

| | | |
|--|----------------------------|--|
| CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ | HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC | Mã số: HD.TN.025 Lần ban hành: 04 Ngày ban hành: 04/04/2018 Trang: 1/8 |
|--|----------------------------|--|

**ĐỊNH LƯỢNG DƯ LƯỢNG HÓCMON TĂNG TRƯỞNG Beta-
AGONIST (SALBUTAMOL, CLENBUTEROL và RACTOPAMINE)
TRONG THỊT GIA SÚC, GIA CẦM, NƯỚC TIỂU GIA SÚC và
TẮCN BẰNG SẮC KÝ LỎNG GHÉP ĐẦU DÒ KHỐI PHỔ BA TỬ
CỰC (LC/MS/MS)**

| Nhân viên biên soạn | Nhân viên xem xét | Nhân viên phê duyệt |
|---------------------|-------------------|-----------------------|
| Nguyễn Văn Lên | Trần Thái Vũ | Trịnh Thị Minh Nguyệt |

THEO DÕI SỬA ĐỔI TÀI LIỆU

| STT | Vị trí | Nội dung sửa đổi | Ngày sửa đổi |
|-----|--------|--------------------------------|--------------|
| 01 | | Thay đổi Header | 04/01/2017 |
| 02 | IV.1 | Thay đổi phương pháp chiết mẫu | 04/04/2018 |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |

| | | |
|--|----------------------------|--|
| CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ | HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC | Mã số: HD.TN.025 Lần ban hành: 04 Ngày ban hành: 04/04/2018 Trang: 2/8 |
|--|----------------------------|--|

A. GIỚI THIỆU

I. Phạm vi áp dụng

- Phương pháp này được áp dụng để xác định Salbutamol, Clenbuterol và Ractopamine trong thực phẩm, TĂCN bằng sắc kí lỏng ghép đầu dò khối phổ ba tứ cực (gọi tắt là LC/MS/MS).

II. Tài liệu tham khảo

CLG – AGON 1.08

III. Nguyên tắc

Mẫu được chiết lên Acetonitrille, sau đó cô quay và định mức lại trong pha động.

IV. An toàn phòng thử nghiệm

- Các phương pháp an toàn phòng thí nghiệm cần phải được thực hiện nghiêm ngặt như sử dụng áo blouse, tủ hút, găng tay, khẩu trang, kính bảo hộ lao động khi thực hiện thí nghiệm.
- Các hoá chất thải phải được thu gom vào các bình chứa riêng biệt, cụ thể và có dán nhãn nhận biết.

B. PHÂN TÍCH

I. Thiết bị và dụng cụ

1. Thiết bị

- Cân phân tích, độ chính xác 0,1 mg.
- Máy ly tâm
- Máy Vortex.
- Máy siêu âm.
- Bộ chiết SPE.
- Bộ lọc dung môi tương thích với màng lọc 0.45µm
- Màng lọc PTFE, 13mm, 0,45µm
- Ống ly tâm 50mL, polypropylen, có nắp đậy
- Bình định mức (CCX A): 10, 50mL
- Pipet vạch (CCX A): 0.5mL, 1mL, 2mL, 5mL.
- Pipet bầu (CCX A): 1mL, 2mL, 5mL
- Dụng cụ thủy tinh các loại: ống Hatch, becher, ...

2. Hệ thống LC/MS/MS

- Hệ thống sắc kí lỏng: Hệ thống LC/MS/MS bao gồm Accela 1250 pump, Autosampler Accela và đầu dò khối phổ 3 tứ cực TSQ Quantum Ultra (Thermal Finigan).
- Cột sắc kí lỏng pha đảo C₁₈: Cột Agilent XDB C18, 5µm- 4.6 x 150mm hoặc tương đương.

| | | |
|--|----------------------------|--|
| CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ | HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC | Mã số: HD.TN.025 Lần ban hành: 04 Ngày ban hành: 04/04/2018 Trang: 3/8 |
|--|----------------------------|--|

II. Hóa chất và dung dịch hóa chất

1. Hóa chất

- Nước cất 2 lần khử ion
- Methanol (MeOH), p.a và HPLC
- HCOOH, Merck
- Acetonitrile (ACS)
- NaCl
- Trisodium Citrate dihydrate
- Disodium hydrogencitrate sesquihydrate

2. Dung dịch thử

- Dung dịch pha động
 - o (A): Thêm 1ml HCOOH vào 1L MeOH; đánh siêu âm 15 phút để loại bọt khí.
 - o (B): Thêm 1ml HCOOH vào 1L H₂O; đánh siêu âm 15 phút để loại bọt khí.
- Dung dịch Acetonitril 5% formic acid: Hòa tan 50ml formic acid trong 1L acetonitrile.

