|  |  |
| --- | --- |
| **TCVN** |  **T I Ê U C H U Ẩ N Q U Ố C G I A** |

**TCVN : 2014**

**Xuất bản lần 1**

**THỰC PHẨM - Xác đỊnh dư lƯỢng βAGONIST TRONG THỊT GIA SÚC – PHƯƠNG PHÁP SẮC KY LỎNG GHÉP HAI LẦN KHối phổ**

*Food – Determination of β2-Agonist residue in cattle meat*

*by liquid chromatography mass - spectrometry LC-MS-MS*

**HÀ NỘI − 2014**

**Lời nói đầu**

TCVN: 2014 do Cục Quản lý Chất lượng Nông lâm sản và thủy sản biên soạn, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn đề nghị, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

**T I Ê U C H U Ẩ N Q U Ố C G I A TCVN : 2014**

**Thực phẩm – Xác định dư lượng β2-Agonist trong thịt gia súc –Phương pháp sắc ký lỏng ghép hai lần khối phổ**

*Food – Determination of β2-Agonist residue in cattle meat by liquid chromatography mass - spectrometry LC-MS-MS*

**1 Phạm vi áp dụng**

Tiêu chuẩn này áp dụng để xác định dư lượng nhóm β2 Agonist gồm các chất Clenbuterol, Salbutamol và Ractopamine trong thịt bò, thịt heo bằng kỹ thuật sắc ký lỏng ghép hai lần khối phổ.

Giới hạn định lượng của phương pháp cho mỗi chất là Clenbuterol 0,2 µg/kg, Salbutamol 5 µg/kg và Ractopamin.HCl là 10 µg /kg.

**2 Nguyên tắc**

Dư lượng Clenbuterol, Salbutamol và Ractopamine tự do trong thịt bò, thịt heo được chiết ra từ mẫu bằng hỗn hợp Axetonitrile và isopropanol. Sử dụng các muối natri clorit, natri sunphat và magiê sunphate để tủa protein và loại nước có trong dịch chiết mẫu. Dịch chiết được làm bay hơi dung môi đến khô, phần cặn hòa tan bằng dung dịch nước chứa 10% Axetonitril, làm sạch bằng n-hexan và đưa vào phân tích bằng kỹ thuật sắc ký lỏng ghép hai lần khối phổ (LC-MS-MS) để xác định và định lượng Clenbutarol, Salbutamol và Ractopamine có trong mẫu**.**

**3 Thuốc thử**

Trong tiêu chuẩn này, chỉ sử dụng thuốc thử có cấp độ tinh khiết phân tích và nước cất hai lần đã khử ion.

**3.1 Chuẩn Clenbuterol.HCL (CLEN.HCl)** , ≥ 98,5 %;

**3.2 Chuẩn Salbutamol sunphat (SAL.SUL),** ≥ 99 %;

**3.3 Chuẩn Ractopamin.HCL (RAC.HCl),** ≥ 98%;

**3.4 Nội chuẩn Clenbuterol D9 (CLEN D9),** >99 %;

**3.5 Nội chuẩn Salbutamol D3 (SAL D3),** ≥ 98%;

**3.6 Nội chuẩn Ractopamin.HCL D6 (RAC D6),** > 99 %;

**3.7 Axetonitril (ACN),** loại dùng cho LC-MS;

**3.8 Nước,** loại dùng cho LC-MS;

**3.9 Metanol (MeOH),** loại dùng cho LC-MS;

**3.10 Isopropanol (IPA)**, loại dùng cho HPLC;

**3.11 n-Hexan**, loại dùng cho phân tích;

**3.12 Natri clorit (NaCl),** loại dùng cho phân tích;

**3.13 Natri sunphat (Na2SO4),** loại dùng cho phân tích;

**3.14 Magiê sunphat (MgSO4) khan**;

**3.15 Axit formic,** độ tinh khiết tối thiểu 99 %;

**3.16 Khí argon**, tinh khiết 99,9%;

**3.17 Khí nitơ,** tinh khiết 99,9%.

**3.18 Pha chế dung dịch chuẩn và nội chuẩn**

**3.18.1. Dung dịch chuẩn gốc CLEN, SAL 1000 μg / ml trong metanol**

Cân lần lượt 22.98 mg chuẩn CLEN.HCL (3.1) và 24.34 mg chuẩn SAL.SUL (3.2) vào các bình định mức dung tích 20 ml (4.4). Hoà tan và định mức đến vạch bằng metanol (3.9) để được dung dịch chuẩn gốc CLEN, SAL có nồng độ 1000 μg/ml. Dung dịch chuẩn gốc được bảo quản ở -18°C trong 1 năm.

