

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.020 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 25/02/2018 Trang: 1/6
---	----------------------------------	---

XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG MELAMINE 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	B	Thay đổi thể tích chiết và hệ số pha loãng	25/02/2018

A. TỔNG QUAN

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.020 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 25/02/2018 Trang: 2/6
---	--	---

I. Phạm vi áp dụng.

- Hướng dẫn việc phân tích hàm lượng Melamine có trong thức ăn chăn nuôi bằng thiết bị LC – MS/MS
- Giới hạn phát hiện của phương pháp: 0.1 ppm
- Giới hạn định lượng của phương pháp: 0.5 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 được 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
 - Micropipette 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 Zic – Hilic 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
 - Methanol
 - Acetonitrile
 - Nước cất khử ion
2. Chất chuẩn.
 - a. Chất chuẩn:

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.020 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 25/02/2018 Trang: 3/6
---	--	---

- *Melamine của sigma Aldrich hoặc tương đương*
- b. Dung dịch chuẩn:
- Dung dịch chuẩn 1000 mg/L:
 - o Cân 10.0 mg chuẩn rắn melamine vào bình định mức 10mL, định mức lên bằng hỗn hợp MeOH/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.
 - Dung dịch chuẩn 40 mg/L:
 - o Rút 1.0 mL dung dịch chuẩn 1000 mg/L cho vào bình định mức 25 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 2 mg/L:
 - o Rút 0.5 mL dung dịch chuẩn 40 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.
 - Dung dịch chuẩn 400 ppb:
 - o Rút 2 mL dung dịch chuẩn 2 mg/L cho vào bình định mức 10 mL, định mức lên bằng hỗn hợp Acetonitrile/DI: 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 01 tháng.
 - ❖ Lưu ý: Khối lượng chuẩn có thể thay đổi trong quá trình cân. Vì vậy nhân viên pha chuẩn phải tính toán lại nồng độ chuẩn dựa trên số liệu cân chuẩn thực tế. Các dung dịch chuẩn trung gian phải có nồng độ như qui định.
- c. Dãy chuẩn làm việc:
- Dãy chuẩn làm việc được pha như sau:

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.020 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 25/02/2018 Trang: 4/6
---	--	---

Stt	Chuẩn sử dụng	V _{Std} , µL	V _{final} , mL	Nồng độ µg/L
1	400 µg/L	25	10	1
2		50		2
3		100		4
4		200		10
5		500		20
6		1 000		40
7		2 000		80
<ul style="list-style-type: none">Chuẩn được bảo quản ở nhiệt độ 0 – 20⁰C và sử dụng tối đa trong 02 tuần.				

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 20 (mL)x2 dung dịch chiết Acetonitrile.
- Vortex mẫu trong 2 phút, siêu âm 30 phút, sau đó lấy ra vortex 2 phút. Ly tâm mẫu trong 15 phút.
- Lọc mẫu vào bình định mức 50 mL. định mức lên đến vạch bằng Acetonitrile.
- Pha loãng mẫu 5 lần bằng hỗn hợp ACN/H₂O (1/1).
- 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.020 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 25/02/2018 Trang: 5/6
--	--	---

Điều kiện AS		Điều kiện LC			
	Column	Thời gian	Acetonitril e 0.1%FA	H ₂ O 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	Zic – Hilic 2.1 mm x 250mm hoặc tương đương	0	95	5	0.5
		1	95	5	
		2	60	40	
		7.5	60	40	
		8	95	5	
		10	95	5	
Điều kiện MS/MS					
<ul style="list-style-type: none">- Q2 gas pressure: 1.2mT- MS acquire time: 6- Ion source : HESI- Polarity: Positive- 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	
	Melamine				
	127	85		68	

2. 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

C. TÍNH TOÁN KẾT QUẢ.

- Xây dựng đường chuẩn biểu thị mối liên hệ giữa diện tích peak m/z 85 với nồng độ chuẩn.
- Hàm lượng Melamine có trong mẫu được tính theo công thức sau:

$$C(\mu g / L) = C_0 \times f$$

Trong đó:

- C₀: nồng độ Melamine tính từ đường chuẩn

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.020 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 25/02/2018 Trang: 6/6
---	--	--

o f: hệ số pha loãng = 250

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
> 20% - 50%	± 25%

E. BÁO CÁO KẾT QUẢ.

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