

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 13804:2023

ISO 23970:2021

Xuất bản lần 1

**SỮA, SẢN PHẨM SỮA VÀ
THỨC ĂN CÔNG THỨC DÀNH CHO TRẺ SƠ SINH –
XÁC ĐỊNH MELAMIN VÀ AXIT CYANURIC BẰNG
SẮC KÝ LỎNG-HAI LẦN KHỐI PHỔ (LC-MS/MS)**

*Milk, milk products and infant formula – Determination of melamine and cyanuric acid
by liquid chromatography and tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)*

HÀ NỘI – 2023

Lời nói đầu

TCVN 13804:2023 hoàn toàn tương đương với ISO 23970:2021;

TCVN 13804:2023 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F12 *Sữa và sản phẩm sữa* biên soạn, Viện Tiêu chuẩn Chất lượng Việt Nam 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 – Xác định melamin và axit cyanuric bằng sắc ký lỏng- hai lần khối phổ (LC-MS/MS)

Milk, milk products and infant formula – Determination of melamine and cyanuric acid by liquid chromatography and tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định hàm lượng melamin và axit cyanuric bằng sắc ký lỏng-hai lần khối phổ (LC-MS/MS). Phương pháp này đã được xác nhận trong một nghiên cứu liên phòng thử nghiệm thông qua việc phân tích các mẫu thêm chuẩn trong thức ăn công thức từ sữa (sữa công thức) dành cho trẻ sơ sinh, thức ăn công thức từ đậu nành dành cho trẻ sơ sinh, sữa bột, sữa nguyên chất, đồ uống từ đậu nành và socola sữa với melamin nằm trong khoảng từ 0,71 mg/kg đến 1,43 mg/kg và với axit cyanuric từ 0,57 mg/kg đến 1,45 mg/kg. Giới hạn định lượng (LOQ) đối với melamin là 0,05 mg/kg và axit cyanuric là 0,25 mg/kg. Giới hạn trên của dải làm việc là 10 mg/kg đối với melamin và 25 mg/kg đối với axit cyanuric.

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 4851 (ISO 3696), *Nước dùng để phân tích trong phòng thí nghiệm – Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử.*

3 Thuật ngữ và định nghĩa

Tiêu chuẩn này không đưa ra các thuật ngữ và định nghĩa.

4 Nguyên tắc

Phần mẫu thử đồng nhất được bổ sung chất nội chuẩn có dán nhãn ^{13}C (melamin và axit cyanuric). Sau khi ủ ít nhất 1 h, thêm nước vào mẫu và lắc để hòa tan huyền phù trong hỗn hợp axetonitril và nước. Mẫu được lắc và ly tâm. Sau khi tách phần dịch nổi phía trên ra khỏi cặn, bổ sung benzoguanamin làm chất chuẩn để xác định độ thu hồi. Một phần dịch nổi phía trên được bơm vào hệ thống LC-MS/MS. Khối phổ ba tứ cực được kết hợp với sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) hoặc sắc ký lỏng siêu hiệu năng (UHPLC). Sử dụng sắc ký lỏng tương tác ưa nước (HILIC). Quá trình ion hóa đạt được bằng ion hóa tia điện (ESI) trong giám sát nhiều phản ứng (MRM).

5 Thuốc thử

5.1 Danh mục thuốc thử

Chỉ sử dụng thuốc thử loại phân tích được công nhận và nước phù hợp với loại 1 của TCVN 4851 (ISO 3696), trừ khi có quy định khác. Chỉ sử dụng thuốc thử có độ tinh khiết thích hợp để phân tích melamin và axit cyanuric.

Kiểm tra độ tinh khiết của thuốc thử và chất chuẩn (ví dụ: dung dịch chuẩn) bằng phép thử trắng trong cùng điều kiện được sử dụng trong phương pháp. Sắc ký đồ không được có bất kỳ tạp chất gây nhiễu tại thời gian lưu của các hợp chất cần phân tích.

5.1.1 Axit formic, từ 98 % đến 100 % phần khối lượng (CAS RN^{®1)} 64-18-6).

5.1.2 Axetonitril, loại gradient HPLC (CAS RN[®] 75-05-8).

5.1.3 Amoni axetat, xấp xỉ 98 % phần khối lượng (CAS RN[®] 631-61-8).

5.1.4 Metanol, loại Ultra LC-MS (CAS RN[®] 67-56-1).

5.1.5 Melamin, khối lượng ≥ 99 %, dạng rắn (CAS RN[®] 108-78-1).

5.1.6 Axit cyanuric, dạng rắn (CAS RN[®] 108-80-5).

5.1.7 Benzoguanamin, dạng rắn (CAS RN[®] 91-76-9).

5.1.8 Melamin ^{13}C , $^{13}\text{C}_3$ (99 %), Amino- $^{15}\text{N}_3$ (98 %), dung dịch có nồng độ khối lượng $\rho = 1\ 000\ \mu\text{g/ml}$. Có thể sử dụng các dung dịch melamin/axit cyanuric đánh dấu đồng vị khác nếu cho các kết quả tương đương; điều này cần phải được đánh giá xác nhận thích hợp.

VÍ DỤ: 1,3,5-Triazin-2,4,6-triamin- $^{13}\text{C}_3$ (melamin), 1,3,5-Triazin-2,4,6-triol- $^{13}\text{C}_3$, 2,4,6-Trihydroxy-1,3,5-triazin- ^{13}C (axit cyanuric).

¹⁾ Số đăng ký CAS[®] (CAS RN[®]) là nhãn hiệu của sản phẩm do tập đoàn CAS cung cấp. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn này và không ấn định phải sử dụng chúng. Có thể được sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho các kết quả tương đương.

5.1.9 Axit cyanuric ^{13}C , $^{13}\text{C}_3$ (99 %), $^{15}\text{N}_3$ (98 %), dung dịch có nồng độ $\rho = 1\,000\ \mu\text{g/ml}$.

CHÚ THÍCH Có thể sử dụng chất thay thế theo 5.1.8.

5.2 Chuẩn bị dung dịch gốc

5.2.1 Dung dịch gốc melamin, $\rho = 1\,000\ \mu\text{g/ml}$.

Cân khoảng 100 mg melamin (5.1.5), chính xác đến 0,1 mg, cho vào bình thủy tinh dung tích 100 ml (6.2) và thêm một lượng nước để đạt được nồng độ 1 000 $\mu\text{g/ml}$. Bảo quản dung dịch trong tủ lạnh ở 4 °C (± 3 °C). Dung dịch ổn định ở điều kiện này trong thời gian ít nhất 1 năm.