**3.18.2. Dung dịch chuẩn gốc RAC.HCL 1000 μg / ml trong metanol**

Cân 20 mg chuẩn RAC.HCL (3.3) vào bình định mức dung tích 20 ml (4.4). Hoà tan và định mức đến vạch bằng metanol (3.9) để được dung dịch chuẩn gốc RAC.HCL có nồng độ 1000 μg / ml. Dung dịch chuẩn gốc được bảo quản ở -18°C trong 1 năm.

*LƯU Ý:*

- Lượng cân của chuẩn CLEN.HCl và SAL.SUL phải được điều chỉnh về dạng CLEN và SAL *(xem phụ lục)*  vì CLEN và SAL là chất phân tích cần quan tâm. Lượng cân của chuẩn RAC.HCl không điều chỉnh về dạng RAC vì RAC.HCl là chất phân tích cần quan tâm.

- Lượng chuẩn của các chất phân tích phải được điều chỉnh hợp lý để đạt nồng độ các chuẩn gốc 1000 μg / ml sau khi tính toán và hiệu chỉnh theo giấy chứng nhận độ tinh khiết của nhà sản xuất.

**3.18.3. Dung dịch chuẩn hỗn hợp trung gian CLEN: 2 μg / ml; SAL: 50 μg / ml; RAC.HCL: 100 μg / ml (S1)**

Hút lần lượt 40 μl chuẩn gốc CLEN 1000 μg/ml; 1000 μl chuẩn gốc SAL 1000 μg/ml và 2000 μl chuẩn gốc RAC.HCL 1000 μg/ml cho vào bình định mức 20 ml (4.4), định mức đến vạch bằng metanol (3.9). Dung dịch bảo quản ở -18°C trong 6 tháng.

**3.18.4. Dung dịch chuẩn hỗn hợp CLEN: 20 ng / ml; SAL: 500 ng / ml; RAC.HCL: 1000 ng / ml (S2)**

Hút chính xác 200 μl dung dịch chuẩn hỗn hợp trung gian **(S1)** cho vào bình định mức 20 ml (4.4), định mức đến vạch bằng axetonitril (3.7). Dung dịch bảo quản ở -18°C trong 3 tháng.

**3.18.5. Dung dịch chuẩn hỗn hợp CLEN, SAL: 2 ng / ml; SAL: 50 ng / ml; RAC.HCL: 100 ng / ml (S3)**

Hút chính xác 2 ml dung dịch chuẩn hỗn hợp trung gian **(S2)** cho vào bình định mức 20 ml (4.4), định mức đến vạch bằng axetonitril (3.7). Dung dịch bảo quản ở -20°C trong 3 tháng.

**3.18.6 Dung dịch nội chuẩn gốc SAL D3 9.8 μg / ml trong metanol**

Pha loãng 1ml dung dịch chuẩn gốc SAL D3 (3.5) có nồng độ 100 ng / μl (98%) trong bình định mức 10 ml (4.4), định mức đến vạch bằng metanol (3.9). Dung dịch được bảo quản ở -20°C trong 1 năm.

*LƯU Ý:*

Nồng độ của các nội chuẩn phải được tính toán và hiệu chỉnh theo giấy chứng nhận độ tinh khiết của nhà sản xuất.

