

## **Xác định hàm lượng chlorate và perchlorate trong mẫu cá tra bằng phương pháp sắc ký lỏng khối phổ hai lần (LC-MS/MS)**

**Huỳnh Thị Ngọc Liên\*, Cô Hồng Sơn, Nguyễn Văn Luy**

*Trung tâm Chất lượng nông lâm thủy sản vùng 6, Cần Thơ, Việt Nam*

*(Ngày đến tòa soạn: 02/08/2022; Ngày chấp nhận đăng: 26/09/2022)*

### **Tóm tắt**

Phương pháp xác định chlorate và perchlorate trong mẫu cá tra dùng kỹ thuật LC-ESI-MS/MS đã được phát triển thành công. Dư lượng chlorate và perchlorate trong mẫu được chiết bằng dung dịch methanol đã được acid hóa với acid formic 1%. Sau đó, dịch chiết được làm sạch bằng bột C<sub>18</sub>, sử dụng cột pha thuận để tách chlorate và perchlorate và định lượng trên thiết bị LC-ESI-MS/MS. Kết quả xác nhận giá trị sử dụng phương pháp cho thấy độ đặc hiệu tốt, đường chuẩn tuyến tính trong khoảng nồng độ 0,0005 - 0,015 mg/L; giới hạn định lượng (LOQ) là 0,005 mg/kg; độ thu hồi từ 91 đến 109% và độ tái lập trong khoảng 6,4 đến 9,5% đều đáp ứng theo yêu cầu của SANTE. Phương pháp đã được áp dụng để phân tích thực tế, trong tổng số 427 mẫu cá tra phi lê thu thập từ các nhà máy chế biến thủy sản, có 76 mẫu phát hiện chlorate tương đương tỉ lệ 18%. Nồng độ chlorate được phát hiện trong khoảng từ 0,43 - 253 mg/kg.

**Từ khóa:** *Chlorate và perchlorate, LC -MS/MS, cá tra.*

### **1. ĐẶT VẤN ĐỀ**

Chlorate và perchlorate (Hình 1) là các anion có công thức phân tử lần lượt là ClO<sub>3</sub><sup>-</sup> và ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>. Chlorate được hình thành như một sản phẩm phụ khi sử dụng chlorine, chlor dioxide hoặc hypochlorite để khử trùng nước uống, nước dùng trong sản xuất thực phẩm và các bề mặt tiếp xúc với thực phẩm [1]. Trong khi đó, Perchlorate xuất hiện tự nhiên trong môi trường, ở dạng trầm tích nitrat và kali, có thể được hình thành trong khí quyển và kết tủa vào đất và nước ngầm. Nó cũng xuất hiện như một chất gây ô nhiễm môi trường phát sinh từ việc sử dụng phân bón nitrat và sản xuất, sử dụng và thải bỏ amoni perchlorate được sử dụng trong thuốc phóng tên lửa, chất nổ, pháo hoa, pháo sáng và máy bơm túi khí và trong các quy trình công nghiệp khác. Perchlorate cũng có thể được hình thành trong quá trình phân hủy natri hypochlorit được sử dụng để khử trùng nước và có thể gây ô nhiễm nguồn nước. Đất và phân bón được coi là những nguồn tiềm ẩn gây ô nhiễm perchlorate trong thực phẩm [2].

\* Điện thoại: 0908 619 997      Email: ngoclienct@gmail.com



**Hình 1.** Công thức cấu tạo của chlorate và perchlorate

Trong báo cáo khoa học “Nguy cơ sức khỏe cộng đồng liên quan dư lượng Chlorate trong thực phẩm” của Cơ quan an toàn thực phẩm Châu Âu (EFSA) năm 2015, EFSA đã phát hiện mức dư lượng Chlorate trong nước và thực phẩm quá cao gây tác động đến việc hấp thụ Iodine - đặc biệt nhóm trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ. Việc hấp thụ nhiều chlorate trong một ngày có thể gây độc cho con người vì nó có thể hạn chế khả năng hấp thụ oxy của máu, dẫn đến suy thận [3, 4]. Perchlorate là một chất tiềm ẩn gây ung thư, và đã được chứng minh là cản trở sự hấp thụ iodide trong tuyến giáp, hạn chế khả năng sản xuất hormone tuyến giáp. Các nghiên cứu gần đây chỉ ra tác động tăng trưởng phát triển ở nồng độ thấp, đặc biệt là đối với sự phát triển của hệ thần kinh [5, 6].