5.2.2 Dung dịch gốc axit cyanuric, $\rho = 1\,000\ \mu\text{g/ml}$.

Cân khoảng 100 mg axit cyanuric (5.1.6), chính xác đến 0,1 mg, cho vào bình thủy tinh dung tích 100 ml (6.2) và thêm một lượng nước để đạt được nồng độ 1 000 $\mu\text{g/ml}$. Bảo quản dung dịch trong tủ lạnh ở 4 °C (± 3 °C). Dung dịch ổn định ở điều kiện này trong thời gian ít nhất 1 năm.

5.2.3 Dung dịch gốc benzoguanamin, $\rho = 1\,000\ \mu\text{g/ml}$.

Cân khoảng 100 mg benzoguanamin (5.1.7), chính xác đến 0,1 mg, cho vào bình thủy tinh dung tích 100 ml (6.2) và thêm một lượng metanol (5.1.4) để đạt được nồng độ 1 000 $\mu\text{g/ml}$. Bảo quản dung dịch trong tủ lạnh ở 4 °C (± 3 °C). Dung dịch ổn định ở điều kiện này trong thời gian ít nhất 1 năm.

5.2.4 Dung dịch gốc melamin ^{13}C , $\rho = 20\ \mu\text{g/ml}$.

Dùng pipet lấy 1,0 ml melamin ^{13}C (5.1.8) cho vào bình định mức dung tích 50 ml (6.3). Thêm nước đến vạch và trộn đều. Nồng độ cuối cùng là 20 $\mu\text{g/ml}$. Chuyển dung dịch vào bình thủy tinh dung tích 100 ml (6.2). Dung dịch ổn định ở điều kiện này trong thời gian ít nhất 1 năm.

5.2.5 Dung dịch gốc axit cyanuric ^{13}C , $\rho = 20\ \mu\text{g/ml}$.

Dùng pipet lấy 1,0 ml axit cyanuric ^{13}C (5.1.9) cho vào bình định mức dung tích 50 ml (6.3). Thêm nước đến vạch và trộn đều. Nồng độ cuối cùng là 20 $\mu\text{g/ml}$. Chuyển dung dịch vào bình thủy tinh dung tích 100 ml (6.2). Dung dịch ổn định ở điều kiện này trong thời gian ít nhất 1 năm.

5.3 Chuẩn bị các dung dịch chuẩn

5.3.1 Dung dịch chuẩn melamin I, $\rho = 20\ \mu\text{g/ml}$.

Dùng pipet lấy 1,0 ml dung dịch gốc melamin (5.2.1) cho vào bình định mức dung tích 50 ml (6.3). Thêm dung dịch pha loãng (5.4.6) đến vạch và trộn đều. Nồng độ của dung dịch thu được là 20 $\mu\text{g/ml}$. Chuyển dung dịch này vào bình thủy tinh dung tích 100 ml (6.2) và bảo quản trong tủ lạnh ở 4 °C (± 3 °C). Dung dịch ổn định ở điều kiện này trong thời gian ít nhất 1 tháng.

5.3.2 Dung dịch chuẩn axit cyanuric I, $\rho = 20 \mu\text{g/ml}$.

Dùng pipet lấy 1,0 ml dung dịch gốc axit cyanuric (5.2.2) cho vào bình định mức dung tích 50 ml (6.3). Thêm dung dịch pha loãng (5.4.6) đến vạch và trộn đều. Nồng độ là 20 $\mu\text{g/ml}$. Chuyển dung dịch vào bình thủy tinh dung tích 100 ml (6.2) và bảo quản trong tủ lạnh ở 4 °C (± 3 °C). Dung dịch ổn định ở điều kiện này trong thời gian ít nhất 1 tháng.

5.3.3 Dung dịch chuẩn melamin II, $\rho = 0,2 \mu\text{g/ml}$.

Dùng pipet lấy 1,0 ml dung dịch chuẩn melamin I (5.3.1) cho vào bình định mức dung tích 100 ml (6.3). Thêm dung dịch pha loãng (5.4.6) đến vạch và trộn đều. Nồng độ là 0,2 $\mu\text{g/ml}$. Chuyển dung dịch vào bình thủy tinh dung tích 100 ml (6.2) và bảo quản trong tủ lạnh ở 4 °C (± 3 °C). Dung dịch ổn định ở điều kiện này trong thời gian ít nhất 1 tháng.

5.3.4 Dung dịch chuẩn axit cyanuric II, $\rho = 0,2 \mu\text{g/ml}$.

Dùng pipet lấy 1,0 ml dung dịch chuẩn axit cyanuric I (5.3.2) cho vào bình định mức dung tích 100 ml (6.3). Thêm dung dịch pha loãng (5.4.6) đến vạch và trộn đều. Nồng độ là 0,2 $\mu\text{g/ml}$. Chuyển dung dịch vào bình thủy tinh dung tích 100 ml (6.2) và bảo quản trong tủ lạnh ở 4 °C (± 3 °C). Dung dịch ổn định ở điều kiện này trong thời gian ít nhất 1 tháng.

5.3.5 Dung dịch chuẩn benzoguanamin I, $\rho = 20 \mu\text{g/ml}$.

Dùng pipet lấy 1,0 ml dung dịch gốc benzoguanamin (5.2.3) cho vào bình định mức dung tích 50 ml (6.3). Thêm dung dịch pha loãng (5.4.6) đến vạch và trộn đều. Nồng độ là 20 $\mu\text{g/ml}$. Chuyển dung dịch vào bình thủy tinh dung tích 100 ml (6.2) và bảo quản trong tủ lạnh ở 4 °C (± 3 °C). Dung dịch ổn định ở điều kiện này trong thời gian ít nhất 1 tháng.

5.3.6 Dung dịch chuẩn benzoguanamin II, $\rho = 2 \mu\text{g/ml}$.

Dùng pipet lấy 1,0 ml dung dịch chuẩn benzoguanamin I (5.3.5) cho vào bình định mức dung tích 10 ml (6.3). Thêm dung dịch pha loãng (5.4.6) đến vạch và trộn đều. Nồng độ là 2 $\mu\text{g/ml}$. Chuyển dung dịch vào bình thủy tinh dung tích 20 ml (6.2) và bảo quản trong tủ lạnh ở 4 °C (± 3 °C). Dung dịch ổn định ở điều kiện này trong thời gian ít nhất 1 tháng.

5.3.7 Dung dịch chuẩn melamin ^{13}C và axit cyanuric ^{13}C , $\rho = 2 \mu\text{g/ml}$.

Dùng pipet lấy 0,5 ml dung dịch gốc melamin ^{13}C (5.2.4) và 0,5 ml dung dịch gốc axit cyanuric ^{13}C (5.2.5) cho vào bình định mức dung tích 5 ml (6.3). Thêm nước đến vạch và trộn đều. Nồng độ của cả hai hợp chất này là 2 $\mu\text{g/ml}$. Chuyển dung dịch vào bình thủy tinh dung tích 20 ml (6.2) và bảo quản trong tủ lạnh ở 4 °C (± 3 °C). Dung dịch ổn định ở điều kiện này trong thời gian ít nhất 1 tháng nếu khối lượng được theo dõi cẩn thận.

