

PHÂN TÍCH MELAMINE TRONG THỰC PHẨM VÀ THỨC ĂN CHĂN NUÔI BẰNG KỸ THUẬT SẮC KÝ LỎNG GHÉP KHỐI PHỔ (LC-MS/MS)

TRẦN CAO SƠN, VŨ THỊ TRANG VÀ CS.

Trung tâm Kiểm nghiệm VSATTP - Viện Dinh dưỡng quốc gia

Tóm tắt:

Một phương pháp sàng lọc và định lượng melamine đã được phát triển và ứng dụng để phân tích mẫu thực phẩm và thức ăn chăn nuôi. Melamine trong mẫu được chiết bằng acid trichlooacetic và làm sạch qua cột chiết pha rắn trao đổi cation mạnh, dịch chiết sau đó được phân tích bằng hệ thống sắc ký lỏng khối phổ 2 lần LC-MS/MS với nguồn ion hóa ESI (+). Kết quả thẩm định phương pháp trên các đối tượng sữa, bánh kẹo và thức ăn chăn nuôi cho thấy phương pháp có độ tin cậy cao với giới hạn tuyến tính từ 20-1000 ng/ml, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng tương ứng là 10 và 40 ng/ml. Độ lặp lại tốt với hệ số biến thiên nhỏ hơn 10% cho tất cả các đối tượng mẫu, độ thu hồi của phương pháp đạt từ 98 đến 102% (loại trừ sai số bằng nội chuẩn melamine-C¹³N¹⁵). Phương pháp đã được áp dụng để phân tích hơn 1000 mẫu thực phẩm và thức ăn chăn nuôi trên địa bàn Hà Nội và lân cận, tỷ lệ số mẫu phát hiện có melamine là 4,8%.

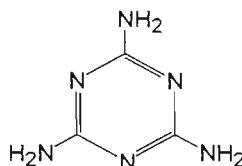
THE ANALYSIS OF MELAMINE IN FOOD AND FEED BY TECHNIQUE OF LIQUID CHROMATOGRAPHY TANDEM MASS SPECTROMETRY (LC-MS/MS)

Abstract:

A method has been developed for screening and confirmation of melamine in food and feed. This method includes extraction procedure with trichlooacetic acid, purification by strong cation exchange cartridge and determination by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) in ESI (+) mode. The method has been validated for milk, candy and feed sample. The linearity is between 20 ng/ml and 1000 ng/ml. Limit of detection and quantification is 10 ng/g and 40 ng/g respectively. The repeatability is good with standard deviations lower than 10% and recoveries were between 98% and 102% with presence of melamine-C¹³N¹⁵ as internal standard. The method has been applied to analysis over than 1000 samples, with 4,8% positive to melamine.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Melamine là một hợp chất hữu cơ có công thức phân tử C₃H₆N₆, với tên khoa học là 1,3,5-triazine-2,4,6-triamine. Chất này chủ yếu được sử dụng trong công nghiệp chế biến chất dẻo nhờ phản ứng với



Melamine
(M=126)

formaldehyde để tạo thành chất melamine-formaldehyde là một loại polimer tổng hợp chống dẫn nhiệt và cháy. Tuy nhiên cũng bởi cấu tạo có 6 nguyên tử nitơ nên nhiều nhà sản xuất đã cho thêm vào sản phẩm của mình để làm tăng hàm lượng protein.