Trong quy định mới nhất của Liên minh Châu Âu tại Chỉ thị số (EU) 2020/749 ngày 04/6/2020 (sửa đổi Phụ lục III, Chỉ thị số 396/2005 qui định mức dư lượng tối đa (MRL) đối với Chlorate trong một số sản phẩm), dư lượng cho phép trong thủy sản và sản phẩm thủy sản chưa được quy định cụ thể. Tuy nhiên, mức giới hạn mặc định vẫn áp dụng ở mức MRL là 0,01 mg/kg.

Hiện nay, nhiều phương pháp đã được sử dụng để xác định chlorate và perchlorate bao gồm: sắc ký ion (IC) [7], chuẩn độ điện thế [8] và phổ biến nhất là sắc ký khối phổ (LC-MS). Trong phương pháp sắc ký khối phổ chlorate và perchlorate có thể được xác định trực tiếp từ dung dịch chiết tách hoặc sử dụng thuốc thử ghép cặp ion [9] để chuyển chất phân tích thành hợp chất khác sau đó phân tích trên thiết bị khối phổ. Đối với các phương pháp sắc ký ion, chuẩn độ điện thế. Giới hạn định lượng (LOQ) của phương pháp cao, không đáp ứng giá trị MRL theo yêu cầu, chẳng hạn: theo phương pháp chuẩn độ điện thế [8] LOQ từ 2 - 50 mg/kg, sắc ký ion [7] LOQ là 0,03 mg/kg cao hơn giá trị MRL quy định là 0,01 mg/kg. Trong khi đó phương pháp sắc ký khối phổ có độ nhạy cao hơn nhiều với LOQ từ 0,001 - 0,01 mg/kg [10, 11].

Tháng 5 năm 2019, Phòng Kiểm nghiệm Kiểm chứng về Thuốc bảo vệ thực vật của Châu Âu tại Đức đã công bố phương pháp phân tích các thuốc bảo vệ thực vật có độ phân cực cao trong thực phẩm có nguồn gốc từ động vật bằng LC-MS/MS [10]. Phương pháp này đã xác nhận giá trị sử dụng trên nền mẫu trứng gà và tất cả các loại sữa bò cho chlorate và perchlorate với LOQ là 0,01 mg/kg cho mỗi chất. Đến nay phương pháp này vẫn chưa công bố dữ liệu xác nhận giá trị sử dụng trên nền mẫu cá.

Từ tháng 10 năm 2019 đến tháng 7 năm 2022, Việt Nam đã có 14 lô hàng cá tra phi lê đông lạnh của bị cơ quan thẩm quyền Đức và Áo cảnh báo phát hiện dư lượng Chlorate ở mức cao từ 1,13 mg/kg đến 44,3 mg/kg [12]. Do đó, việc phát triển phương pháp xác định chlorate và perchlorate có độ nhạy đáp ứng quy định MRL của Châu Âu là rất cần thiết,

nhằm đảm bảo chất lượng sản phẩm và sức khỏe của người tiêu dùng, hạn chế rủi ro hàng thủy sản Việt Nam xuất khẩu bị thị trường nhập khẩu trả về.

Qua tham khảo các tài liệu [10-14] cũng như các khảo sát từ thực tế, phương pháp sắc ký lỏng ghép hai lần khối phổ đã được nghiên cứu để phân tích dư lượng chlorate và perchlorate tồn dư trong cá tra. Phương pháp này xác định chlorate và perchlorate trực tiếp từ dung dịch chiết tách sau khi được làm sạch.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu trong bài báo này là dư lượng các chất chlorate và perchlorate tồn dư trong mẫu cá tra.

Các mẫu thử dùng trong nghiên cứu này có nguồn gốc từ các nhà máy chế biến thủy sản tại các tỉnh An Giang, Bến Tre, Cần Thơ, Đồng Tháp, Hậu Giang, Tiền Giang và Vĩnh Long.

