

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 13073:2020

Xuất bản lần 1

**THỨC ĂN CHĂN NUÔI - XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG
CYSTEAMIN - PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG - PHỔ KHỐI
LƯỢNG HAI LẦN**

*Animal feed – Determination of cysteamine –
Liquid chromatography tandem mass spectrometry method*

HÀ NỘI – 2020

Lời nói đầu

TCVN 13073:2020 do Cục Chăn nuôi 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.

Thức ăn chăn nuôi – Xác định hàm lượng cysteamin – Phương pháp sắc ký lỏng - phổ khối lượng hai lần

Animal feed – Determination of cysteamin – Liquid chromatography mass tandem spectrometry method

CẢNH BÁO AN TOÀN: Rửa tất cả dụng cụ thủy tinh bằng chất tẩy trước khi rửa bằng nước. Tất cả các giai đoạn phân tích cần được thực hiện trong tủ hút. Loại bỏ các dung môi thải theo các quy định về môi trường.

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp sắc ký lỏng – phổ khối lượng hai lần để xác định hàm lượng cysteamin trong thức ăn chăn nuôi.

Giới hạn định lượng (LOQ) của phương pháp là 0,5 mg/kg.

2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn này. Đối với tài liệu viện dẫn ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản được nêu. Đối với tài liệu viện dẫn không ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản mới nhất, bao gồm cả các sửa đổi, bổ sung (nếu có).

TCVN 6952 Thức ăn chăn nuôi – Hướng dẫn chuẩn bị mẫu.

3 Nguyên tắc

Cysteamin trong mẫu được chiết bằng dung dịch MeOH : H₂O (1:1, theo thể tích). Dịch chiết được lọc qua màng lọc 0,2 μm. Hàm lượng cysteamin được xác định bằng hệ thống sắc ký lỏng - phổ khối lượng hai lần.

4 Thuốc thử

Tất cả các thuốc thử được sử dụng phải là loại tinh khiết phân tích, nước được sử dụng là nước đề ion hoặc nước có chất lượng tương đương, trừ khi có quy định khác.

TCVN 13073:2020

4.1 Axetonitril (CH₃CN), loại dùng cho LC-MS.

4.2 Metanol (CH₃OH), loại dùng cho LC-MS.

4.3 Axit formic (HCOOH), độ tinh khiết ≥ 98%.

4.4 Dung dịch axit formic 0,1% trong nước, cho 1 ml axit formic (4.3) vào bình định mức 1000 ml chứa khoảng 500 ml nước, định mức đến vạch bằng nước, lắc đều.

4.5 Dung dịch metanol ÷ nước (MeOH : H₂O) (1:1, theo thể tích), trộn 500 ml metanol (4.2) và 500 ml nước, lắc đều.

4.6 Chuẩn cysteamin dichloride, độ tinh khiết ≥ 95%.

4.7 Dung dịch chuẩn gốc 1000 µg/ml, cân khoảng 50 mg chất chuẩn (4.6), chính xác đến 0,1 mg, cho vào bình định mức 50 ml. Hoà tan và định mức đến vạch bằng nước. Dung dịch chuẩn gốc được bảo quản ở 2 + 8 °C, tránh ánh sáng, bền trong 3 tháng.

Chú ý: Nồng độ của dung dịch chuẩn được hiệu chỉnh dựa vào độ tinh khiết và lượng cân thực tế và quy đổi về nguyên trạng cysteamin.

4.8 Dung dịch chuẩn trung gian 10 µg/ml, hút 1 ml dung dịch chuẩn gốc 1000 µg/ml (4.7) vào bình định mức 100 ml, định mức đến vạch bằng nước. Dung dịch chuẩn được bảo quản ở 2 + 8 °C, tránh ánh sáng, bền trong 1 tháng.

5 Thiết bị, dụng cụ

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

5.1 Hệ thống sắc ký lỏng ghép khối phổ hai lần, có thể sử dụng hệ thống gồm sắc ký lỏng kèm bộ bơm mẫu tự động ghép nối với detector khối phổ loại ba tứ cực với nguồn ion hóa phun điện tử (ESI), chế độ ion dương.

