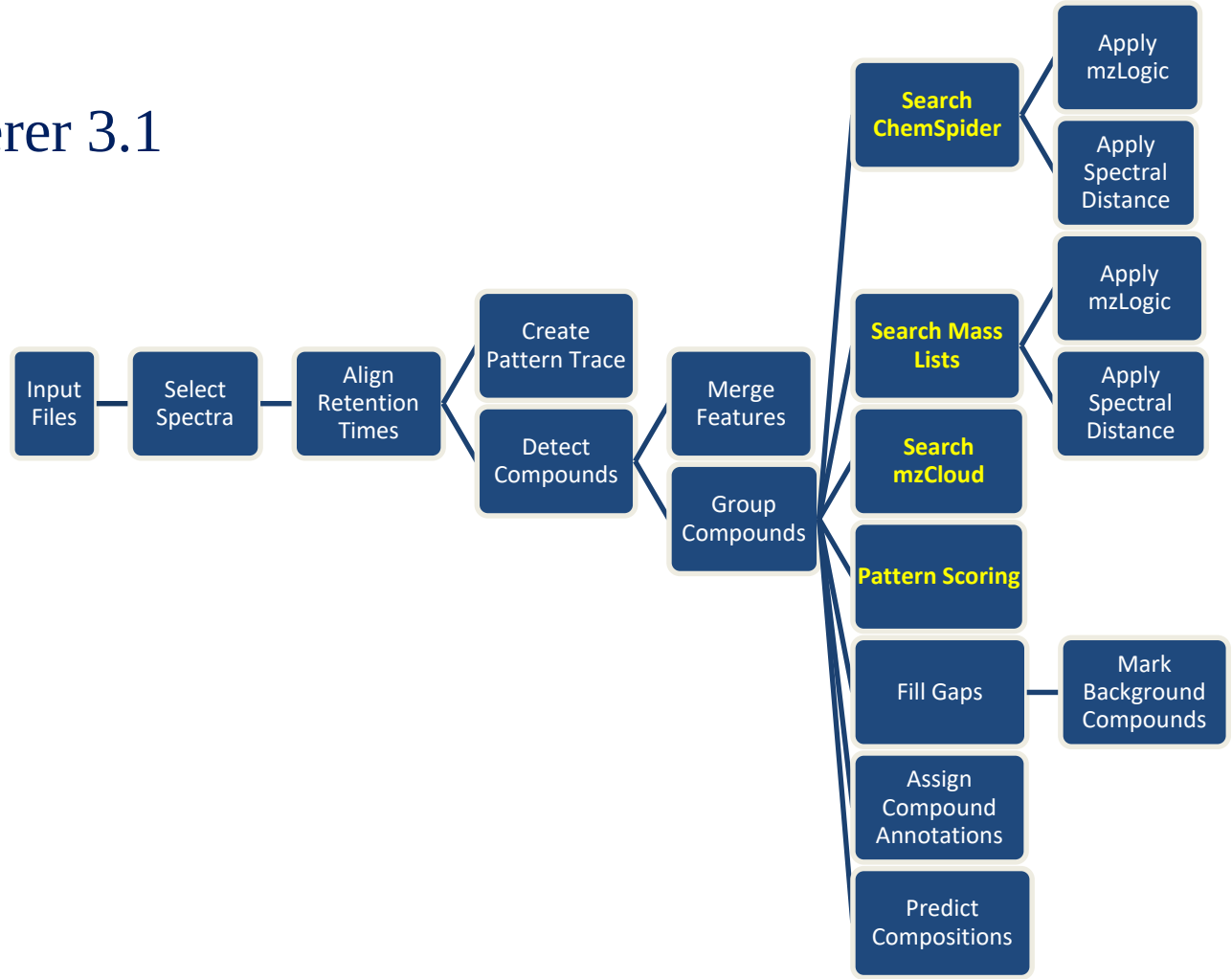
Điều kiện HRMS

- Khối phổ: Q-Exactive (Thermo Scientific)
- Nguồn: HESI (+) và (-)
- Chế độ full MS–dd-MS/MS
  - Full MS: 200 – 2000 m/z; độ phân giải 70.000 FWHM
  - dd-MS/MS: độ phân giải 17.500 FWHM
  - Thế phân mảnh: NCE 40%, 70%, 100%
  - Độ c

