

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.005 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 25/02/2018 Trang: 1/6
---	----------------------------------	---

## XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG MELAMINE TRONG THỰC PHẨM BĂNG 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
		Thay đổi format SOP	25-02-2018

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	<b>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH</b>	Mã số: HD.TN.005 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 25/02/2018 Trang: 2/6
---	--	---

## **A. TỔNG QUAN**

### **I. Phạm vi áp dụng.**

- Hướng dẫn việc phân tích hàm lượng Melamine có trong thực phẩm bằng thiết bị LC – MS/MS
- Giới hạn phát hiện của phương pháp: 50 ppb
- Giới hạn định lượng của phương pháp: 200ppb

### **II. Tài liệu tham khảo.**

- CLG – MEL 1.01: Determination and confirmation of Melamine by LC – MS/MS (\*)
- 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 làm sạch trên cột SPE, rửa giải 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.
  - Bộ chiết SPE
  - Cột SPE Oasis MCX 60mg/ 3cc
  - Bơm rút chân không.
  - 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 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
  - Ammonium hydroxide (NH<sub>4</sub>OH)

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.005 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 25/02/2018 Trang: 3/6
---	----------------------------------	---

- Perchloric acid (HClO<sub>4</sub>)
  - chloric acid (HCl)
  - Methanol
  - Acetonitrile
  - Nước cất khử ion
  - Dung dịch HClO<sub>4</sub> 0.2M: hòa tan 11.4g perchloric acid trong 1L nước.
  - Dung dịch HCl (1% v): hòa tan 1mL HCl đậm đặc trong 99mL nước.
  - Dung dịch Methanol 5% NH<sub>4</sub>OH: hòa tan 5mL NH<sub>4</sub>OH trong 95mL Methanol.
2. Chất chuẩn.
- a. Chất chuẩn:
- *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/H<sub>2</sub>O (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<sub>base</sub>: 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/H<sub>2</sub>O (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/H<sub>2</sub>O (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.
- c. Dây chuẩn làm việc:
- Dây 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.005 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 25/02/2018 Trang: 4/6
---	----------------------------------	---

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

d. Pha động chạy máy:

- H<sub>2</sub>O 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 m (g) mẫu vào ống ly tâm 50mL và thêm vào V (mL) dung dịch chiết HClO<sub>4</sub> 0.2M như bảng sau:

Nền mẫu	Lượng mẫu lấy	Thể tích dịch chiết (mL)
Nền mẫu rắn	1 g	10
Nền mẫu sệt (sữa chua, kem)	1 g	10
Mẫu lỏng	1 mL	9

- Vortex mẫu trong 2 phút, siêu âm 30 phút, sau đó lấy ra vortex 2 phút. Ly tâm mẫu trong 15 phút.

<b>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</b>	<b>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH</b>	Mã số: HD.TN.005 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 25/02/2018 Trang: 5/6
--	--	---

b. Làm sạch mẫu trên SPE

- Cột SPE được hoạt hóa 3mL MeOH (5% NH<sub>4</sub>OH), 3mL HCl 1%, 3mL MeOH và 3mL nước DI với tốc độ 1mL/min
- Cho 2.0mL dịch chiết của mẫu qua cột với tốc độ 1mL/min.
- Rửa cột với 3mL nước DI, 3mL MeOH.
- Rút khô cột trong 3 phút.

c. Rửa giải Melamine.

- Rửa giải melamine ra khỏi cột bằng 3mL MeOH (5% NH<sub>4</sub>OH) vào bình cầu.
- Cô quay và định mức lại bằng 1mL pha động ACN/H<sub>2</sub>O (1/4).
- 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	Acetonitril e 0.1%FA	H <sub>2</sub> O 0.1% FA	Tốc độ dòng, mL/phút
<ul style="list-style-type: none"><li>- Injection type: Full loop</li><li>- Needle height from bottom: 1.0</li><li>- Flush volume: 100µL</li><li>- Tray temp control: off</li><li>- Column oven control: off</li><li>- Wash column: 500µL</li></ul>	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"><li>- Q2 gas pressure: 1.2mT</li><li>- MS acquire time: 6</li><li>- Ion source : HESI</li><li>- Polarity: Positive</li><li>- Scan type: SRM</li><li>- Capillary temp: 350°C</li><li>- Vaporizer temperature: 200</li><li>- ESI spray voltage: ≥ 3000V</li><li>- Sheath gas:30</li><li>- Aux gas : 5</li></ul>	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:
  - o Pha động định mức mẫu.
  - o Các điểm chuẩn từ thấp đến cao.

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.005 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 25/02/2018 Trang: 6/6
---	----------------------------------	---

- 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 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:

- o  $C_0$ : nồng độ Melamine tính từ đường chuẩn
- o  $f$ : hệ số pha loãng =  $(V_{dm} * V_{chiết}) * n / (V_{qua\ cột} * m)$  ( với  $n$ : hệ số pha loãng mẫu sau định mức nếu có)

#### 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	

- 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:
  - o BM.15.04a
  - o BM.15.06