

II.3

CÁC NGHIÊN CỨU VỀ PHƯƠNG PHÁP KIỂM NGHIỆM THỰC PHẨM

XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH MELAMIN TRONG SỮA BẰNG HỆ LC-MSD ION TRAP

NGUYỄN TIẾN ĐẠT, LÊ THỊ PHƯƠNG QUỲNH, NGUYỄN HOÀI NAM
TRẦN HỒNG HẠNH, PHAN THỊ THANH HƯƠNG, PHAN QUỐC LONG
Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên

Tóm tắt:

Việc xác định sự có mặt của melamin trong sữa là một vấn đề cấp thiết của xã hội. Trong thời gian qua, chúng tôi đã xây dựng được quy trình chiết và phương pháp xác định melamin trong sữa (ở dạng bột và lỏng) đơn giản, dễ thực hiện với các dung môi và trang thiết bị sẵn có tại Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên. Sử dụng hệ máy LC-MSD ion trap sẵn có, chúng tôi cũng đã thiết lập được đường chuẩn định mức trong sữa với độ nhạy 0.2ppm.

ESTABLISHMENT METHOD DETERMINATION MELAMINE IN MILK WITH SYSTEM “LC-MSD ION TRAP”

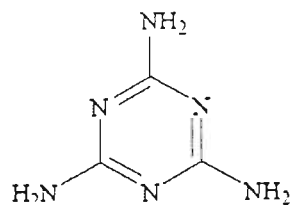
Abstract:

Determination the present of melamine in milk products now are urgent in social public. In the pass time, we are established rules of operation for extraction and method, simple of determination melamine in milk (power form and liquid), easy in practice with solvents and equipment available on hand at Institute of Chemistry and Chemistry compounds. Use high technology equipment, LC-MSD Ion trap available on hand, we are established standard line for determination in milk with precise 0.2 ppm.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Melamine là một hợp chất hữu cơ, công thức hóa học là $C_3H_6N_6$ (Hình 1) và tên khoa học là 1,3,5-triazine-2,4,6-triamine. Đây là một chất dạng tinh thể màu trắng (chế biến chất dẻo, đồ chơi, thuốc nhuộm, tan nhẹ trong nước.

Melamine được sử dụng nhiều trong sản xuất công nghiệp nhuộm, quần áo chống cháy, hồ, đồ gia dụng, sản xuất phân bón... với nhiều đặc tính ưu việt như tính kết dính cao, không nhiệt tốt, không bị ăn mòn, không mùi vị. Tuy nhiên, gần đây, một số nhà sản xuất ở Trung Quốc đã đưa melamine vào sản xuất thức ăn cho gia súc, vào sữa - các sản phẩm của sữa cho con người với mục đích làm tăng giả hàm lượng protein trong các sản phẩm này. Hầu hết các xét nghiệm protein đều căn cứ vào hàm lượng nitơ (phương pháp Kjeldahl hoặc Dumas) nên các kết quả xét nghiệm thường bị hiểu lầm là hàm lượng protein trong các sản phẩm này cao do trong cấu trúc phân tử melamine chứa 6 nguyên tử N nhưng thực chất nitơ trong melamine không có giá trị dinh dưỡng. Không những không có giá trị dinh dưỡng, mà melamine còn có nguy cơ cao ảnh hưởng xấu đến sức khỏe của con người, đặc biệt là trẻ em do sử dụng sữa chứa melamine. Các công bố của Trung Quốc cho thấy đã phát hiện sự có mặt của melamine trong sữa và các sản phẩm sữa của nhiều hãng sữa nổi tiếng, liên quan đến bệnh sỏi thận và suy thận ở trẻ em đã gây chấn động dư luận. Trẻ nhỏ càng được uống nhiều sữa chứa melamine thì độ hấp thu melamine vào cơ thể càng lớn và khi có sự kết hợp giữa melamine và axit cyanuaric, sẽ hình thành chất rắn trong ống thận, gây ra suy thận, hoại thận dẫn đến gây bệnh sỏi thận và làm tắc nghẽn ống thận có thể gây tử vong [2].