Mẫu trắng là mẫu cá tra được phi lê từ mẫu cá tra nguyên con lấy từ vùng nuôi cá tra tại Cần Thơ. Quá trình nuôi không sử dụng các sản phẩm chứa chlor, chlor dioxide hoặc hypochlorite để khử trùng.

### 2.2. Hóa chất, chất chuẩn

Các hóa chất, chất chuẩn sử dụng trong nghiên cứu này đều thuộc loại tinh khiết dùng phân tích và phù hợp cho kỹ thuật LC-MS/MS.

Chất chuẩn chlorate và perchlorate có nồng độ 1.000 mg/L (số lô lần lượt là BCCD9678-73166, BCCD8713-76462) được cung cấp từ hãng Sigma (Mỹ). Dung dịch chuẩn trung gian và chuẩn làm việc được chuẩn bị bằng cách pha loãng dung dịch chuẩn gốc. Nồng độ các dung dịch chuẩn làm việc nằm trong khoảng 0,001 - 0,02 mg/L.

Dung môi và hóa chất khác sử dụng loại dùng cho kỹ thuật LC-MS/MS được cung cấp từ hãng Merck (Đức) gồm: methanol (MeOH), acetonitrile (ACN), acid formic (FA), amoni formate (AF), nước cất. Bột C<sub>18</sub> loại endcap, kích thước hạt nhỏ hơn hoặc bằng 70 µm được cung cấp từ hãng Agilent (Mỹ).

### 2.3. Thiết bị và các dụng cụ phụ trợ

Hệ thống sắc ký lỏng ghép khối phổ hai lần (LC-MS/MS), thiết bị gồm hệ sắc ký lỏng siêu hiệu năng cao Acquity H-Class Plus kết nối với detector khối phổ Xevo TQ-S micro của hãng Waters (Mỹ). Một số thiết bị phụ trợ khác như: máy lắc ống nghiệm Glas-Col (Mỹ), máy ly tâm Rotixa 500 RS Hettich (Đức), bể siêu âm Elma (Đức), cân phân tích Sartorius CPA 225D (độ chính xác 0,1 mg) và các thiết bị, dụng cụ thông thường khác của phòng thí nghiệm.

### 2.4. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.4.1. Khảo sát điều kiện tối ưu hệ thống sắc ký lỏng khối phổ LC-MS/MS

Để tối ưu hóa điều kiện phân tích, tiêm trực tiếp hỗn hợp chuẩn chlorate và perchlorate nồng độ 0,01 µg/mL vào detector khối phổ (MS/MS) với nguồn ion hóa phun điện tử (ESI)

âm. Quá trình tối ưu hóa được thực hiện trên phần mềm Masslynx 4.2. Chọn chế độ khảo sát tự động để bắn phá ion phân tử (ion mẹ) thành các ion con, lựa chọn ion con có cường độ tín hiệu cao nhất để định lượng và ion con có cường độ thấp hơn để định tính. Việc tối ưu hóa điều kiện phân mảnh sao cho thu được ít nhất một ion mẹ và hai ion con.

Đối với điều kiện sắc ký lỏng (LC), sử dụng cột Torus DEA 100 Å, 1,7 µm (2,1 mm × 100 mm) của hãng Waters, thành phần pha động gồm 0,9% FA trong ACN và 0,9% FA trong 50 mM AF và tiến hành khảo sát chương trình pha động.