Năm 2007, nhiều nước trên thế giới cũng đã đối mặt với vấn đề này khi hàng loạt động vật nuôi bị chết cho ăn phải thức ăn có melamine. Đặc biệt gần đây ở Trung Quốc, khi melamine được phát hiện thấy trong sữa và trứng gà gây sởi thận cho người sử dụng đặc biệt là trẻ em. Việc sản phẩm của nhiều hãng sữa nổi tiếng của Trung Quốc bị phát hiện thấy chất melamine đã rung lên hồi chuông cảnh báo đối với toàn thế giới. Việt Nam với vị trí địa lý gần Trung Quốc, thì vấn đề này càng đáng lo ngại hơn. Trên thị trường Việt Nam có rất nhiều các loại sữa và trứng nhập khẩu từ Trung Quốc, đòi hỏi phải có sự kiểm tra kỹ lưỡng nhằm đảm bảo sự an toàn cho sức khỏe người sử dụng. Đồng thời, việc kiểm soát tốt lượng melamine trong các nguồn thức ăn chăn nuôi cũng là một cách hữu hiệu để ngăn ngừa melamine tồn dư trong trứng gia cầm.

Gần đây, nhiều nước trên thế giới đã ban hành tiêu chuẩn về giới hạn cho phép của melamine trong thực phẩm. Theo FDA Mỹ, hàm lượng melamine cho phép đối với các loại thực phẩm là 2,5 mg/kg, ngoại trừ thức ăn của trẻ sơ sinh là không được phép có. Ở các nước thuộc khu vực Đông Nam Á như Singapore và Thái Lan đều quy định giới hạn melamine tương đối cao, trong sữa trẻ sơ sinh là 1mg/kg và trong thực phẩm khác là 5 mg/kg. Ở Việt Nam, Bộ Y tế mới đây đã ban hành tiêu chuẩn melamine trong sữa và thực phẩm, theo đó đối với thức ăn trẻ sơ sinh giới hạn cho phép là 1mg/kg, đối với các loại thực phẩm khác là 2,5mg/kg trong khi Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn cũng đã quy định hàm lượng melamine trong các loại thức ăn chăn nuôi được phép tối đa là 5 mg/kg. Hầu hết các nước trên thế giới đều quy định sử dụng phương pháp LC-MS/MS để phân tích melamine, đây là một kỹ thuật hiện đại và cho kết quả đáng tin cậy.

Với tình hình như vậy, Trung tâm Kiểm nghiệm VSATTP thuộc Viện Dinh dưỡng Quốc gia đã tiến hành triển khai kịp thời phương pháp định lượng melamine trong thực phẩm, cũng như trong thức ăn chăn nuôi bằng kỹ thuật LC/MS/MS.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Mẫu thực phẩm bao gồm các loại sữa bột, sữa nước, sữa chua, sữa tươi, nguyên liệu dùng làm sữa, các sản phẩm bánh kẹo chế biến từ sữa, trứng gia cầm các loại.

- Mẫu thức ăn chăn nuôi bao gồm các loại bột cá, bột thịt xương, bột ngô, và thức ăn chăn nuôi hỗn tạp.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Nguyên tắc

Melamin được chiết bằng dung dịch acid tricloacetic ở pH=1-2. Dịch chiết sau đó được làm sạch qua cột chiết pha rắn trao đổi cation SCX và phân tích bằng máy sắc ký lỏng khối phổ 2 lần (LC-MS/MS).

2.2.2. Dụng cụ thiết bị chính

- Máy sắc ký lỏng khối phổ 2 lần LCQ-Duo của hãng Thermo (để sàng lọc)

- Máy sắc ký lỏng khối phổ 2 lần TSQ Quantum Access của hãng Thermo

- Các dụng cụ khác: Bộ chiết SPE; máy ly tâm; máy rung siêu âm; máy lắc Vortex; bộ lọc dung môi sắc ký.

2.2.3. Dung môi hóa chất

- Chuẩn melamine (hãng Dr. Ehrenstorfer).
- Nội chuẩn melamine- $C^{13}N^{15}$ (hãng Cambridge Isotope).
- Acid tricloacetic, Methanol, Acid acetic, Pentafluoro Propionic Acid - PFPA amoni acetate (Merck).
- Nước cất 2 lần hoặc nước siêu sạch.
- Màng lọc 0,45 μm .