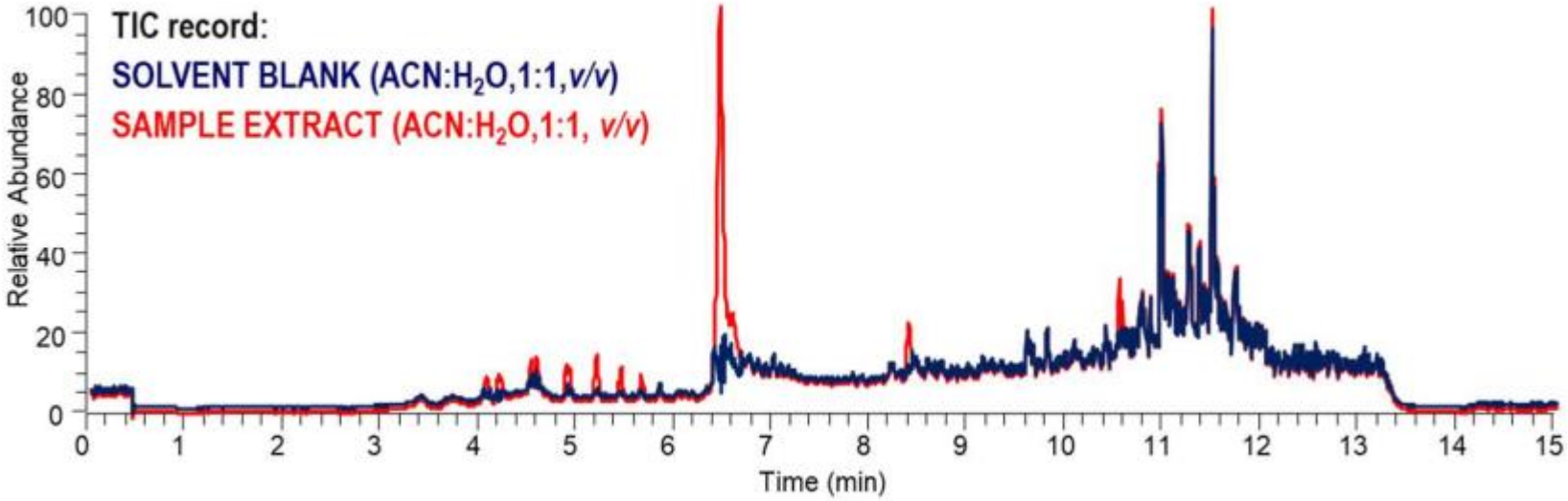


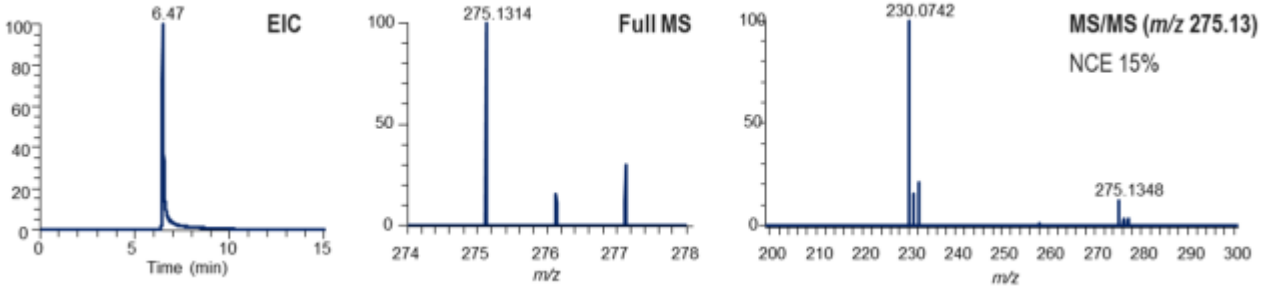
Xử lý và phân tích số liệu

- Phần mềm
  - Compound Discoverer 3.1
  - Trace Finder 4.1