#### 2.4.2. Khảo sát, đánh giá quy trình xử lý mẫu

Sử dụng mẫu trắng, thêm chất chuẩn cần phân tích vào mẫu trắng và tiến hành xử lý mẫu theo quy trình khảo sát. Sau đó đánh giá các tiêu chí về độ thu hồi, độ lặp lại so với các quy định của SANTE [15]. Dựa vào các phương pháp tham khảo [10-14] quy trình xử lý mẫu được lựa chọn như sau: cân 5 g mẫu trắng đã được đồng nhất vào ống ly tâm nhựa 50 mL, thêm 0,5 mL chuẩn hỗn hợp chlorate và perchlorate 1 µg/mL, lắc đều và để yên ít nhất 15 phút. Thêm 10 mL 1% FA trong methanol, lắc mạnh và siêu âm 15 phút. Ly tâm 6 phút ở tốc độ 4.500 vòng/phút, hút 1 mL lớp trên cho vào ống ly tâm nhựa 15 mL chứa 100 mg bột C<sub>18</sub>. Lắc đều 1 phút sau đó ly tâm 6 phút ở tốc độ 4.500 vòng/phút. Lọc dịch chiết qua màng lọc mẫu có đường kính lỗ 0,20 đến 0,22 µm vào lọ đựng mẫu, pha loãng 0,2 mL dịch chiết sau khi lọc với 0,8 mL nước cất và tiến hành xác định trên thiết bị LC-MS/MS.

#### 2.4.3. Xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp

Phương pháp được xác nhận giá trị sử dụng theo Hướng dẫn số SANTE/11312/2021 [15] của Châu Âu về phê duyệt phương pháp thuốc bảo vệ thực vật.

Các thông số cơ bản được đánh giá gồm: độ đặc hiệu; độ tuyến tính của đường chuẩn; ảnh hưởng của nền mẫu; giới hạn phát hiện và định lượng; độ chụm thông qua độ lặp lại, độ tái lập nội bộ; độ đúng thông qua độ thu hồi và tỉ lệ ion.

#### 2.4.4. Phương pháp xử lý số liệu

Xử lý các số liệu thống kê bằng phần mềm Microsoft Excel 2010. Hàm lượng chlorate và perchlorate trong cá tra được tính bằng phần mềm Masslynx 4.2 trên thiết bị sắc ký lỏng khối phổ.

## 3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

### 3.1. Tối ưu hóa điều kiện phân tích trên thiết bị LC-MS/MS

#### 3.1.1. Tối ưu hóa điều kiện detector khối phổ

Thiết bị khối phổ ba tứ cực với nguồn ion hóa phun điện tử, chế độ ion âm được sử dụng để khảo sát điều kiện tối ưu ion mẹ và các ion con. Kết quả được trình bày ở Bảng 1.

Các thông số phân tích khối phổ được tối ưu khác gồm: điện thế đầu phun mao quản 0,42 kV; nhiệt độ nguồn ion hóa: 150°C; nhiệt độ khí hóa hơi 400°C; tốc độ dòng khí hóa hơi 800 L/h, năng lượng định hướng ion đi vào 0,5 V.

**Bảng 1.** Điều kiện phân mảnh của các ion mẹ và ion con

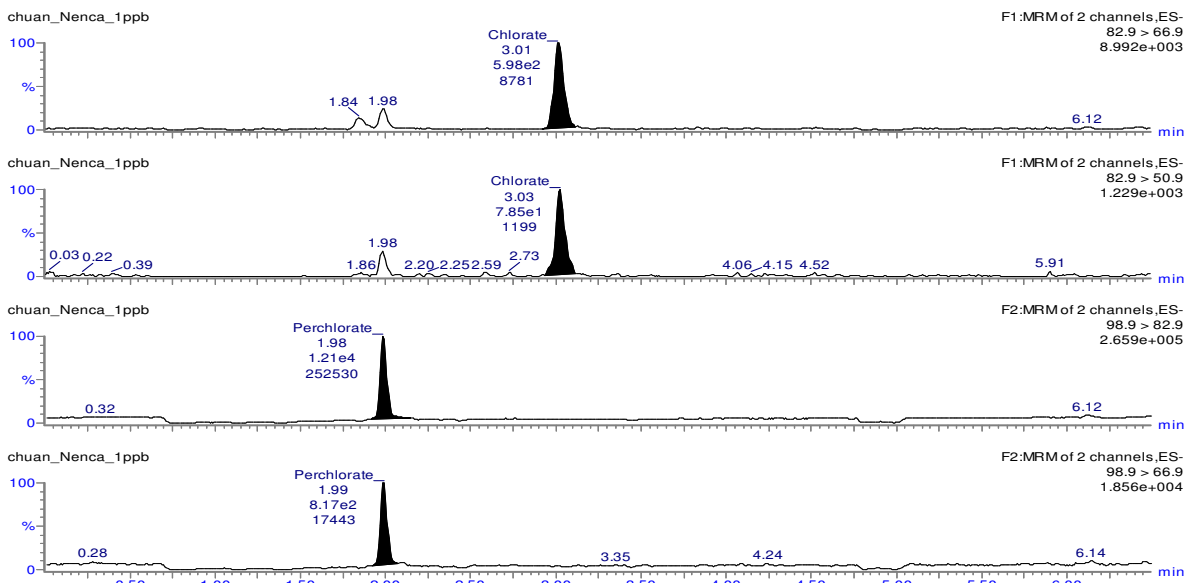
Chất phân tích	Ion mẹ (m/z)	Ion con (m/z)	Cone (V)	CE (eV)	Ghi chú
Chlorate	82,9	66,9	85	12	Định lượng Định tính (13,4%)*
		50,9		16	
Perchlorate	98,9	82,9	60	20	Định lượng Định tính (6,2%)*
		66,9		30	