5.4 Chuẩn bị dung dịch hiệu chuẩn

5.4.1 Dùng pipet lấy các thể tích nêu trong Bảng 1 cho vào bình định mức dung tích 10 ml (6.3) và thêm dung dịch pha loãng (5.4.6) đến vạch.

Bảng 1 – Chuẩn bị các dung dịch hiệu chuẩn

Dung dịch hiệu chuẩn	Số dung dịch hiệu chuẩn						
	1	2	3	4	5	6	7
Dung dịch chuẩn melamin I (5.3.1), tính bằng mililit (ml)	0	0	0	0	0	0,05	0,25
Dung dịch chuẩn axit cyanuric I (5.3.2), tính bằng mililit (ml)	0	0	0	0	0	0,05	0,25
Dung dịch chuẩn melamin II (5.3.3), tính bằng mililit (ml)	0	0,05	0,25	1,25	2,5	0	0
Dung dịch chuẩn axit cyanuric II (5.3.4), tính bằng mililit (ml)	0	0,05	0,25	1,25	2,5	0	0
Dung dịch chuẩn benzoguanamin II (5.3.6), tính bằng mililit (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Dung dịch chuẩn melamin ¹³ C và axit cyanuric ¹³ C (5.3.7), tính bằng mililit (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Nồng độ ¹³ C melamin – ¹³ C axit cyanuric, tính bằng miligam trên mililit (µg/ml)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Nồng độ melamin tự nhiên – axit cyanuric, tính bằng miligam trên mililit (µg/ml)	0	0,001	0,005	0,025	0,05	0,1	0,5

5.4.2 Pha động A dùng cho HPLC, nồng độ chất c(amoni axetat) = 10 mmol/L.

Hòa tan 0,77 g amoni axetat (5.1.3) trong 1 000 ml nước.

5.4.3 Pha động B dùng cho HPLC

Axetonitril (5.1.2).

5.4.4 Pha động A dùng cho UHPLC

Trộn 3 phần thể tích axit formic (5.1.1) với 97 phần thể tích nước.

5.4.5 Pha động B dùng cho UHPLC, c(amoni axetat) = 20 mmol/L trong hỗn hợp gồm 3 phần thể tích nước và 97 phần thể tích axetonitril.

Hòa tan 1,54 g amoni axetat (5.1.3) trong 30 ml nước. Thêm 970 ml axetonitril (5.1.2) vào hỗn hợp và lắc mạnh. Hỗn hợp đục để qua đêm sẽ trong.

TCVN 13804:2023

Sự lựa chọn tối ưu cho pha động A và B có thể phụ thuộc vào cấu hình thiết bị (xem 6.10 đến 6.12), đặc biệt là loại cột được sử dụng. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho các kết quả tương đương.

5.4.6 Dung dịch pha loãng

Dùng ống đong chuyển 70 ml axetonitril (5.1.2) và 30 ml nước vào bình định mức dung tích 100 ml (6.3) và lắc đều. Bảo quản ở nhiệt độ phòng không quá 1 tháng.

6 Thiết bị, dụng cụ

Tất cả các mô tả kỹ thuật là các ví dụ về các thông số và thiết lập hệ thống có thể có của các thiết bị được sử dụng.

Sử dụng thiết bị và dụng cụ thủy tinh thông thường của phòng thử nghiệm và cụ thể như sau.

6.1 Ống polypropylen cacbonat dùng một lần, dung tích khoảng 50 ml.

6.2 Bình thủy tinh, dung tích 20 ml và 100 ml.

6.3 Bình định mức một vạch, dung tích 5 ml, 10 ml, 50 ml và 100 ml.

6.4 Máy lắc, có thể điều chỉnh từ 0 lần/min đến 300 lần/min.

6.5 Bể siêu âm.

6.6 Máy ly tâm, có khả năng ly tâm các ống 50 ml (6.1) và lực ly tâm tối đa đạt ít nhất là 4 000 g.

6.7 Máy ly tâm, có khả năng ly tâm các ống thử micro chuẩn (6.8), được làm lạnh và lực ly tâm tối đa đạt ít nhất là 6 000 g.

6.8 Ống thử micro chuẩn, dung tích 1,5 ml.

6.9 Lọ nhỏ (vial), dùng cho LC.

6.10 Máy sắc ký lỏng khối phổ ba tứ cực bao gồm:

a) **hệ thống bơm**, có khả năng cung cấp gradient ở lưu lượng yêu cầu;

b) **kim phun**, có khả năng bơm 5 μ l.

6.11 Cột HILIC TSKgel® Amide-80²⁾, chiều dài 100 mm, đường kính trong 3,0 mm và kích thước hạt 3 μ m.

²⁾ TSKgel là nhãn hiệu sản phẩm được cung cấp bởi Tosoh Corporation. Thông tin đưa ra để tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn này và không ấn định phải sử dụng chúng. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho kết quả tương đương.

6.12 Cột HILIC UHPLC BEH™ (cầu nối etyl hỗn hợp)³⁾, chiều dài 150 mm, đường kính trong 2,1 mm và cỡ hạt 1,7 µm.

6.13 Nitơ lỏng

6.14 Máy nghiền, có khả năng nghiền đến cỡ hạt cuối cùng < 300 µm.

7 Cách tiến hành

7.1 Chuẩn bị mẫu

Làm ấm tất cả các sản phẩm dạng lỏng có nguồn gốc từ sữa, ví dụ: sữa nguyên chất, sữa tách kem, sữa tươi nguyên chất và socola sữa, đến nhiệt độ 40 °C và lắc nhẹ.

Nếu cần, nghiền tất cả các sản phẩm dạng khô làm từ sữa, đậu nành hoặc lúa mì, ví dụ: sữa bột, thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh và bánh quy, cỡ hạt < 1 mm.

Nghiền tất cả các sản phẩm có nguồn gốc từ sữa hoặc từ ca cao, ví dụ: socola, kẹo ngọt (kẹo bơ cứng), sử dụng phương pháp đông lạnh, ví dụ, nitơ lỏng sau khi cắt thành các khối nhỏ ≤ 1 cm.

7.2 Chiết

7.2.1 Yêu cầu chung

Phân tích các mẫu theo dãy thứ tự sau:

- dung dịch hiệu chuẩn;
- mẫu trắng kiểm soát quy trình ($n = 1$);
- chất chuẩn (đã được chứng nhận) ở cấp độ thích hợp hoặc mẫu chuẩn tự chuẩn bị;
- tất cả các mẫu;
- số dung dịch hiệu chuẩn 3, 4 hoặc 5 (xem Bảng 1).

