

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 9048 : 2012

ISO/TS 15495:2010

Xuất bản lần 1

**SỮA, SẢN PHẨM SỮA
VÀ THỨC ĂN CÔNG THỨC DÀNH CHO TRẺ SƠ SINH-
HƯỚNG DẪN ĐỊNH LƯỢNG MELAMINE VÀ AXIT
XYANURIC BẰNG SẮC KÝ LỎNG- KHÓI PHỎ HAI LẦN
(LC-MS/MS)**

Milk, milk products and infant formulae –

Guidelines for the quantitative determination of melamine and cyanuric acid

By liquid chromatography – tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

HÀ NỘI - 2012

Lời nói đầu

TCVN 9048:2012 hoàn toàn tương đương với ISO/TS 15495:2010;

TCVN 9048:2012 do Cục An toàn vệ sinh thực phẩm tổ chức biên soạn,
Bộ Y tế đề nghị, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định,
Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Sữa, sản phẩm sữa và thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh – Hướng dẫn định lượng melamine và axit xyanuric bằng sắc kí lỏng-khối phổ hai lần (LC-MS/MS)

Milk, milk products and infant formulae – Guidelines for the quantitative determination of melamine and cyanuric acid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này đưa ra hướng dẫn để định lượng melamine và axit xyanuric trong sữa, các sản phẩm sữa bột và thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh bằng sắc kí lỏng-khối phổ hai lần (LC-MS/MS) ion hóa phun điện tử.

CHÚ THÍCH: Các ví dụ về các phương pháp LC-MS/MS được nêu trong Phụ lục A và Phụ lục B.

2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn này. Đối với các tài liệu viện dẫn ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản được nêu. Đối với các 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 6910-1 (ISO 5725-1), *Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo – Phần 1: Nguyên tắc và định nghĩa chung.*

TCVN 8244 (ISO 3534) (tất cả các phần), *Thống kê học – Từ vựng và ký hiệu.*

3 Thuật ngữ và định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này sử dụng các thuật ngữ và định nghĩa được nêu trong TCVN 6910-1 (ISO 5725-1), TCVN 8244 (ISO 3534) và các thuật ngữ và định nghĩa sau đây:

3.1

Hàm lượng melamine (melamine content)

Phần khối lượng của chất được xác định bằng các quy trình quy định trong tiêu chuẩn này.

CHÚ THÍCH: Hàm lượng melamine được biểu thị bằng miligam trên kilogam sản phẩm.

TCVN 9048:2012

3.2

Hàm lượng axit xyanuric (cyanuric acid content)

Phần khối lượng của chất được xác định bằng các quy trình quy định trong tiêu chuẩn này.

CHÚ THÍCH: Hàm lượng axit xyanuric được biểu thị bằng miligam trên kilogam sản phẩm.

3.3

Giới hạn tối đa (maximum limit)

ML

Hàm lượng tối đa của melamine hoặc axit xyanuric được phép hoặc chấp nhận được trong sữa, các sản phẩm sữa bột và thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh.

4 Nguyên tắc

Mẫu được đồng hóa và có thể được hoàn nguyên nếu ở dạng bột. Thêm dung môi thích hợp vào mẫu thử để kết tủa protein từ nền mẫu và để chiết melamine và axit xyanuric. Sau khi li tâm, phần dịch nổi phía trên được phân tích bằng LC-MS/MS.

Đối với mục đích của tiêu chuẩn này, LC-MS/MS tạo ra bằng bất kì phương pháp kết nối sắc kí lỏng hiệu năng cao (HPLC) hoặc sắc kí lỏng siêu hiệu năng (UPLC) với detector khối phổ loại ba tứ cực hoặc bẫy ion. Sự tách sắc kí dựa trên sắc kí lỏng với tương tác ưa nước (HILIC) để đảm bảo tách tốt melamine và axit xyanuric. Sự ion hóa các chất được thực hiện bằng kỹ thuật ion hóa phun điện tử (ESI) và phát hiện dựa trên chế độ theo dõi phản ứng được chọn (SRM).

CHÚ THÍCH: Có thể sử dụng các kỹ thuật ion hóa khác với hiệu năng tương đương. Các mảnh khối khác có thể được sử dụng miễn là chúng tuân thủ các tiêu chí về hiệu năng (các điểm xác định) theo 2002/657/EC (Tài liệu tham khảo [8]).

Việc định lượng melamine và axit xyanuric dựa vào dung dịch pha loãng chứa các chất chuẩn nội đồng vị bền cho cả hai chất phân tích.

5 Lấy mẫu

Việc lấy mẫu không được quy định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo TCVN 6400 (ISO 707)⁽¹⁾.

Mẫu gửi đến phòng thử nghiệm phải đúng là mẫu đại diện, không bị hư hại hoặc thay đổi trong quá trình vận chuyển hoặc bảo quản.

6 Chuẩn bị mẫu thử

Khối lượng của mẫu thử để phân tích hoặc hoàn nguyên (tùy chọn) cần đảm bảo đại diện cho sản phẩm và thích hợp để đảm bảo hiệu quả chiết của các chất phân tích.

Các chuẩn đồng vị đánh dấu nên được thêm trực tiếp vào mẫu khô hoặc ướt ngay từ bước đầu tiên của quá trình phân tích.

Nồng độ của các chất chuẩn nội thêm vào cần tương ứng với hàm lượng melamine và axit xyanuric cần phân tích. Việc chiết có thể thực hiện với một thể tích tối thiểu 5 ml dung môi chiết cho mỗi gam mẫu, để thu được tỉ lệ phần khối lượng của dung môi hữu cơ trong hỗn hợp dịch chiết cuối cùng ít nhất là 70 %. Nên chiết ít nhất trong 5 min bằng cách lắc mạnh hoặc kết hợp giữa rung siêu âm và lắc xoay. Sau đó li tâm mẫu trong điều kiện thích hợp và được lọc qua màng lọc.

Bất kì cách chuẩn bị mẫu thử nào khác cũng được chấp nhận nếu đáp ứng được các tiêu chí về hiệu năng và được xác nhận giá trị sử dụng theo các yêu cầu quy định trong tiêu chuẩn này.

7 Cách tiến hành

7.1 Điều kiện LC-MS/MS – Sắc kí

Sử dụng cột riêng để tách sắc kí lỏng.

Thời gian lưu tối thiểu chấp nhận được đối với melamine và axit xyanuric phải gấp hai lần thời gian lưu tương ứng của thể tích chết của cột. Thời gian lưu thu được từ dịch chiết phải trùng với thời gian lưu của chất chuẩn trong dải quy định.

Tỉ lệ giữa thời gian lưu tương đối của chất phân tích với thời gian lưu tương đối của chất chuẩn nội phải tương ứng với tỉ lệ này của chất chuẩn với sai số $\pm 2,5\%$.

7.2 Điều kiện LC-MS/MS – Khối phổ

Việc phát hiện phổ khối của melamine và axit xyanuric được thực hiện tốt nhất bằng cách sử dụng thiết bị LC-MS/MS ba tứ cực.

Phân tích định lượng và định tính phải đạt được trong chế độ SRM. Khi sử dụng thiết bị ba tứ cực cho mỗi hợp chất, tối thiểu là hai quá trình chuyển khối được sử dụng để phát hiện chất phân tích, trong khi ít nhất một quá trình chuyển khối được sử dụng cho chất chuẩn nội. Tuy nhiên, nên sử dụng hai quá trình chuyển khối cho chất chuẩn nội.

Sự chuyển khối thích hợp nhất (cường độ cao nhất) được sử dụng để định lượng (ion định lượng) và sự chuyển đổi thứ hai để khẳng định (ion định tính). Tỉ lệ giữa cường độ ion định tính và cường độ ion định lượng (Rq/Q) phải được kiểm tra và tiêu chí chấp nhận được áp dụng dựa trên giá trị của Rq/Q (Bảng 1).

Bảng 1 – Giới hạn tương đối cho phép tối đa đối với tỉ lệ giữa cường độ ion định tính và ion định lượng (Rq/Q)

Rq/Q (% ion định lượng)	Dung sai (tương đối, tính bằng %)
> 50	± 20
> 20 đến 50	± 25
> 10 đến 20	± 30
≤ 10	± 50

8 Các tiêu chí về hiệu năng

8.1 Yêu cầu chung

Mỗi phòng thử nghiệm cần xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp thực hiện để chứng minh sự thích hợp với mục đích. Nên xác nhận giá trị sử dụng theo quy trình được quy định trong Tài liệu tham khảo [8]. Các giới hạn tối đa và tối thiểu cho các đặc tính, được chấp nhận trong quy trình nêu trên, được quy định tại 8.2 và 8.5.

8.2 Độ nhạy tối thiểu yêu cầu

Giới hạn định lượng (LOQ) yêu cầu nên thấp hơn ít nhất 10 lần so với giới hạn tối đa (ML) để đảm bảo việc định lượng độ tin cậy tại ML.

8.3 Độ đúng và độ thu hồi

Theo tiêu chuẩn này, độ đúng và độ thu hồi thông thường từ 95 % đến 105 %. Để phương pháp phân tích được chấp nhận, độ đúng và độ thu hồi cần phải đạt từ 80 % đến 110 %.

8.4 Độ lặp lại

Hệ số biến thiên của độ lặp lại thông thường từ 3 % đến 6 %, với giới hạn <15 %.

8.5 Độ tái lập nội bộ phòng thử nghiệm

Hệ số biến thiên của độ tái lập nội bộ phòng thử nghiệm thường từ 5 % đến 10 %, với giới hạn <15 %.

9 Báo cáo thử nghiệm

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

- a) tất cả thông tin cần thiết để nhận dạng đầy đủ mẫu thử;
- b) phương pháp lấy mẫu được sử dụng, nếu biết;
- c) phương pháp thử được sử dụng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- d) tất cả các chi tiết vận hành không được quy định trong tiêu chuẩn này, hoặc được coi là tùy chọn, cùng với chi tiết về bất kì sự cố bất thường có thể ảnh hưởng đến kết quả thử nghiệm;
- e) kết quả thử nghiệm thu được;
- f) kết quả cuối cùng thu được, nếu kiểm tra độ lặp lại.

Phụ lục A

(Tham khảo)

Ví dụ A – Sữa bò và thức ăn công thức từ sữa dành cho trẻ sơ sinh – Định lượng đồng thời melamine và axit xyanuric bằng sắc kí lỏng khối phổ hai lần ion hóa phun điện tử

A.1 Phạm vi áp dụng

Phụ lục này quy định phương pháp đã được xác nhận giá trị sử dụng nội bộ để xác định hàm lượng melamine và axit xyanuric trong sữa bò (CM) và thức ăn công thức dạng bột từ sữa dành cho trẻ sơ sinh (PIF) bằng sắc kí lỏng khối phổ hai lần (LC-MS/MS) ion hóa phun điện tử với chế độ SRM.

Việc xác định sự có mặt của melamine và axit xyanuric trong mẫu thử được tiến hành dựa trên các tiêu chí khẳng định được quy định trong Quyết định số 2002/657/EC của Ủy ban châu Âu (Tài liệu tham khảo [8]).

Việc định lượng được tiến hành dựa trên việc sử dụng các chất đánh dấu ($^{13}\text{C}_3$, $^{15}\text{N}_3$)-melamine và ($^{13}\text{C}_3$, $^{15}\text{N}_3$)-axit xyanuric làm chất chuẩn nội (IS). Các chi tiết kĩ thuật, dữ liệu xác nhận giá trị sử dụng và kết quả thử nghiệm thành thạo xem Tài liệu tham khảo [10].