Hình 1. Melamine

Với việc nhập khẩu lớn nguyên liệu sữa, sữa và các sản phẩm sữa từ Trung Quốc, Việt Nam cũng đối mặt với vấn đề melamine trong sữa. Vì vậy, theo yêu cầu của Cục An toàn vệ sinh thực phẩm (c/v số 3802/QĐ-BYT ngày 1/10/2008 của Bộ Y tế), rất cần thiết phải xây dựng các phương pháp hiện đại, chính xác để phát hiện hàm lượng melamine trong sữa và các sản phẩm của sữa nhằm ngăn chặn kịp thời việc lưu hành của các sản phẩm này trên thị trường. Kết hợp với phương pháp đã công bố của Trung tâm Kiểm nghiệm Vệ sinh an toàn thực phẩm [5] và tham khảo một số nghiên cứu trên thế giới [1, 3, 4], chúng tôi giới thiệu quy trình chiết melamine từ sữa (dạng bột và lỏng), phương pháp xác định định tính và định lượng melamine trong sữa và các sản phẩm của sữa bằng hệ máy LC-MSD Ion Trap sẵn có tại Viện Hoá học các hợp chất thiên nhiên, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Hoá chất, dụng cụ, thiết bị

- Dung môi hoá chất: loại dùng cho phân tích và chạy HPLC (Merck, Đức).
- Melamin chuẩn 99%: Sigma-Aldric
- Máy sắc ký lỏng kết nối khối phổ LC-MSD Ion Trap Agilent 1200 Series (USA). Cột sắc ký Zorbax RX-SIL (150 mm x 2,1 mm x 5 mm) và tiền cột C₁₈ của hãng Agilent.

2.2. Điều kiện chạy cột

- Lượng mẫu bơm 5µl, sử dụng hệ thống bơm mẫu tự động có điều nhiệt, bơm và rửa kim sau khi nạp mẫu vào cột.
- Nhiệt độ cột 30°C
- Tốc độ dòng 0,4ml/ph
- Thời gian chạy 6 phút
- Hệ dung môi pha động:

- + Kênh A: 5 mM amoniumacetat trong nước
- + Kênh B: acetonitrile
- Chương trình chạy: chạy isocratic 95%B trong 6 phút
- Chọn chế độ quét ở bước sóng UV 254 nm và 240 nm

Các thông số cho hệ thống khối phổ ESI-MS (6300 Ion Trap)

- Hệ thống khối phổ ESI-MS được kết nối với phần mềm 6300 Series Trap Control Ver.6.1 và DataAnalysis Ver.3.4 để điều khiển, thu thập và xử lý số liệu.

- Hệ nén khí dung (nitơ 99,99%) có tốc độ dòng 8,0 ml/ph được đưa vào với áp suất đầu phun đạt 30 psi, nhiệt độ làm khô đạt 325°C.

- Khoảng quét phổ từ 50-200 *m/z*. Chế độ quét bẫy và bắn mảnh phổ khối lựa chọn Manual MS (n) ở mode positive.

2.3. Chuẩn bị dung dịch gốc melamine

- Từ melamine chuẩn (99%, Cat.No.M2659, Aldrich), cân chính xác 5,0 mg bằng cân phân tích cho vào bình định mức 50ml.

- Thêm 10 ml hỗn hợp ACN:H₂O (1:1) vào.

- Siêu âm đến khi toàn bộ lượng melamine được hòa tan hết.

- Hòa thêm ACN:H₂O (1:1) cho đến vạch định mức 50ml, thu được dung dịch gốc melamine có nồng độ 100 µg/ml (dung dịch A).

- Dung dịch gốc trung gian (dung dịch B, nồng độ 1 µg/ml) cũng được chuẩn bị bằng cách dùng pipet hút 500 µl dung dịch gốc chuyển vào bình định mức 50 ml rồi định mức bằng hỗn hợp ACN:H₂O (1:1).

Từ các dung dịch gốc trên pha loãng thành các dung dịch có nồng độ khác nhau cho các thí nghiệm tiếp sau.