Mẫu trắng không được có tạp chất bằng hoặc cao hơn giới hạn định lượng. Có thể sử dụng nền mẫu được phân tích trước đó cho thấy không có axit cyanuric (CYA) và melamin (MEL) trong mẫu trên LOQ. Lượng mẫu được dùng để chiết là 1 g mẫu trắng. Sai lệch khối lượng mẫu phải được tính đến trong Công thức (5) (m = khối lượng mẫu tính bằng gam).

Sử dụng đường chuẩn để định tính và định lượng. Dung dịch hiệu chuẩn 3, 4 hoặc 5 sau các dãy được

³⁾ BEH là nhãn hiệu của một sản phẩm do Waters Corporation cung cấp. Thông tin này đưa ra để thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn này và không ấn định phải sử dụng chúng. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho kết quả tương đương.

TCVN 13804:2023

sử dụng để kiểm soát độ ổn định. Diện tích melamin và axit cyanuric thu được bằng chất chuẩn này phải bằng diện tích thu được với cùng chất chuẩn trong đường chuẩn với độ lệch tối đa 10 %.

7.2.2 Quy trình chiết

Cân 1 g mẫu, chính xác đến 0,01 g, cho vào ống nghiệm dùng một lần (6.1). Thêm 250 µl dung dịch gốc melamin ¹³C (5.2.4) và 250 µl dung dịch gốc axit cyanuric ¹³C (5.2.5). Ủ ít nhất 1 h ở nhiệt độ môi trường. Thêm 5 ml nước nóng (96 °C đến 100 °C) và lắc bằng tay trong 30 s để thu được hỗn hợp huyền phù. Thêm 5 ml axetonitril (5.1.2) và lắc lại. Trộn hỗn hợp huyền phù với 30 ml axetonitril (5.1.2) và 10 ml nước. Lắc kỹ trong 5 min và ly tâm 10 min ở 3 400 g. Chuyển 1,5 ml dịch chiết vào ống thử micro chuẩn (6.8) và ly tâm 10 min ở 7 800 g. Chuyển 1 000 µl lớp phía trên vào lọ LC (6.9) và thêm 50 µl dung dịch chuẩn benzoguanamin II (5.3.6). Cho phép có những thay đổi nhỏ đối với điều kiện có thể chứng minh sẽ cho kết quả tương đương.

CHÚ THÍCH Phức chất melamin-axit cyanuric có thể giữ nguyên trong quá trình chiết, nhưng chúng phân ly do axit formic trong dung dịch rửa giải.

7.3 Xác định

Bơm 5 µl dung dịch hiệu chuẩn (1 đến 7, xem Bảng 1) và 5 µl dịch chiết mẫu. Xác định các pic melamin và axit cyanuric dựa vào thời gian lưu, quá trình chuyển khối và tỷ lệ ion. Xác định lượng melamin và axit cyanuric bằng cách so sánh diện tích của pic mẫu với diện tích của pic melamin và axit cyanuric tương ứng đã biết trong dung dịch hiệu chuẩn. Thực hiện hiệu chuẩn dựa trên nguyên tắc pha loãng đồng vị.

8 Cài đặt hệ thống

8.1 Thông số HPLC

Các thông số gradient nêu trong Bảng 2 đã cho thấy thu được kết quả tốt. Tùy thuộc vào hệ thống LC MS/MS, các thông số có thể cần được điều chỉnh. Ngoài ra, có thể sử dụng hệ thống UHPLC, xem 8.3.

Bảng 2 – Các thông số gradient HPLC

Số dung dịch hiệu chuẩn	Thời gian min	Tốc độ dòng ml/min	Pha động A %	Pha động B %
1	Bắt đầu	0,25	10	90
2	8,00	0,25	10	90
3	13,00	0,25	65	35
4	14,00	0,25	90	10
5	15,00	0,25	90	10
6	15,50	0,25	10	90
7	25,00	0,125	10	90

8.2 Thông số HPLC-MS/MS

Trong quá trình đánh giá xác nhận phương pháp, máy đo quang phổ loại Micromass^{TM 4)} Quattro Ultima đã được sử dụng và đề cập đến các cài đặt thiết bị được liệt kê trong Bảng 3. Cũng có thể sử dụng các thiết bị khác từ một số nhà cung cấp khác. Thông tin thêm được nêu trong Tài liệu tham khảo [2]. Máy đo quang phổ vận hành ở chế độ luân phiên cho các ion dương và âm trong ba cửa sổ khác nhau. Cửa sổ 1 dành cho các ion dương (benzoguanamin), cửa sổ 2 dành cho các ion âm (axit cyanuric) và cửa sổ 3 dành cho các ion dương (melamin). Cửa sổ xác định thời gian lưu được xác định trước mỗi dãy bằng cách phân tích dung dịch hiệu chuẩn của melamin và axit cyanuric, trước tiên ở chế độ dương và sau đó ở chế độ âm trong khoảng thời gian của gradient LC.

Việc tối ưu hóa các thông số chuyển khối MS có thể khác nhau tùy thuộc vào các đặc tính của khối phổ ba tứ cực. Các thông số được xác định bằng cách khuếch tán melamin, axit cyanuric và tối ưu hóa năng lượng cone và năng lượng va chạm cho quá trình chuyển khối.

Bảng 3 – Nguồn và các thông số phân tích đối với MS/MS

Nguồn	(ES-)	(ES+)
Mao quản (kV)	3,00	2,70
Năng lượng điện thế cone (V)	25	35
Nhiệt độ nguồn (°C)	120	120
Nhiệt độ khử solvat (°C)	350	350
Tốc độ dòng khí cone (L/h)	190 đến 193	190 đến 193
Tốc độ dòng khí khử solvat (L/h)	560 đến 565	560 đến 565
Áp suất buồng va chạm (Pa)	Khoảng 0,26	Khoảng 0,26
Máy phân tích		
Độ phân giải 1 khối lượng thấp (LM)	12,5	14,0
Độ phân giải 1 khối lượng cao (LM)	12,5	14,
Năng lượng ion 1 (V)	1,0	1,0
Độ phân giải LM 2	12,5	13,0
Độ phân giải HM 2	12,5	13,0
Năng lượng ion 2 (V)	1,0	1,0
Hệ số nhân (V)	650	650

Các thông số nêu trong Bảng 4 và Bảng 5 cho thấy thu được kết quả tốt. Tùy thuộc vào hệ thống HPLC-MS/MS, các thông số có thể cần được điều chỉnh. Ngoài ra, có thể sử dụng hệ thống UHPLC, xem 8.3.