\* Tỷ lệ tương đối ion định tính so với ion định lượng

### 3.1.2. Tối ưu hóa điều kiện sắc ký

Sau khi lựa chọn được các ion mẹ, ion con và các điều kiện tối ưu, tiến hành phân tích dung dịch chuẩn hỗn hợp chlorate và perchlorate có nồng độ 10 ng/mL.

Trên cơ sở tham khảo các phương pháp [10-14] và điều kiện thực tế, thành phần pha động gồm Kênh A (70%) dung dịch hỗn hợp 0,9% FA trong ACN, Kênh B (30%) dung dịch hỗn hợp 0,9% FA trong 50 mM AF. Cột được sử dụng là cột Torus DEA 100 Å, (1,7 μm × 2,1 mm × 100 mm). Tốc độ dòng 0,32 mL/phút và thể tích tiêm 10 μL. Thời gian phân tích trong khoảng 6 phút.



**Hình 2.** Sắc ký đồ của chất chuẩn chlorate và chuẩn perchlorate 1 μg/L pha trong hỗn hợp methanol và nước tỉ lệ 20 : 80 theo thể tích

Hình 2 thể hiện sắc ký đồ của chuẩn chlorate và perchlorate được pha trong hỗn hợp dung môi methanol và nước. Hình dạng các pic trên sắc ký đồ thu được nhọn, đối xứng và có độ phân giải tốt. Thời gian lưu của Perchlorate và Chlorate lần lượt là 1,99 và 3,02 phút. Vì vậy, có thể chứng minh điều kiện sắc ký lỏng lựa chọn là phù hợp để xác định các chất phân tích.

### 3.2. Đánh giá quy trình xử lý mẫu

Dựa trên quy trình xử lý mẫu nêu ở mục 2.4.2, đánh giá độ lặp lại và độ thu hồi trên nền mẫu trắng thêm chuẩn mức 0,1 mg/kg với cả hai chỉ tiêu chlorat và perchlorate. Kết quả thể hiện trong Bảng 2.

**Bảng 2. Kết quả phân tích đánh giá quy trình xử lý mẫu**

Mẫu	Nồng độ mẫu thêm chuẩn (mg/kg)	Kết quả thu được (mg/kg)		Độ thu hồi (%)		Độ lặp lại (%)	
		Chlorate	Perchlorate	Chlorate	Perchlorate	Chlorate	Perchlorate
1	0,10	0,095	0,098	95,15	97,60		
2	0,10	0,099	0,098	98,50	98,38		
3	0,10	0,092	0,093	92,33	93,07	3,25	3,07
4	0,10	0,099	0,092	98,94	92,03		
5	0,10	0,095	0,098	95,15	97,60		

Kết quả ở Bảng 2 cho thấy độ thu hồi của chlorate và perchlorate đều lớn hơn hoặc bằng 92 %; độ lặp lại lần lượt là 3,25 và 3,07% đáp ứng yêu cầu của SANTE [15] và EU/2021/808 [16]. Kết quả này chứng minh quy trình phân tích mẫu là phù hợp để xác định Perchlorate và Chlorate trong các mẫu cá tra.