**3.18.7. Dung dịch nội chuẩn gốc CLEN D9 100 μg / ml trong metanol**

Lấy một ít metanol (3.9) cho vào lọ chứa 1 mg chuẩn gốc CLEN D9 (3.4), lắc cho đến khi chất rắn tan hoàn toàn, sau đó cho dung dịch vào bình định mức 10 ml (4.4), tráng rửa ống chứa chất chuẩn vài lần bằng metanol (3.9), gộp tất cả dung dịch vào bình định mức 10 ml (4.4), định mức đến vạch bằng metanol (3.9). Dung dịch chuẩn này được bảo quản ở -20°C trong 1 năm.

**3.18.8. Dung dịch nội chuẩn gốc RAC.HCL D6 100μg/ml trong metanol.**

Lấy một ít metanol (3.9) cho vào lọ chứa 1 mg chuẩn gốc RAC.HCL D6 (3.6), lắc cho đến khi chất rắn tan hoàn toàn, sau đó cho dung dịch vào bình định mức 10 ml (4.4), tráng rửa ống amplous chứa chất chuẩn vài lần bằng metanol (3.9), gộp tất cả dung dịch vào bình định mức 10 ml (4.4), định mức đến vạch bằng metanol (3.9). Dung dịch chuẩn này được bảo quản ở -20°C trong 1 năm.

**3.18.9. Dung dịch hỗn hợp nội chuẩn CLEN D9, RAC.HCL D6, 10 μg / ml (IS1)**

Hút lần lượt 1 ml nội chuẩn CLEN D9 (3.18.6) và RAC.HCL D6 (3.18.7) cho vào bình định mức 10 ml (4.4), định mức đến vạch bằng metanol (3.9). Dung dịch bảo quản ở -20°C trong 6 tháng.

**3.18.10. Dung dịch hỗn hợp chuẩn nội làm việc 50 ng / ml trong axetonitril (IS2).**

Hút lần lượt 100 µl dung dịch hỗn hợp nội chuẩn **IS1** (3.18.8)và 102 μl dung dịch nội chuẩn SAL D3 (3.18.5) cho vào bình định mức 10 ml (4.4), định mức đến vạch bằng axetonitril (3.7). Dung dịch chuẩn này được bảo quản ở -20°C trong 3 tháng.

**3.19 Pha động**

 A: axetonitril (3.7) .

B: Nước (3.8) + 0,1 % axit formic (3.15).

**3.20. Dung dịch 10%ACN trong nước cất**

Lấy 10 ml axetonitril cho vào bình định mức 100 ml (4.4) rồi định mức đến vạch bằng nước cất, lắc đều. Dung dịch pha trước khi sử dụng và bảo quản ở nhiệt độ phòng.

**4 Thiết bị, dụng cụ**

Sử dụng thiết bị, dụng cụ của phòng thử nghiệm thông thường và cụ thể như sau:

**4.1 Hệ thống máy sắc ký lỏng khối phổ LC-MS-MS**

 - Bơm 2 kênh dung môi biến đổi dòng;

- Đầu dò MS-MS;

- Máy tính và phần mềm phân tích;

- Cột sắc ký Hypersil GOLD C18, đường kính trong là 2,1 mm, kích thước hạt nhồi là 1,9 μm, độ dài của cột là 100 mm.

#### 4.2 Ống ly tâm nhựa, dung tích 50 ml có nắp;

**4.3 Ống ly tâm thủy tinh**, dung tích 10 ml;

**4.4 Bình định mức thủy tinh**, dung tích 10 ml, 20 ml, 25 ml, 50 ml, 100 ml; 1000 ml;

**4.5 Pipet tự động**, dung tích 50 μl, 100 μL, 250 μl, 1000 μl, 5000 µl;

**4.6 Máy ly tâm lạnh**, tốc độ 4000 vòng / phút;

 **4.7 Cân phân tích**, có độ chính xác đến 0,1 mg;

 **4.8 Bơm hút chân không**;

 **4.9 Màng lọc dung môi,** đường kính 45 mm, kích thước lỗ 0,2 μm, làm bằng chất liệu chịu được cả nước và dung môi hữu cơ;

