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 |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |

1. **TỔNG QUAN**
2. **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

1. **Tài liệu tham khảo.**

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

1. **Nguyên tắc.**
   * Mẫu được chiết với dịch chiết thích hợp, sau đó pha loãng và phân tích trên thiết bị LC – MS/MS
2. **Thông tin an toàn phòng thí nghiệm.**
   * Tất cả các nhân viên khi bước vào khu vực thử nghiêm phải tuân thủ nội qui của phòng thử nghiệm.
3. **PHÂN TÍCH**
4. **Thiết bị và dụng cụ phân tích.**
5. 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 Votex
   * 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
6. Thiết bị phân tích

* Hê thống LC – MS/MS:
  + Bộ tiêm mẫu tự động
  + Bộ sắc ký lỏng (LC) có thể chịu áp suất hơn 400 Bar.
  + Đầu dò khối phổ ba tứ cực
* Cột sắc ký C18 2.1 mm x 250mm hoặc tương đương.

1. **Hoá chất và chất chuẩn.**
2. 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

1. Chất chuẩn.
2. Chất chuẩn:

* *ammelide của sigma Aldrich hoặc tương đương*
* *Dicyandiamide của sigma Aldrich hoặc tương đương*

1. Dung dịch chuẩn:

* Dung dịch chuẩn 1000 mg/L:
  + Cân 10.0 mg chuẩn rắn ammelide vào bình định mức 10mL, định mức lên bằng hỗn hợp Acetonitrile/H2O (1/1).
  + Cân 10.0 mg chuẩn rắn dicyandiamide vào bình định mức 10mL, định mức lên bằng hỗn hợp Acetonitrile/H2O (1/1).
  + Chuẩn được đượng trong ống nghiệm, bảo quản ở nhiệt độ 0 – 200C. Chuẩn sử dụng tối đa 12 tháng.
  + Nồng độ chuẩn được tính theo công thức sau:



Trong đó:

* m: khối lượng chuẩn đã cân để pha chuẩn (mg)
* V: thể tích chuẩn định mức (L)
* Mbase: 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 suất.
* 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:
  + 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). Votex 2 phút.
  + Chuẩn được đựng trong ống nghiệm, bảo quản ở nhiệt độ 0 – 200C. Chuẩn sử dụng tối đa 06 tháng.
* Dung dịch chuẩn 20 mg/L:
  + 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). Votex 2 phút.
  + Chuẩn được đựng trong ống nghiệm, bảo quản ở nhiệt độ 0 – 200C. Chuẩn sử dụng tối đa 03 tháng.

1. Dãy chuẩn làm việc:

* Dẫy chuẩn làm việc được pha như sau: chiết chuẩn trên nền mẫu
* 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, votex và để yên 30 phút. Tiến hành chiết chuẩn như mục B.IV.2

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Stt | Chuẩn sử dụng | VStd, 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 |

1. 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.

1. **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.

1. Phương pháp tiến hành.
2. Chiết mẫu.

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

**V. Phân tích**

1. Thông số thiết bị:

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| ***Điều kiện AS*** |  | | ***Điều kiện LC*** | | | |
| ***Column*** | | ***Thời gian*** | ***H2O***  ***0.1% FA*** | ***Acetonitrile***  ***0.1%FA*** | ***Tốc độ dòng, mL/phút*** |
| * Injiection type: Full loop * Needle height from bottom: 1.0 * Flush volume: 100µL * Tray temp control: off * Column oven control: off * Wash column: 500µL | C18  2.1 mm x 250mm hoặc tương đương | | 0 | 90 | 10 | 0.4 |
| 5 | 90 | 10 |
| Điều kiện MS/MS | | | | | | |
| * Q2 gas pressure: 1.2mT * MS acquire time: 6 * Ion source : HESI * Polarity: Póitive * Scan type: SRM * Capillary temp: 350oC * 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 |

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

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

1. **TÍNH TOÁN KẾT QUẢ.**

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

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 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:



Trong đó:

* C0: nồng độ Chất phân tích tính từ đường chuẩn ứng
* f: hệ số pha loãng (nếu có sua khi kết thúc quá trình chiết)

1. **KIỂM SOÁT DỮ LIỆU QA/QC**

* Đồ thị tính tuyến tính ít nhất 5 điểm ( bao gồm điểm Zero) với r2 ≥ 0.995
* Độ thu hồi:

|  |  |
| --- | --- |
| **Nồng độ** | **% Hth** |
| 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% - 50%  > 10% - 20%  ≤ 10% | ± 20%  ± 25%  ± 30%  ± 50% |

1. **BÁO CÁO KẾT QUẢ.**

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