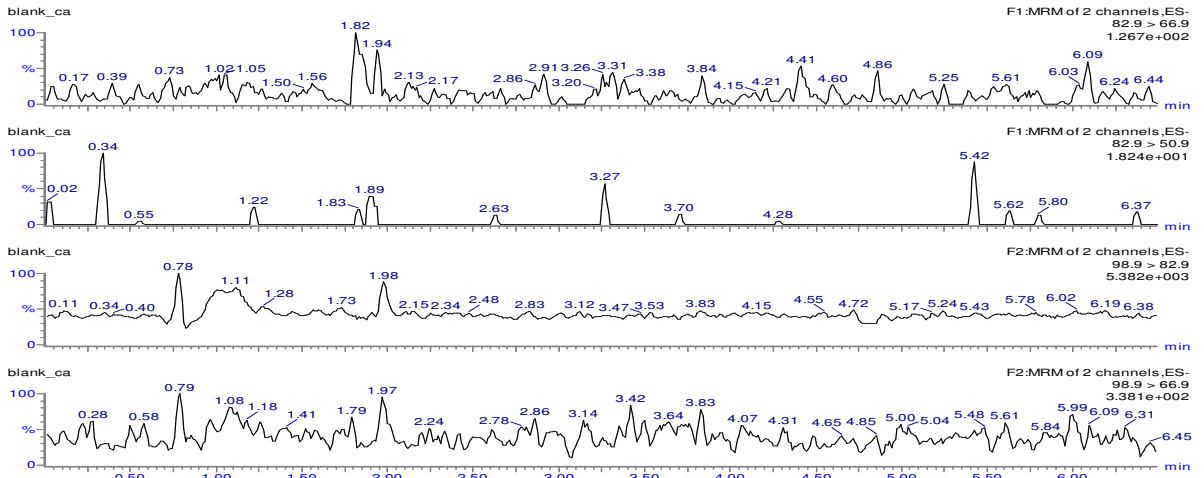
### 3.3. Xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp

#### 3.3.1. Độ đặc hiệu

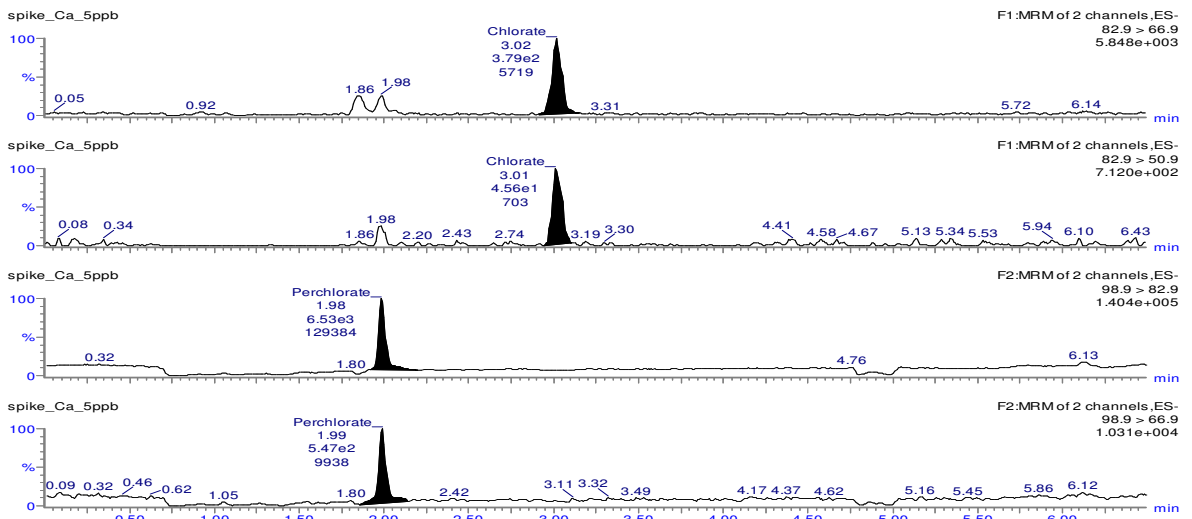
Đánh giá độ đặc hiệu của phương pháp thông qua các tiêu chí sau:

- Theo thiết bị phân tích: tính số điểm nhận diện IP (IP - Identification point). Mỗi ion mẹ là 1 điểm, mỗi ion con là 1,5 điểm. Kết quả thu được khi tiến hành phân tích chuẩn, mẫu trắng và mẫu trắng thêm chuẩn cho thấy chlorate và perchlorate đều có 1 ion mẹ (1 điểm), 2 ion con (3 điểm), kỹ thuật LC-MS/MS được tính 1 điểm nên tổng số điểm IP là 5 điểm, thỏa mãn yêu cầu đối với đối với phương pháp LC-MS/MS theo các quy định [15-16].