Phương pháp này cho phép định lượng chính xác tại các nồng độ dưới đây và cao hơn:

- hàm lượng melamine và axit xyanuric trong CM tương ứng ở nồng độ 0,05 mg/kg và 0,10 mg/kg;
- hàm lượng melamine và axit xyanuric trong PIF tương ứng ở nồng độ 0,05 mg/kg và 0,10 mg/kg;
- hàm lượng melamine và axit xyanuric trong PIF ở nồng độ 1,00 mg/kg.

A.2 Thuật ngữ và định nghĩa

Xem Điều 3.

A.3 Nguyên tắc

Quá trình phân tích gồm pha loãng mẫu trong hỗn hợp dung dịch axetonitril và nước, để kết tủa protein đồng thời chiết melamine và axit xyanuric. Sau khi li tâm, phần dịch phía trên được phân tích bằng LC-MS/MS ở chế độ SRM, thực hiện bằng cả chế độ ion âm và ion dương. Sự chuyển đổi giữa hai chế độ được thực hiện trong cùng một lần phân tích.

A.4 Thuốc thử

Chỉ sử dụng các thuốc thử tinh khiết phân tích, trừ khi có quy định khác và sử dụng nước cất hoặc nước đã loại khoáng hoặc nước có độ tinh khiết tương đương.

CHÚ THÍCH: Số CAS được cung cấp cho mỗi thuốc thử.

Trước khi sử dụng hóa chất, cần tuân theo hướng dẫn hoặc thủ tục đảm bảo an toàn được quy định bởi cơ quan có thẩm quyền.

A.4.1 Nước, sử dụng cho sắc kí (số CAS 7732-18-5).

A.4.2 Axetonitril (CH_3CN), dùng cho sắc kí lỏng (số CAS 75-05-8).

A.4.3 Amoni axetat ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$), tinh khiết phân tích (số CAS 631-61-8).

A.4.4 Axit xyanuric (CNOH)₃, > 98 % khối lượng (số CAS 108-80-5)

A.4.4.1 Dung dịch chuẩn gốc axit xyanuric, nồng độ 0,25 mg/ml.

Cân 63,8 mg axit xyanuric (A.4.4), chính xác đến 0,1 mg, cho vào bình định mức 250 ml (A.5.12), tính lại nồng độ theo độ tinh khiết của từng chất. Hoà tan và thêm nước (A.4.1) đến vạch. Rung siêu âm trong ít nhất 15 min cho đến khi tan hoàn toàn.

Dung dịch chuẩn gốc axit xyanuric được bảo quản ở nhiệt độ phòng, tránh ánh sáng. Pha mới dung dịch chuẩn gốc hàng tuần.

A.4.4.2 Dung dịch chuẩn làm việc axit xyanuric I, nồng độ 20 µg/ml.

Dùng pipet lấy 4 ml dung dịch chuẩn gốc axit xyanuric (A.4.4.1) chuyển vào bình định mức 50 ml (A.5.12). Thêm nước (A.4.1) đến vạch và trộn. Dung dịch chuẩn làm việc axit xyanuric I được bảo quản ở nhiệt độ phòng, tránh ánh sáng. Pha mới dung dịch chuẩn làm việc I hàng tuần.

A.4.4.3 Dung dịch chuẩn làm việc axit xyanuric II, nồng độ 2 µg/ml.

Dùng pipet lấy 1 ml dung dịch chuẩn làm việc axit xyanuric I (A.4.4.2) chuyển vào bình định mức 10 ml (A.5.12). Thêm nước (A.4.1) đến vạch và trộn. Dung dịch chuẩn làm việc axit xyanuric II được bảo quản ở nhiệt độ phòng, tránh ánh sáng. Pha mới dung dịch chuẩn II hàng tuần.

A.4.4.4 Dung dịch chuẩn làm việc axit xyanuric III, nồng độ 200 ng/ml.

Dùng pipet lấy 0,5 ml dung dịch chuẩn làm việc axit xyanuric I (A.4.4.2) chuyển vào bình định mức 50 ml (A.5.12). Thêm nước (A.4.1) đến vạch và trộn. Dung dịch chuẩn làm việc axit xyanuric III được bảo quản ở nhiệt độ phòng, tránh ánh sáng. Pha mới dung dịch chuẩn III hàng tuần.

TCVN 9048:2012

A.4.5 Axit xyanuric đánh dấu ($^{13}\text{C}_3\text{H}_3^{16}\text{N}_3\text{O}_3$), độ tinh khiết đồng vị: $^{13}\text{C}_3 = 99\%$, vòng $^{15}\text{N}_3 > 98\%$, độ tinh khiết khối lượng đạt 90%, nồng độ 100 $\mu\text{g/ml}$ trong nước – 1,2 ml.

A.4.5.1 Dung dịch chuẩn gốc axit xyanuric đánh dấu, nồng độ 100 $\mu\text{g/ml}$.

Dung dịch chuẩn gốc axit xyanuric đánh dấu sử dụng trực tiếp được bán sẵn trên thị trường. Dung dịch được bảo quản ở nhiệt độ phòng, tránh ánh sáng.

Sử dụng cùng mẻ chất chuẩn nội để lập đường chuẩn tại A.6.2 và để thêm chuẩn vào dịch chiết như trong quy trình chiết mẫu (A.9.1).

A.4.5.2 Dung dịch làm việc axit xyanuric đánh dấu I, nồng độ 20 $\mu\text{g/ml}$.

Dùng pipet lấy 1 ml dung dịch chuẩn gốc axit xyanuric đánh dấu (A.4.5.1) chuyển vào bình định mức 5 ml (A.5.12). Thêm nước (A.4.1) đến vạch và trộn. Dung dịch làm việc axit xyanuric đánh dấu I được bảo quản ở nhiệt độ phòng, tránh ánh sáng.

A.4.5.3 Dung dịch làm việc axit xyanuric đánh dấu II, nồng độ 2 $\mu\text{g/ml}$.

Dùng pipet lấy 0,5 ml dung dịch làm việc axit xyanuric đánh dấu I (A.4.5.2) chuyển vào bình định mức 5 ml (A.5.12). Thêm nước (A.4.1) đến vạch và trộn. Dung dịch làm việc axit xyanuric đánh dấu II được bảo quản ở nhiệt độ phòng, tránh ánh sáng.

A.4.5.4 Dung dịch làm việc axit xyanuric đánh dấu III, nồng độ 200 ng/ml.

Dùng pipet lấy 0,5 ml dung dịch làm việc axit xyanuric đánh dấu I (A.4.5.2) chuyển vào bình định mức 50 ml (A.5.12). Thêm nước (A.4.1) đến vạch và trộn. Dung dịch làm việc axit xyanuric đánh dấu III được bảo quản ở nhiệt độ phòng, tránh ánh sáng.

A.4.6 Melamine ($\text{C}_3\text{H}_6\text{N}_6$), phần khối lượng $> 99\%$ (số CAS 108-78-1).

A.4.6.1 Dung dịch chuẩn gốc melamine, nồng độ 0,25 mg/ml.

Cân 62,5 mg melamine (A.4.6), chính xác đến 0,1 mg, cho vào bình định mức 250 ml (A.5.12). Hòa tan và thêm nước (A.4.1) đến vạch. Rung siêu âm trong ít nhất 15 min cho đến khi tan hoàn toàn. Dung dịch chuẩn được bảo quản ở nhiệt độ phòng, tránh ánh sáng. Pha mới dung dịch chuẩn gốc hàng tuần.

A.4.6.2 Dung dịch làm việc melamine I, nồng độ 20 $\mu\text{g/ml}$.

Dùng pipet lấy 4 ml dung dịch chuẩn gốc melamine (A.4.6.1) chuyển vào bình định mức 50 ml (A.5.12). Thêm nước (A.4.1) đến vạch và trộn. Dung dịch làm việc melamine I được bảo quản ở nhiệt độ phòng, tránh ánh sáng. Pha mới dung dịch làm việc I hàng tuần.

A.4.6.3 Dung dịch làm việc melamine II, nồng độ 2 µg/ml.

Dùng pipet lấy 1 ml dung dịch làm việc melamine I (A.4.6.2) chuyển vào bình định mức 10 ml (A.5.12). Thêm nước (A.4.1) đến vạch và trộn. Dung dịch làm việc melamine II được bảo quản ở nhiệt độ phòng, tránh ánh sáng. Pha mới dung dịch làm việc II hàng tuần.

A.4.6.4 Dung dịch làm việc melamine III, nồng độ 200 ng/ml.

Dùng pipet lấy 0,5 ml dung dịch làm việc melamine I (A.4.6.2) chuyển vào bình định mức 50 ml (A.5.12). Thêm nước (A.4.1) đến vạch và trộn. Dung dịch làm việc melamine III được bảo quản ở nhiệt độ phòng, tránh ánh sáng. Pha mới dung dịch làm việc III hàng tuần.

A.4.7 Melamine đánh dấu [$^{13}\text{C}_3\text{N}_3(^{15}\text{NH}_2)_3$], độ tinh khiết đồng vị: $^{13}\text{C}_3 = 99\%$, amino- $^{15}\text{N}_3 = 98\%$, độ tinh khiết $\geq 98\%$ khối lượng, 100 µg/ml trong nước – 1,2 ml, ví dụ CNLM-8150-1.2¹⁾.

A.4.7.1 Dung dịch gốc melamine đánh dấu, nồng độ 10 µg/ml.

Dung dịch gốc melamine đánh dấu được bán sẵn trên thị trường. Dung dịch được bảo quản ở nhiệt độ phòng, tránh ánh sáng. Sử dụng cùng mẻ chất chuẩn nội để lập đường chuẩn trong A.6.2 và để thêm chuẩn vào dịch chiết như trong quy trình chiết mẫu (A.9.1).

A.4.7.2 Dung dịch làm việc melamine đánh dấu I, nồng độ 20 µg/ml.

Dùng pipet lấy 1 ml dung dịch gốc melamine đánh dấu (A.4.7.1) chuyển vào bình định mức 5 ml (A.5.12). Thêm nước (A.4.1) đến vạch và trộn. Dung dịch làm việc melamine đánh dấu I được bảo quản ở nhiệt độ phòng, tránh ánh sáng.

A.4.7.3 Dung dịch làm việc melamine đánh dấu II, nồng độ 2 µg/ml.

Dùng pipet lấy 0,5 ml dung dịch làm việc melamine đánh dấu I (A.4.7.2) chuyển vào bình định mức 5 ml (A.5.12). Thêm nước (A.4.1) đến vạch và trộn. Dung dịch làm việc melamine đánh dấu II được bảo quản ở nhiệt độ phòng, tránh ánh sáng.

A.4.7.4 Dung dịch làm việc melamine đánh dấu III, nồng độ 200 ng/ml.

Dùng pipet lấy 0,5 ml dung dịch làm việc melamine đánh dấu I (A.4.7.2) chuyển vào bình định mức 50 ml (A.5.12). Thêm nước (A.4.1) đến vạch và trộn. Dung dịch làm việc melamine đánh dấu II được bảo quản ở nhiệt độ phòng, tránh ánh sáng.