**4.10 Bộ lọc dung môi bằng thủy tinh**;

 **4.11 Máy lắc**, tốc độ tối thiểu 4000 vòng / phút;

**4.12 Máy lắc ngang**, tốc độ tối thiểu 300 vòng / phút;

**4.13 Lọ đựng mẫu**, dung tích 2 ml;

**4.14Màng lọc mẫu**, đường kính 13 mm, kích thước lỗ 0,2 μm, làm bằng PTFE;

**4.15 Bộ hút dung môi tự động**, thể tích 25 ml;

**4.16 Bộ bay hơi nitơ**, có điều chỉnh nhiệt độ;

**4.17 Máy xay thịt**.

**5 Lấy mẫu**

Việc lấy mẫu không qui định trong tiêu chuẩn, nên lấy mẫu theo TCVN 4833 – 1: 2002 (ISO 3100-1:1991).

Mẫu phân tích tại phòng thử nghiệm phải là mẫu đại diện và không bị hư hỏng hoặc bị biến đổi trong quá trình vận chuyển hoặc bảo quản.

**6 Chuẩn bị mẫu**

Cắt thịt thành từng miếng nhỏ, đồng hóa mẫu bằng cách cho mẫu đi qua máy xay thịt (4.17) hai lần và trộn. Chuyển mẫu đã đồng nhất sang dụng cụ đựng mẫu, đậy nắp kín và lưu trữ ở nhiệt độ -10°C. Khi thực hiện phân tích, phải đưa mẫu về nhiệt độ phòng.

**6.1 Chuẩn bị mẫu thử**

Cân 5,0 g mẫu đã đồng nhất vào ống ly tâm 50 ml (4.2). Cho vào 50 μl dung dịch hỗn hợp chuẩn nội làm việc **IS1** 50 ng / ml (3.18.9).

**6.2 Chuẩn bị mẫu trắng**

Mẫu trắng là mẫu thịt heo, thịt bò đã được xác định không nhiễm Clenbuterol, Salbutamol và Ractopamin.HCl. Mẫu trắng được chuẩn bị như mẫu thử.

**6.3 Chuẩn bị mẫu kiểm soát**

Mẫu kiểm soát được chuẩn bị từ mẫu trắng như mẫu thử nhưng có bổ sung thêm 50 μL dung dịch chuẩn hỗn hợp **S2** (3.18.4) vào mẫu. Trộn đều bằng máy lắc, sau đó để yên 15 phút trước khi tiến hành các bước tiếp theo.

**6.4 Chuẩn bị mẫu xây dựng đường chuẩn**

Đường chuẩn được xây dựng dựa trên nền mẫu trắng. Cân 5 mẫu mỗi mẫu 5,0 g đã đồng nhất vào ống ly tâm 50 ml (4.2), bổ sung 50 μl dung dịch hỗn hợp chuẩn nội làm việc **IS1** 50 ng / ml (3.18.9) vào các ống nghiệm chứa mẫu trắng. Tiến hành trộn đều bằng máy lắc (4.11) trong 15 giây, sau đó để yên 15 phút trước khi tiến hành các bước tiếp theo.

**7 Tiến hành thử nghiệm**

**7.1 Chiết mẫu và làm sạch mẫu**

Cho 4 ml axetonitril (3.7) và 1ml isopropanol (3.10) vào các ống nghiệm chứa mẫu trắng, mẫu kiểm soát, mẫu thử và mẫu trắng dùng để dựng đường chuẩn. Trộn đều bằng máy lắc (4.11) trong 2 phút. Tiếp theo, thêm vào mỗi ống 1,2 g NaCl (3.12), lắc mạnh 2 phút, sau đó tiếp tục thêm vào mỗi ống 4 g Na2SO4 và 0,5 g MgSO4, lắc đều 2 phút trên máy lắc (4.11). Sau khi lắc mẫu, ly tâm 4 phút ở tốc độ 4000 vòng / phút. Dùng pipet, chuyển 1 ml lớp trên sang ống nghiệm thuỷ tinh (4.3). Sau đó cho bay hơi bằng bộ bay hơi N2 (4.9) đến khô ở nhiệt độ 40°C.