2.4. Chiết melamin từ mẫu sữa

- Cho các mẫu sữa (2 g mẫu rắn hoặc 5 g mẫu lỏng) vào ống li tâm 50 ml. Thêm 15 ml TCA 1%, lắc đều. Siêu âm 30 phút, ly tâm với tốc độ 5000 v/ph trong 5 phút, gạn riêng phần nước, sau đó bổ sung thêm 5 ml TCA 1% vào phần tủa rồi lắc đều và siêu âm tiếp trong 10 phút. Ly tâm với tốc độ 5000 v/ph trong 5 phút rồi gộp phần nước trong lại, lọc qua giấy lọc vào cốc hoặc bình nón 50 ml.

- Lọc qua SPE: cột SPE SCX được hoạt hóa bằng 6ml methanol, 6ml nước và 6 ml dung dịch TCA 1%. Nạp toàn bộ dịch chiết ở trên vào cột với tốc độ khoảng 1 ml/phút (điều chỉnh tốc độ bằng áp suất trên bộ chiết SPE). Cột được rửa tạp bằng 3 ml nước cất và 3 ml methanol. Hút khô cột trong 1 phút.

- Rửa giải chính xác bằng 2 ml x 2 lần hỗn hợp MeOH:NH₄OH (95:5), lưu ý để dung môi rửa giải thấm vào cột trong 1 phút trước khi rửa giải, tốc độ rửa giải khoảng 1 ml/phút.

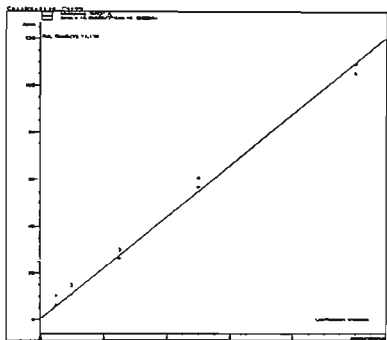
- Thu dung dịch rửa giải vào ống nghiệm, lọc qua màng lọc và bơm vào hệ thống LC-MS.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Định tính melamine chuẩn và xây dựng đường chuẩn định lượng

Hệ thống LC-MS được chuẩn bị và chạy rửa cột trong khoảng 15 phút bằng ACN rồi cho chạy ổn định trong 15 phút với hệ dung môi ban đầu dùng để phân tích (ACN/H₂O (5mM Amoniumacetat) 95:5). Melamine được phát hiện bởi detector UV-Vis/DAD ở bước sóng 240 nm (bước sóng này được chọn thông qua thí nghiệm quét khoảng hấp thụ cực đại UV của melamine) và detector khối phổ với các mảnh bầy là m/z 127 [M+H]⁺, 85 [C₂N₄H₅]⁺, và 68 [C₂N₃H₂]⁺. Pic tín hiệu của Melamine được phát hiện một cách ổn định tại thời gian lưu Rt 3,0 - 3,4 phút đối với tất cả các mẫu phân tích. Melamine ở nồng độ 0,2 ppm không nhận dạng được bằng detector UV nhưng có thể được phát hiện trên phổ MS.

Đường chuẩn định lượng melamine được thiết lập dựa trên thang nồng độ 0, 0,5, 1,0 2,5 và 5,0 ppm. Mẫu sữa bột không chứa melamine (2 g) được phối trộn với melamin chuẩn theo thang nồng độ ở trên rồi chiết theo quy trình đã mô tả trong phần II, mỗi nồng độ được lặp lại 3 lần. Đường chuẩn được tính toán xây dựng bằng phần mềm ChemStation dựa trên diện tích pic tại thời gian lưu Rt 3,0- 3,4 phút bằng phương pháp hồi quy tuyến tính trên phần mềm ChemStation for LC3D System (Hình 2).