¹⁾ CNLM-8150-1.2 là tên thương mại của sản phẩm được cung cấp bởi Cambridge Isotope Laboratories. Thông tin này đưa ra nhằm tạo thuận lợi cho người sử dụng tiêu chuẩn và tiêu chuẩn này không ấn định phải sử dụng các sản phẩm này. Có thể sử dụng các sản phẩm tương đương nếu chúng cho kết quả giống nhau.

A.5 Thiết bị, dụng cụ

Dụng cụ thủy tinh (ví dụ bình định mức, A.5.12) dùng để chuẩn bị dung dịch chuẩn gốc và dung dịch làm việc có thể bị nhiễm bẩn, đặc biệt là nhiễm melamine, do đó nên được làm sạch theo quy trình sau:

- dùng nước vòi đã làm ấm và chất tẩy rửa để rửa dụng cụ thủy tinh;
- dùng chổi rửa làm sạch các dụng cụ thủy tinh;
- rửa các nút chai thủy tinh với nước vòi đã làm ấm rồi tráng lại ba lần bằng nước cất;
- tráng dụng cụ thủy tinh bằng etanol và để khô trong không khí.

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

A.5.1 Ống li tâm, bằng polypropylen, dung tích 50 ml.

A.5.2 Máy li tâm, gồm một rôto, thích hợp với ống 50 ml, có gia tốc 4 000g.

A.5.3 Pipet, dung tích 0,5 ml, 1 ml và 4 ml, loại A (hoặc AS) của TCVN 7150 (ISO 835)^[2].

A.5.4 Micropipet tự động, ISO 8655-2^[6], có thể hiệu chuẩn bởi người sử dụng.

A.5.5 Màng lọc nylon, cỡ lỗ 0,22 µm.

A.5.6 Bộ loại khí (nếu không phải là một phần của hệ thống sắc kí lỏng).

A.5.7 Cân phân tích, có thể cân chính xác đến 0,1 mg.

A.5.8 Bể rung siêu âm.

A.5.9 Lọ đựng mẫu.

A.5.10 Thiết bị LC-MS/MS

Hệ thống HPLC 1100²⁾ của hãng Agilent gắn với khối phổ ba tứ cực 4000 Qtrap³⁾ được trang bị với nguồn ion hóa phun điện tử Turbulon Spray^{® 3)}.

A.5.11 Cột HPLC, TSKgel Amide-80⁴⁾, đường kính 2,0 mm, chiều dài 250 mm, đường kính hạt nhỏ 5 µm.

²⁾ HPLC Agilent 1100 là tên thương mại của thiết bị được cung cấp bởi Agilent. Thông tin này đưa ra nhằm tạo thuận lợi cho người sử dụng tiêu chuẩn và tiêu chuẩn này không ấn định phải sử dụng các sản phẩm này. Có thể sử dụng các sản phẩm tương đương nếu chúng cho kết quả giống nhau.

³⁾ 4000 Qtrap và Turbulon Spray là tên thương mại của các thiết bị cung cấp bởi Applied Biosystem. Thông tin này đưa ra nhằm tạo thuận lợi cho người sử dụng tiêu chuẩn và tiêu chuẩn này không ấn định phải sử dụng các sản phẩm này. Có thể sử dụng các sản phẩm tương đương nếu chúng cho kết quả giống nhau.

A.5.12 Bình định mức, dung tích 5 ml, 10 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml và 1 000 ml, loại A của TCVN 7153 (ISO 1042)^[3].

A.6 Chuẩn bị thuốc thử

A.6.1 Dung dịch hỗn hợp axetonitril và nước (tỉ lệ 70 + 30)

Dùng ống đong, lấy 70 ml axetonitril (A.4.2) và 30 ml nước (A.4.1) vào bình định mức 100 ml (A.5.12) và trộn. Dung dịch được bảo quản ở nhiệt độ phòng không quá 1 tuần.

A.6.2 Dung dịch chuẩn melamine và axit xyanuric

A.6.2.1 Dung dịch chuẩn melamine và axit xyanuric (nồng độ từ 0 mg/l đến 2,00 mg/l) với chất chuẩn nội tương ứng (nồng độ là 1,00 mg/l)

Chuẩn bị năm dung dịch chuẩn hỗn hợp được pha trong các bình định mức 5 ml (A.5.12) có dải nồng độ từ 0 mg/l đến 2,00 mg/l và nồng độ chất chuẩn nội 1,00 mg/l được nêu trong Bảng A.1.

Dung dịch chuẩn được bảo quản ở 4 °C, tránh ánh sáng.

Bảng A.1 – Hỗn hợp chuẩn melamine và axit xyanuric từ 1 đến 5

	Dung dịch chuẩn				
	1	2	3	4	5
Dung dịch làm việc melamine II (A.4.6.3), µl	0	25	50	75	100
Dung dịch làm việc axit xyanuric II (A.4.4.3), µl	0	25	50	75	100
Dung dịch làm việc melamine đánh dấu II (A.4.7.3), µl	50	50	50	50	50
Dung dịch làm việc axit xyanuric đánh dấu II (A.4.5.3), µl	50	50	50	50	50
Dung dịch axetonitril-nước (A.6.1), µl	4900	4850	4800	4750	4700
Tương ứng với:					
Tổng nồng độ của các chất phân tích, ng/ml	0	10	20	30	40
Tổng nồng độ của các chất chuẩn nội, ng/ml	20	20	20	20	20
Hàm lượng các chất phân tích (tương ứng trong mẫu), mg/kg	0,00	0,50	1,00	1,50	2,00
Hàm lượng các chất chuẩn nội (tương ứng trong mẫu), mg/kg	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

⁴⁾ TSKgel Amide-80 là tên thương mại của các thiết bị cung cấp bởi Tosoh Bioscience. Thông tin này đưa ra nhằm tạo thuận lợi cho người sử dụng tiêu chuẩn và tiêu chuẩn này không ấn định phải sử dụng các sản phẩm này. Có thể sử dụng các sản phẩm tương đương nếu chúng cho kết quả giống nhau.

TCVN 9048:2012

A.6.2.2 Dung dịch chuẩn hỗn hợp gồm melamine (nồng độ từ 0 mg/l đến 0,20 mg/l) và axit xyanuric (nồng độ từ 0 mg/l đến 0,30 mg/l) với các chất chuẩn nội tương ứng (nồng độ 0,10 mg/l)

Chuẩn bị năm dung dịch chuẩn hỗn hợp trong các bình định mức 5 ml (A.5.12) có dải nồng độ melamine từ 0 mg/l đến 0,20 mg/l và nồng độ axit xyanuric từ 0 mg/l đến 0,30 mg/l với nồng độ chất chuẩn nội tương ứng cho cả 2 chất là 0,10 mg/l được nêu trong Bảng A.2.

Dung dịch được bảo quản ở 4 °C, tránh ánh sáng.

Bảng A.2 – Hỗn hợp chuẩn melamine và axit xyanuric từ 6 đến 10

	Dung dịch chuẩn				
	6	7	8	9	10
Dung dịch làm việc melamine III (A.4.6.4), µl	0	25	50	75	100
Dung dịch làm việc axit xyanuric III (A.4.4.4), µl	0	50	75	100	150
Dung dịch làm việc melamine đánh dấu III (A.4.7.4), µl	50	50	50	50	50
Dung dịch làm việc axit xyanuric đánh dấu III (A.4.5.4), µl	50	50	50	50	50
Dung dịch axetonitril-nước (A.6.1), µl	4900	4825	4775	4725	4650
Tương ứng với:					
Nồng độ melamine, ng/ml	0	1	2	3	4
Nồng độ axit xyanuric, ng/ml	0	2	3	4	6
Nồng độ chất chuẩn nội (melamine hoặc axit xyanuric), ng/ml	2	2	2	2	2
Hàm lượng melamine (tương ứng trong mẫu), mg/kg	0,00	0,05	0,10	0,15	0,20
Hàm lượng axit xyanuric (tương ứng trong mẫu), mg/kg	0,00	0,10	0,15	0,20	0,30
Hàm lượng chất chuẩn nội (melamine và axit xyanuric, tương ứng trong mẫu), mg/kg	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10

A.6.3 Dung dịch chạy sắc kí

A.6.3.1 Pha động A: dung dịch amoni axetat nồng độ 10 mmol/l trong nước.

Chuyển 0,77 g amoni axetat (A.4.3) vào bình định mức 1 000 ml (A.5.12). Hòa tan bằng khoảng 50 ml nước (A.4.1). Thêm nước (A.4.1) đến vạch và trộn. Lọc qua màng lọc 0,22 µm.

A.6.3.2 Pha động B: axetonitril.

Sử dụng axetonitril tinh khiết dùng cho HPLC (A.4.2).

A.7 Lấy mẫu

Việc lấy mẫu không được quy định trong phụ lục này. Nên lấy mẫu theo TCVN 6400 (ISO 707) ^[1].

Mẫu gửi đến phòng thử nghiệm phải đúng là mẫu đại diện, không bị hư hại hoặc thay đổi trong quá trình vận chuyển và bảo quản.

Nếu không thể tiến hành phân tích ngay thì bảo quản mẫu sữa bò ở 4 °C hoặc đông lạnh.

A.8 Chuẩn bị mẫu thử

A.8.1 Thức ăn công thức dạng bột từ sữa dành cho trẻ sơ sinh

Đồng nhất mẫu bằng cách chuyển mẫu vào một bình chứa có dung tích gấp đôi lượng mẫu phòng thử nghiệm. Đậy ngay bình chứa.

Trộn đều hỗn hợp bằng cách lắc và đảo chiều bình chứa nhiều lần.

A.8.2 Sữa bò

Để mẫu thử về nhiệt độ phòng. Đảo trộn mẫu thử nhiều lần để đảm bảo mẫu được đồng nhất trước khi đem cân phần mẫu thử.

A.9 Cách tiến hành

A.9.1 Quy trình chiết mẫu

Cân 1 g mẫu sữa bò (A.8.2) hoặc thức ăn công thức dạng bột dành cho trẻ sơ sinh (A.8.1), chính xác đến 0,01 g, cho vào ống li tâm 50 ml (A.5.1)

- a) Đối với mẫu có hàm lượng melamine và hàm lượng axit xyanuric đến 2 mg/kg, với nồng độ chất chuẩn nội 1 mg/kg, thêm vào phần mẫu thử 50 µl dung dịch làm việc melamine đánh dấu I (A.4.7.2) và 50 µl làm việc axit xyanuric đánh dấu I (A.4.5.2). Trộn đều cho đến khi thể tích thêm vào được hấp thụ hoàn toàn bởi nền mẫu.
- b) Đối với mẫu có hàm lượng melamine đến 0,2 mg/kg và hàm lượng axit xyanuric đến 0,3 mg/kg với nồng độ chất chuẩn nội 0,1 mg/kg, thêm vào phần mẫu thử 50 µl chuẩn làm việc melamine đánh dấu II (A.4.7.3) và 50 µl chuẩn làm việc axit xyanuric đánh dấu II (A.4.5.3). Trộn đều cho đến khi thể tích thêm vào được hấp thụ hoàn toàn bởi nền mẫu.

Sau đó, thêm 5 ml nước (A.4.1) vào ống li tâm đã được chuẩn bị ở a) hoặc b). Trộn đều để không tạo cục kết dính. Thêm 5 ml axetonitril (A.4.2). Lắc mạnh trong ít nhất 1 min.