⁴⁾ Micromass là nhãn hiệu của sản phẩm do Waters Corporation cung cấp. Thông tin này được cung cấp để tạo sự thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn này và không ấn định phải sử dụng chúng. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho kết quả tương đương.

Bảng 4 – Các thông số MRM cho MS/MS

Chất phân tích	Chuyển khối	Chế độ ion hóa	Thời gian dừng s	Thời gian trì hoãn giữa các kênh s	Thời gian quét liên tục s	Nặng lượng điện thế cone V	Năng lượng va chạm eV
BENZ	188 > 85	ES+	0,2	0,01	0,1	35	20
	188 > 104		0,2	0,01	0,1	35	25
CYA	128 > 85	ES-	0,2	0,01	0,1	25	10
	128 > 42		0,2	0,01	0,1	25	15
¹³ C CYA	134 > 89	ES-	0,2	0,01	0,1	25	10
	134 > 44		0,2	0,01	0,1	25	15
MEL	127 > 85	ES+	0,2	0,01	0,1	35	20
	127 > 68		0,2	0,01	0,1	35	30
¹³ C MEL	133 > 89	ES+	0,2	0,01	0,1	35	20
	133 > 71		0,2	0,01	0,1	35	30
CHÚ DẪN ¹³ C CYA IS: ¹³ C axit cyanuric ¹³ C MEL TS: ¹³ C melamin BENZ: benzoguanamin							

Bảng 5 – Các thông số HPLC

Thể tích bơm (μl)	5
Nhiệt độ cột (°C)	40
Bắt đầu trì hoãn dung môi 1 (min)	0
Kết thúc trì hoãn dung môi 1 (min)	1,5
Bắt đầu trì hoãn dung môi 2 (min)	15
Kết thúc trì hoãn dung môi 2 (min)	23
Thời gian MRM ES- (min)	từ 4 đến 8,5
Thời gian MRM ES+ (min)	từ 1,5 đến 4, từ 8,5 đến 15
Pha động A	nước với amoni axetat 10 mmol/L (5.4.2)
Pha động B	acetonitrile (5.4.3)
Cột	Cột HILIC TSKgel® Amide-80 (6.11)

8.3 Các thông số UHPLC

Các thông số gradient nêu trong Bảng 6 cho thấy thu được kết quả tốt. Tùy thuộc vào hệ thống UHPLC-MS/MS, các thông số có thể được điều chỉnh. Ngoài ra, có thể sử dụng hệ thống HPLC, xem 8.1.

Bảng 6 – Các thông số gradient UHPLC (tỷ lệ phân dòng 1: 1)

Số dung dịch hiệu chuẩn	Thời gian min	Tốc độ dòng ml/min	Pha động A %	Pha động B %
1	Bắt đầu	0,7	10	90
2	1,00	0,7	10	90
3	3,20	0,7	6,0	94
4	3,50	0,7	50	50
5	5,00	0,7	50	50
6	5,20	0,7	0	100
7	9,00	0,7	0	100

8.4 Thông số UHPLC-MS/MS

Trong quá trình đánh giá xác nhận phương pháp, máy đo quang phổ thuộc loại Micromass™⁴⁾ Quattro Ultima đã được sử dụng và đề cập đến các cài đặt thiết bị được liệt kê trong Bảng 7. Máy đo khối phổ được vận hành ở chế độ luân phiên cho các ion dương và âm trong hai cửa sổ khác nhau. Cửa sổ 1 dành cho các ion âm (axit cyanuric) và cửa sổ 2 dành cho các ion dương (melamin và benzoguanamin). Cửa sổ xác định thời gian lưu được xác định trước từng dãy bằng cách phân tích dung dịch hiệu chuẩn của melamin và axit cyanuric, trước tiên ở chế độ dương và sau đó ở chế độ âm đối với thời gian gradient.

Bảng 7 – Nguồn và các thông số phân tích cho MS/MS

Nguồn	(ES-)	(ES+)
Mao quản (kV)	3,00	2,70
Năng lượng điện thế cone (V)	30	35
Nhiệt độ nguồn (°C)	120	120
Nhiệt độ khử solvat (°C)	350	350
Tốc độ dòng khí Cone (L/h)	từ 190 đến 193	từ 190 đến 193
Tốc độ dòng khí khử solvat (L/h)	từ 560 đến 565	từ 560 đến 565
Áp suất buồng va chạm (Pa)	Khoảng 0,26	Khoảng 0,26
Máy phân tích		
Độ phân giải 1 khối lượng thấp (LM)	12,5	15,0
Độ phân giải 1 khối lượng cao (LM)	12,5	15,0
Năng lượng ion 1 (V)	1,0	1,0
Độ phân giải LM 2	12,5	15,0
Độ phân giải HM 2	12,5	15,0
Năng lượng ion 2 (V)	1,0	1,0
Hệ số nhân (V)	650	650

Các thông số được đưa ra trong Bảng 8 và Bảng 9 đã cho thấy thu được kết quả tốt.

Bảng 8 – Các thông số MRM cho MS/MS

Chất phân tích	Chuyển khối	Chế độ ion hóa	Thời gian dừng s	Thời gian trì hoãn giữa các kênh s	Thời gian quét liên tục s	Năng lượng điện thế cone V	Năng lượng va chạm eV
CYA	128 > 85	ES-	0,05	0,01	0,03	25	10
	128 > 42		0,05	0,01	0,03	25	15
¹³ C CYA IS	134 > 89	ES-	0,05	0,01	0,03	25	10
	134 > 44		0,05	0,01	0,03	25	15
MEL	127 > 85	ES+	0,05	0,01	0,03	35	20
	127 > 68		0,05	0,01	0,03	35	30
¹³ C MEL IS	133 > 89	ES+	0,05	0,01	0,03	35	20
	133 > 71		0,05	0,01	0,03	35	30
BENZ IS	188 > 85	ES+	0,2	0,01	0,03	35	20
	188 > 104		0,2	0,01	0,03	35	25
CHÚ DẪN ¹³ C CYA IS: ¹³ C axit cyanuric ¹³ C MEL IS: ¹³ C melamin BENZ: benzoguanamin							

Bảng 9 – Các thông số UHPLC

Thể tích bơm (μl)	5
Nhiệt độ cột CC)	40
Thời gian MRM ES- (min)	từ 0 đến 2
Thời gian MRM ES+ (min)	từ 2 đến 10
Pha động A	hỗn hợp nước và axit formic (5.4.4)
Pha động B	hỗn hợp axetonitril và nước với amoni axetat (5.4.5)
Cột	Cột HILIC UHPLC ® BEH™ (6.12)

8.5 Chuẩn bị hệ thống LC-MS/MS và các mẫu

8.5.1 Điều chỉnh hệ thống LC-MS/MS

Hai tuần một lần kiểm tra LC-MS/MS để hiệu chuẩn khối lượng chính xác theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Chỉ hiệu chỉnh hệ thống khi quan sát thấy có sự khác biệt giữa khối lượng đo được so với khối lượng lý thuyết.