2.2.4. Xử lý kết quả

Xử lý kết quả theo phương pháp thống kê.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

3.1. Kết quả xây dựng phương pháp

3.1.1. Xây dựng đường chuẩn

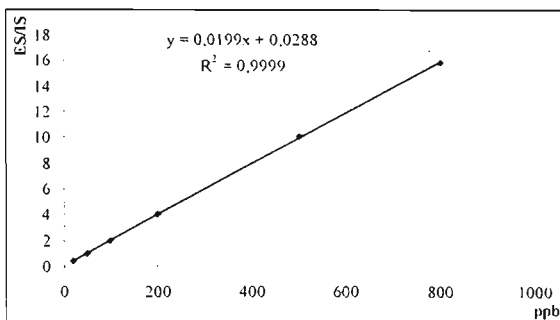
- *Dung dịch chuẩn gốc melamine 100 mcg/ml*: Cân chính xác khoảng 10mg chất chuẩn melamin, hòa tan (rung siêu âm cho tan hoàn toàn) và định mức đến 100ml bằng nước cất.

- *Dung dịch chuẩn trung gian melamine 10 mcg/ml*: Hút chính xác 10ml dung dịch chuẩn gốc ở trên cho vào bình định mức 100ml, định mức đến vạch bằng hỗn hợp nước cất. (ES)

- *Dung dịch nội chuẩn 1 mcg/ml*: Pha từ dung dịch nội chuẩn gốc là 100 mcg/ml (nhà sản xuất) trong nước cất đến nồng độ 1 mcg/ml (IS).

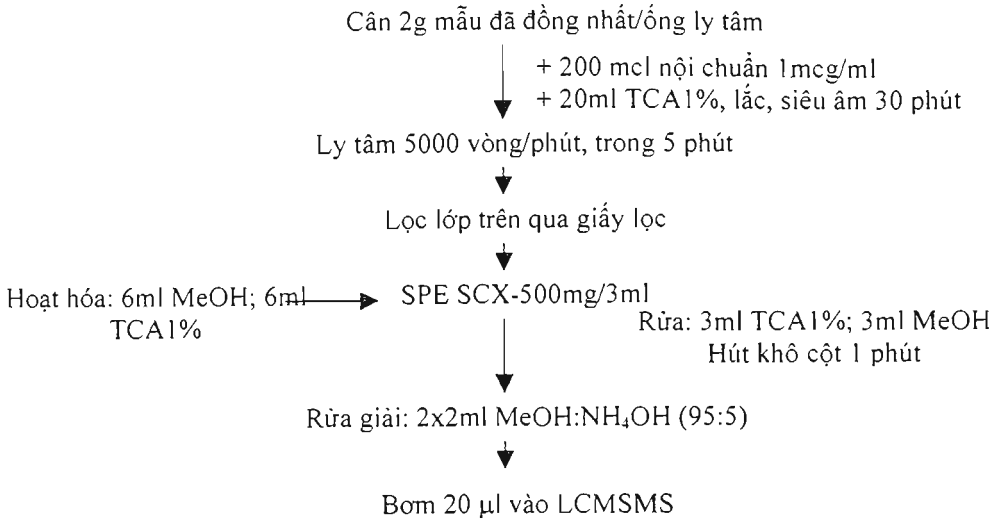
- *Dãy dung dịch chuẩn chạy sắc ký*: Các dd chuẩn chạy máy được pha như sau:

Nồng độ (ppb)	Dd ES (ml)	Dd IS (ml)	Nước cất (ml)
20	20	50	930
0	50	50	900
100	100	50	850
200	200	50	750
500	500	50	450
800	800	50	150



- *Lập đường chuẩn* dựa vào tương quan giữa tỷ lệ diện tích của pic melamine chuẩn so với ngoại chuẩn với nồng độ dung dịch chuẩn tương ứng.

