

## **XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG MELAMIN THÔI NHIỄM TỪ ĐỒ NHỰA LÀM TỪ MELAMIN BẰNG SẮC KÝ LỎNG KHỐI PHỔ HAI LẦN**

*Đến tòa soạn 16 - 6 - 2015*

**Trần Cao Sơn, Lê Thị Hồng Hảo**

*Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm Quốc gia*

**Bùi Cao Tiến, Nguyễn Thị Ánh Hường**

*Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội*

### **SUMMARY**

#### **DETERMINATION OF MELAMINE MIGRATION FROM TABLEWARE MADE OF MELAMINE PLASTIC BY LIQUID CHROMATOGRAPHY TANDEM MASS SPECTROMETRY**

*A method of quantification of melamine migrating from melamine-made tableware samples was developed and validated. The samples were filled with a suitable simulant (either water or 3% acetic acid) and placed in an oven at 70 °C for 90 minutes. Melamine was separated by liquid chromatography using HILIC column (150 mm x 4.6 mm x 5 μm) and then quantified by a triple-quadrupole mass spectrometry in ESI(+) mode. Melamine-C<sup>13</sup>N<sup>15</sup> isotope was used as internal standard. The method performance was good with the linear range from 10 ng/mL to 500 ng/mL and the limit of quantitation was 10 ng/mL. The method was applied to analyze 12 samples taken from local markets and supermarkets in Hanoi. The levels of melamine migration in samples taken from supermarkets were significant higher than that from local markets.*

#### **1. ĐẶT VẤN ĐỀ**

Melamin, 1,3,5-triazine-2,4,6-triamine, là một chất quan trọng trong ngành công nghiệp sản xuất nhựa cứng, khi kết hợp với formaldehyd tạo thành hợp chất polyme tổng hợp có tính chống dẫn nhiệt và cháy, vì vậy thường được sử dụng để làm bát đĩa nhựa đựng thực phẩm. Tuy nhiên khi sử

dụng những sản phẩm nhựa này, melamin có thể thôi nhiễm ra thực phẩm và đi vào cơ thể gây hại cho sức khỏe con người, đặc biệt với những đồ ăn nóng (như canh, súp,...) và có tính axit cao, cũng như những món đồ cũ và có chất lượng thấp [1]. Các nghiên cứu về melamin thường tập trung xác định melamin trong các sản phẩm

thực phẩm và thức ăn chăn nuôi. Hiện nay tại Việt Nam chưa có bất kỳ nghiên cứu cũng như quy định nào về hàm lượng melamin thôi nhiễm trong khi trên thị trường lại xuất hiện khá nhiều bát đĩa nhựa làm từ nhựa melamin có nguồn gốc không rõ ràng, tiềm ẩn nhiều nguy cơ. Theo quy định của ủy ban châu Âu, hàm lượng melamin thôi nhiễm tối đa là 2,5 mg/kg [2]. Trong bài báo này chúng tôi trình bày kết quả sử dụng phương pháp sắc ký lỏng khối phổ hai lần (LC-MS/MS) để nghiên cứu xác định hàm lượng melamin thôi nhiễm từ bát, đĩa nhựa trên địa bàn Hà Nội, góp phần khuyến cáo và bảo vệ sức khỏe người tiêu dùng.

## 2. THỰC NGHIỆM

### 2.1. Đối tượng nghiên cứu, hóa chất và thiết bị

Đối tượng nghiên cứu là các mẫu bát, đĩa được lấy ngẫu nhiên từ chợ và siêu thị trên địa bàn Hà Nội. Mẫu được rửa sạch bằng nước máy và tráng lại bằng nước cất trước khi phân tích.

Thiết bị phân tích chính là hệ thống sắc ký lỏng ghép khối phổ hai lần gồm sắc ký lỏng LC-20AD-XR của Shimadzu và khối phổ 5500 QQQ của ABSciex. Ngoài ra, sử dụng các thiết bị thông thường của phòng thí nghiệm như máy rung siêu âm, tủ sấy, cân phân tích độ chính xác 0,1 mg, bộ lọc dung môi sắc ký.

Chất chuẩn melamin và nội chuẩn  $C^{13}N^{15}$ -melamin được cung cấp bởi Sigma-Aldrich và Cambridge Isotope. Các dung môi, hoá chất gồm acetonitril, amoni acetat, axit acetic của hãng Merck.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

Dựa trên quy định của Châu Âu (2002/72/EC) về việc kiểm tra melamin thôi nhiễm, tiến hành ngâm thôi nhiễm trong môi trường axit acetic và nước cất. Theo quy định này, điều kiện phù hợp để ngâm thôi nhiễm là ở 70°C trong thời gian 90 phút [3]. Điều kiện ngâm thôi nhiễm như sau: ngâm mẫu trong tủ sấy ở 70°C trong 90 phút với axit acetic 3% hoặc nước cất 2 lần.