3. Chất chuẩn

a. Thông tin về chất chuẩn

- Salbutamol sulfate, Dr. Ehrenstofer hoặc tương đương.
- Clenbuterol hydrochloride, Dr.Ehrenstofer hoặc tương đương.
- Ractopamine hydrochloride, Dr.Ehrenstofer hoặc tương đương.
- Salbutamol-d₃, Dr.Ehrenstofer hoặc tương đương.
- Clenbuterol-d₉, Dr.Ehrenstofer hoặc tương đương.
- Ractopamine d₆, Dr.Ehrenstofer hoặc tương đương.

b. Dung dịch chuẩn gốc

- Dung dịch chuẩn gốc

Nồng độ chuẩn gốc được tính theo công thức sau:

$$✓ \text{ Salbutamol: } C_{\text{Salbutamol}} = \frac{m \times 239.311}{288.4} \times \frac{1000}{V} \times \text{pure}$$

$$✓ \text{ Clenbuterol: } C_{\text{Clenbuterol}} = \frac{m \times 277.19}{313.65} \times \frac{1000}{V} \times \text{pure}$$

$$✓ \text{ Ractopamine: } C_{\text{Ractopamine}} = \frac{m \times 301.38}{337.8} \times \frac{1000}{V} \times \text{pure}$$

Trong đó: m: khối lượng chuẩn rắn (mg)

Pure: Độ tinh khiết của chuẩn.

- Cách pha dung dịch chuẩn gốc:

o Tiến hành kiểm tra cân trước khi cân chuẩn. Cân chuẩn bằng cân HV.023.H

🌈 Salbutamol: Cân **12.2mg** chất chuẩn rắn Salbutamol sulfate vào bình định mức

10ml, định mức tới vạch bằng methanol. Ta được dung dịch chuẩn có nồng độ như sau:

$$C_{Salbutamol} = \frac{12.2 \times 239.311}{288.4} \times \frac{1000}{10} \times 0.99 = 1002.22 (mg / L)$$

🌈 Clenbuterol: Cân **11.5mg** chất chuẩn rắn Clenbuterol hydrochloride vào bình định mức 10ml, định mức tới vạch bằng methanol. Ta được dung dịch chuẩn gốc có nồng độ như sau:

$$C_{Clenbuterol} = \frac{11.5 \times 277.19}{313.65} \times \frac{1000}{10} \times 0.985 = 1001.07 (mg / L)$$

🌈 Ractopamine: Cân **11.5mg** chất chuẩn rắn Ractopamine hydrochloride vào bình định mức 10 ml, định mức đến vạch bằng methanol. Ta được dung dịch chuẩn gốc có nồng độ như sau:

$$C_{Ractopamine} = \frac{11.5 \times 301.38}{337.8} \times \frac{1000}{10} \times 0.98 = 1005.49 (mg / L)$$

🌈 Hỗn hợp nội chuẩn (200 µg/L): Lấy 0.1mL của dung dịch nội chuẩn Salbutamol-d3 (100mg/L), 0.2mL Ractopamine d6 (100ppm) và 0.1mL của dung dịch nội chuẩn Clenbuterol-d9 (100mg/L) vào bình định mức 50mL và định mức đến vạch bằng MeOH:H₂O=10:90.

c. Dung dịch chuẩn trung gian

- Hỗn hợp chuẩn trung gian 40mg/L: Lấy 1ml từ mỗi dung dịch chuẩn gốc định mức lên 25ml được hỗn hợp chuẩn trung gian 40mg/L.
- Hỗn hợp chuẩn trung gian 2mg/L: Lấy 0.5ml từ hỗn hợp chuẩn trung gian 40mg/L vào bình định mức 10mL và định mức đến vạch bằng MeOH.
- Hỗn hợp chuẩn trung gian 200µg/L: Lấy 1mL từ hỗn hợp chuẩn 2mg/L vào bình định mức 10mL và định mức đến vạch bằng MeOH:H₂O=10:90.
- Hỗn hợp chuẩn trung gian 20µg/L: Lấy 1.0mL từ hỗn hợp chuẩn 200µg/L vào bình định mức 10mL và định mức đến vạch bằng MeOH:H₂O=10:90.
- Lưu ý:* Vì khối lượng cân chuẩn có thể giao động. Vì vậy nhân viên pha chuẩn phải tính lại nồng độ chuẩn dựa trên khối lượng chuẩn thực cân. Nhưng các chuẩn trung gian phải pha đúng nồng độ như trên.