Sau khi bay hơi đến khô. Đối với mẫu trắng, mẫu kiểm soát và mẫu thử hoà tan bằng 1 ml dung dịch 10% ACN trong nước (3.20). Đối với mẫu trắng dùng để dựng đường chuẩn, thêm chuẩn theo các thể tích như ở **bảng 1**, lắc đều khoảng 30 giây trên máy lắc (4.11). Tiếp theo, thêm 1 ml n-hexan (3.11). Trộn đều bằng máy lắc trong trong 10 giây (4.11), ly tâm 6 phút ở 4000 vòng / phút (4.6). Sau đó loại bỏ lớp trên. Hút lớp dưới lọc qua màng lọc (4.14) vào lọ đựng mẫu (4.13). Dung dịch sẵn sàng để phân tích trên thiết bị LC-MS/MS.

**Bảng 1 - Xây dựng đường chuẩn**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **STT** | **Nồng độ chuẩn (ng/ml)** | **Thể tích dung dịch chuẩn hỗn hợp S2 sử dụng (μl)** | **Thể tích dung dịch chuẩn hỗn hợp S3 sử dụng (μl)** | **Thể tích định mức(\*) (μl)** | **Nồng độ dung dịch nội chuẩn IS, CLEN D9; SAL D3 và RAC D6 (ng / ml)** |
| CLEN | SAL | RAC.HCl |
| Mẫu 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1000 | 0,5 |
| Mẫu 2 | 0,1 | 2,5 | 5 | 0 | 50 | 1000 | 0,5 |
| Mẫu 3 | 0,2 | 5 | 10 | 10 | 0 | 1000 | 0,5 |
| Mẫu 4 | 0,4 | 10 | 20 | 20 | 0 | 1000 | 0,5 |
| Mẫu 5 | 0,8 | 20 | 40 | 40 | 0 | 1000 | 0,5 |
| Mẫu 6 | 1,6 | 40 | 80 | 80 | 0 | 1000 | 0,5 |

**(\*):** *Dung dịch dùng định mức: dung dịch 10% ACN trong nước***.**

*LƯU Ý:*

*Nếu mẫu nhiều béo, khi cho n-hexan vào và lắc quá mạnh thì dung dịch sẽ tạo huyền phù khó tách lớp. Nên lắc vừa phải và tiến hành loại béo lần thứ 2 nếu cần.*

**7.2 Tiến hành thử nghiệm trên LC-MS-MS**

**7.2.1 Điều kiện HPLC**

- Cột sắc ký Hypersil GOLD C18, đường kính trong là 2,1 mm, kích thước hạt nhồi là 1,9 μm, độ dài của cột là 100 mm;

 - Nhiệt độ cột: 40°C;

- Thể tích tiêm mẫu: 10 μl;

- Thời gian phân tích: 6 phút;

- Tốc độ dòng: 0,2 ml / phút;

- Pha động: chương trình gradient thể hiện theo bảng 2:

**Bảng 2 - Chương trình pha động**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Thời gian****(phút)** | **Tốc độ dòng****(mL / phút)** | **Pha động A****(%)** | **Pha động B****(%)** |
| Initial | 0,2 | 5 | 95 |
| 0,5 | 0,2 | 5 | 95 |
| 1,0 | 0,2 | 20 | 80 |
| 4,0 | 0,2 | 80 | 20 |
| 4,2 | 0,2 | 5 | 95 |
| 6,0 | 0,2 | 5 | 95 |

**7.2.2 Điều kiện trên MS**

Điều kiện trên MS như sau:

Kiểu ion hóa: ESI (+);

Nhiệt độ nguồn ion hóa: 150°C;

Nhiệt độ hóa hơi dung môi: 400°C;

Tốc độ dòng khí làm bay hơi dung môi: 800 l / h;

Tốc độ dòng khí qua Cone Gas: 30 l / h.