5.2 Cột sắc ký lỏng HILIC, ví dụ cột sắc ký TSK Gel (150 mm x 2 mm; 3 µm) hoặc tương đương.

5.3 Máy lắc xoáy, có thể đạt tốc độ tối thiểu 1000 vòng/phút.

5.4 Máy ly tâm, có thể ly tâm 6000 vòng/phút đối với ống ly tâm 50 ml.

5.5 Cân phân tích, có thể cân chính xác đến 0,1 mg.

5.6 Bình định mức các loại: dung tích 10, 20, 50, 100, 1000 ml.

5.7 Ống ly tâm: loại dung tích 50 ml; bằng nhựa polypropylen có nắp.

5.8 Pipet tự động, điều chỉnh được thể tích trong khoảng 10 - 100 µl, 100 - 1000 µl, 500 - 5000 µl.

5.9 Giấy lọc, đường kính 11 cm.

5.10 Màng lọc ưa nước, ví dụ loại Hydrophilic minisart RC kích thước lỗ 0,2 µm hoặc tương đương.

5.11 Lọ đựng mẫu, dung tích 2 ml.

5.12 Ống đong thủy tinh, dung tích 500 ml

5.13 Bể rung siêu âm

6 Lấy mẫu

Việc lấy mẫu không quy định trong tiêu chuẩn này, nên lấy mẫu theo TCVN 4325.

Mẫu gửi đến phòng thử nghiệm phải đúng là mẫu đại diện và không bị hư hỏng hoặc bị biến đổi chất lượng trong suốt quá trình bảo quản và vận chuyển.

7 Cách tiến hành

7.1 Chuẩn bị mẫu sơ bộ

Mẫu được chuẩn bị theo TCVN 6952 Thức ăn chăn nuôi – Hướng dẫn chuẩn bị mẫu.

7.2 Chuẩn bị mẫu thử

Cân chính xác khoảng 1 g mẫu trên cân phân tích (5.5) vào ống ly tâm 50 ml (5.7). Thêm chính xác 15 ml dung dịch MeOH : H₂O (1:1, theo thể tích) (4.5). Lắc xoáy (5.3) trong 1 min, đem rung siêu âm (5.13) trong 15 min. Ly tâm trong 5 min ở tốc độ 6000 vòng/phút. Lọc qua giấy lọc (5.9) vào bình định mức 25 ml (5.6). Phần cặn được chiết lần 2 với 10 ml MeOH : H₂O (1:1, theo thể tích) (4.5) tương tự như lần 1. Sau đó gộp dịch của lần chiết 2 với lần chiết 1 và định mức trong bình định mức 25 ml bằng dung dịch MeOH : H₂O (1:1, theo thể tích) (4.5). Lọc dịch qua màng lọc 0,2 µm (5.10) rồi phân tích trên thiết bị LC-MS/MS. Nếu mẫu có hàm lượng cao, nằm ngoài đường chuẩn thì cần pha loãng với hệ số k thích hợp.

Chú ý: Cysteamin là chất dễ bị oxi hóa, cần bảo quản mẫu trong điều kiện 2 – 8°C và phân tích trong vòng 7 ngày kể từ khi nhận được mẫu thử.

7.3 Chuẩn bị mẫu trắng

Mẫu trắng là mẫu không chứa chất cần phân tích. Cân 1,00 g mẫu trắng vào ống ly tâm (5.7) và thực hiện các bước tương tự như với mẫu thử (7.2).

7.4 Chuẩn bị mẫu kiểm soát

Cân 1,00 g mẫu thử vào ống ly tâm (5.7), thêm chính xác 125 µl dung dịch chuẩn trung gian 10 µg/ml (4.8) và thực hiện các bước tương tự như với mẫu thử (7.2).

7.5 Chuẩn bị dãy dung dịch chuẩn

Các dung dịch chuẩn được chuẩn bị bằng cách thêm chuẩn vào mẫu trắng (7.3). Cân 1,00 g mẫu trắng (7.3) lần lượt vào 5 ống ly tâm 50 ml (5.7). Sau đó, thêm lần lượt 50, 125, 250, 375, 500 µl dung dịch chuẩn trung gian 10 µg/ml (4.8) để được các mẫu chuẩn lần lượt tương ứng với các hàm lượng 0,5; 1,25; 2,5; 3,75; 5,0 mg/kg và thực hiện các bước như mẫu thử (7.2).