Thêm 30 ml axetonitril (A.4.2) và 10 ml nước (A.4.1). Lắc mạnh trong ít nhất 5 min để không tạo cục kết dính. Tốt nhất là dùng máy lắc tự động. Li tâm dung dịch thu được ở 4 000g ở nhiệt độ phòng trong 10 min để thu được dịch trong phía trên.

TCVN 9048:2012

Nếu lớp dịch này không trong thì chuyển phần dịch sang ống li tâm khác và li tâm lại với tốc độ 8 500g ở nhiệt độ phòng trong 10 min bằng máy li tâm.

Chuyển khoảng 0,5 ml đến 1 ml dịch trong vào lọ đựng mẫu HPLC. Sau đó đem phân tích trên LC-MS/MS (A.9.3).

A.9.2 Mẫu trắng thuốc thử

Nếu cần kiểm soát sự nhiễm bẩn melamine và axit xyanuric trong quá trình chiết mẫu, sử dụng mẫu trắng thuốc thử không cho thêm nền mẫu. Phân tích mẫu trắng thuốc thử cùng với mỗi dãy mẫu phân tích hàng ngày.

A.9.3 Điều kiện LC-MS/MS

A.9.3.1 Điều kiện HPLC

Pha động A: Dung dịch amoni axetat (A.6.3.1)

Pha động B: Axetonitril (A.6.3.2)

Thể tích bơm: 5 µl

Cột sắc kí: TOSOH TSKgel Amide-80, đường kính 2,0 mm, chiều dài 250 mm, cỡ hạt 5 µm

Nhiệt độ cột: Nhiệt độ phòng

Tốc độ dòng: 0,25 ml/min

Gradient: gradient sắc kí lỏng như trong Bảng A.3

Van chuyển: Dòng từ HPLC được cho vào detector MS từ 3,0 min đến 13,5 min

Bảng A.3 – Gradient sắc kí lỏng sử dụng để phân tích melamine và axit xyanuric

Thời gian min	A %	B %
0	10	90
8	10	90
13	65	35
14	90	10
15	90	10
15,5	10	90
25	10	90

Trong các điều kiện trên, thời gian lưu của axit xyanuric khoảng 6,4 min và của melamine khoảng 11,5 min (xem Hình A.1 đến Hình A.3).

A.9.3.2 Các thông số về khối phổ

Các thông số khối phổ thu được bằng cách bơm dung dịch làm việc melamine I (A.4.6.2) và dung dịch làm việc axit xyanuric I (A.4.4.2), đều có nồng độ 20 µg/ml, với tốc độ 5 µl/min tốc độ vào dòng HPLC 0,25 ml/min, sử dụng bộ kết nối chữ T. Dòng HPLC có chứa 50 % pha động A (A.6.3.1) và 50 % pha động B (A.6.3.2). Bảng A.4 đến Bảng A.6 đưa ra điều kiện hoạt động của thiết bị để phân tích melamine và axit xyanuric.

Bảng A.4 – Các thông số khối phổ điển hình đối với melamine

Thông số	Biosystems Aclex 4000 QTrap
Kiểu ion hóa	Ion hóa phun điện tử (ESI)
Điện thế dòng phun	3,5 kV
Chiều phân cực	Ion hóa dương
Nhiệt độ buồng ion hóa	500 °C
Khí	Khí chắn (curtain gas): 69 kPa (10 psi) Khí nguồn ion 1: 207 kPa (30 psi) Khí nguồn ion 2: 207 kPa (30 psi)
Điện thế bắn phá (DP)	60 V
Điện thế đầu vào (EP)	10 V
Điện thế bắn đầu ra (CXP)	15 V
Áp suất khí bắn phá (SRM)	0,8 Pa (6 mTorr), nitơ
Độ rộng chân pic (mỗi chế độ)	0,5 Th
Độ phân giải	Unit (cả hai tứ cực)
Thời gian quét	100 ms
Chuyển đổi ion dương/ion âm tại T	8 min

Bảng A.5 – Các thông số MS cho axit xyanuric

Thông số	Biosystems Sciex 4000 QTrap
Kiểu ion hóa	Ion hóa phun điện tử (ESI)
Điện thế dòng phun	-3,5 kV
Chiều phân cực	Ion hóa âm
Nhiệt độ buồng ion hóa	500 °C
Khí	Khí chắn (curtain gas): 69 kPa (10 psi) Khí nguồn ion 1: 207 kPa (30 psi) Khí nguồn ion 2: 207 kPa (30 psi)
Điện thế bắn phá (DP)	- 40 V
Điện thế đầu vào (EP)	- 10 V
Điện thế bắn đầu ra (CXP)	- 15 V
Áp suất khí bắn phá (SRM)	0,8 Pa (6 mTorr), nitơ
Độ rộng chân pic (mỗi chế độ)	0,7 Th
Độ phân giải	Unit (cả hai tứ cực)
Thời gian quét	100 ms
Chuyển đổi ion dương/ion âm	8 min

Bảng A.6 – Các phản ứng chuyển khối đối với phân tích melamine, axit xyanuric và các chất chuẩn nội tương ứng và tỉ lệ diện tích cùng với giới hạn chấp nhận theo quy định tại Quyết định số 2002/657/EC của Ủy ban Châu Âu (Tài liệu tham khảo [8])

Chất phân tích	Phản ứng chuyển khối (m/z) ^a để		Tỉ lệ diện tích pic ± giới hạn (%)
	Định lượng	Định tính	
Melamine	127,0 → 85,1 (26)	127,0 → 68,0 (45)	0,28 ± 25
Melamine đánh dấu [¹³ C ₃ N ₃ (¹⁵ NH ₂) ₃] (IS)	133,0 → 89,1 (26)	133,0 → 71,1 (45)	0,19 ± 25
Axit xyanuric	128,0 → 42,1 (30)	128,0 → 85,2 (14)	0,55 ± 20
Axit xyanuric đánh dấu [¹³ C ₃ H ₃ ¹⁵ N ₃ O ₃] (IS)	134,0 → 44,1 (30)	134,0 → 88,9 (14)	0,52 ± 20

^a Năng lượng bắn phá, đo bằng electron volt, được đưa ra trong dấu ngoặc đơn.

CHÚ THÍCH: Tùy vào loại detector MS sử dụng mà tỉ lệ diện tích pic của các phản ứng chuyển khối có thể khác so với số liệu trong Bảng A.6.

A.9.3.3 Phép thử kiểm tra thiết bị

Cần đảm bảo các điều kiện hoạt động của thiết bị LC-MS/MS để đáp ứng yêu cầu của phương pháp. Điều này liên quan đến việc bơm một dung dịch hiệu chuẩn nồng độ thấp (ví dụ dung dịch chuẩn 7, Bảng A.2) để kiểm tra xem độ nhạy của thiết bị có thích hợp không.

A.9.4 Quy trình lập đường chuẩn và phân tích mẫu

Melamine và axit xyanuric được định lượng bằng phương pháp ngoại chuẩn. Bơm các dung dịch chuẩn (A.6.2.1 hoặc A.6.2.2) cho mỗi dãy mẫu phân tích hàng ngày.

A.9.5 Khẳng định

Melamine và axit xyanuric được coi là dương tính trong mẫu thử nếu đáp ứng đầy đủ các tiêu chí từ a) đến c) theo quy định tại Quyết định số 2002/657/EC của Ủy ban châu Âu (Tài liệu tham khảo [8]).

- Có tín hiệu chất phân tích với hai chế độ chuyển khối cho mỗi chất phân tích và hai chế độ chuyển khối cho các chất chuẩn nội tương ứng. Tỷ lệ tín hiệu trên nhiều đối với mỗi ion phải $\geq 3:1$.
- Tỷ lệ giữa thời gian lưu sắc ký của chất phân tích với thời gian lưu của chất chuẩn nội tương ứng, nghĩa là thời gian lưu tương đối của chất phân tích, tương ứng với thời gian lưu tương đối trung bình của dung dịch hiệu chuẩn trong dung sai $\pm 2,5\%$.
- Tỷ lệ diện tích pic giữa các phản ứng chuyển khối khác nhau của mỗi chất phân tích nằm trong khoảng cho phép quy định tại Quyết định số 2002/657/EC của Ủy ban châu Âu (Tài liệu tham khảo [8]), được nêu trong Bảng A.6.

A.10 Tính và biểu thị kết quả

A.10.1 Tính kết quả

Phần mềm thích hợp có thể có hướng dẫn xử lý kết quả, kiểm tra tính tuyến tính của đường chuẩn, tính các tỷ lệ diện tích thu được từ các phản ứng chuyển khối khác nhau (như trong Bảng A.6), để khẳng định sự có mặt của chất phân tích và đưa ra kết quả cuối cùng, biểu thị bằng miligam trên kilogam.

CHÚ THÍCH: Đường chuẩn có dạng:

$$\alpha = bw + a$$

Trong đó:

- α là tỷ lệ diện tích;
- b là độ dốc;
- w là phần khối lượng;
- a là hệ số tự do.

TCVN 9048:2012

Tính hàm lượng chất cần phân tích, w_a , bằng miligam trên kilogam (đối với chất phân tích là melamine thì $w_a = w_m$; chất phân tích là axit xyanuric thì $w_a = w_c$), theo công thức sau:

$$w_a = \frac{(A_a / A_{IS}) - a}{b} \times \frac{m_{IS}}{m_a \times 1000}$$

Trong đó:

A_a là diện tích pic của chất phân tích có trong mẫu;

A_{IS} là diện tích pic của chất chuẩn nội có trong mẫu;

a là hệ số tự do;

b là độ dốc;

m_{IS} là khối lượng chất chuẩn nội thêm vào mẫu thử, tính bằng nanogam (ng) (A.9.1);

m_a là khối lượng mẫu thử, tính bằng gam (g) (A.9.1).

A.10.2 Biểu thị kết quả

Biểu thị kết quả đến hai chữ số thập phân.

A.11 Các đặc tính hiệu năng

A.11.1 Độ tuyến tính

Các dải tuyến tính đã thử nghiệm được nêu trong a) và b).

a) Melamine: tương ứng từ 0 mg/kg đến 0,20 mg/kg và từ 0 mg/kg đến 2,00 mg/kg (hàm lượng tương đương trên nền mẫu).

b) Axit xyanuric: tương ứng từ 0 mg/kg đến 0,30 mg/kg và từ 0 mg/kg đến 2,00 mg/kg (hàm lượng tương đương trên nền mẫu).

Khi hiệu chuẩn theo mô hình tuyến tính thì độ lặp lại phải được phân bố đều và các tín hiệu đo phải ổn định trong dải nồng độ trên.

A.11.2 Giới hạn phát hiện

LOD (tỉ lệ tín hiệu trên nhiễu bằng 3) của melamine là 0,03 mg/kg và của axit xyanuric là 0,05 mg/kg trên cả hai loại mẫu CM và PIF.

A.11.3 Giới hạn định lượng

LOQ của melamine là 0,05 mg/kg và của axit xyanuric là 0,10 mg/kg trên cả hai loại mẫu CM và PIF.