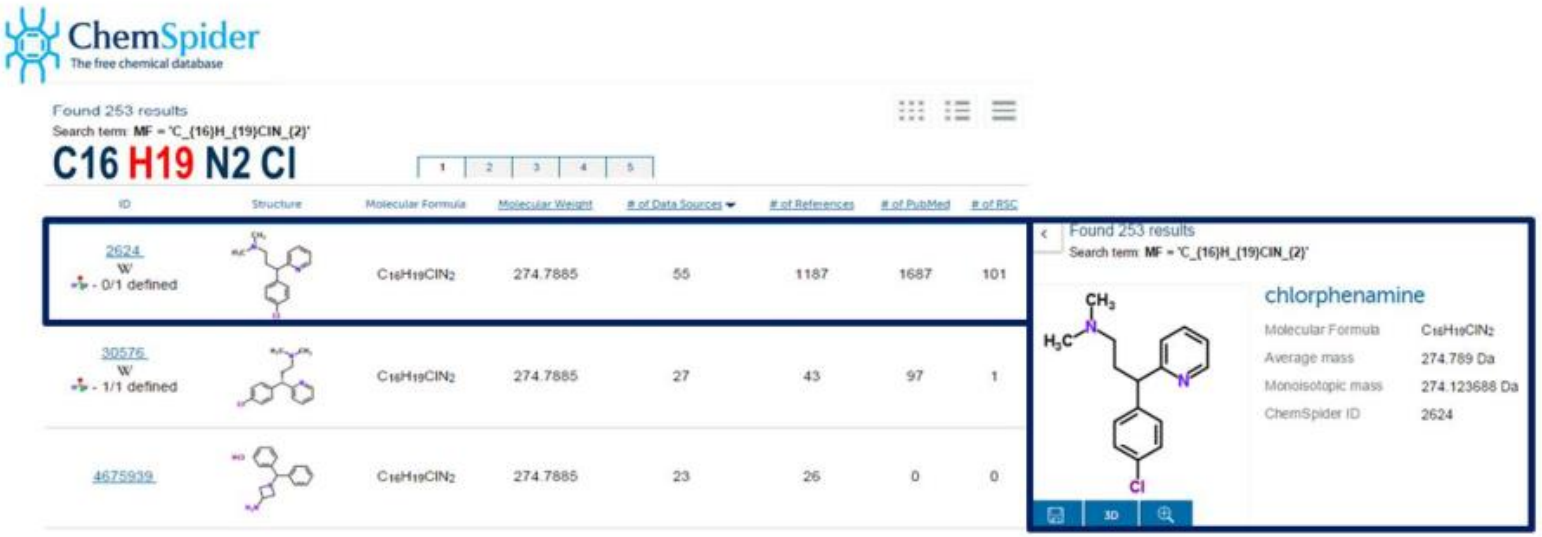


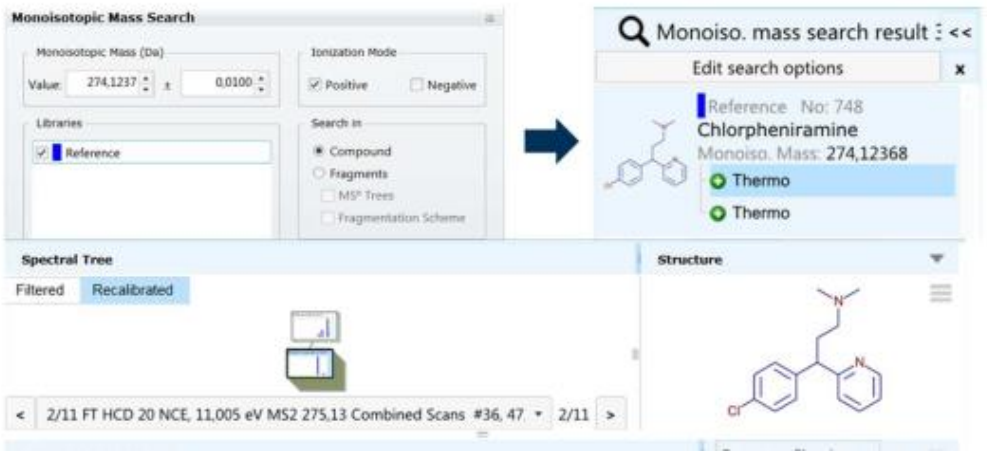
Mẫu nền


TIC record:
SOLVENT BLANK (ACN:H2O,1:1,v/v)
SAMPLE EXTRACT (ACN:H2O,1:1, v/v)
Relative Abundance
Time (min)