8.5.2 Kiểm tra cài đặt thiết bị

Bơm 5 μl dung dịch có nồng độ trung bình và kiểm tra hình dạng pic và thời gian lưu của melamin và

axit cyanuric.

8.5.3 Kiểm tra độ nhạy của hệ thống

Bơm 5 μ l dung dịch có nồng độ thấp nhất. Tỷ lệ tín hiệu trên nhiễu của melamin của chuyển khối 127 > 85 và của axit cyanuric của chuyển khối 128 > 85 phải ít nhất là 9. Nếu không, cần thực hiện hành động thích hợp, ví dụ, bằng cách làm sạch cone hoặc bằng cách thay cột phân tích (hình dạng pic không rõ ràng).

8.5.4 Danh mục mẫu

Phân tích các mẫu theo dãy thứ tự sau:

- dung dịch hiệu chuẩn;
- mẫu trắng kiểm soát quy trình ($n = 1$);
- chất chuẩn (đã được chứng nhận) ở cấp độ thích hợp hoặc mẫu chuẩn tự chuẩn bị;
- tất cả các mẫu;
- số dung dịch hiệu chuẩn 3, 4 hoặc 5 (xem Bảng 1).

9 Tính và biểu thị kết quả

9.1 Yêu cầu chung

Việc tính các kết quả thường được thực hiện trong phần mềm định lượng, thường được cung cấp cùng với thiết bị LC-MS/MS. Để thực hiện phép tính chính xác, một vài yếu tố về dữ liệu cần được đánh giá, được liệt kê dưới đây.

- Các phép tính (9.2 đến 9.4) sẽ dựa trên diện tích pic (không phải chiều cao pic).
- Thời gian lưu của tất cả các hợp chất cần tìm được kiểm tra so với thời gian lưu được thiết lập trước trong phương pháp xử lý dữ liệu. Nếu cần, thời gian lưu được điều chỉnh theo phương pháp xử lý dữ liệu để cho phép tự động nhận diện các hợp chất và xử lý dữ liệu. Sau khi xử lý dữ liệu, mọi kết quả thường được kiểm tra thủ công để tích phân chính xác. Thời gian lưu sẽ được đánh giá theo các tiêu chí trong 9.3.
- Hệ số biến thiên của đáp ứng tương đối đối với melamin và axit cyanuric phải nhỏ hơn 5 % trên dải hiệu chuẩn. Hệ số đáp ứng tương đối trung bình phải được sử dụng cho từng hợp chất.
- Hệ số biến thiên đối với ^{13}C MEL IS và ^{13}C CYA IS phải nhỏ hơn 30 %.

9.2 Tiêu chí hiệu chuẩn

Sử dụng ít nhất một đường chuẩn năm điểm và tính hệ số tương đối r^2 . Đường chuẩn không cần phải đi qua gốc tọa độ.

Kết quả mẫu phải nằm trong dải nồng độ hiệu chuẩn. Khi kết quả nằm ngoài dải nồng độ hiệu chuẩn, thì mẫu phải được pha loãng thích hợp và phân tích lại cho đến khi nằm trong dải.

9.3 Tiêu chí nhận dạng

Melamin và axit cyanuric được nhận dạng dựa trên thời gian lưu, sự chuyển khối và tỷ lệ chuyển khối. Các cường độ tương đối của chuyển khối được phát hiện (dựa trên diện tích pic), biểu thị bằng phần trăm cường độ chuyển khối mạnh nhất, phải tương ứng với cường độ của dung dịch hiệu chuẩn, đo được trong cùng điều kiện nằm trong các dung sai (xem Tài liệu tham khảo [1]), nêu trong Bảng 10.

Bảng 10 – Dung sai tương đối

Cường độ tương đối % pic nền	Dung sai tương đối
> 50 %	± 20 %
> 20 % đến 50 %	± 25 %
> 10 % đến 20 %	± 30 %
< 10 %	± 50 %

Đối với mỗi mẫu, tỷ lệ thời gian lưu của melamin và axit cyanuric so với thời gian lưu của chất tương tự ^{13}C phải tương ứng với tỷ lệ thời gian lưu của melamin và axit cyanuric trong dung dịch hiệu chuẩn ở dung sai ± 2,0 %.

9.4 Độ thu hồi

Chỉ cần kiểm tra độ thu hồi đối với tính năng của phương pháp. Độ thu hồi chỉ để cung cấp thông tin và các hệ số thu hồi này không được áp dụng để hiệu chỉnh các kết quả.

Độ thu hồi được ước tính từ tỷ lệ của hệ số đáp ứng tương đối của chất chuẩn nội được dán nhãn đồng vị ổn định (^{13}C MEL IS và ^{13}C CYA IS).

Tính độ thu hồi, R_{rec} , tính bằng %, đối với chất nội chuẩn được sử dụng (^{13}C MEL IS) bằng Công thức (1) và (2):

$$R_{rec} = \frac{F_{rmsa}}{F_{rmst}} \times 100 \quad (1)$$

$$F_{rm} = \frac{A_{ism} \times \rho_{rs}}{A_{rs} \times \rho_{ism}} \quad (2)$$

Trong đó:

F_{msa} là hệ số đáp ứng tương đối (F_m) của chất chuẩn nội được dán nhãn khối lượng trong mẫu;

F_{mst} là hệ số đáp ứng tương đối (F_m) của chất chuẩn nội được dán nhãn khối lượng trong dung dịch hiệu chuẩn;

A_{ism} là diện tích của ion ^{13}C MEL IS mạnh nhất có trong mẫu;

A_{rs} là diện tích của ion BENZ mạnh nhất có trong mẫu;

ρ_{ism} là nồng độ khối lượng của ^{13}C MEL IS, tính bằng $\mu\text{g/ml}$;

ρ_{rs} là nồng độ khối lượng của BENZ, tính bằng $\mu\text{g/ml}$.

Dữ liệu được thu thập có thể dùng để kiểm tra một dãy các giá trị độ thu hồi.

a) Việc giảm hoặc tăng chất nền có thể tính được từ diện tích đối với BENZ trong dịch chiết mẫu so với diện tích BENZ trung bình của các mức hiệu chuẩn. Việc giảm hoặc tăng thêm chất nền phải nằm trong khoảng 60 % đến 150 %.

b) Phần trăm độ thu hồi của chất chuẩn nội ^{13}C MEL IS trong mẫu có thể được tính như sau. Trước tiên, tính diện tích tương đối của ^{13}C MEL IS bằng cách xác định tỷ lệ giữa diện tích ^{13}C MEL IS và ^{13}C BENZ IS của mẫu phân tích. Sau đó, tính toán tỷ lệ cho ^{13}C MEL IS và BENZ IS trong dung dịch hiệu chuẩn. Cuối cùng, chia tỷ lệ ^{13}C MEL IS/BENZ IS đã tính được trong mẫu cho tỷ lệ ^{13}C MEL IS/BENZ IS trong dung dịch hiệu chuẩn và nhân với 100 %.

