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

1. **TỔNG QUAN**
2. **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 chủa phương pháp: 50 ppb
* Giới hạn định lượng của phương pháp: 200ppb

1. **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

1. **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
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.
   * Bộ chiết SPE
   * Cột SPE Oasis MCX 60mg/ 3cc
   * Bơm rút chân không.
   * 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 Zic – Hilic 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

* Ammonium hydroxide (NH4OH)
* Perchloric acid (HClO4)
* chloric acid (HCl)
* Methanol
* Acetonitrile
* Nước cất khử ion
* Dung dịch HClO4 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% NH4OH: hòa tan 5mL NH4OH trong 95mL Methanol.

1. Chất chuẩn.
2. Chất chuẩn:

* *Melamine của sigma Aldrich hoặc tương đương*

1. Dung dịch chuẩn:

* Dung dịch chuẩn 1000 mg/L:
  + Cân 10.0 mg chuẩn rắn melamine vào bình định mức 10mL, định mức lên bằng hỗn hợp MeOH/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.
* Dung dịch chuẩn 40 mg/L:
  + 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). 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 2 mg/L:
  + 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). Votex 2 phút.
  + Chuẩn được đựng trong ống nghiệm, bảo quản ở nhiệt độ 0 – 200C. Chuẩn sử dụng tối đa 01 tháng.

1. Dãy chuẩn làm việc:

* Dẫy chuẩn làm việc được pha như sau:

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Stt | Chuẩn sử dụng | VStd, µL | Vfinal, 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 |
| * *Chuẩn được bảo quản ở nhiệt độ 0 – 200C và sử dụng tối đa trong 02 tuần.* | | | | |

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 sang chiếu trực tiếp vào mẫu.

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

* Cân m (g) mẫu vào ống ly tâm 50mL và thêm vào V (mL) dung dịch chiết HClO4 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 |

* Votex mẫu trong 2 phút, siêu âm 30 phút, sau đó lấy ra votex 2 phút. Ly tâm mẫu trong 15 phút.

1. Làm sạch mẫu trên SPE

* Cột SPE được hoạt hóa 3mL MeOH (5% NH4OH), 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.

1. Rửa giải Melamine.

* Rửa giải melamine ra khỏi cột bằng 3mL MeOH (5% NH4OH) vào bình cầu.
* Cô quay và định mức lại bằng 1mL pha động ACN/H2O (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*** | ***Acetonitrile***  ***0.1%FA*** | ***H2O***  ***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 | 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 | | | | | | |
| * Q2 gas pressure: 1.2mT * MS acquire time: 6 * Ion source : HESI * Polarity: Positive * 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 |
| Melamine | | | | |
| 127 | | 85 | | 68 |
|  | | | | |

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 m/z 85 với nồng độ chuẩn.
* Hàm lượng Melamine có trong mẫu được tính theo công thức sau:



Trong đó:

* C0: nồng độ Melamine tính từ đường chuẩn
* f: hệ số pha loãng = (Vđm\*Vchiết)\*n/(Vqua cột\*m) ( với n: hệ số pha loãng mẫu sau định mức nếu có)

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 |

* 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