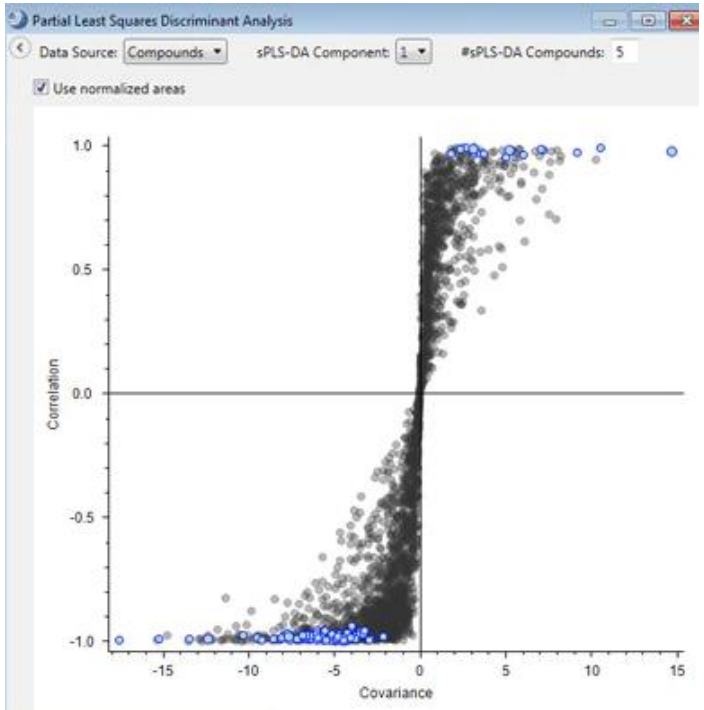

6.47
EIC
Time (min)
275.1314
Full MS
m/z
230.0742
MS/MS (m/z 275.13)
NCE 15%
275.1348
m/z

Chemspider và mzCloud





Thuật toán thống kê



Nội dung

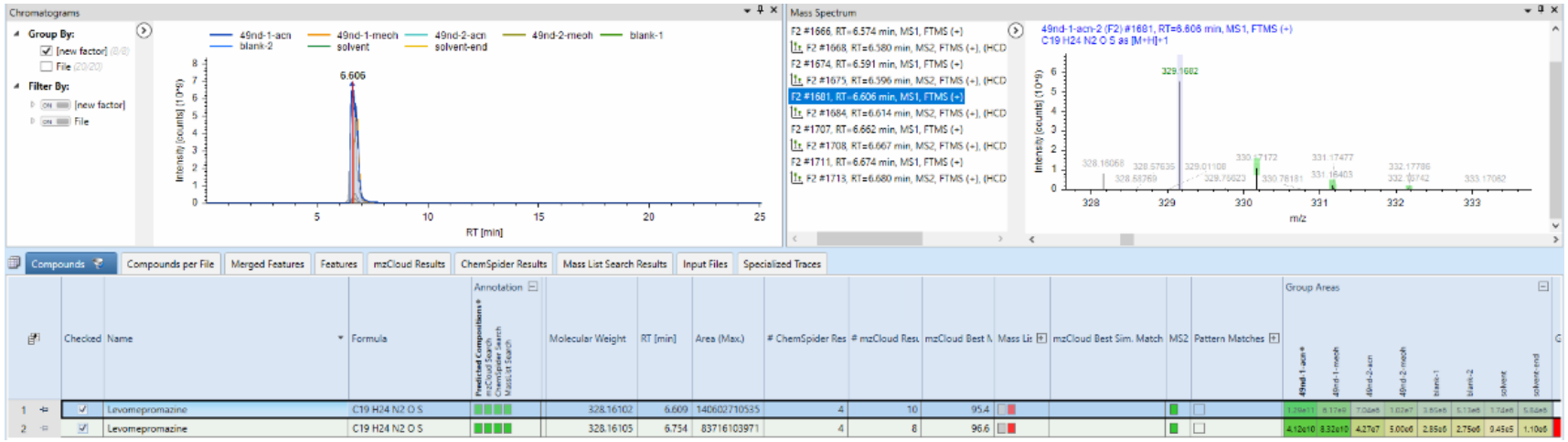
- Giới thiệu chung
- Phương pháp nghiên cứu
- Sàng lọc xác định nguyên nhân ngộ độc thực phẩm
- Sàng lọc chất trộn trái phép trong TPBVSK
- Kết luận

Một số vụ ngộ độc giai đoạn 2020-2021

Nền mẫu	Địa điểm	Triệu chứng	Chuẩn bị mẫu	Điều kiện LC-HR/MS	Chất phát hiện
Rượu ngâm	Nghe An (09/2020)	Tan máu	Quy trình 1 + 2	C18, positive, negative HILIC, positive, negative	Pyrogallol
Cháo gà	Vinh Phuc (09/2020)	Ngất xỉu, hôn mê, yếu cơ	Quy trình 1	C18, positive	Levomepromazine
Nấm rừng	Son La (02/2021, 03/2021)	Tử vong	Quy trình 2	C18, positive	Amanitin
Canh rau rừng	Nghe An (03/2021)	Tử vong	Quy trình 2	C18, positive	Gelsemium alkaloids
Canh rau rừng	Lang Son (04/2021)	Tử vong	Quy trình 1 + 2 + 3	C18, positive, negative HILIC, positive, negative	Gelsemium alkaloids
Rau rừng	Tuyen Quang (08/2021)	Tử vong	Quy trình 2	C18, positive	Gelsemium alkaloids
Bò hầm rượu vang	Hanoi (08/2021)	Thiếu máu cấp tính	Quy trình 1	C18, positive	C.I. Acid Orange 7 parent
Nấm rừng	Son La (09/2021)	Ảo giác	Quy trình 2	C18, positive	Psilocybin Psilocin
Rau hầm	Lao Cai (10/2021)	Đau họng, buồn nôn, nôn	Quy trình 2	C18, positive	Dioscorea alkaloids
Quả dại	Ha Giang (09/2021)	Đau bụng, tiêu chảy, buồn nôn, nôn, tiêu chảy	Quy trình 2	C18, positive, negative HILIC, positive, negative	Delavaya toxocarpa Phorbol esters
Cá nướng	Tuyen Quang (10/2021)	Dị ứng	Quy trình 1 + 2	C18, positive, negative HILIC, positive, negative	Histamine
Quả dại	Lao Cai (10/2021)	Tử vong	Quy trình 2	C18, positive, negative HILIC, positive, negative	Capparis alkaloids