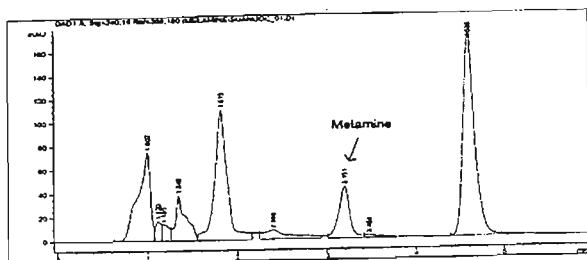


Hình 2. Đường chuẩn định lượng Melamine trong sữa

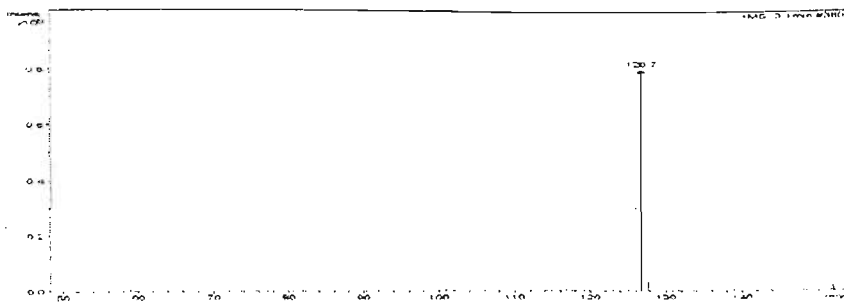
3.2. Định tính và định lượng melamine trong sản phẩm sữa

Hai mẫu sữa (một mẫu bột và một mẫu nước) do Viện Dinh dưỡng cung cấp được chiết theo quy trình đã mô tả ở trên. Kết quả phân tích định tính cho thấy có mặt melamine trong mẫu sữa nước bằng việc bầy được mảnh m/z 127 [M+H]⁺ đặc trưng của melamine (Hình 3 và 4). Đối chiếu với đường chuẩn, hàm lượng melamine trong mẫu sữa này được xác định là 110 ppm.

Đối với mẫu sữa bột không phát hiện thấy sự có mặt melamine trên sắc đồ trong khoảng thời gian lưu 3,0-3,4 phút cũng như mảnh phổ m/z 127.



Hình 3. Sắc ký đồ mẫu sữa nước chứa malamine



Hình 4. Phổ positive ESI-MS của melamine trong mẫu sữa nước

IV. KẾT LUẬN

Để đáp ứng được nhu cầu phân tích sự có mặt của melamine trong các sản phẩm sữa với điều kiện sẵn có, chúng tôi đã xây dựng được quy trình chiết melamine trong sữa và phương pháp phân tích định tính melamine trong sữa bằng hệ LC-MS Ion Trap Agilent 1200 Series và đã thiết lập được đường chuẩn có thể dùng để định lượng melamine trong các sản phẩm sữa. Theo phương pháp này, chúng tôi đã định tính và định lượng được melamine trong một mẫu sữa nước do Viện Dinh dưỡng cung cấp. Tuy nhiên do độ nhạy của hệ máy LC-MS không cao nên kết quả chỉ đánh giá được những mẫu có hàm lượng melamine trên 0,2 ppm.

Lời cảm ơn - Nghiên cứu này được Viện Hoá học các Hợp chất thiên nhiên hỗ trợ kinh phí.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Andersen WC, et al (2008), *Determination and confirmation of melamine residues in catfish, trout, tilapia, salmon, and shrimp by liquid chromatography with Tandem mass spectrometry*. J. Agric. Food Chem. 2008, 56, 4340-4347.
2. Ching-Wan Lam, et al, "Diagnosis and spectrum of melamine-related renal disease: Plausible mechanism of stone formation in humans", *Clinica Chimica Acta* 402, 150-155.
3. Filigenzi MS, et al, "The determination of melamine in muscle tissue by liquid chromatography tandem mass spectrometry", *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2007, 21, 4027-4032.
4. Jianqiu Mi, et al, *Rapid screening and confirmation of melamine residues in milk and its products by liquid chromatography Tandem mass spectrometry*. Agilent Technologies, 10/2008.
5. Phân tích melamin trong sữa và các sản phẩm sữa bằng kỹ thuật LC/MS/MS, Trung tâm Kiểm nghiệm VSATTP, Viện Dinh dưỡng, 9/2008.