Các điều kiện phân ly MS-MS như sau:

**Bảng 3 - Điều kiện phân ly MS-MS**

| **Tên hợp chất** | **Ion Mẹ (m/z)** | **Ion Con (m/z)** | **Năng lượng (Sample Cone)****(V)** | **Năng lượng** **va chạm****(eV)** |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Clenbuterol | 276,97 | 167,89202,94\* | 18 | 2814 |
| Clenbuterol D9 | 286,03 | 168,80203,90\* | 18 | 3016 |
| Salbutamol | 240,10 | 148,01222,01\* | 16 | 1810 |
| Salbutamol D3 | 243,03 | 151,01255,10\* | 18 | 1810 |
| Ractopamin.HCl | 302,10 | 121,01164,06\* | 20 | 2816 |
| Ractopamin.HCl D6 | 308,10 | 290,10168,10\* | 20 | 2216 |

GHI CHÚ: *ion có kí hiệu (\*) là ion dùng để định lượng.*

#### 7.3 Trình tự bơm mẫu

**7.3.1 Bơm dung môi kiểm tra máy:** dung dịch10% ACN trong nước (3.20);

**7.3.2 Bơm các dung dịch lập đường chuẩn;**

**7.3.3 Bơm mẫu trắng;**

**7.3.4 Bơm mẫu kiểm soát;**

**7.3.5 Bơm mẫu thử.**

**8 Tính toán và biểu thị kết quả**

**8.1 Tính hệ số tín hiệu**

Tính cho từng chất cần phân tích theo phương trình: 

Trong đó: RF: hệ số tín hiệu;

 Area: diện tích pic của ion định lượng của chất cần phân tích;

 ISConc: nồng độ của ion định lượng của nội chuẩn;

 ISArea: diện tích pic của ion định lượng của nội chuẩn.

**8.2 Xây dựng đường chuẩn**

Xây dựng phương trình bậc nhất giữa hệ số tín hiệu với nồng độ chất chuẩn bổ sung vào mẫu và chuẩn bị mẫu theo mục 6.4. Phương trình có dạng: RF = ax + b. Trong đó:

- RF: hệ số tín hiệu, tính theo mục 8.1;

- x: nồng độ chất chuẩn thêm vào mẫu, chuẩn bị theo mục 6.4;

 - b: điểm cắt của đường chuẩn với trục tung;

 - a: hệ số góc của đường chuẩn.

Phương trình đạt yêu cầu khi hệ số hồi quy 1 ≤ R2 ≤ 0.99.

**8.3 Hàm lượng chất phân tích trong mẫu**

Dư lượng các chất cần phân tích trong mẫu được tính theo phương pháp đường chuẩn xây dựng theo mục 8.2. Nồng độ trong mẫu phân tích được tính theo công thức sau:



Trong đó:

 C: là nồng độ của Agonist có trong mẫu, tính bằng μg / kg;

 Cx: là nồng độ Agonist đo được suy ra từ đường chuẩn, μg / l;

 V1: là thể tích ban đầu mà chất phân tích có mặt trong đó (5 ml), tính bằng ml;

 V2: là thể tích dịch trích mang đi phân tích (1ml), tính bằng ml;

 V3: là thể tích định mức cuối cùng (1ml), tính bằng ml;

 F: là hệ số pha loãng mẫu khi đo (nếu không pha loãng, F = 1);

 a: là khối lượng mẫu thử, tính bằng gam (g).

**8.4 Biểu thị kết quả**

Kết quả được biểu thị bằng đơn vị μg / kg (ppb), hai số sau dấu phẩy.

**9 Báo cáo thử nghiệm**

Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ:

- Thông tin cần thiết về việc nhận biết đầy đủ mẫu thử;

- Phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu có;

- Phương pháp thử đã sử dụng, viện dẫn tiêu chuẩn này;

- Các chi tiết bất thường khác có thể ảnh hưởng tới kết quả thử nghiệm;

- Độ lập lại của phương pháp;

- Kết quả thử nghiệm thu được.

**THƯ MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO**

[1] United States Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health Science, *Screening and Confirmation of Beta-Agonists by HPLC/MS/MS*, CLG- AGON1.04.

[2] Science China, *Determination of 23 2-agonists and 5 -blockers in animal muscle by high performance liquid chromatography-linear ion trap mass spectrometry*, Vol.53, April 2010, pages: 832–840.

[3] AOAC Offical Method 2011.03, *Parent and total Ractopamine in Bovine, Swine and Turkey tissues, LC-MS-MS.*

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_