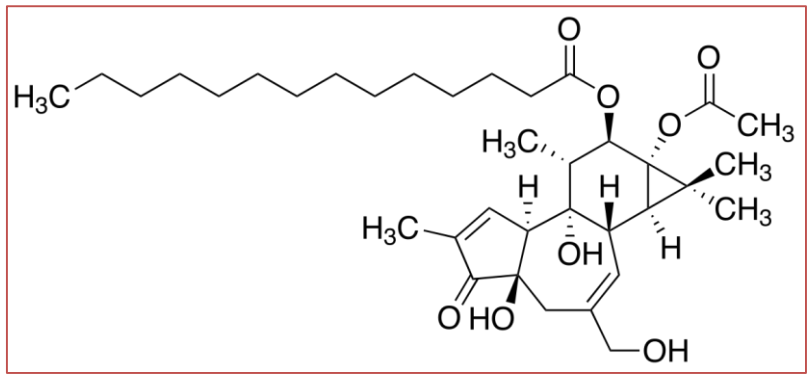
VD: Case ngộ độc thực phẩm

- Vĩnh Phúc 9/2020
- 15 người, ăn cháo gà và gà nướng vào buổi tối
- Triệu chứng: Nhức đầu, đau cơ, lỏng lẻo cơ, mệt mỏi
- Phát hiện: Levopromazine trong mẫu cháo gà



VD: Case ngộ độc thực phẩm

- Hà Giang, 09/2021
- 4 trẻ em (11 tuổi) ăn
- Triệu chứng: Đau đầu, chóng mặt, buồn nôn, nôn, đi ngoài
- Phát hiện: Phorbol ester
- Cây: Mắc rạc, dầu chòng

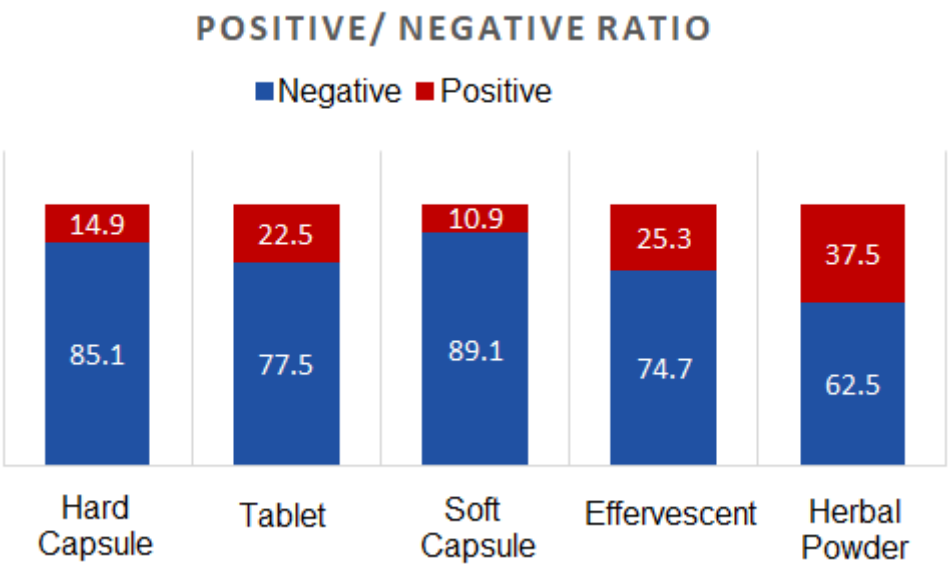


Nội dung

- Giới thiệu chung
- Phương pháp nghiên cứu
- Sàng lọc xác định nguyên nhân ngộ độc thực phẩm
- Sàng lọc chất trộn trái phép trong TPBVSK
- Kết luận

Sàng lọc chủ đích (known unknown)

518 mẫu



25 hợp chất PDE-5i

BỘ Y TẾ

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

Số: 10 /2021/TT-BYT

Hà Nội, ngày 30 tháng 6 năm 2021

THÔNG TƯ
Quy định Danh mục chất cấm sử dụng trong sản xuất, kinh doanh thực phẩm bảo vệ sức khỏe

