

<b>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</b>	<b>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC</b>	Mã số: HD.TN.083 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 30/10/2017 Trang: 1/5
--	----------------------------	---

## ĐỊNH LƯỢNG LYSINE TRONG THỨC ĂN CHĂN NUÔI BẰNG SẮC KÝ LỎNG GHÉP ĐẦU DÒ TỬ NGOẠI – KHẢ KIẾN (HPLC – UV/Vis)

Nhân viên biên soạn	Nhân viên xem xét	Nhân viên phê duyệt
Nguyễn Thị Xuân Mai	Trần Thái Vũ	Trần Thái Vũ

### THEO DÕI SỬA ĐỔI TÀI LIỆU

STT	Vị trí	Nội dung sửa đổi	Ngày sửa đổi
<b>1</b>		Thay đổi format SOP	<b>04/01/2018</b>

<p><b>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</b></p>	<p><b>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC</b></p>	<p>Mã số: HD.TN.083 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 30/10/2017 Trang: 2/5</p>
---	-----------------------------------	---

## A. TỔNG QUAN

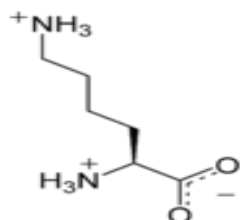
### I. Phạm vi áp dụng:

Phương pháp này dùng để xác định Lysine trong nền mẫu là Thức ăn chăn nuôi. Giới hạn phát hiện và định lượng của phương pháp: 330ppm và 1000ppm

### II. Tài liệu tham khảo:

AOAC 999.12 & AOAC 994.12

Công thức cấu tạo



CTPT:  $C_6H_{14}N_2O_2$

$M_w$ : 146.19

### III. Nguyên tắc:

Mẫu được thủy phân bằng acid HCl sau đó trung hòa, cho tạo dẫn xuất dansyl chloride và phân tích trên HPLC-UV.

### IV. Thông tin an toàn phòng thí 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 cần thiết.

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 phân tích

#### 1. Thiết bị cơ bản

- Cân phân tích, độ chính xác 0.1 mg; 1mg
- Ống ly tâm 50mL, 15mL
- Bếp đun có điều chỉnh nhiệt độ
- Màng lọc Nilon 13 mm, 0,45  $\mu$ m
- Bình định mức (CCX A): 100mL
- Micropipet 1mL, 200 $\mu$ L

<p><b>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</b></p>	<p><b>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC</b></p>	<p>Mã số: HD.TN.083 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 30/10/2017 Trang: 3/5</p>
---	-----------------------------------	---

g. Vial 1.5 mL

## 2. Thiết bị phân tích

- Hệ thống HPLC/PDA của Thermo: gồm pump, đầu dò PDA, autosampler hoặc tương đương.
- Cột sắc ký lỏng pha đảo pha đảo C18 150mm x 4.6mm, kích thước hạt 5µm (hoặc tương đương).

## II. Hóa chất và chất chuẩn

### 1. Hóa chất

- ✓ Nước cất 2 lần khử ion, HPLC
- ✓ ACN, HPLC.
- ✓ HCl
- ✓ NaOH
- ✓ Phenol
- ✓ Dansyl chloride
- ✓  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$

### 2. Pha động chạy máy:

- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  20mM, pH=3.0: Cân 2.72g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  hòa tan trong 1L nước khử ion và chỉnh pH về 3 bằng acid  $\text{H}_3\text{PO}_4$  loại bột khí trước khi chạy máy.
- Đệm borate 0.2M (pH=9.7)
- Dansyl chloride 1% acetone

### 3. Chất chuẩn

Chuẩn gốc Lysine.HCl của Sigma-Aldrich

#### 3.1 Chuẩn gốc 1000 ppm

Cân chính xác khoảng 10mg chuẩn gốc vào bình định mức 10mL, định mức đến vạch bằng nước cất được dung dịch chuẩn gốc 1000ppm.

#### 3.2 Chuẩn làm việc:

Lấy 0.2; 0.5; 1; 2; 5mL của dung dịch chuẩn gốc vào bình định mức 10mL và định mức đến vạch bằng nước cất, được các dung dịch chuẩn có nồng độ lần lượt là: 20ppm; 50ppm; 100ppm; 200ppm; 500ppm

## III. Kiểm soát QA/QC

## IV. Xử lý mẫu

### 1. Chuẩn bị mẫu

Mẫu được đồng nhất và nghiền mịn sao cho mẫu sau khi nghiền lọt hết qua rây 1,00mm

### 2. Phương pháp tiến hành

#### 2.1 Thủy phân mẫu

<p><b>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</b></p>	<p><b>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC</b></p>	<p>Mã số: HD.TN.083 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 30/10/2017 Trang: 4/5</p>
---	-----------------------------------	---

Cân chính xác khoảng 1g mẫu vào ống thủy tinh chịu nhiệt có nắp đậy, thêm 15mL HCl 1:1, lắc đều, đặt vào tủ sấy ở nhiệt độ 110°C trong 16h, lấy ra để nguội, trung hòa bằng NaOH 7.5M, chuyển hết vào bình định mức 100mL và định mức đến vạch bằng nước cất, lắc đều, lọc qua giấy lọc bằng vàng. Dung dịch sau lọc được cho dẫn xuất với dansyl chloride.