A.11.4 Giới hạn quyết định và khả năng phát hiện trên thức ăn công thức từ sữa dành cho trẻ sơ sinh

Giả thiết giới hạn tối đa (ML) là 1 mg/kg trong PIF, thì giới hạn quyết định, $w_{CC\alpha}$ và khả năng phát hiện, $w_{CC\beta}$, được nêu trong a) và b).

a) Đối với melamine: $w_{CC\alpha} = 1,03 \text{ mg/kg}$; $w_{CC\beta} = 1,05 \text{ mg/kg}$;

b) Đối với axit xyanuric: $w_{CC\alpha} = 1,04 \text{ mg/kg}$; $w_{CC\beta} = 1,09 \text{ mg/kg}$.

A.11.5 Độ thu hồi

Đối với cả melamine và axit xyanuric, độ thu hồi đã hiệu chỉnh bằng chất chuẩn nội nằm trong khoảng 99 % đến 116 %.

A.11.6 Độ chụm

Giá trị về giới hạn lặp lại tương đối và giới hạn tái lập nội bộ phòng thử nghiệm thu được từ các nghiên cứu liên phòng thử nghiệm quy mô nhỏ theo TCVN 6910-1 (ISO 5725-1) và TCVN 6910-2 (ISO 5725-2) ^[6], nhưng không đáp ứng tất cả các yêu cầu của các tiêu chuẩn này.

A.11.6.1 Giới hạn lặp lại tương đối

Giá trị giới hạn lặp lại tương đối thu được bằng cách sử dụng quy trình mô tả trong phương pháp này được trình bày trong Bảng A.7.

Bảng A.7 – Giá trị độ lặp lại tương đối điển hình

Chất phân tích	Nền mẫu	Giá trị độ lặp lại tương đối %	Khoảng nồng độ mg/kg
Melamine	CM	6	0,05 đến 0,15
	PIF	12	0,05 đến 0,15
	PIF	4	0,5 đến 1,5
Axit xyanuric	CM	8	0,1 đến 0,2
	PIF	11	0,1 đến 0,2
	PIF	5	0,5 đến 1,5

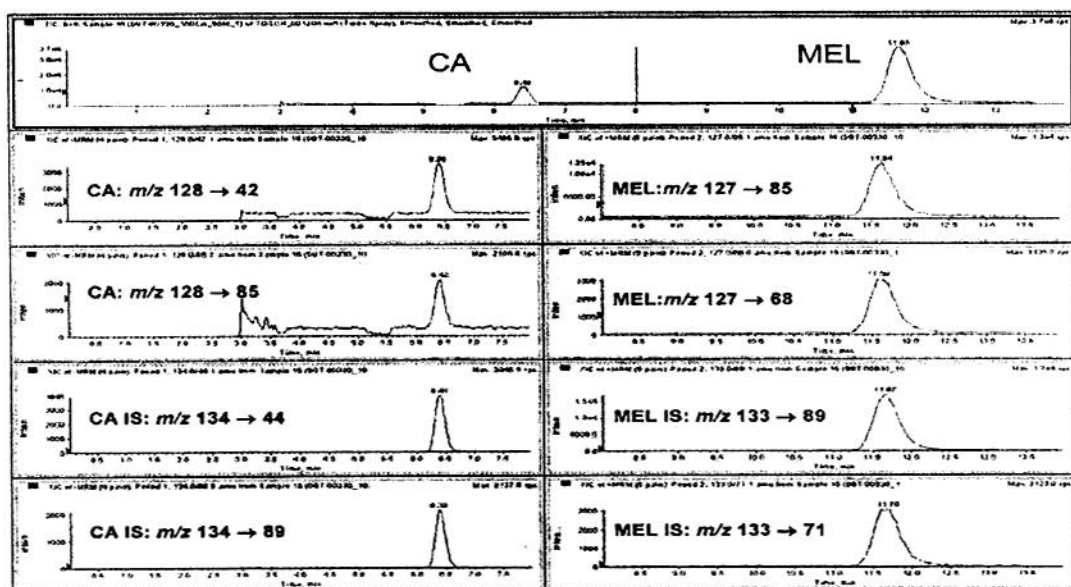
A.11.6.2 Giới hạn tái lập nội bộ phòng thử nghiệm

Giá trị giới hạn tái lập phòng thử nghiệm thu được bằng cách sử dụng quy trình mô tả trong phương pháp này được trình bày trong Bảng A.8.

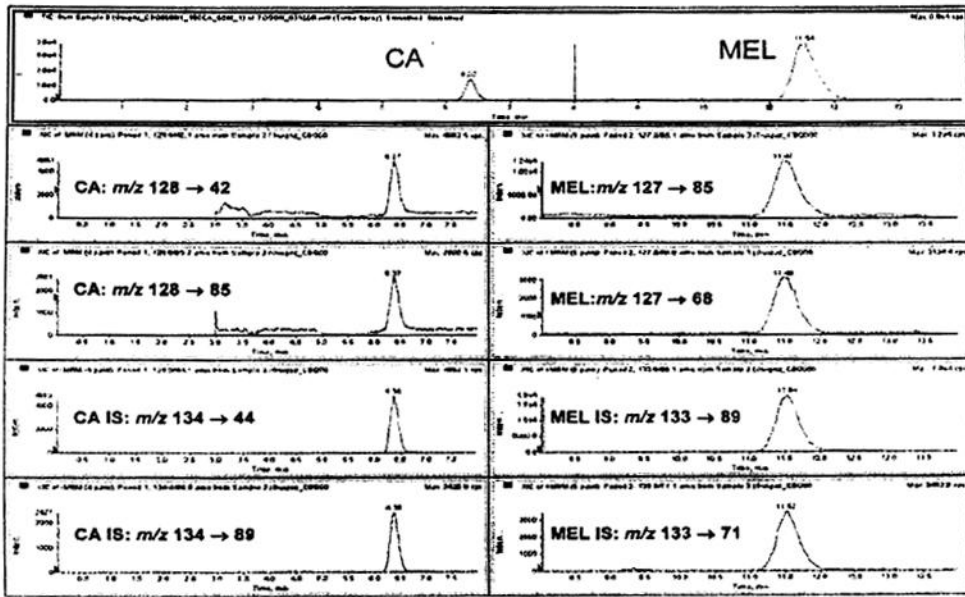
Bảng A.8 – Giá trị tái lập tương đối nội bộ phòng thử nghiệm điển hình

Chất phân tích	Nền mẫu	Giá trị độ lặp lại tương đối %	Khoảng nồng độ mg/kg
Melamine	CM	13	0,05 đến 0,15
	PIF	15	0,05 đến 0,15
	PIF	6	0,5 đến 1,5
Axit xyanuric	CM	10	0,1 đến 0,2
	PIF	31	0,1 đến 0,2
	PIF	13	0,5 đến 1,5

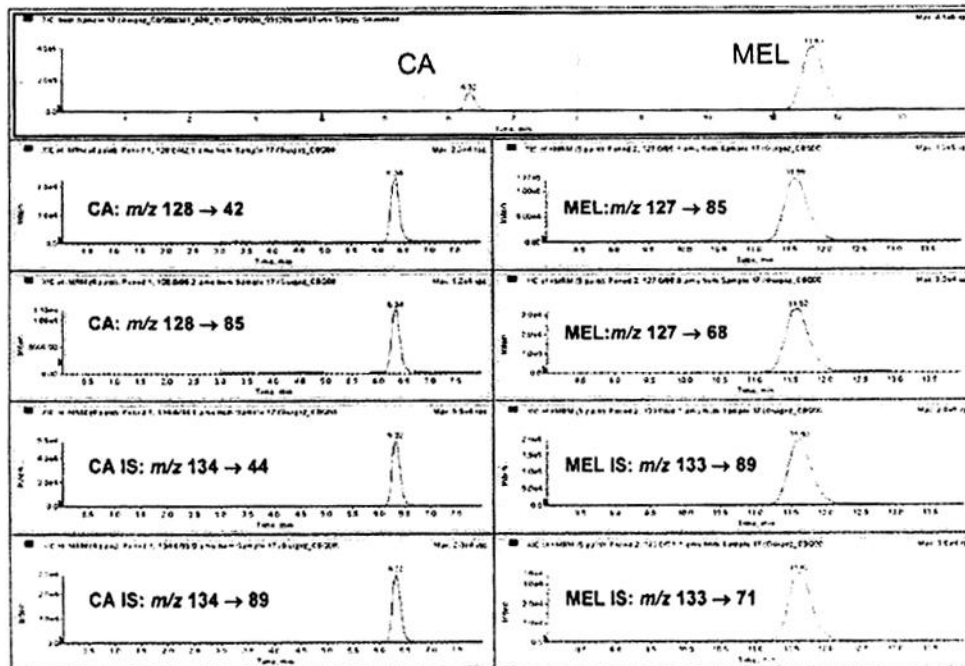
A.12 Sắc đồ mẫu



Hình A.1 – Ví dụ về sắc đồ LC-MS/MS của melamine (MEL) và axit xyanuric (CA) từ dịch chiết mẫu sữa bò thêm chuẩn ở mức: MEL = 0,05 mg/kg (IS = 0,1 mg/kg), CA = 0,10 mg/kg (IS = 0,1 mg/kg)



Hình A.2 – Ví dụ về sắc đồ LC-MS/MS của melamine (MEL) và axit xyanuric (CA) từ dịch chiết mẫu thức ăn công thức dạng bột từ sữa dành cho trẻ sơ sinh thêm chuẩn ở mức: MEL = 0,05 mg/kg (IS = 0,1 mg/kg), CA = 0,1 mg/kg (IS = 0,1 mg/kg)



Hình A.3 – Ví dụ về sắc đồ LC-MS/MS của melamine (MEL) và axit xyanuric (CA) từ dịch chiết mẫu thức ăn công thức từ sữa dành cho trẻ sơ sinh thêm chuẩn ở mức: MEL = 0,5 mg/kg (IS = 0,1 mg/kg), CA = 0,5 mg/kg (IS = 0,1 mg/kg)

TCVN 9048:2012

A.13 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm của phương pháp A phải bao gồm ít nhất các thông tin sau:

- a) tất cả thông tin cần thiết để nhận dạng đầy đủ mẫu thử;
- b) phương pháp lấy mẫu được sử dụng, nếu biết;
- c) phương pháp thử được sử dụng, viện dẫn phụ lục này [Phụ lục A của TCVN 9048 (ISO/TS 15495)];
- d) tất cả các chi tiết vận hành không được quy định trong phụ lục này, hoặc được coi là tùy chọn, cùng với chi tiết về bất kì sự cố nào có thể ảnh hưởng đến kết quả thử nghiệm;
- e) kết quả thử nghiệm thu được;
- f) kết quả cuối cùng thu được, nếu kiểm tra độ lặp lại.

Phụ lục B (Tham khảo)

Ví dụ B – Phân tích định lượng melamine và axit xyanuric trong thức ăn công thức từ sữa dành cho trẻ sơ sinh và sữa bò bằng sắc kí lỏng sử dụng khối phổ bẫy ion tuyến tính

B.1 Phạm vi áp dụng

Phụ lục này quy định phương pháp xác định melamine và axit xyanuric trong thức ăn công thức từ sữa dành cho trẻ sơ sinh và trong sữa bò bằng phương pháp khối phổ hai lần (LC-MS/MS) bẫy ion tuyến tính với nguồn ion hóa phun điện tử và chế độ theo dõi phản ứng được chọn (SRM). Định lượng bằng cách dùng dung dịch đồng vị (^{13}C , ^{15}N)-melamine và đồng vị (^{13}N , ^{15}C)-axit xyanuric làm chất chuẩn nội (IS).