BỘ Y TẾ

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

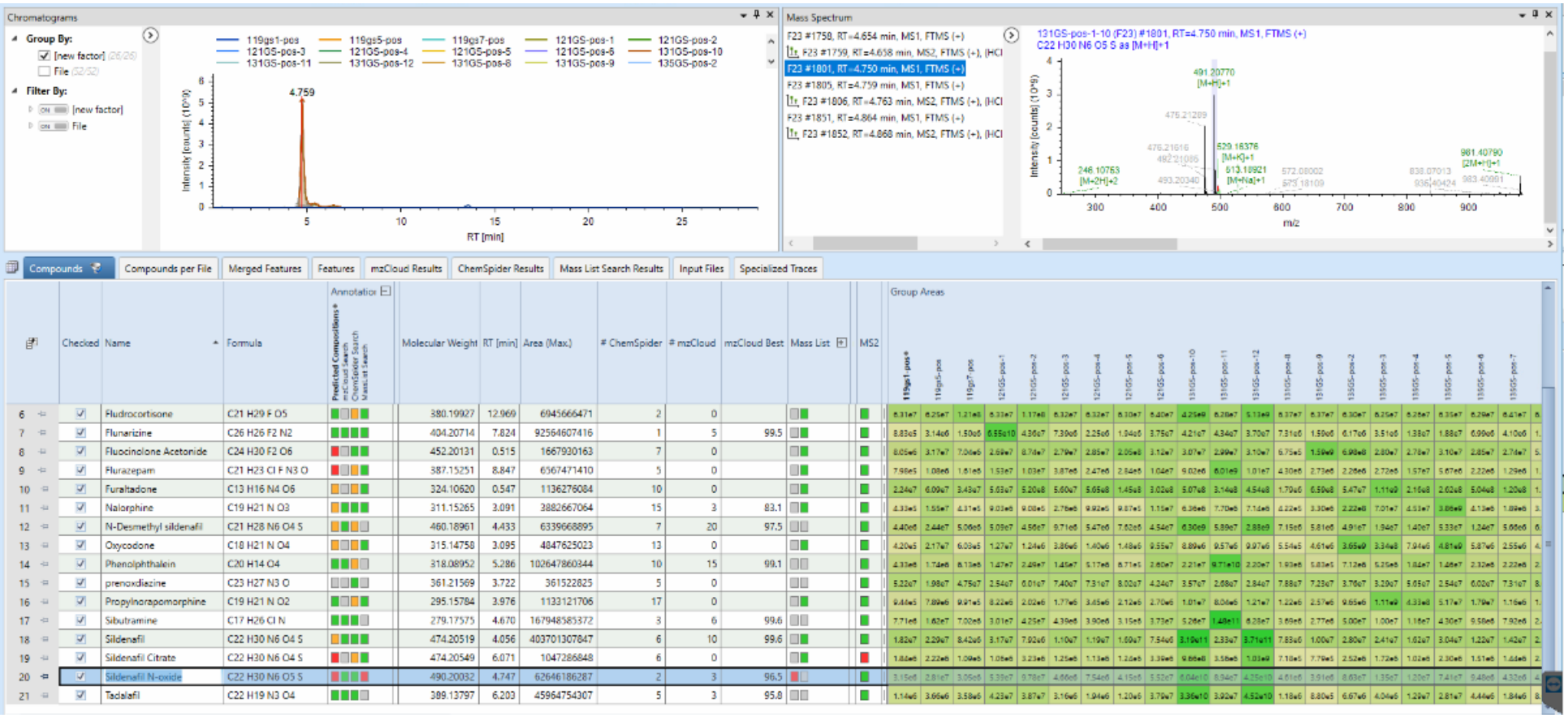
PHỤ LỤC
DANH MỤC CÁC CHẤT
(Ban hành kèm theo Thông tư số 10/2021/TT-BYT ngày 30 tháng 6 năm 2021)

STT	Tên chất	Tên khoa học
1	1-3-dimethylamylamine	4-methylhexan-2-amine
2	Aildenafil	5-[5-[(3S,5R)-3,5-dimethylpiperazin-1-yl]sulfonyl-2-ethoxyphenyl]-1-methyl-3-propyl-6H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-7-one
3	Aminotadalafil	(2R,8R)-6-amino-2-(1,3-benzodioxol-5-yl)-3,6,17-dodecahydrocyclopenta[a]phenanthren-3-one
77	Thioaidenafil	5-[5-[(3S,5R)-3,5-dimethylpiperazin-1-yl]sulfonyl-2-ethoxyphenyl]-1-methyl-3-propyl-6H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidine-7-thione
78	Thiosildenafil	5-[2-ethoxy-5-(4-methylpiperazin-1-yl)sulfonylphenyl]-1-methyl-3-propyl-6H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidine-7-thione
79	Triamcinolone	9α -Fluoro-11β,16α,17α,21-tetrahydroxypregna-1,4-diene-3,20-dione
80	Vardenafil	1-{[3-(3,4-Dihydro-5-methyl-4-oxo-7-propylimidazo[5,1-f]-as-triazin-2-yl)-4-ethoxyphenyl]sulfonyl}-4-ethylpiperazine