3.1.2. Các bước xử lý mẫu



3.1.3. Điều kiện chạy máy

a. Sàng lọc trên máy LC-MS/MS LCQ Duo (ion trap MS)

Điều kiện HPLC:

- Cột Symmetry C18 (150 mm x 4,6mm x 5 mcm) và tiền cột C18 của Waters
- Nhiệt độ cột: Nhiệt độ phòng hoặc 30⁰C; Thể tích bơm mẫu: 20 µl
- Pha động: A: Dung dịch PFPA 0,5 mM trong nước; B: Acetonitril

Thời gian	A (%)	B (%)	Tốc độ dòng (ml/phút)
0	95	5	0,5
1	95	5	0,5
5	5	95	0,5
5,5	5	95	0,5
7	95	5	0,5
10	95	5	0,5

Điều kiện khối phổ:

Nguồn ion: ESI (+) 4000V

Chế độ chạy: SRM 127 -> 85 (CE: 40V) sàng lọc

SRM 133 -> 89 (CE: 40V) nội chuẩn

b. Khẳng định và định lượng bằng máy TSQ Quantum Access (triple quadrupole)

Điều kiện HPLC:

- Cột HILIC (150 mm x 4,6mm x 5 mcm) và tiền cột của Phenomenex.
- Nhiệt độ cột: Nhiệt độ phòng hoặc 30⁰C; Thể tích bơm mẫu: 10 µl
- Pha động: A: Dung dịch Amoni acetate 20 mM trong nước; B: Acetonitril

Thời gian	A (%)	B (%)	Tốc độ dòng (ml/phút)
0	10	90	0,5
1	100	0	0,5
6	10	90	0,5
5,5	10	90	0,5

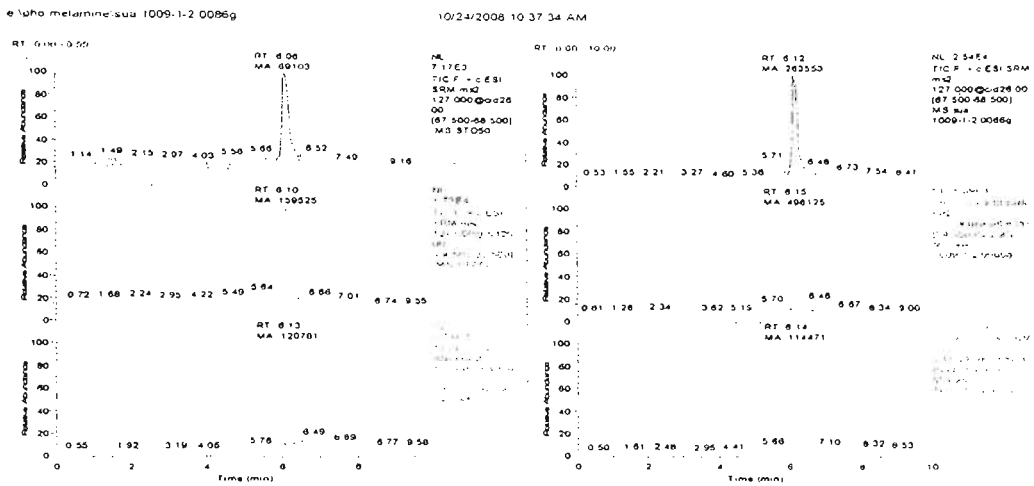
Điều kiện khối phổ:

Nguồn ion: ESI (+) 4500V

Chế độ chạy: SRM 127 -> 85 (CE: 26V) định lượng

SRM 127 -> 68 (CE: 27V) khẳng định

SRM 133 -> 89 (CE: 26V) nội chuẩn



Hình 1. Sắc đồ mẫu chuẩn 50ppb (trái) và mẫu sữa có melamine

3.2. Kết quả thẩm định phương pháp

3.2.1. Khoảng tuyến tính

Khoảng tuyến tính xác định được trong khoảng từ 20ng/ml đến 1000ng/ml.