B.2 Thuật ngữ và định nghĩa

Xem Điều 3.

B.3 Nguyên tắc

Melamine và axit xyanuric được chiết đồng thời bằng axetonitril cùng lúc với kết tủa protein. Sau khi li tâm, lớp trên được tiếp tục phân tích bằng LC-MS/MS bẫy ion ở chế độ SRM. Melamine và axit xyanuric được phân tích riêng biệt lần lượt ở hai chế độ ion dương và ion âm.

B.4 Thuốc thử

Chỉ sử dụng các thuốc thử tinh khiết phân tích, trừ khi có quy định khác và sử dụng nước cất hoặc nước đã loại khoáng hoặc nước có độ tinh khiết tương đương.

CHÚ THÍCH: Số CAS được cung cấp cho mỗi thuốc thử.

Trước khi sử dụng hóa chất, cần tuân theo hướng dẫn hoặc thủ tục đảm bảo an toàn được quy định bởi cơ quan có thẩm quyền.

B.4.1 Nước, dùng cho sắc kí (số CAS 7732-18-5).

B.4.2 Axetonitril (CH_3CN), loại dùng cho sắc kí lỏng (số CAS 75-05-8).

B.4.3 Amoni axetat ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$), tinh khiết phân tích (số CAS 631-61-8).

B.4.4 Dung dịch axit formic (CH_2O_2), nồng độ 1 % thể tích (số CAS 64-18-6).

Dùng pipet lấy 10 ml axit formic (số CAS 64-18-6, tinh khiết phân tích) cho vào bình định mức 1 000 ml (B.5.8). Thêm nước (B.4.1) đến vạch và trộn.

B.4.5 Axit xyanuric $[(\text{CHOH})_3]$, độ tinh khiết lớn hơn 98 % khối lượng (số CAS 108-80-5)

B.4.5.1 Dung dịch chuẩn gốc axit xyanuric, nồng độ 0,1 mg/ml

Cân 20 mg axit xyanuric (B.4.5), chính xác đến 0,1 mg, cho vào bình định mức 200 ml (B.5.8). Hòa tan và thêm dung dịch axit formic (B.4.4) đến vạch. Siêu âm 10 min cho tan hoàn toàn.

Dung dịch chuẩn gốc axit xyanuric có thể bảo quản được 10 ngày ở 4 °C. Chuẩn bị dung dịch chuẩn gốc mới sau 10 ngày.

B.4.5.2 Dung dịch làm việc axit xyanuric, nồng độ 10 µg/ml

Dùng pipet lấy 10 ml dung dịch chuẩn gốc axit xyanuric (B.4.5.1) vào bình định mức 100 ml (B.5.8). Thêm dung dịch axit formic (B.4.4) đến vạch. Siêu âm ít nhất 10 min cho tan hoàn toàn.

Dung dịch làm việc axit xyanuric có thể bảo quản được 10 ngày ở 4 °C. Chuẩn bị dung dịch làm việc mới sau 10 ngày.

B.4.6 Axit xyanuric đánh dấu ($^{13}\text{C}_3\text{H}_3^{15}\text{N}_3\text{O}_3$), độ tinh khiết đồng vị: $^{13}\text{C}_3 = 99\%$; vòng $^{15}\text{N}_3 > 98\%$; độ tinh khiết hóa học $> 90\%$ khối lượng, nồng độ 100 µg/ml – 1,2 ml.

B.4.6.1 Dung dịch chuẩn gốc axit xyanuric đánh dấu, nồng độ 100 µg/ml

Dung dịch chuẩn gốc axit xyanuric đánh dấu có thể được mua từ Cambridge Isotope Laboratories⁵⁾ (độ tinh khiết 90 % khối lượng). Bảo quản ở nhiệt độ phòng, tránh ánh sáng.

B.4.6.2 Dung dịch làm việc axit xyanuric đánh dấu, nồng độ 10 µg/ml

Dùng pipet lấy 1,1 ml dung dịch chuẩn gốc axit xyanuric đánh dấu (B.4.6.1) vào bình định mức 10 ml (B.5.8). Thêm dung dịch axit formic (B.4.4) đến vạch và trộn.

Dung dịch làm việc axit xyanuric đánh dấu được sử dụng làm chất chuẩn nội (IS). Bảo quản dung dịch ở 4 °C.

⁵⁾ Cambridge Isotope Laboratories là ví dụ về nhà cung cấp thích hợp. Thông tin này đưa ra nhằm tạo thuận lợi cho người sử dụng tiêu chuẩn và tiêu chuẩn này không ấn định phải sử dụng sản phẩm của nhà cung cấp này.

B.4.7 Melamine (C₃H₆N₆), > 98 % khối lượng (số CAS 108-78-1)**B.4.7.1 Dung dịch chuẩn gốc melamine, nồng độ 0,1 mg/ml.**

Cân 20 mg melamine (B.4.7), chính xác đến 0,1 mg, vào bình định mức 200 ml (B.5.8). Hòa tan và thêm dung dịch axit formic (B.4.4) đến vạch. Siêu âm ít nhất 10 min cho tan hoàn toàn.

Dung dịch chuẩn gốc melamine có thể bảo quản được 10 ngày ở 4 °C. Chuẩn bị dung dịch chuẩn làm việc mới sau 10 ngày.

B.4.7.2 Dung dịch làm việc melamine I, nồng độ 10 µg/ml.

Dùng pipet lấy 10 ml dung dịch chuẩn gốc melamine (B.4.7.1) vào bình định mức 100 ml (B.5.8). Thêm dung dịch axit formic (B.4.4) đến vạch. Siêu âm ít nhất 10 min cho hòa tan hoàn toàn.

Dung dịch làm việc melamine I có thể bảo quản được 10 ngày ở 4 °C. Chuẩn bị dung dịch làm việc mới sau 10 ngày.

B.4.7.3 Dung dịch làm việc melamine II, nồng độ 1 µg/ml.

Dùng pipet lấy 10 ml dung dịch làm việc melamine I (B.4.7.2) vào bình định mức 100 ml (B.5.8). Thêm dung dịch axit formic (B.4.4) đến vạch. Siêu âm ít nhất 10 min cho hòa tan hoàn toàn.

Dung dịch làm việc melamine II có thể bảo quản được 10 ngày ở 4 °C. Chuẩn bị dung dịch làm việc mới sau 10 ngày.

B.4.8 Melamine đánh dấu [¹³C₃N₃(¹⁵NH₂)₃], độ tinh khiết đồng vị: ¹³C₃ = 99 %, amino-¹⁵N₃ = 98 %; độ tinh khiết hóa học ≥ 98 % khối lượng, 100 µg/ml trong nước – 1,2 ml.

B.4.8.1 Dung dịch chuẩn gốc melamine đánh dấu, nồng độ 100 µg/ml.

Dung dịch chuẩn gốc melamine đánh dấu được bán sẵn. Bảo quản dung dịch ở nhiệt độ phòng, tránh ánh sáng.

B.4.8.2 Dung dịch làm việc melamine đánh dấu, nồng độ 10 µg/ml.

Dùng pipet lấy 1 ml dung dịch chuẩn gốc melamine đánh dấu (B.4.8.1) vào bình định mức 10 ml (B.5.8). Thêm dung dịch axit formic (B.4.4) đến vạch và trộn.

Dung dịch làm việc melamine đánh dấu được sử dụng làm chất chuẩn nội (IS). Bảo quản dung dịch ở 4 °C.

B.5 Thiết bị, dụng cụ

Dụng cụ thủy tinh (ví dụ bình định mức, B.5.8) dùng để chuẩn bị dung dịch chuẩn gốc và dung dịch làm việc có thể bị nhiễm bẩn, đặc biệt là nhiễm melamine. Vì thế, tất cả dụng cụ cần được rửa sạch bằng chất tẩy rửa phòng thử nghiệm, tráng bằng nước cất và làm khô trong không khí.

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

B.5.1 Ống li tâm, hình trụ, bằng polypropylen, dung tích 50 ml, ví dụ 21008-169⁶⁾.

B.5.2 Máy li tâm, có rotor thích hợp với ống 50 ml và gia tốc góc 4 000g, ví dụ RC6⁷⁾.

B.5.3 Cột HPLC, ZIC-HILIC⁸⁾, 2,1 mm x 150 mm, 5 µm, 20 nm.

B.5.4 Xyranh bằng nhựa, dung tích 3 ml, Norm-Ject⁶⁾.

B.5.5 Bộ lọc dạng xyranh, loại đĩa 13 mm, màng nylon 0,2 µm, ví dụ 28143-985⁶⁾.

B.5.6 Bơm HPLC Surveyor MS⁹⁾ nối với khối phổ bẫy ion tuyến tính LTQ-XL⁹⁾, được trang bị nguồn ion hóa phun điện tử.

B.5.7 Cân phân tích, có thể đọc đến 0,1 mg.

B.5.8 Bình định mức, dung tích 10 ml, 100 ml, 200 ml và 1 000 ml, TCVN 7153 (ISO 1042)³⁾, loại A.

B.6 Chuẩn bị thuốc thử

B.6.1 Đường chuẩn của melamine và axit xyanuric

B.6.1.1 Dung dịch chuẩn melamine (0 mg/l đến 5 mg/l) với chất chuẩn nội tương ứng (ở mức 1,00 mg/l)

Chuẩn bị dung dịch chuẩn melamine vào 6 bình định mức dung tích 10 ml riêng biệt (B.5.8) như trong Bảng B.1. Bảo quản các dung dịch ở 4 °C.

⁶⁾ 21008-169, Norm-Ject (53548-014) và 281343-985 là tên thương mại của các sản phẩm được cung cấp bởi VWR. Thông tin này đưa ra nhằm tạo thuận lợi cho người sử dụng tiêu chuẩn và tiêu chuẩn này không ấn định phải sử dụng các sản phẩm này. Có thể sử dụng các sản phẩm tương đương nếu chúng cho kết quả giống nhau.

⁷⁾ RC6 là tên thương mại của sản phẩm được cung cấp bởi Sorvall. Thông tin này đưa ra nhằm tạo thuận lợi cho người sử dụng tiêu chuẩn và tiêu chuẩn này không ấn định phải sử dụng các sản phẩm này. Có thể sử dụng các sản phẩm tương đương nếu chúng cho kết quả giống nhau.

⁸⁾ ZIC-HILIC là tên thương mại của sản phẩm được cung cấp bởi Merck, sẵn có ở Nest Group, loại Q150454. Thông tin này đưa ra nhằm tạo thuận lợi cho người sử dụng tiêu chuẩn và tiêu chuẩn này không ấn định phải sử dụng các sản phẩm này. Có thể sử dụng các sản phẩm tương đương nếu chúng cho kết quả giống nhau.

⁹⁾ Surveyor MS và LTQ-XL là tên thương mại của các sản phẩm được cung cấp bởi ThermoElectron. Thông tin này đưa ra nhằm tạo thuận lợi cho người sử dụng tiêu chuẩn và tiêu chuẩn này không ấn định phải sử dụng các sản phẩm này. Có thể sử dụng các sản phẩm tương đương nếu chúng cho kết quả giống nhau.