- Theo quy trình xử lý mẫu: phân tích ít nhất 6 mẫu trắng thêm chuẩn ở nồng độ 0,005 mg/kg theo phương pháp đã được xây dựng. Kết quả sắc ký đồ mẫu trắng thêm chuẩn (Hình 4) cho thấy thời gian lưu của perchlorate và chlorate lần lượt 1,99 và 3,02 phút đúng với thời gian lưu của mẫu chuẩn như Hình 2.



Hình 3. Sắc ký đồ phân tích mẫu trắng



Hình 4. Sắc ký đồ phân tích mẫu trắng thêm chuẩn ở nồng độ 0,0005 mg/kg với yếu tố pha loãng ( $f = 10$ ).

Hơn nữa, sắc ký đồ mẫu trắng Hình 3, tại thời điểm 3,02 phút trùng với thời gian lưu của chlorate không xuất hiện pic có mảnh phổ khối  $m/z = 82,9 > 66,9$  (mảnh đặc trưng của chlorate) và tại thời điểm 1,98 phút tuy có xuất hiện pic có mảnh phổ khối  $m/z = 98,9 > 82,9$  (mảnh đặc trưng của perchlorate) nhưng cường độ nhỏ hơn 10 %. Mức cho phép theo yêu cầu của SANTE là nhỏ hơn hoặc bằng 30% [15]. Do đó, phương pháp phân tích chlorate và perchlorate có độ đặc hiệu cao, phù hợp theo các quy định đối với phương pháp sử dụng kỹ thuật LC-MS/MS [15-16].

### 3.3.2. Độ tuyến tính của đường chuẩn

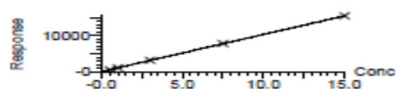
Đường chuẩn được xây dựng theo phương pháp thêm chuẩn. Tiến hành thêm chuẩn vào 6 mẫu trắng với các mức nồng độ trong khoảng từ 0,0005 - 0,015 mg/L. Đường chuẩn xây dựng theo sự phụ thuộc giữa độ đáp ứng (tổng diện tích ion định lượng và định tính) của mỗi chất ứng với từng nồng độ. Việc xây dựng đường chuẩn được thực hiện theo phần mềm

của thiết bị và theo phương trình hồi quy tuyến tính. Các kết quả cho thấy, trong khoảng khảo sát có sự tuyến tính giữa độ đáp ứng và nồng độ, phương trình hồi quy thu được của chlorate là  $y = 1035x + 24,71$  với hệ số tương quan  $r^2 > 0,999$ , của perchlorate là  $y = 18903x + 157$  với  $r^2 > 0,999$  và độ chệch cho mỗi mức nồng độ nhỏ hơn  $\pm 10\%$  (Hình 5).

**Compound name: Chlorate**

#	Name	Type	Std. ...	RT	Area	IS Area	Response	ppb	%D...	1° R...	S/N	Vial
1	1 std1_031019_CHL-Ca	Stand...	0.00								1:25	
2	2 std2_031019_CHL-Ca	Stand...	0.50	2.98	465.41		532.831	0.491	-1.8	0.14	146	1:26
3	3 std3_031019_CHL-Ca	Stand...	1.00	2.98	927.96		1056.526	0.997	-0.3	0.14	266	1:27
4	4 std4_031019_CHL-Ca	Stand...	3.00	2.98	2748.07		3134.990	3.006	0.2	0.14	707	1:28
5	5 std5_031019_CHL-Ca	Stand...	7.50	2.98	6939.73		7798.236	7.513	0.2	0.12	1845	1:29
6	6 std6_031019_CHL-Ca	Stand...	15.00	2.98	13737.15		15537.764	14.993	-0.0	0.13	1969	1:30

