

**XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG DICYANDIAMIDE &
AMMELIDE TRONG THỨC ĂN CHĂN NUÔI
BẰNG THIẾT BỊ LC – MS/MS**

Nhân viên biên soạn	Nhân viên xem xét	Nhân viên phê duyệt
Nguyễn Văn Lên	Trần Thái Vũ	Trần Thái Vũ

THEO DÕI SỬA ĐỔI TÀI LIỆU

STT	Vị trí	Nội dung sửa đổi	Ngày sửa đổi

A. TỔNG QUAN

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.216 Lần ban hành: 01 Ngày ban hành: 30/01/2018 Trang: 2/6
--	--	---

I. Phạm vi áp dụng.

- Hướng dẫn việc phân tích hàm lượng Dicyandiamide & ammelide có trong thức ăn chăn nuôi bằng thiết bị LC – MS/MS
- Giới hạn phát hiện của phương pháp: 1 ppm
- Giới hạn định lượng của phương pháp: 5 ppm

II. Tài liệu tham khảo.

- TCVN 9048: 2012
- Journal of Food and Drug analysis, Vol. 21, No. 1, 2013, Pages 66 - 72

III. Nguyên tắc.

- Mẫu được chiết với dịch chiết thích hợp, sau đó pha loãng và phân tích trên thiết bị LC – MS/MS

VI. Thông tin an toàn phòng thí nghiệm.

- Tất cả các nhân viên khi bước vào khu vực thử nghiệm phải tuân thủ nội qui của phòng thử nghiệm.

B. PHÂN TÍCH

I. Thiết bị và dụng cụ phân tích.

1. Thiết bị cơ bản.
 - Cân phân tích với khoảng chia nhỏ nhất 0.1 mg.
 - Cân kỹ thuật với khoảng chia nhỏ nhất 1 mg.
 - Máy ly tâm, máy Vortex
 - Micropipete 20 µL; 200 µL và 1000 µL
 - Đầu tip 20µL; 200 µL và 1000 µL.
 - Syringe lọc mẫu và đầu lọc mẫu Nilon 0.45µm
 - Vial 1.8mL
2. Thiết bị phân tích
 - Hệ thống LC – MS/MS:
 - o Bộ tiêm mẫu tự động
 - o Bộ sắc ký lỏng (LC) có thể chịu áp suất hơn 400 Bar.
 - o Đầu dò khối phổ ba tứ cực
 - Cột sắc ký C₁₈ 2.1 mm x 250mm hoặc tương đương.

II. Hoá chất và chất chuẩn.

1. Hoá chất: Tất cả hóa chất sử dụng phải là dạng hóa chất tinh khiết dung cho phân tích
 - Acetonitrile
 - Formic acid: tinh khiết phân tích
 - Nước cất khử ion
2. Chất chuẩn.
 - a. Chất chuẩn:
 - ammelide của sigma Aldrich hoặc tương đương
 - Dicyandiamide của sigma Aldrich hoặc tương đương
 - b. Dung dịch chuẩn:

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.216 Lần ban hành: 01 Ngày ban hành: 30/01/2018 Trang: 3/6
--	--	---

- Dung dịch chuẩn 1000 mg/L:
 - o Cân 10.0 mg chuẩn rắn ammelide vào bình định mức 10mL, định mức lên bằng hỗn hợp Acetonitrile/H₂O (1/1).
 - o Cân 10.0 mg chuẩn rắn dicyandiamide vào bình định mức 10mL, định mức lên bằng hỗn hợp Acetonitrile/H₂O (1/1).
 - o Chuẩn được đựng trong ống nghiệm, bảo quản ở nhiệt độ 0 – 20°C. Chuẩn sử dụng tối đa 12 tháng.
 - o Nồng độ chuẩn được tính theo công thức sau:

$$C(\text{mg} / \text{L}) = \frac{m \times M_{\text{base}}}{M \times V} \times \text{pure}\%$$

Trong đó:

- m: khối lượng chuẩn đã cân để pha chuẩn (mg)
- V: thể tích chuẩn định mức (L)
- M_{base}: khối lượng mol phân tử ở dạng base có trong công thức chuẩn của nhà sản xuất.
- M: khối lượng mol phân tử của chất chuẩn của nhà sản xuất.
- Pure%: độ tinh khiết của chất chuẩn.
- *Lưu ý: Nhân viên pha chuẩn phải tính lại nồng độ dung dịch chuẩn đã pha dựa trên khối lượng chuẩn thực tế đã cân, độ tinh khiết và quy cách chuẩn của nhà sản xuất.*
- Dung dịch chuẩn 200 mg/L:
 - o Rút 2.0 mL mỗi dung dịch chuẩn 1000 mg/L cho vào bình định mức 10 mL, định mức lên đến vạch bằng hỗn hợp Acetonitrile/H₂O (1/1). Vortex 2 phút.
 - o Chuẩn được đựng trong ống nghiệm, bảo quản ở nhiệt độ 0 – 20°C. Chuẩn sử dụng tối đa 06 tháng.
- Dung dịch chuẩn 20 mg/L:
 - o Rút 1.0 mL dung dịch chuẩn 200 mg/L cho vào bình định mức 10 mL, định mức lên đến vạch bằng hỗn hợp Acetonitrile/H₂O (1/1). Vortex 2 phút.
 - o Chuẩn được đựng trong ống nghiệm, bảo quản ở nhiệt độ 0 – 20°C. Chuẩn sử dụng tối đa 03 tháng.