d. Dung dịch chuẩn làm việc

- Pha dãy dung dịch chuẩn làm việc như sau:

| Dãy chuẩn được pha từ dung dịch chuẩn 20 (µg/L) | | | | | |
|---|------------------------------|--------------------------|---------------------|-----------------------|----------------------|
| No. | V _{Rút chuẩn} mL | V _{Định mức} mL | IS (mL) | C ₀ (µg/L) | Dụng cụ pha chuẩn |
| Std 01 | 0.05 | 10.0 | 0.05ml IS 200ppb | 0.1 | Micropipete 200µL |
| Std 02 | 0.1 | | | 0.2 | |
| Std 03 | 0.20 | | | 0.4 | |
| Std 04 | 0.5 | | | 1.0 | Pipet 2ml |

| | | |
|--|----------------------------|--|
| CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ | HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC | Mã số: HD.TN.025 Lần ban hành: 04 Ngày ban hành: 04/04/2018 Trang: 5/8 |
|--|----------------------------|--|

| | | | | | |
|--------|---|--|--|-----|--|
| Std 05 | 1 | | | 2.0 | |
| Std 06 | 2 | | | 4.0 | |

III. Thực hiện QA/QC.

- Trong mỗi đợt phân tích, nhân viên phân tích phải thực hiện các mẫu sau để đảm bảo QA/QC.
 - Blank thuốc thử.
 - Blank matrix
 - QC trên nền mẫu tương ứng.
 - Thực hiện xử lý mẫu giống B.IV

IV. Phân tích mẫu.

1. Xử lý mẫu

- Cân khoảng m (g) [thịt, sản phẩm thịt: 5g; TĂCN: 2g; Nước tiểu: 5mL] mẫu cho vào ống ly tâm, thêm vào 0.05mL nội chuẩn 200ppb (Clen-d9, sal-d3), vortex đều, thêm 5ml nước cất, 0.5mL NH₄OH lắc mạnh cho mẫu đồng nhất, thêm vào 10mL Acetonitrile, lắc mạnh trong 2 phút, thêm vào hỗn hợp muối (4g MgSO₄ + 1g Na₂SO₄) lắc mạnh trong 2 phút. Sau đó ly tâm ở 3500vòng/ phút trong 10 phút, hút 2mL lớp trên vào ống ly tâm 15ml có chứa 0.3g MgSO₄ + 0.05g bột C18 + 0.05g PSA, vortex trong 1 phút, ly tâm 3000 vòng/ phút. Hút 1mL dung dịch cho vào bình cầu nhỏ và cô quay chân không đến cạn. Định mức bằng 1mL (V₃) pha động, vortex đều, lọc qua màng lọc 0.45µm vào vial.

2. Phân tích trên LC /MS/MS

- Điều kiện máy LC

o Điều kiện cho bơm

Chương trình gradient dung môi theo thời gian

| Thời gian | MeOH(0.1%HCOOH) | H2O(0.1%HCOOH) | Tốc độ dòng, mL/phút |
|-----------|-----------------|----------------|----------------------|
| 0 | 10 | 90 | |
| 1 | 10 | 90 | |
| 2 | 70 | 30 | |
| 4.5 | 70 | 30 | 0.4 |
| 5 | 10 | 90 | |
| 6 | 10 | 90 | |

o Điều kiện cho hệ thống tiêm mẫu tự động

- Injection type: Full loop
- Injection volume: 20µl
- Needle height from bottom: 0.5
- Flush volume: 100µl

| | | |
|--|----------------------------|--|
| CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ | HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC | Mã số: HD.TN.025 Lần ban hành: 04 Ngày ban hành: 04/04/2018 Trang: 6/8 |
|--|----------------------------|--|

- Tray temp control: off
- Column oven control: off
- Điều kiện MS
 - o Q2 gas pressure: 1.2mT
 - o Ion source : H-ESI
 - o Polarity: positive
 - o Scan type: SRM
 - o Capillary temp: 350°C
 - o ESI spray voltage: 3000V.
 - o Sheath gas: 40
 - o Aux gas : 0

| Parent | Center mass | Width | Scan time | Collision Energy |
|--------|-------------|-------|-----------|------------------|
| 239.82 | 165.77 | 0.5 | 0.05 | 24 |
| 239.82 | 147.86 | | | 28 |
| 242.86 | 150.89 | | | 28 |
| 242.86 | 168.86 | | | 22 |
| 301.84 | 107 | | | 18 |
| 301.84 | 163.91 | | | 22 |
| 276.73 | 132 | | | 18 |
| 276.73 | 202.9 | | | 26 |
| 285.83 | 267.8 | | | 20 |
| 285.83 | 203.8 | | | 26 |
| 308 | 168 | | | 20 |
| 308 | 290 | | | 20 |