3.2.2. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng

Thêm chuẩn vào mẫu trắng ở các mức nồng độ gần giới hạn phát hiện, tại nồng độ mà chiều cao pic gấp khoảng 3 lần chiều cao nhiễu đường nền là giới hạn phát hiện (LOD) và gấp khoảng 10 lần nhiễu là giới hạn định lượng (LOQ).

Kết quả xác định LOD và LOQ như sau: LOD = 10ng/g LOQ = 40ng/g

Kết quả xác định LOD và LOQ cho thấy phương pháp có độ nhạy tốt, đáp ứng yêu cầu so với giới hạn cho phép melamine thấp nhất là 1ppm.

3.2.3. Độ lặp lại và độ thu hồi của phương pháp

Phân tích mẫu trắng thêm chuẩn ở các mức nồng độ khác nhau, phân tích lặp lại 6 lần tính hiệu suất thu hồi R% và hệ số biến thiên RSD%.

Bảng 1. Kết quả xác định độ thu hồi và hệ số biến thiên (n=6)

Đối tượng mẫu	Nồng độ chuẩn thêm (ng/g)	Hiệu suất chiết (%)	CV (%) (đã loại trừ sai số theo nội chuẩn)	R (%) (đã loại trừ sai số theo nội chuẩn)
Sữa	50	81,4	6,3	98,2
	150	75,5	4,8	98,0
	750	72,9	3,6	98,6
Kẹo	50	90,0	5,6	100,4
	150	87,6	5,0	98,1
	750	86,9	3,9	99,6
Thức ăn chăn nuôi	50	79,4	9,2	101,7
	150	77,3	8,9	100,6
	750	70,1	8,8	99,8

Hiệu suất thu hồi đạt từ 98-102% và RSD% từ 3,6-9,2% đáp ứng yêu cầu của châu Âu theo Quyết định 2002/657/EC (R% từ 80-110% và CV% từ 15-20%).

3.2.4. Độ đúng của phương pháp

Phương pháp được ứng dụng để phân tích mẫu liên phòng thí nghiệm do phòng thí nghiệm Health Sciences Authority (HSA) thuộc Singapore tổ chức.

Bảng 2. Kết quả so sánh liên phòng

Mẫu	NIN - VN (ng/g)	REF (ng/g)	E_n
Sữa 01	ND	ND	0
Sữa 02	244	199	0,94
Sữa 03	200	190	0,24
Sữa 04	1025	1012	0,09

Các kết quả thu được cho thấy phương pháp có độ đúng tốt với E_n đều nhỏ hơn 1.

3.3. Kết quả phân tích melamine trên các đối tượng mẫu thực tế

Từ tháng 09 năm 2008 đến tháng 03 năm 2009, Trung tâm Kiểm nghiệm VSATTP - Viện Dinh dưỡng đã phân tích hơn 1000 mẫu. Kết quả được thể hiện trong bảng sau:

Bảng 3. Kết quả phân tích các đối tượng mẫu tại TTKN VSATTP

Đối tượng mẫu	Số lượng mẫu	Số mẫu dương tính	Tỷ lệ dương tính (%)
Nhóm sữa bột và nguyên liệu sữa	458	42	8,3
Nhóm sữa tươi, sữa chua, caramen	196	4	2,0
Nhóm bánh kẹo và sản phẩm từ sữa	287	4	1,4
Nhóm trứng	42	0	0,0
Nhóm thức ăn chăn nuôi	132	8	6,1
Tổng số	1115	54	4,8

Trên tổng số 54 mẫu dương tính với melamine, chỉ có 1 mẫu thuộc nhóm thức ăn chăn nuôi có hàm lượng melamine vượt quá tiêu chuẩn cho phép (5 mg/kg).