CHÚ THÍCH Trong các trường hợp đặc biệt, ví dụ, nếu có chất gây nhiễu từ lớp lót hộp có trong mẫu, thì BENZ không phải là chất chuẩn nội phù hợp để thu hồi và có thể dẫn đến đánh giá thấp khả năng thu hồi. Có thể sử dụng chất chuẩn nội triazin thay thế, chẳng hạn như acetoguanamin, sau khi được thử nghiệm về khả năng áp dụng.

Đánh giá độ thu hồi đối với ^{13}C CYA IS theo cùng một quy trình tương tự như mô tả ở trên.

Có thể xác định được độ đúng bằng cách phân tích mẫu chuẩn (đã được chứng nhận) ở mức thích hợp hoặc mẫu chuẩn tự chuẩn bị (xem 7.2.1). Ngoài ra, độ đúng có thể được xác định bằng cách so sánh kết quả tính được cho MEL và CYA trong mẫu trắng thêm chuẩn với giá trị lý thuyết (lượng thêm chuẩn), được biểu thị bằng phần trăm. Độ đúng trong khoảng từ 80 % đến 110 %.

9.5 Tính kết quả

Tính hệ số đáp ứng tương đối, F_m , đối với các hợp chất sẵn có trong mẫu từ đường chuẩn, sử dụng Công thức (3):

$$F_{rn} = \frac{A_{xmc} \times \rho_{ismc}}{\rho_x \times A_{ismc}} \quad (3)$$

Trong đó:

TCVN 13804:2023

A_{xmc} là diện tích của melamin và axit cyanuric;

A_{ismc} là diện tích của ^{13}C melamin và ^{13}C axit cyanuric;

ρ_{ismc} là nồng độ khối lượng của ^{13}C melamin và ^{13}C axit cyanuric, tính bằng $\mu\text{g/ml}$;

ρ_x là nồng độ khối lượng của hợp chất sẵn có trong mẫu, tính bằng $\mu\text{g/ml}$.

Do đó, tính hệ số đáp ứng tương đối trung bình, $\overline{F_{rn}}$, sử dụng Công thức (4):

$$\overline{F_{rn}} = \frac{1}{a} \times \sum_{i=1}^a F_{rn} i(b) \quad (4)$$

Trong đó:

a là số lượng chất chuẩn (mức nồng độ);

b là hợp chất sẵn có trong mẫu;

i là mức hiệu chuẩn.

Tính phần khối lượng, w_x , của hợp chất cần phân tích, sử dụng Công thức (5):

$$w_x = \frac{A_x \times \rho_{is}}{A_{is} \times F \times F_m} \quad (5)$$

Trong đó:

w_x là phần khối lượng của melamin và axit cyanuric, tính bằng mg/kg ;

A_x là diện tích của melamin và axit cyanuric trong dịch chiết mẫu;

A_{is} là diện tích của ^{13}C melamin và ^{13}C axit cyanuric trong dịch chiết mẫu;

ρ_{is} là nồng độ khối lượng của chất nội chuẩn dán nhãn đã được bơm, tính bằng $\mu\text{g/ml}$;

F là hệ số tính toán từ nồng độ (tính bằng $\mu\text{g/ml}$) đến hàm lượng trên nền mẫu (tính bằng mg/kg)
 $= m/v$, trong đó v = thể tích cuối cùng, tính bằng ml và m = phần mẫu thử, tính bằng g .

10 Dữ liệu về độ chụm

10.1 Yêu cầu chung

Chi tiết về phép thử liên phòng thử nghiệm về độ chụm của phương pháp được nêu trong Phụ lục A. Các giá trị thu được từ phép thử liên phòng thử nghiệm có thể không áp dụng được cho các dải nồng độ chất phân tích và/hoặc chất nền khác so với dải nồng độ chất phân tích và/hoặc chất nền đã cho trong Phụ lục A.

10.2 Độ lặp lại

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử độc lập, đơn lẻ, thu được trên vật liệu thử giống hệt nhau, do cùng một người thao tác, sử dụng cùng một thiết bị, trong một khoảng thời gian ngắn, không quá 5 % các trường hợp vượt quá giá trị r như sau:

Các giá trị đối với melamin là:

$\bar{x} = 1,26$ mg/kg	$r = 0,183$ mg/kg	(sữa công thức dành cho trẻ sơ sinh)
$\bar{x} = 0,73$ mg/kg	$r = 0,367$ mg/kg	(thức ăn công thức từ đậu nành dành cho trẻ sơ sinh)
$\bar{x} = 1,04$ mg/kg	$r = 0,136$ mg/kg	(sữa bột)
$\bar{x} = 1,43$ mg/kg	$r = 0,126$ mg/kg	(sữa nguyên chất)
$\bar{x} = 1,06$ mg/kg	$r = 0,435$ mg/kg	(đồ uống từ đậu nành)
$\bar{x} = 0,71$ mg/kg	$r = 0,354$ mg/kg	(socola sữa)

Các giá trị của axit cyanuric là:

$\bar{x} = 0,83$ mg/kg	$r = 0,175$ mg/kg	(sữa công thức dành cho trẻ sơ sinh)
$\bar{x} = 0,87$ mg/kg	$r = 0,292$ mg/kg	(thức ăn công thức từ đậu nành dành cho trẻ sơ sinh)
$\bar{x} = 1,45$ mg/kg	$r = 0,375$ mg/kg	(sữa bột)
$\bar{x} = 0,57$ mg/kg	$r = 0,104$ mg/kg	(sữa nguyên chất)
$\bar{x} = 0,91$ mg/kg	$r = 0,365$ mg/kg	(đồ uống từ đậu nành)
$\bar{x} = 0,96$ mg/kg	$r = 0,365$ mg/kg	(socola sữa)

10.3 Độ tái lập

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử đơn lẻ, thu được trên vật liệu thử giống hệt nhau, được báo cáo bởi hai phòng thử nghiệm, không quá 5 % các trường hợp vượt quá giá trị R như sau:

Các giá trị của melamin là:

$\bar{x} = 1,26$ mg/kg	$R = 0,680$ mg/kg	(sữa công thức dành cho trẻ sơ sinh)
$\bar{x} = 0,73$ mg/kg	$R = 0,626$ mg/kg	(thức ăn công thức từ đậu nành dành cho trẻ sơ sinh)
$\bar{x} = 1,04$ mg/kg	$R = 0,647$ mg/kg	(sữa bột)
$\bar{x} = 1,43$ mg/kg	$R = 0,453$ mg/kg	(sữa nguyên chất)
$\bar{x} = 1,06$ mg/kg	$R = 0,657$ mg/kg	(đồ uống từ đậu nành)
$\bar{x} = 0,71$ mg/kg	$R = 0,609$ mg/kg	(socola sữa)

TCVN 13804:2023

Các giá trị của axit cyanuric là:

$\bar{x} = 0,83$ mg/kg	$R = 0,402$ mg/kg	(sữa công thức dành cho trẻ sơ sinh)
$\bar{x} = 0,87$ mg/kg	$R = 0,450$ mg/kg	(thức ăn công thức từ đậu nành dành cho trẻ sơ sinh)
$\bar{x} = 1,45$ mg/kg	$R = 0,375$ mg/kg	(sữa bột)
$\bar{x} = 0,57$ mg/kg	$R = 0,214$ mg/kg	(sữa nguyên chất)
$\bar{x} = 0,91$ mg/kg	$R = 0,608$ mg/kg	(đồ uống từ đậu nành)
$\bar{x} = 0,96$ mg/kg	$R = 0,365$ mg/kg	(socola sữa)

11 Báo cáo thử nghiệm

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

- mọi thông tin cần thiết để nhận biết mẫu thử (loại mẫu, nguồn gốc và ký hiệu của mẫu);
- viện dẫn tiêu chuẩn này;
- ngày và quy trình lấy mẫu (nếu biết);
- ngày nhận mẫu;
- ngày thử nghiệm;
- các kết quả thử nghiệm và đơn vị được biểu thị;
- mọi điều kiện thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này hoặc được xem là tùy chọn có thể ảnh hưởng đến kết quả.

Phụ lục A
(tham khảo)

Dữ liệu về độ chụm

Dữ liệu đưa ra trong Bảng A.1 và A.2 thu được trong nghiên cứu liên phòng thí nghiệm^[2] do RIKILT Wageningen UR tổ chức theo TCVN 6910-2 (ISO 5725-2)^[3] cho các quy trình nghiên cứu cộng tác nhằm đánh giá xác nhận các đặc tính của phương pháp phân tích.

Bảng A.1 - Dữ liệu độ chụm đối với melamin trong sữa công thức dành cho trẻ sơ sinh, thức ăn công thức từ đậu nành dành cho trẻ sơ sinh, sữa bột, sữa nguyên chất, đồ uống từ đậu nành và socola sữa

Mẫu	Sữa công thức dành cho trẻ sơ sinh	Thức ăn công thức từ đậu nành dành cho trẻ sơ sinh	Sữa bột	Sữa nguyên chất	Đồ uống từ đậu nành	Socola sữa
Năm thử nghiệm liên phòng	2014	2014	2014	2014	2014	2014
Số phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	9	9	9	9	9	9
Số ngoại lệ (phòng thử nghiệm)	0	0	0	0	0	0
Số lượng kết quả được chấp nhận	9	9	9	9	9	9
Giá trị trung bình, \bar{x} tính bằng mg/kg	1,26	0,73	1,04	1,43	1,06	0,71
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r , tính bằng mg/kg	0,126 8	0,169 1	0,067 4	0,043 1	0,146 5	0,119 5
Hệ số biến thiên lặp lại, $C_{v,r}$ tính bằng %	10,1	23,1	6,51	3,00	13,9	16,9
Giới hạn lặp lại, r [$r = 2,8 \times s_r$], tính bằng mg/kg	0,183	0,367	0,136	0,126	0,435	0,354
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R , tính bằng mg/kg	0,242 8	0,223 7	0,231 2	0,126 0	0,234 8	0,217 5
Hệ số biến thiên tái lập, $C_{v,R}$ tính bằng %	19,4	30,7	21,2	11,7	21,0	35,1
Giới hạn tái lập, R [$R = 2,8 \times s_R$], tính bằng mg/kg	0,680	0,626	0,647	0,453	0,657	0,609
Độ thu hồi, tính bằng %	-	-	-	-	-	-
Giá trị HorRat, theo Tài liệu tham khảo [4]	1,26	1,83	1,33	0,77	1,32	2,08

Bảng A.2 - Dữ liệu về độ độ chụm đối với axit cyanuric trong sữa công thức dành cho trẻ sơ sinh, thức ăn công thức từ đậu nành dành cho trẻ sơ sinh, sữa bột, sữa nguyên chất, đồ uống từ đậu nành và socola sữa

Mẫu	Sữa công thức dành cho trẻ sơ sinh	Thức ăn công thức từ đậu nành dành cho trẻ sơ sinh	Sữa bột	Sữa nguyên chất	Đồ uống từ đậu nành	Socola sữa
Năm thử nghiệm liên phòng thử nghiệm	2014	2014	2014	2014	2014	2014
Số phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	6	7	6	6	7	6
Số ngoại lệ (phòng thử nghiệm)	1	1	1	1	1	1
Số lượng kết quả được chấp nhận	5	6	5	5	6	5
Giá trị trung bình, \bar{x} tính bằng mg/kg	0,83	0,87	1,45	0,57	0,91	0,96
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r , tính bằng mg/kg	0,062 4	0,104 4	0,134 1	0,037 1	0,130 4	0,130 5
Hệ số biến thiên lặp lại, $C_{v,r}$ tính bằng %	7,51	12,0	9,23	6,47	15,0	13,5
Giới hạn lặp lại, r [$r = 2,8 \times s_r$], tính bằng mg/kg	0,175	0,292	0,375	0,104	0,365	0,365
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R , tính bằng mg/kg	0,143 7	0,160 6	0,134 1	0,076 6	0,217 2	0,130 5
Hệ số biến thiên tái lập, $C_{v,R}$ tính bằng %	17,3	18,5	9,23	13,4	25,1	13,5
Giới hạn tái lập, R [$R = 2,8 \times s_R$], tính bằng mg/kg	0,402	0,450	0,375	0,214	0,608	0,365
Độ thu hồi, tính bằng %	-	-	-	-	-	-
Giá trị HorRat, theo Tài liệu tham khảo [4]	1,05	1,13	0,61	0,77	1,53	0,84

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] Commission Decision No. 2002/657/EC implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, Official Journal of the European Communities, 12.8.2002, L-2221/8-36
 - [2] ELBERS I.J.W., TRAAG W.A. *Method validation study on determination of melamine and cyanuric acid in food* <https://edepot.wur.nl/324323>
 - [3] 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.*
 - [4] HORWITZ W., ALBERT R., The Horwitz Ratio (HorRat): A Useful Index of Method Performance with Respect to Precision. J. AOAC Int. 2006, **89** pp. 1095-1109
-