c. Dãy chuẩn làm việc:

- Dãy chuẩn làm việc được pha như sau: chiết chuẩn trên nền mẫu

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.216 Lần ban hành: 01 Ngày ban hành: 30/01/2018 Trang: 4/6
--	--	---

- Cân 1g mẫu vào 06 ống ly tâm 50mL, và được đánh số thứ tự Std1 → Std6. Lần lượt cho chuẩn vào giống như bảng sau, vortex và để yên 30 phút. Tiến hành chiết chuẩn như mục B.IV.2

Stt	Chuẩn sử dụng	V _{Std} , µL		Nồng độ, mg/Kg
1	20 mg/L	50	Tính trên 1g mẫu	1
2		100		2
3		200		4
4	200 mg/L	50		10
5		100		20
6		200		40

d. Pha động chạy máy:

- H₂O 0.1% Formic acid: cho 4mL acid formic vào 4L nước LC/MS.
- Acetonitrile 0.1% Formic acid: cho 4mL acid formic vào 4L Acetonitrile HPLC.

III. Kiểm soát QA/QC.

Trong mỗi đợt phân tích, nhân viên phân tích thực hiện các mẫu sau để kiểm soát chất lượng phân tích.

- Mẫu Blank hóa chất:
- Mẫu Blank matrix: Mẫu blank phù hợp với nền mẫu phân tích.
- Mẫu QC: Mẫu spike trên nền mẫu Blank matrix

Thực hiện mẫu Blank, blank matrix và mẫu QC theo mục B.IV.2.

IV. xử lý mẫu.

1. Chuẩn bị mẫu.

- Mẫu phải được đồng nhất bằng máy xay mẫu.
- Mẫu được bảo quản ở nhiệt độ phòng, tránh ẩm và ánh sáng chiếu trực tiếp vào mẫu.

2. Phương pháp tiến hành.

a. Chiết mẫu.

- Cân 1 (g) mẫu vào ống ly tâm 50mL và thêm vào 10 (mL) Acetonitrile (4% Formic acid).
- Vortex mẫu trong 2 phút, siêu âm 30 phút, sau đó lấy ra vortex 2 phút. Ly tâm mẫu trong 15 phút.
- Pha loãng mẫu 02 lần trong nước cất khử ion, vortex, siêu âm.
- Mẫu được lọc vào vial và phân tích trên thiết bị LC – MS/MS.

V. Phân tích

1. Thông số thiết bị:

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.216 Lần ban hành: 01 Ngày ban hành: 30/01/2018 Trang: 5/6
--	--	---

Điều kiện AS		Điều kiện LC			
	Column	Thời gian	H ₂ O 0.1% FA	Acetonitrile 0.1%FA	Tốc độ dòng, mL/phút
<ul style="list-style-type: none">- Injection type: Full loop- Needle height from bottom: 1.0- Flush volume: 100μL- Tray temp control: off- Column oven control: off- Wash column: 500μL	C ₁₈ 2.1 mm x 250mm hoặc tương đương	0	90	10	0.4
		5	90	10	
Điều kiện MS/MS					
<ul style="list-style-type: none">- Q2 gas pressure: 1.2mT- MS acquire time: 6- Ion source : HESI- Polarity: Póitive- Scan type: SRM- Capillary temp: 350°C- Vaporizer temperature: 200- ESI spray voltage: ≥ 3000V- Sheath gas:30- Aux gas : 5	Ion chính	Ion định lượng		Ion xác nhận	
	Dicyandiamide				
	85	68		43.3	
	Ammelide				
	129	70		86	

2. Trình tự của quá trình tiêm mẫu trên thiết bị phân tích.

- Mẫu được phân tích theo trình tự như sau:
 - o Pha động định mức mẫu.
 - o Các điểm chuẩn từ thấp đến cao.
 - o Pha động
 - o Mẫu Blank
 - o Mẫu
 - o Mẫu QC
 - o Chuẩn check

C. TÍNH TOÁN KẾT QUẢ.

- Xây dựng đường chuẩn biểu thị mối liên hệ giữa diện tích peak với nồng độ chuẩn.

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.216 Lần ban hành: 01 Ngày ban hành: 30/01/2018 Trang: 6/6
--	--	---

Chỉ tiêu phân tích	Ion chính	Ion định lượng	Ion xác nhận
Dicyandiamide	85	68	43.3
Ammelide	129	70	86

- Hàm lượng Chất phân tích có trong mẫu được tính theo công thức sau:

$$C(mg / Kg) = C_0 \times f$$

Trong đó:

- C_0 : nồng độ Chất phân tích tính từ đường chuẩn ứng
- f : hệ số pha loãng (nếu có sau khi kết thúc quá trình chiết)

D. KIỂM SOÁT DỮ LIỆU QA/QC

- Đồ thị tính tuyến tính ít nhất 5 điểm (bao gồm điểm Zero) với $r^2 \geq 0.995$
- Độ thu hồi:

Nồng độ	% H _{th}
100 ppb	80 – 110
1 ppm	
10 ppm	
100 ppm	90 – 107

- Độ lệch của thời gian lưu không quá 2.5%.
- Tỷ số ion.

Tỷ số ion	Độ lệch cho phép
> 50%	± 20%
> 20% - 50%	± 25%
> 10% - 20%	± 30%
≤ 10%	± 50%

E. BÁO CÁO KẾT QUẢ.

- Kết quả phân tích được báo cáo theo biểu mẫu:
 - BM.15.04a
 - BM.15.06