3.4. Bàn luận

- Melamine có 3 nhóm $-NH_2$ nên có khả năng tạo muối với acid, lợi dụng điểm này chúng tôi dùng dung dịch acid để tách melamine ra khỏi nền mẫu. Acid trichloacetic 1% vừa có tác dụng acid hóa vừa có tác dụng tủa protein khỏi nền mẫu sữa. Các phương pháp khác trên thế giới hiện nay đều sử dụng acid hydrochloric, nên phải thêm một bước loại tạp nữa bằng dichlometan.

- Cột SPE SCX là cột trao đổi cation mạnh, melamine trong môi trường acid tồn tại dạng cation $-NH_3^+$ được liên kết chặt chẽ với nền cột và dễ dàng được rửa giải ra khi chuyển dạng $-NH_2$ (trong môi trường kiềm) hơn so với cột MCX.

- Là một chất có tính phân cực mạnh, melamine rất khó có sự lưu giữ trên cột sắc ký C18, do đó khi sử dụng cột C18 chúng tôi cho thêm chất tạo cặp ion là (PFPA) có tác dụng tăng sự lưu giữ melamine trên cột C18 giúp tách melamine ra khỏi các chất có trong nền mẫu.

IV. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1. Kết luận

- Đã xây dựng thành công phương pháp phân tích melamine phù hợp điều kiện phòng thí nghiệm, bao gồm quá trình xử lý mẫu và phân tích trên máy LC-MS/MS.

- Đã thẩm định các thông số chính của phương pháp cho thấy phương pháp có độ nhạy đạt yêu cầu, độ chính xác cao có thể ứng dụng để phân tích melamin trong các đối tượng thực phẩm và thức ăn chăn nuôi.

- Đã kiểm nghiệm, giám sát hàm lượng melamine trong các đối tượng khác nhau trên địa bàn Hà Nội và phụ cận, giúp các cơ quan quản lý nhà nước quản lý tốt hơn sự vi phạm về hàm lượng melamine trong các loại thực phẩm đặc biệt là sữa.

4.2. Kiến nghị

Bên cạnh melamine, acid cyanuric cũng là một chất quan trọng cần kiểm soát. Hiện nay nhiều nước trên thế giới đã có tiêu chuẩn về acid cyanuric tuy nhiên ở Việt Nam vẫn chưa có tiêu chuẩn về giới hạn cho phép cũng như phương pháp phân tích chất này. Do đó cần có những nghiên cứu thêm về phương pháp phân tích cả hai chất melamine và acid cyanuric cũng như mối liên hệ giữa hai chất này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Andersen W. C. & al. (2007). *Determination of Melamin residues in Catfish by Triple Quadrupole LC/MS/MS with HILIC Chromatography*, Food and Drug Administration, United State of American.
2. Mark E. B., Aisling O. (2007), *Melamin, Ammeline and Cyanuric acid analysis by UPLC/MS/MS and UPLC/PDA*, Waters Application Note.
3. Peter V., Jonathan B., Kefei W., Dipankar G. (2008), *Analysi of melamin and Cyanuric acid in Food matrices by LC/MS/MS*, Thermo Application Note 424.

4. Roberto M.V. & al. (2008), *Method development and validation for melamin and its derivatives in rice concentrates by liquid chromatography. Application to animal feed sample*, *Anal. Bioanal. Chem.* 392, 523-531.
5. Romer Labs (2007), *AgraQuant Melamin Assay*, Romer Labs Methods, Singapore.
6. Sancho J.V. & al. (2005), *Residue determination of cyromazine and its metabolite melamin in chard samples by ion-pair liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry*, *Analytica Chimica Acta*, 530, 237-243.
7. Sherri T. & al. (2008) *Determination of melamin and cyanuric acid residues in Infant Formula using LC-MS/MS*, Food and Drug Administration, United State of American.
8. Smoker M., Alexander J. K. (2008), *Interim Method for Determination of melamin and cyanuric acid residues in Foods using LC-MS/MS*, Food and Drug Administration, United State of American.