Công thức được sử dụng để tính toán hàm lượng melamin thôi nhiễm từ bao bì như sau:

$$X(\mu\text{g} / \text{kg}) = \frac{(A_{ES} - b).6}{\frac{IS}{a} \times 1000}$$

Trong đó:

X : Hàm lượng melamin trong mẫu ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )

$A_{ES/IS}$ : Tỷ lệ diện tích pic melamin và nội chuẩn  $C^{13}N^{15}$ -melamin

a, b: hệ số trong phương trình đường chuẩn  $y = ax + b$

6 là hệ số. Theo quy định của EU thì hàm lượng thôi nhiễm trên diện tích bề mặt ngâm mẫu là 6 dm<sup>2</sup> (ng/ml) được quy đổi tỉ lệ với số gam melamin thôi nhiễm trong 1 kg mẫu (mg/kg)

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Khảo sát các điều kiện khối phổ

Các điều kiện của nguồn ESI (+) được khảo sát với sự có mặt của hệ dung môi sắc ký. Các điều kiện MS phân tích melamin được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Các điều kiện MS phân tích melamin

Chất phân tích	Ion mẹ (m/z)	Định lượng		Xác nhận	
		Ion con (m/z)	CE(eV)	Ion con (m/z)	CE(eV)
Melamin	127	85	30	68	30
Melamin-C <sup>13</sup> N <sup>15</sup>	133	89	30	71	30

### 3.2. Khảo sát điều kiện HPLC

Melamin là hợp chất có tính phân cực cao, khi phân tích bằng cột pha đảo thông thường (như C18), thời gian lưu thu được rất sớm do tương tác của melamin với pha tĩnh thấp. Để tách melamin hoàn toàn khỏi nền mẫu, cột Luna HILIC (150 mm x 4,6 mm x 5 µm) của Phenomenex đã được lựa chọn.

Để tăng khả năng tạo ion trong MS, thường sử dụng thêm các dung dịch axit hoặc muối dễ bay hơi. Chế độ rửa giải gradient với 2 kênh: amoni acetat 10 mM trong nước (A) và acetonitril (B) đã được khảo sát. Tốc độ dòng là 1,0 ml/phút. Điều kiện gradient được tối ưu để được pic sắc ký nhọn, cân đối, thời gian lưu khoảng 6 phút (bảng 2).

Bảng 2. Điều kiện gradient phân tích melamin

Thời gian (phút)	Amoni acetat 10 mM (%)	ACN (%)	Tốc độ dòng (ml/phút)
0 - 3	10	90	1,0
4 - 6	50	50	1,0
6,5 - 10	10	90	1,0

### 3.3. Xây dựng quy trình xử lý mẫu

Để đánh giá thời nhiễm các hợp chất hoá học, quy định của châu Âu yêu cầu thực hiện trên môi trường phù hợp với loại thực phẩm chứa đựng và sao cho hàm lượng thời nhiễm lớn nhất. Đối với các sản phẩm bát đĩa nhựa, hai loại môi trường được quan tâm là môi trường nước cất (điều kiện trung tính) và môi trường axit acetic 3% (điều kiện axit). Quy trình thời nhiễm được tóm tắt như sau: mẫu bát đĩa được

rửa sạch bằng nước máy và tráng lại bằng nước cất, ngâm trong môi trường thời nhiễm thời gian 90 phút ở nhiệt độ 70°C. Sau đó dịch ngâm được lọc qua giấy lọc, lấy 950 µL dịch lọc và 50 µL nội chuẩn melamin 1 µg/mL vào vial, phân tích bằng LC-MS/MS. Thực hiện đánh giá so sánh sự thời nhiễm melamin từ 2 môi trường trên, lặp lại 2 lần lấy giá trị trung bình, các kết quả được trình bày ở bảng 3.