Bảng B.1 – Dung dịch chuẩn melamine

	Dung dịch chuẩn					
	1	2	3	4	5	6
Dung dịch làm việc melamine I (B.4.7.2), µl	0	0	100	200	450	700
Dung dịch làm việc melamine II (B.4.7.3), µl	0	150	0	0	0	0
Dung dịch melamine đánh dấu (IS) (B.4.8.2), µl	150	150	150	150	150	150
Axetonitril (B.4.2), µl	9850	9700	9750	9650	9400	9150
Tương ứng với						
Nồng độ melamine, ng/ml	0	15	100	200	450	700
Nồng độ melamine đánh dấu (IS), ng/ml	150	150	150	150	150	150
Hàm lượng melamine (tương ứng trong mẫu), mg/kg	0,00	0,10	0,66	1,33	3,00	4,66
Hàm lượng chất chuẩn nội melamine (tương ứng trong mẫu), mg/kg	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

B.6.1.2 Dung dịch chuẩn axit xyanuric (0 mg/l đến 5 ml/l) với chất chuẩn nội axit xyanuric tương ứng (ở mức 0,66 mg/l)

Chuẩn bị dung dịch chuẩn axit xyanuric vào 6 bình định mức riêng biệt (B.5.8) như trong Bảng B.1. Bảo quản các dung dịch ở 4 °C.

Bảng B.2 – Dung dịch chuẩn axit xyanuric

	Dung dịch chuẩn					
	1	2	3	4	5	6
Dung dịch chuẩn làm việc axit xyanuric (B.4.5.2), µl	0	25	100	200	550	700
Dung dịch axit xyanuric đánh dấu (IS) (B.4.6.2), µl	100	100	100	100	100	100
Axetonitril (B.4.2), µl	9900	9875	9800	9700	9350	9200
Tương ứng với:						
Nồng độ axit xyanuric, ng/ml	0	25	100	200	550	700
Nồng độ axit xyanuric đánh dấu (IS), ng/ml	100	100	100	100	100	100
Hàm lượng axit xyanuric (tương ứng trong mẫu), mg/kg	0,00	0,17	0,66	1,33	3,66	4,66
Hàm lượng chất chuẩn nội axit xyanuric (tương ứng trong mẫu), mg/kg	0,66	0,66	0,66	0,66	0,66	0,66

TCVN 9048:2012

B.6.2 Dung môi sắc kí

B.6.2.1 Pha động A, dung dịch amoni axetat, nồng độ 10 mmol/l trong hỗn hợp axetonitril và nước (1:1).

Chuyển 0,77 g amoni axetat vào bình định mức 1 000 ml (B.5.8). Thêm 500 ml nước (B.4.1) và hòa tan amoni axetat. Thêm axetonitril (B.4.2) đến vạch và trộn. Lọc dung dịch qua màng lọc 0,22 µm.

B.6.2.2 Pha động B, axetonitril.

Sử dụng axetonitril (B.4.2).

B.7 Lấy mẫu

Việc lấy mẫu không phải là một phần của phương pháp mô tả trong phụ lục này. Nên lấy mẫu theo TCVN 6400 (ISO 707)^[1].

Điều quan trọng là mẫu gửi đến phòng thử nghiệm phải đúng là mẫu đại diện, không bị hư hại hoặc thay đổi trong quá trình vận chuyển hoặc bảo quản.

Bảo quản sữa tươi ở 4 °C nếu không thực hiện phân tích ngay sau khi nhận mẫu.

B.8 Chuẩn bị phần mẫu thử

B.8.1 Thức ăn công thức từ sữa dành cho trẻ sơ sinh

Đảm bảo mẫu phòng thử nghiệm được đồng nhất bằng cách chuyển vào bình chứa có dung tích lớn gấp hai lần dung tích mẫu. Đậy kín ngay bình. Trộn đều bằng cách lắc kỹ và dốc ngược bình chứa.

B.8.2 Sữa bò

Giữ mẫu ở nhiệt độ phòng. Đảm bảo mẫu đồng nhất trước khi cân bằng cách quay ngược bình nhiều lần.

B.9 Cách tiến hành

B.9.1 Quy trình chiết

Cân 3,00 g thức ăn công thức từ sữa dành cho trẻ sơ sinh (B.8.1) hoặc sữa bò (B.8.2), chính xác đến 0,01 g, cho vào ống li tâm 50 ml (B.5.1). Thêm 300 µl dung dịch làm việc melamine đánh dấu (IS) (B.4.8.2). Thêm 200 µl dung dịch làm việc axit xyanuric đánh dấu (IS) (B.4.6.2). Sau đó thêm 19,5 ml axetonitril (B.4.2) và lắc kỹ để đảm bảo không tạo cục kết dính.

Siêu âm dung dịch mẫu trong 5 min, sau đó lắc xoáy trong 5 min. Li tâm dung dịch mẫu với gia tốc 4 000 g ở nhiệt độ phòng trong 10 min. Lấy ra khoảng 2 ml lớp trên bằng xyranh nhựa và lọc qua bộ lọc (B.5.5) vào lọ đựng mẫu HPLC.

B.9.2 Điều kiện LC-MS/MS

Bơm dung dịch mẫu vào LC/MS để phân tích.

CHÚ THÍCH: Melamine và axit xyanuric được phát hiện riêng biệt bằng các lần phân tích LC/MS khác nhau.

B.9.2.1 Điều kiện HPLC

Pha động A:	Dung dịch amoni axetat (B.6.2.1)
Pha động B:	Axetonitrile (B.6.2.2)
Thể tích bơm:	10 µl
Cột sắc kí:	ZIC-HILIC, 2,1 mm x 150 mm, 5 µm, 20 nm
Nhiệt độ cột:	Nhiệt độ phòng
Tốc độ dòng:	0,4 ml/min
Gradient:	Xem Bảng B.3
Van chuyển:	Dòng qua HPLC được cho trực tiếp qua van detector MS trong khoảng từ 4 min đến 9 min

Bảng B.3 – Gradient sắc kí lỏng sử dụng để phân tích melamine hoặc axit xyanuric

Thời gian min	A %	B %
0	3	97
2	3	97
2,5	20	80
11	20	80
11,5	3	97
16	30	97

Điều kiện HPLC đối với melamine và axit xyanuric là giống nhau. Trong các điều kiện này, thời gian lưu của cả melamine và axit xyanuric là khoảng 5 min.

B.9.2.1 Các thông số về khối phổ

Hiệu chuẩn chất phân tích bằng cách dùng xyranh bơm dung dịch chuẩn melamine và dung dịch chuẩn axit xyanuric nồng độ 10 µg/ml. Giữ tốc độ bơm của xyranh không đổi 5 µl/min bằng van nổi chữ T với tốc độ dòng HPLC là 0,4 ml/min. Giữ tỉ lệ dòng HPLC là 20 % pha động A và 80 % pha động B. Các điều kiện vận hành MS cho phân tích melamine và axit xyanuric được liệt kê trong Bảng B.4 đến Bảng B.6.

Bảng B.4 – Các thông số khối phổ điển hình đối với melamine

Thông số	Bẫy ion tuyến tính LTQ-XL
Kiểu ion hóa	Ion hóa phun điện tử (ESI)
Điện thế dòng phun	5 kV
Chiều phân cực	Ion hóa dương
Nhiệt độ ống chuyển	350 °C
Khí	Khí mang: 60 đơn vị tùy ý Khí hỗ trợ: 20 đơn vị tùy ý Khí làm sạch: 0
Dòng điện phun	5,6 µA
Điện thế mao quản	20 V
Thời gian bơm mẫu tối đa	100 ms

Bảng B.5 – Các thông số khối phổ điển hình đối với axit xyanuric

Thông số	Bẫy ion tuyến tính LTQ-XL
Kiểu ion hóa	Ion hóa phun điện tử (ESI)
Điện thế dòng phun	- 4 kV
Chiều phân cực	Ion hóa âm
Nhiệt độ ống chuyển	400 °C
Khí	Khí mang: 60 đơn vị tùy ý Khí hỗ trợ: 20 đơn vị tùy ý Khí làm sạch: 0
Dòng điện phun	4,3 µA
Điện thế mao quản	- 14 V
Thời gian bơm mẫu tối đa	100 ms

Bảng B.6 – Các phản ứng chuyển khối xảy ra trong bẫy ion đối với phân tích melamine, axit xyanuric và các chất chuẩn nội tương ứng

Chất phân tích	Phản ứng chuyển khối (m/z) ^a :
Melamine	127,1 → 85,1 (24)
Melamine đánh dấu [¹³ C ₃ N ₃ (¹⁵ NH ₂) ₃] (IS)	133,1 → 89,1 (24)
Axit xyanuric	128,0 → 85,0 (24)
Axit xyanuric đánh dấu (¹³ C ₃ H ₃ ¹⁵ N ₃ O ₃) (IS)	134,0 → 88,9 (24)
^a Năng lượng va chạm, đo bằng electron vôn, được đưa ra trong dấu ngoặc đơn	

B.10 Tính và biểu thị kết quả

B.10.1 Tính kết quả

CHÚ THÍCH: Đường chuẩn có dạng:

$$\alpha = bw + a$$

Trong đó:

- a là tỉ lệ diện tích;
- b là độ dốc;
- w là phân khối lượng;
- a là hệ số tự do.

Tính hàm lượng chất cần phân tích, w_a , bằng miligam trên kilogam (nếu chất phân tích là melamine: $w_a = w_m$; chất phân tích là axit xyanuric $w_a = w_c$) theo công thức sau:

$$w_a = \frac{\alpha - a}{b} \times \frac{20}{m \times 1000}$$

Trong đó:

- α là tỉ lệ diện tích peak của chất phân tích và diện tích peak của chất chuẩn nội (IS) sau khi phân tích bằng LC/MS;
- a là hệ số tự do;
- b là độ dốc;
- m là khối lượng của phần mẫu thử(B.9.1), tính bằng gam (g).

B.10.2 Biểu thị kết quả

Biểu thị kết quả phân tích đến hai chữ số thập phân.

TCVN 9048:2012

B.11 Các đặc tính hiệu năng

B.11.1 Độ tuyến tính

Đường chuẩn melamine tuyến tính trong khoảng từ 0 mg/kg đến 5 mg/kg (hàm lượng tương đương trong mẫu). Tương tự với axit xyanuric là từ 0 mg/kg đến 7 mg/kg (hàm lượng tương đương trong mẫu).

B.11.2 Độ thu hồi

Tổng số có 16 mẫu thức ăn công thức từ sữa dành cho trẻ sơ sinh đã được thêm melamine và axit xyanuric với các mức gấp 0,1; 0,5; 1 và 1,5 lần mức tối đa (ML).

Độ thu hồi trung bình của melamine là 99 % và của axit xyanuric là 105 %.

B.11.3 Giới hạn phát hiện (LOD)

Giới hạn phát hiện (tỉ lệ tín hiệu trên nhiễu bằng 3) của melamine trong thức ăn công thức từ sữa dành cho trẻ sơ sinh là 0,08 mg/kg và trong sữa bò là 0,07 mg/kg.

Giới hạn phát hiện của axit xyanuric trong thức ăn công thức từ sữa dành cho trẻ sơ sinh là 0,10 mg/kg và trong sữa bò 0,07 mg/kg.

B.11.4 Giới hạn định lượng (LOQ)

Giới hạn định lượng (mức thấp nhất đã được xác nhận giá trị sử dụng) của melamine trong thức ăn công thức từ sữa dành cho trẻ sơ sinh là 0,11 mg/kg và trong sữa bò là 0,10 mg/kg.