## 2.2 Tạo dẫn xuất với Dansyl chloride

Cho vào ống ly tâm 15mL, 0.5mL của dung dịch đệm borate, thêm 0.2mL của dung dịch mẫu thử hoặc chuẩn, lắc đều, thêm 0.5mL dung dịch dansyl chloride 1% lắc đều, phản ứng 60°C trong 30 phút, lấy ra để nguội, lọc vào vial và phân tích trên HPLC-UV.

## V. Phân tích

### 1. Thông số thiết bị

- Cột sắc ký: cột C<sub>18</sub> 150mm x 4.6mm, kích thước hạt 5µm. (hoặc tương đương)
  - Thể tích tiêm: 20 µl
  - Tốc độ : 1.0 mL/phút
  - Bước sóng: 254nm
- Chương trình pha động

Thời gian (phút)	% KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 20mM, pH=3.0	% ACN
0	88	12
21	88	12
25	52	48
40	52	48
41	88	12
45	88	12

Lưu ý: Với các cột sắc ký lỏng C<sub>18</sub> phân cực khác nhau (chiều dài, đường kính cột, kích cỡ hạt...), tỉ lệ thành phần pha động hay tốc độ dòng có thể thay đổi.

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

Sau khi hệ thống cân bằng (khoảng 30 phút), các mẫu sẽ được phân tích theo trình tự sau:

- ✓ Các dung dịch chuẩn có nồng độ từ thấp đến cao;
- ✓ Mẫu cần kiểm nghiệm.
- ✓ Mẫu thêm chuẩn
- ✓ Chuẩn check

Chú ý: Khi phân tích mẫu hàng loạt, tiêm xen kẽ một điểm chuẩn sau khi phân tích chuỗi 5 mẫu và kết thúc là một điểm chuẩn.

<b>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</b>	<b>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC</b>	Mã số: HD.TN.083 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 30/10/2017 Trang: 5/5
--	----------------------------	---

### C. TÍNH TOÁN KẾT QUẢ

Xây dựng đường chuẩn biểu thị mối quan hệ giữa diện tích thu được với nồng độ tương ứng. Kết quả chất cần phân tích trong mẫu được tính toán thông qua diện tích tương ứng so với đường chuẩn, theo công thức sau:

$$C(\%) = \frac{C_0 \times V}{m \times 10000} \times f$$

- C: nồng độ Lysine trong mẫu, ppm
- C<sub>0</sub>: nồng độ Lysine trong dịch chiết tính theo đường chuẩn, mg/L
- V: Thể tích chiết, mL
- f: hệ số pha loãng
- m: khối lượng cân, g
- 10000: hệ số chuyển đổi từ ppm ra %

### D. KIỂM SOÁT DỮ LIỆU QA/QC

1. Đường chuẩn phải có độ tuyến tính tốt (ít nhất là 05 điểm chuẩn), hệ số tương quan hồi qui tuyến tính (R<sup>2</sup>) phải lớn hơn hoặc bằng 0.995.
2. Độ lệch của các dung dịch chuẩn tiêm xen kẽ giữa các mẫu phân tích không vượt quá ±10 % giá trị thật.
3. Mẫu thêm chuẩn được thực hiện ít nhất 1 lần cho một lô mẫu (≥5 mẫu). Hiệu suất thu hồi của mẫu thêm chuẩn phải phù hợp theo bảng 1:
4. Mẫu lặp lại được thực hiện ít nhất 1 lần cho một lô mẫu (≥ 5 mẫu). Độ lệch tương đối giữa hai mẫu lặp lại phải phù hợp theo bảng 1:

Bảng 1: Giới hạn cho phép của hiệu suất thu hồi và độ lặp lại ở các khoảng nồng độ khác nhau

ST T	Hàm lượng	Đơn vị	Độ thu hồi, %	RSD, %
1	2000-5000	ppm	97-104	≤ 3.11
2	2-5	%	97-103	≤ 2.32

### 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.