7.6 Phân tích trên thiết bị LC-MS/MS

- Điều kiện phân tích bằng LC-MS/MS được đưa ra ở phụ lục A. Các phòng thí nghiệm có thể sử dụng điều kiện phân tích tối ưu khác để phù hợp với thiết bị của phòng.

- Thứ tự bơm mẫu: dung môi, dãy dung dịch chuẩn, dung môi, mẫu trắng, mẫu thử. Cứ 10 mẫu thử thì bơm lại dung dịch chuẩn 1,25 mg/kg hoặc bơm lại mẫu kiểm soát.

- Mẫu kiểm soát phải đạt độ thu hồi từ 80 – 110%.

8 Tính kết quả

Dựa vào đường chuẩn tương quan giữa tỷ lệ diện tích pic chuẩn với nồng độ và diện tích pic của mẫu, tính được hàm lượng cysteamine trong dung dịch mẫu thử (C).

Hàm lượng cysteamine trong mẫu thử, X, được biểu thị bằng mg/kg, được tính theo công thức sau:

$$X = \frac{C \times V \times k}{m}$$

Trong đó: C: Nồng độ cysteamine trong dung dịch mẫu thử được tính từ đường chuẩn (µg/ml)

m: Khối lượng mẫu thức ăn chăn nuôi (g)

V: Thể tích dung dịch mẫu cuối cùng phân tích LC-MS/MS (ml)

k: Hệ số pha loãng (nếu có), trong trường hợp không pha loãng thì hệ số k = 1

9 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải bao gồm ít nhất các thông tin sau đây:

- a) Các thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- b) Phương pháp lấy mẫu, nếu biết;
- c) Phương pháp thử, viện dẫn tiêu chuẩn này;

- d) Các điều kiện thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này hoặc được xem là tùy chọn, cùng với mọi tình huống bất thường có thể ảnh hưởng đến kết quả;
- e) Kết quả thử nghiệm thu được.

Phụ lục A
(Tham khảo)

Ví dụ điều kiện phân tích cysteamin bằng thiết bị LC-MS/MS

A.1 Điều kiện LC

- Cột sắc ký TSK Gel (150 mm x 2 mm; 3 µm)
- Tốc độ dòng: 0,4 ml/min.
- Nhiệt độ cột: 25°C.
- Thể tích bơm mẫu: 10 µl.
- Pha động: theo chế độ gradient như bảng dưới

Bảng 1: Gradient phân tích cysteamin

Thời gian (min)	Axit formic 0,1 % trong nước (%)	Axetonitril (%)
0,01	10	90
1,70	10	90
1,80	90	10
4,50	90	10
4,60	10	90
6,00	10	90

A.2 Điều kiện khối phổ

- Khối phổ AB Sciex 5500 QQQ (Sciex)
- Nguồn ion hóa ESI, chế độ ion dương (+), thế phun 5,0 kV
- Nhiệt độ đầu phun (IS) 450°C
- Curtain Gas (CUR) 30 psi
- Collision gas (CAD) 8 psi
- Ion source gas 1 (GS1) 30 psi
- Ion source gas 2 (GS2) 30 psi
- Declustering Potential (DP) 120