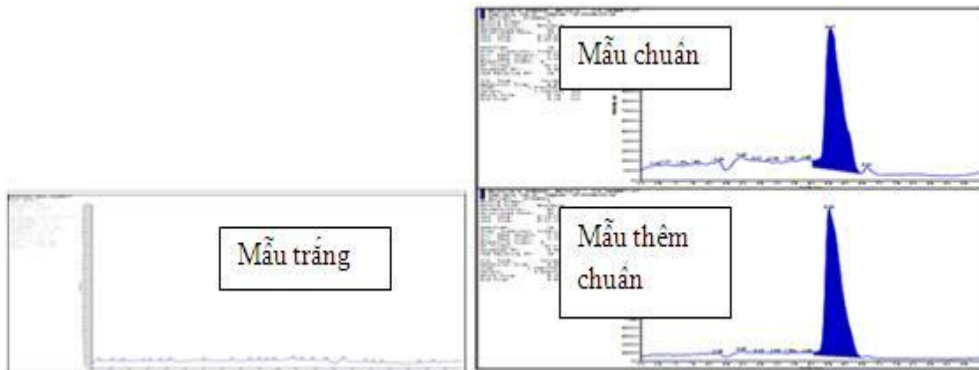
Bảng 3. Đánh giá môi trường ngâm mẫu

Tên mẫu	Môi trường	Nồng độ (ng/ml)	Nồng độ (mg/kg)	Trung bình
Mẫu 1a	Axit acetic 3%	2440	4,31	4,495
Mẫu 1b	Axit acetic 3%	2650	4,68	
Mẫu 2a	Nước cất	448	0,79	0,68
Mẫu 2b	Nước cất	325	0,57	

Từ kết quả thu được cho thấy hàm lượng melamin thôi nhiễm trong môi trường axit cao hơn trong môi trường nước cất khoảng 6,6 lần. Do đó, để đánh giá được nguy cơ tối đa thôi nhiễm melamin vào thực phẩm, chúng tôi lựa chọn môi trường axit acetic 3% cho các thí nghiệm tiếp theo.

### 3.4. Thẩm định phương pháp

- Đánh giá độ lặp lại của thiết bị bằng cách phân tích lặp lại một mẫu 6 lần ở khoảng nồng độ trung bình là 60 ng/ml. Kết quả thu được ở bảng 5 cho thấy độ lệch chuẩn tương đối của diện tích pic  $RSD = 1,4\%$  đáp ứng yêu cầu ( $<2\%$ ).



Hình 2. Sắc đồ melamin mẫu trắng, mẫu chuẩn, mẫu thêm chuẩn

- Đường chuẩn được xây dựng trong khoảng nồng độ từ 10 ng/mL đến 500 ng/mL. Kết quả cho thấy đường chuẩn có hệ số tương quan đạt yêu cầu  $R^2 > 0,99$ .

- Giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ) được xác định bằng cách phân tích các mẫu trong nền axit acetic 3% có nồng độ thấp đến khi thu được tín hiệu chất phân tích cao gấp khoảng 3 lần và 10 lần tín hiệu nền. Kết quả thu được như sau  $LOQ = 10 \text{ ng/mL}$ ,  $LOD = 3 \text{ ng/mL}$ .

- Tính đặc hiệu được đánh giá bằng cách phân tích mẫu trắng, mẫu chuẩn, mẫu thêm chuẩn. Kết quả ở hình 2 cho thấy mẫu trắng không xuất hiện pic của melamin, mẫu thêm chuẩn xuất hiện pic ở cùng thời gian lưu với mẫu chuẩn. Ngoài ra, số điểm nhận dạng (IP) và tỷ lệ ion cũng được sử dụng để đảm bảo tính đặc hiệu của phương pháp. Với bắn phá 1 ion mẹ thành 2 ion con đã đạt được số điểm IP là 4 đạt yêu cầu của Châu Âu theo quyết định 657/2002. Tỷ lệ ion xác định được trong nghiên cứu này với các ion  $m/z$  68/85 là  $36\% \pm 9\%$ .

### 3.5. Thôi nhiễm nhiều lần

Tiến hành đánh giá thôi nhiễm melamin từ các mẫu qua nhiều lần ngâm khác nhau. Thực hiện phân tích 1 loại mẫu, lặp lại 8 lần. Sau khi thí nghiệm thôi nhiễm lần thứ nhất, mẫu được rửa sạch bằng nước cất và thực hiện tiếp thí nghiệm thôi nhiễm lần thứ hai theo quy trình xử lý mẫu. Lặp lại lần thôi nhiễm thứ 3 tương tự như trên (bảng 4).