KT. BỘ TRƯỞNG
THỨ TRƯỞNG

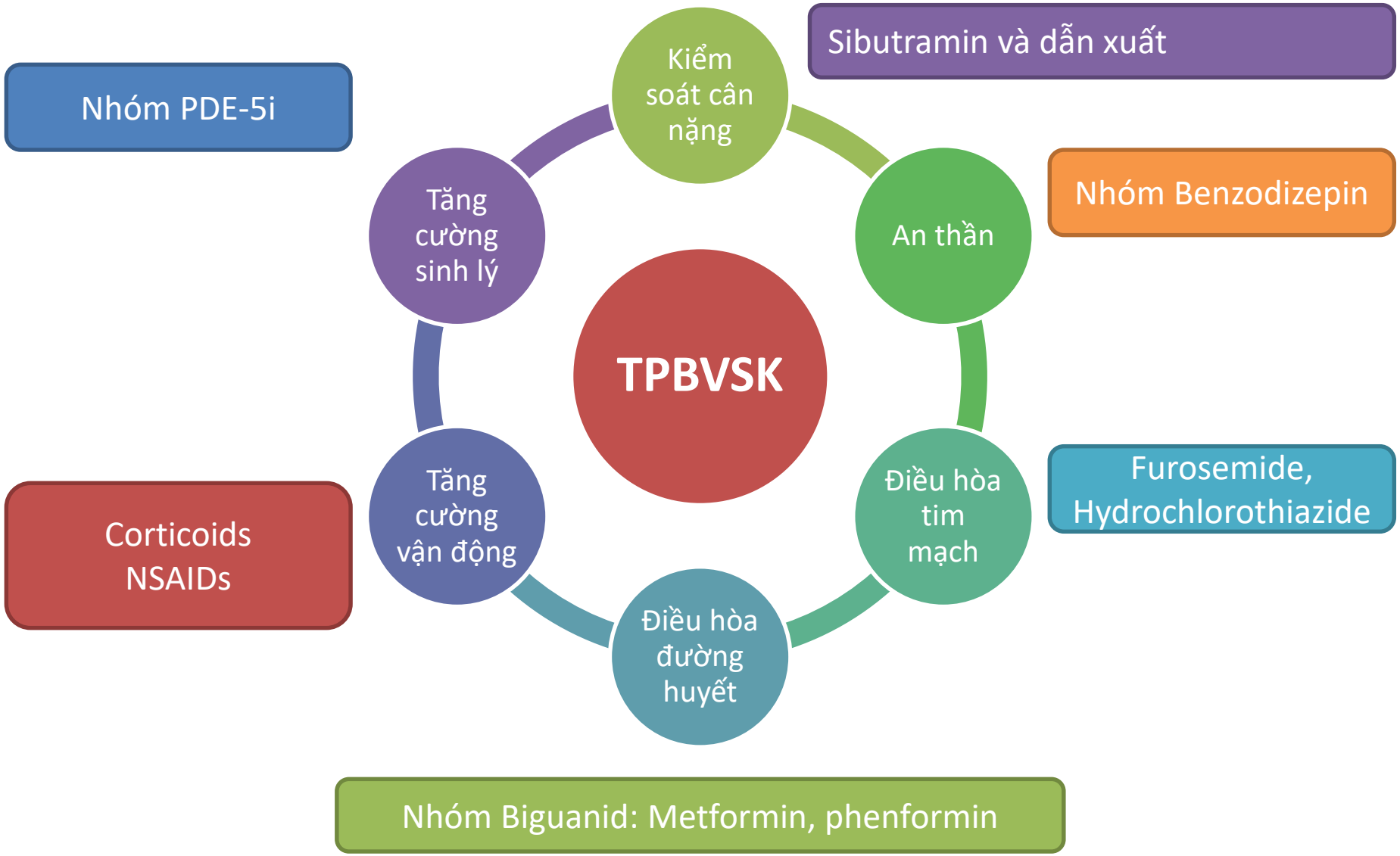
Trương Quốc Cường

Ví dụ: Nhóm PDE-5i



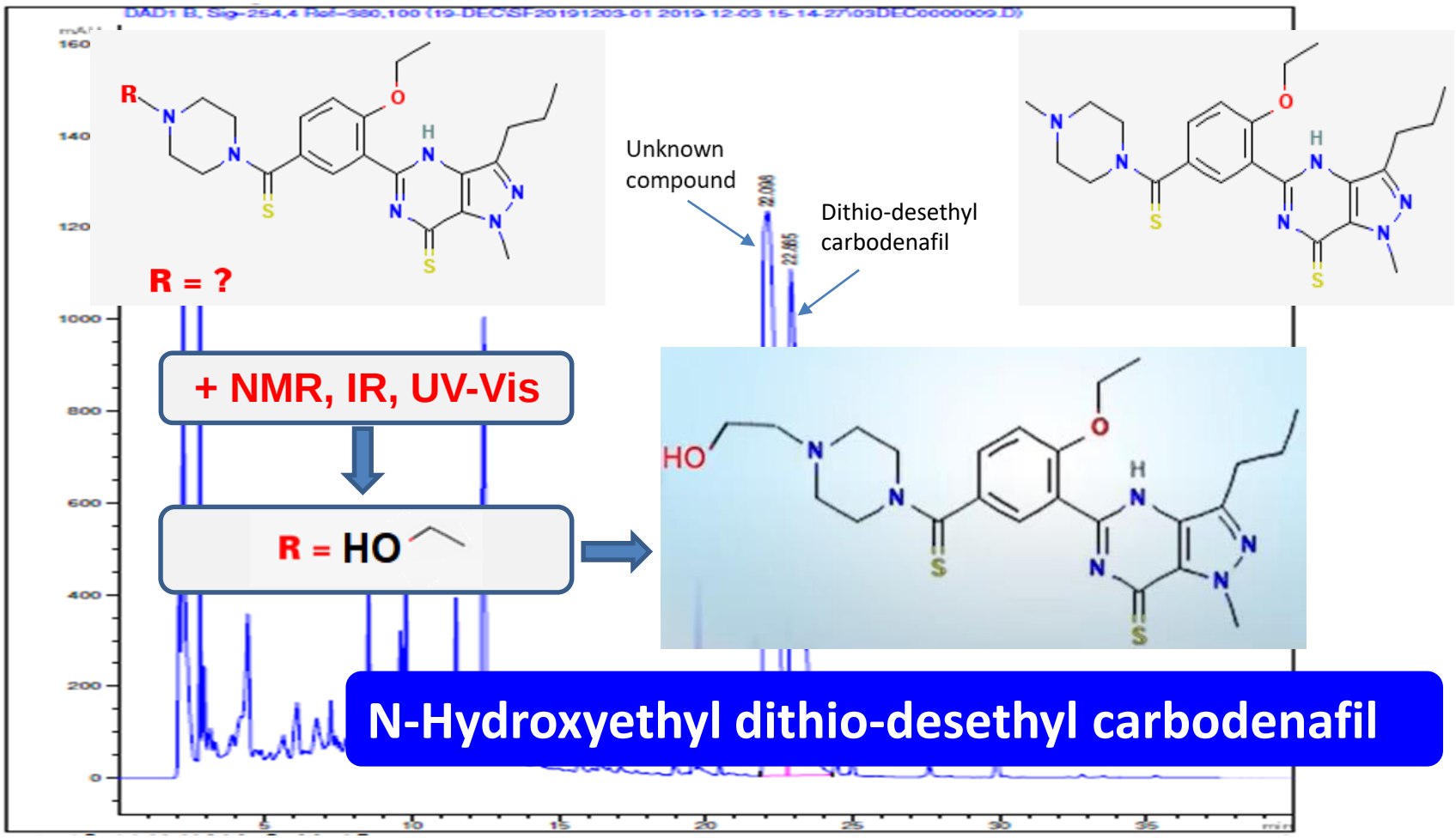
Phát hiện Sildenafil-N-oxide trong mẫu TPBVSK

Chất trộn trái phép trong TPBVSK



Sàng lọc không chủ đích (unknown unknown)

Xác định cấu trúc **01 hợp chất PDE-5i hoàn toàn mới**



N-Hydroxyethyl dithio-desethyl carbodenafil

Nội dung

- Giới thiệu chung
- Phương pháp nghiên cứu
- Sàng lọc xác định nguyên nhân ngộ độc thực phẩm
- Sàng lọc chất trộn trái phép trong TPBVSK
- Kết luận

Kết luận

- LC-HRMS đã hỗ trợ cho việc xác định tác nhân gây ngộ độc thực phẩm

  ⇒ góp phần tìm hướng điều trị phù hợp nhất

  ⇒ cảnh báo đến người dân

- LC-HRMS là công cụ hiệu quả để xác định các hợp chất trộn trái phép trong TPBVSK
  - Tuy nhiên, để xác định chất chưa biết cần dựa trên nhiều kỹ thuật phổ khác nhau
- LC-HRMS có thể được ứng dụng rộng rãi hơn trong sàng lọc các hóa chất nhằm kiểm soát ATTP

HỘI NGHỊ KHOA HỌC ANALYTICA VIETNAM 2022

Thank you for your attention!