Giới hạn định lượng của melamine trong thức ăn công thức từ sữa dành cho trẻ sơ sinh là 0,13 mg/kg và trong sữa bò 0,10 mg/kg.

B.11.5 Giới hạn quyết định và khả năng phát hiện melamine và axit xyanuric trong thức ăn công thức từ sữa dành cho trẻ sơ sinh và trong sữa bò

Giả thiết giới hạn tối đa (ML) là 1 mg/kg trong thức ăn công thức từ sữa dành cho trẻ sơ sinh, giới hạn quyết định, w_{CC_α} , và khả năng phát hiện, w_{CC_β} , được tính bằng cách thêm chuẩn vào 20 mẫu thức ăn công thức từ sữa dành cho trẻ sơ sinh ở giới hạn tối đa 1 mg/kg, cho kết quả nêu trong a) và b):

a) Đối với melamine: $w_{CC_\alpha} = 1,06$ mg/kg; $w_{CC_\beta} = 1,16$ mg/kg;

b) Đối với axit xyanuric: $w_{CC_\alpha} = 1,11$ mg/kg; $w_{CC_\beta} = 1,19$ mg/kg.

CẢNH BÁO: Các giá trị trên thu được trong các điều kiện lặp lại và cần được kiểm tra độ tái lập trước khi sử dụng các giá trị này.

B.11.6 Độ chụm**B.11.6.1 Độ lặp lại**

Độ lặp lại điển hình thu được từ cùng một người phân tích trong cùng một phòng thử nghiệm, sử dụng phương pháp này là:

- a) Đối với melamine: 8 % nằm ngoài dải hàm lượng từ 0,5 mg/kg đến 1,5 mg/kg;
- b) Đối với axit xyanuric: 9 % nằm ngoài dải hàm lượng từ 0,5 mg/kg đến 1,5 mg/kg.

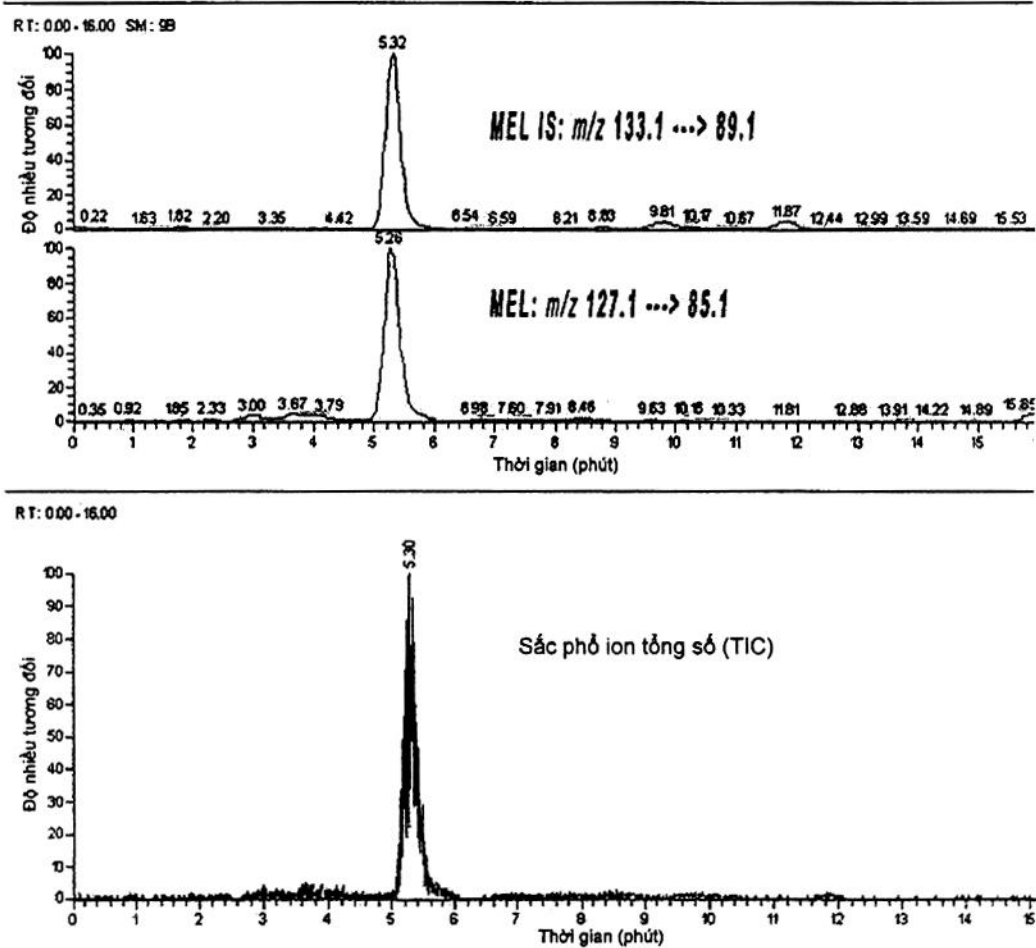
CHÚ THÍCH: Các giá trị này được tính theo hệ số biến thiên độ lặp lại, $C_{v,r}$, cho một dãy các phân tích. Ba dãy phân tích được tiến hành ở các mức 0,5 mg/kg, 1 mg/kg và 1,5 mg/kg. Trong ba trường hợp này, giá trị $C_{v,r}$ cho mỗi dãy là 8 % đối với chất phân tích là melamine và 9 % đối với chất phân tích là axit xyanuric.

B.11.6.2 Độ tái lập

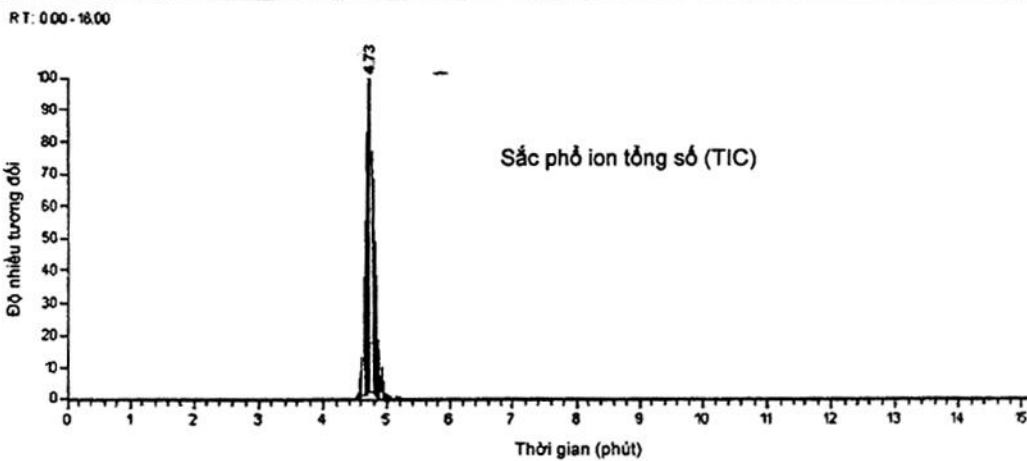
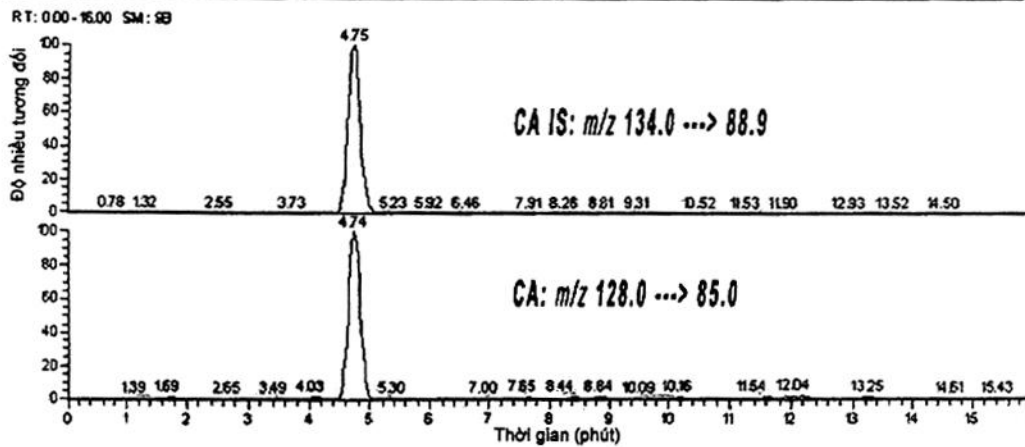
Chưa xác định.

B.12 Sắc kí đồ của mẫu

Xem Hình B.1 và Hình B.2.



Hình B.1 – Sắc kí đồ chạy LC-MS/MS của melamine (MEL) từ dịch chiết mẫu thức ăn công thức từ sữa dành cho trẻ sơ sinh NIST với mức thêm chuẩn: MEL = 0,50 mg/kg



Hình B.2 – Sắc kí đồ chạy LC-MS/MS của axit xyanuric (CA) trong mẫu thức ăn công thức từ sữa dành cho trẻ sơ sinh ở mức thêm chuẩn: CA = 0,50 mg/kg

B.13 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm của phương pháp B phải bao gồm ít nhất các thông tin sau:

- tất cả thông tin cần thiết để nhận dạng đầy đủ mẫu thử;
- phương pháp lấy mẫu được sử dụng, nếu biết;
- phương pháp thử được sử dụng, viện dẫn phụ lục này [Phụ lục B của TCVN 9048 (ISO/TS 15495)];
- tất cả các chi tiết vận hành không được quy định trong phụ lục này, hoặc được coi là tùy chọn, cùng với chi tiết về bất kỳ sự cố nào có thể ảnh hưởng đến kết quả thử nghiệm;
- kết quả thử nghiệm thu được;
- kết quả cuối cùng thu được, nếu kiểm tra độ lặp lại.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 6400 (ISO 707), *Sữa và sản phẩm sữa – Hướng dẫn lấy mẫu*
 - [2] TCVN 7150 (ISO 835), *Dụng cụ thí nghiệm bằng thủy tinh – Pipet chia độ*
 - [3] TCVN 7153 (ISO 1042), *Dụng cụ thí nghiệm bằng thủy tinh – Bình định mức*
 - [4] TCVN 8488 (ISO 4788), *Dụng cụ thí nghiệm bằng thủy tinh – Ống đong chia độ*
 - [5] TCVN 6910-2 (ISO 5725-2), *Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo – Phần 2: Phương pháp cơ bản xác định độ lặp lại và độ tái lập của phương pháp đo tiêu chuẩn*
 - [6] ISO 8655-2, *Piston-operated volumetric apparatus – Part 2: Piston pipettes*
 - [7] ISO 11843-5, *Capability of detection – Part 5: Methodology in the linear and non-linear calibration cases*
 - [8] Commission Decision 2002/657/EC, 2002, *Official Journal of the European Communities*, L221, 8-36, 12 August 2002, implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, last amended by Commission Decision 2005/34 of 11 January 2005
 - [9] SANCO/2004/276rev4, *Guidelines for the implementation of decision 2002/657/EC*, 2008-12
 - [10] DESMARCHELIER, A., GUILLAMON CUADRA, M., DELATOUR, T., MOTTIER, P. *Simultaneous quantitative determination of melamine and axit xyanuric in cow's milk and milk-based infant formula by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry*. J. Agric. Food Chem. 2009, 57, pp. 7186-7193
-