- Entrance Potential (EP) 10

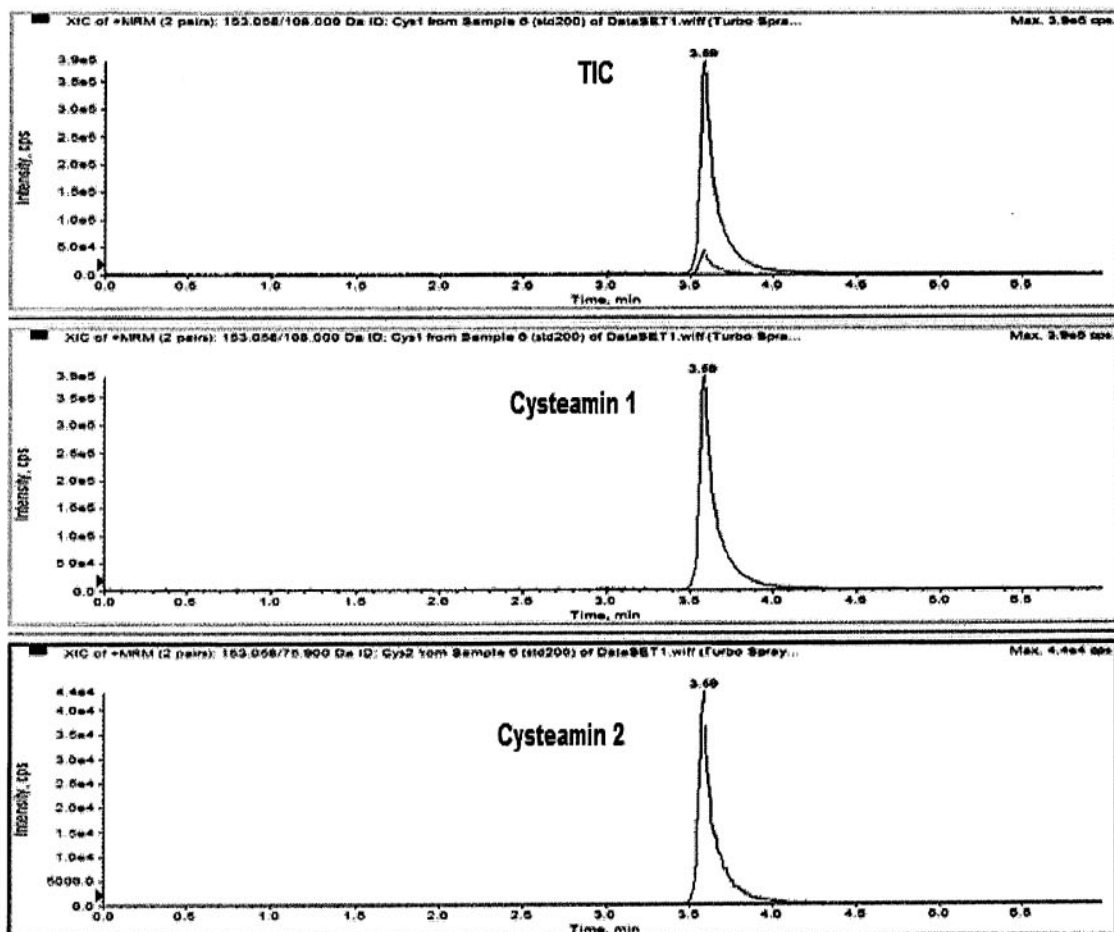
- Chế độ phân tích MRM như sau:

Bảng 2: Điều kiện MRM phân tích cysteamin

Tên chất phân tích	Mảnh mẹ (m/z)	Mảnh con (m/z)	Collision energy (eV)	Collision cell exit (CXP)
Cysteamin	153	108*	10	50
	153	76	18	50

Ghi chú: (*) mảnh định lượng

Phụ lục B
(Tham khảo)
Sắc ký đồ của cysteamin



Hình 1: Sắc ký đồ TIC, MRM của cysteamin

CHÚ THÍCH:

- TIC: sắc ký đồ tổng của cysteamin
- Cysteamin1: sắc ký đồ ion 1 (dùng để định lượng; 153→108) của cysteamin
- Cysteamin2: sắc ký đồ ion 2 (dùng để định tính; 153→76) của cysteamin

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] TCVN 4325 Thức ăn chăn nuôi – Lấy mẫu.

[2] M. Stachowicz , B. Lehmann, A. Tibi , P. Prognon, V. Daurat, D. Pradeau (1998): "Determination of total cysteamine in human serum by a high-performance liquid chromatography with fluorescence detection", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.

[3] Ogony Joshua, Mare Suneetha, Wu Wei, Ercal Nuran (2006): "High performance liquid chromatography analysis of 2-mercaptoethylamine (cysteamine) in biological samples by derivatization with N-(1-pyrenyl) maleimide (NPM) using fluorescence detection", Journal of Chromatography B.

[4] Michael J. Kelly and David Perrettt, Susan R. Rudge (1987), "The Determination of Cysteamine in Physiological Fluids by HPLC with Electrochemical Detection", Biomedical chromatography Vol 2, No 5.