Bảng 4. So sánh các lần thổi nhiễm khác nhau

Lần phân tích	Lần 1 (ng/mL)	Lần 2 (ng/mL)	Thay đổi (%)	Lần 3 (ng/mL)	Thay đổi (%)
TB	20,2	16,3	-20	29,0	+78%
SD	2,92	4,89		13,2	
<b>RSD(%)</b>	<b>14,4</b>	<b>30,0</b>		<b>45,6</b>	

Các kết quả thu được cho thấy:

- Lần 1 độ lệch chuẩn tương đối là 14,4% đáp ứng được yêu cầu của AOAC ( $RSD \leq 21\%$ ). Trong khi đó, RSD lần 2, 3 không đáp ứng được yêu cầu và có xu hướng ngày càng tăng do bề mặt của các mẫu đã không đồng nhất sau lần thí nghiệm trước.
- Lần 2 hàm lượng melamin thổi nhiễm đã giảm đi ở hầu hết các mẫu (trung bình giảm khoảng 20%). Tuy nhiên, lần 3 hàm lượng

melamin thổi nhiễm lại tăng ở tất cả các mẫu nghiên cứu.

### 3.5. Áp dụng phương pháp

Tiến hành phân tích một số mẫu bát đĩa trên địa bàn Hà Nội. Kết quả được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5. Hàm lượng melamin thổi nhiễm trong một số sản phẩm bát đĩa nhựa trên địa bàn Hà Nội

Ký hiệu	Tên mẫu	Địa điểm lấy mẫu	Nồng độ (ng/mL)	Diện tích (dm <sup>2</sup> )	Kết quả (mg/kg)
M1	Bát nhỏ màu trắng	St.Fivimart	55,4	1,27	0,261
M2	Bát nhỏ màu xanh	St.Fivimart	77,8	1,272	0,367
M3	Bát to màu trắng	St.Fivimart	20,9	6,343	0,02
M4	Bát to màu xanh	St.Fivimart	25,3	6,343	0,024
M5	Đĩa hình elip	St.Fivimart	125	3,958	0,189
M6	Đĩa tròn nhỏ	St.Fivimart	62,2	2,545	0,147
M7	Đĩa tròn to (trắng)	St.Fivimart	98,8	15,205	0,039
M8	Bát to hoa văn	C.Phùng Khoang	2240	5,201	<b>2,584</b>
M9	Bát to màu xanh	C.Phùng Khoang	1380	5,201	1,592
M10	Bát to màu trắng	C.Nguyễn Cao	858	5,844	0,881
M11	Đĩa tròn hoa văn	C.Nguyễn Cao	2210	15,205	0,872
M12	Bát nhỏ hoa văn	C.Nguyễn Cao	1005	1,272	<b>4,741</b>

Các kết quả thu được cho thấy:

- Các mẫu lấy ở siêu thị, cho kết quả hàm lượng melamin thấp từ  $0,02 \div 0,367$  mg/kg nằm trong giới hạn cho phép của Ủy ban Châu Âu EU là 2,5 mg/kg. Trong số 5 mẫu lấy ở chợ, có 2 mẫu vượt giới hạn phép, 3 mẫu còn lại tuy vẫn nằm trong giới hạn cho phép nhưng có kết quả cao vượt hơn so với các mẫu ở siêu thị hàng trăm lần. Từ đó cho thấy chất lượng các sản phẩm bát đĩa từ nhựa melamin trong siêu thị tốt và an toàn hơn so với các sản phẩm ở chợ (không rõ nguồn gốc).

#### 4. KẾT LUẬN

Các điều kiện xử lý mẫu và điều kiện LC-MS/MS đã được khảo sát để thôi nhiễm melamin từ bát đĩa nhựa và xác định melamin thôi nhiễm. Kết quả phân tích cho thấy tất cả các mẫu trên địa bàn Hà Nội đều phát hiện có melamin thôi nhiễm với nồng độ từ  $0,02$  mg/kg  $\div$   $4,741$  mg/kg. Các mẫu ở siêu thị có hàm lượng thôi nhiễm melamin ở mức an toàn, trong khi đó 2/5 mẫu được lấy ở chợ có hàm lượng melamin thôi nhiễm vượt mức an toàn theo quy định của Châu Âu.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Zamri C., Haron D.E., Ahmad E.D., Taha H., Mustafa A.M. (2011) “Analysis of melamin migration from melamin food contact articles”, *Food additives & contaminants - Part A Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment*, 28(7), 967-973.
2. Commission Regulation (EU) 1282/2011 of 28 November 2011 amending and correcting the Commission Regulation (EU) No 10/2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food.
3. Commission Directive 2002/72/EC of 6 August 2002 relating to plastic materials and articles intended to come into contact with foodstuffs.