3. Trình tự tiêm mẫu

- Pha động
- Các dung dịch chuẩn làm việc, từ nồng độ thấp đến cao
- Pha động
- Mẫu blank

| | | |
|--|----------------------------|--|
| CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ | HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC | Mã số: HD.TN.025 Lần ban hành: 04 Ngày ban hành: 04/04/2018 Trang: 7/8 |
|--|----------------------------|--|

- Mẫu cần phân tích
- Chuẩn check

Chú ý: Khi phân tích mẫu hàng loạt, tiêm xen kẽ một chuẩn và pha động sau khi phân tích chuỗi 5 mẫu và kết thúc bằng một dung dịch chuẩn.

C. TÍNH KẾT QUẢ

- Xây dựng đường chuẩn biểu thị mối quan hệ giữa tỉ lệ của diện tích pic ion định lượng và diện tích pic ion định lượng của nội chuẩn so với nồng độ các chất chuẩn tương ứng. Kết quả chất cần phân tích trong mẫu được tính toán thông qua tỉ lệ diện tích pic.

| Chất phân tích | Ion chính | Ion định lượng | Ion xác nhận |
|----------------|-----------|----------------|--------------|
| Salbutamol | 239.82 | 147.86 | 165.77 |
| Salbutamol-d3 | 242.86 | 150.89 | 168.86 |
| Ractopamine | 301.84 | 163.91 | 107 |
| Ractopamine d6 | 308 | 168 | 290 |
| Clenbuterol | 276.73 | 202.9 | 132 |
| Clenbuterol-d9 | 285.83 | 203.8 | 267.8 |

$$C = \frac{C_o * V_1 * V_3}{V_2 * m}$$

Trong đó:

- o C: nồng độ Salbutamol hoặc Ractopamine hoặc Clenbuterol có trong mẫu, tính theo µg/kg
- o C_o: nồng độ Salbutamol hoặc Ractopamine hoặc Clenbuterol tính theo đường chuẩn, tính theo ng /mL
- o V₁, V₂ và V₃ lần lượt là thể tích định mức dịch chiết mẫu, thể tích mẫu lấy cô quay và thể tích định mức sau cùng.

Lưu ý: Với những mẫu không phát hiện, không cần xây dựng đường chuẩn mà chỉ cần tiêm chuẩn ở một nồng độ duy nhất để xác nhận và so sánh

D. BẢO ĐẢM QA/QC

- Tỷ lệ tín hiệu / nhiễu cho mỗi ion không nhỏ hơn 3:1
- Đường chuẩn phải có độ tuyến tính tốt (tối thiểu thực hiện trên 05 điểm chuẩn), hệ số tương quan hồi qui tuyến tính (R²) phải lớn hơn hoặc bằng 0.995
- Tỉ số ion kém nhạy hơn so với ion nhạy nhất trong mẫu dương tính không được khác biệt quá giới hạn qui định so với tỉ số tương ứng của chuẩn trong cùng một điều kiện phân tích.

| Tỉ số cường độ tương đối so với ion base pic | Mức sai biệt tối đa cho phép |
|--|------------------------------|
| >50% | ± 20% |

| | | |
|--|----------------------------|--|
| CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ | HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC | Mã số: HD.TN.025 Lần ban hành: 04 Ngày ban hành: 04/04/2018 Trang: 8/8 |
|--|----------------------------|--|

| | |
|-------------|-------|
| >20 đến 50% | ± 25% |
| >10 đến 20% | ± 30% |
| ≤ 10% | ± 50% |

- Độ lệch tương đối thời gian lưu của chất phân tích trong mẫu và chuẩn (hoặc chuẩn trên nền mẫu nếu thời gian lưu chịu ảnh hưởng của nền mẫu) không được lệch quá $\pm 2.5\%$.
- Độ lệch của các dung dịch tiêm xen kẽ giữa các mẫu phân tích không vượt quá $\pm 10\%$ giá trị thật.

E. BÁO CÁO KẾT QUẢ

- Kết quả báo cáo phân tích được ghi nhận lại trong phiếu phân tích BM.15.04a và BM.15.06.