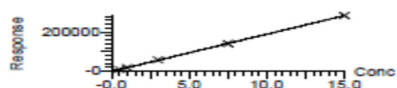
Compound name: Chlorate  
 Correlation coefficient:  $r = 0.999999$ ,  $r^2 = 0.999998$   
 Calibration curve:  $1034.7 * x + 24.7088$   
 Response type: External Std, Area  
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: Null, Axis trans: None



**Compound name: Perchlorate**

#	Name	Type	Std. ...	RT	Area	IS Area	Response	ppb	%D...	1° R...	S/N	Vial
1	1 std1_031019_CHL-Ca	Stand...	0.00								1:25	
2	2 std2_031019_CHL-Ca	Stand...	0.50	1.96	8950.31		9610.833	0.500	0.0	0.07	395	1:26
3	3 std3_031019_CHL-Ca	Stand...	1.00	1.96	17151.72		18354.795	0.963	-3.7	0.07	525	1:27
4	4 std4_031019_CHL-Ca	Stand...	3.00	1.96	54995.20		58264.732	3.074	2.5	0.06	1038	1:28
5	5 std5_031019_CHL-Ca	Stand...	7.50	1.96	132646.05		140996.288	7.451	-0.7	0.06	2436	1:29
6	6 std6_031019_CHL-Ca	Stand...	15.00	1.96	266524.91		283926.875	15.012	0.1	0.07	4193	1:30

Compound name: Perchlorate  
 Correlation coefficient:  $r = 0.999968$ ,  $r^2 = 0.999935$   
 Calibration curve:  $18902.5 * x + 156.967$   
 Response type: External Std, Area  
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: Null, Axis trans: None



**Hình 5.** Đường chuẩn của chlorate và perchlorate trên nền mẫu trắng cá

**3.3.3. Đánh giá ảnh hưởng nền mẫu**

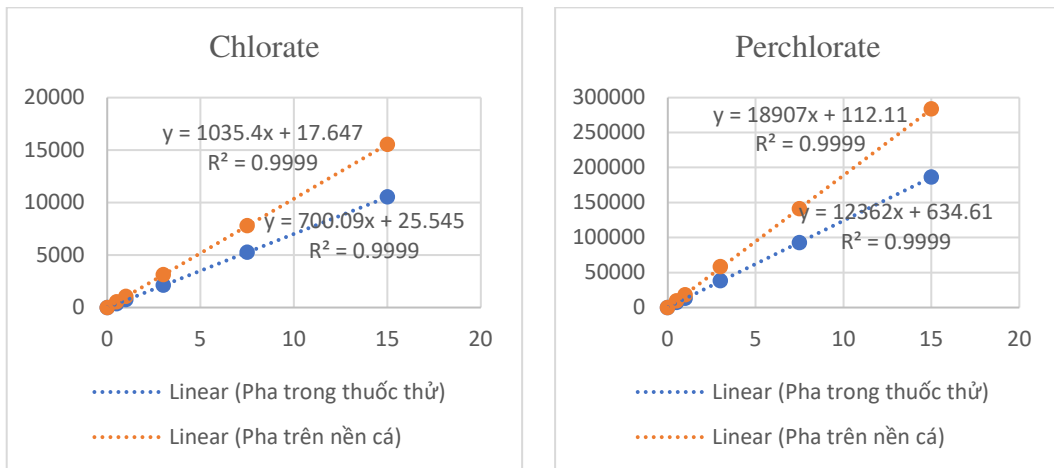
Ảnh hưởng nền của phương pháp được đánh giá thông qua so sánh đường chuẩn pha trong pha động và trên nền mẫu trong khoảng nồng độ 0,0005 - 0,015 mg/L. Kết quả các đường biểu diễn độ tuyến tính và phương trình đường chuẩn được thể hiện trong Hình 6. Hệ số góc của các đường chuẩn lệch nhau tương ứng 47,90 và 52,94 % đối với chlorate và perchlorate là vượt mức cho phép 20% theo quy định của SANTE [15]. Như vậy có thể kết luận nền mẫu có ảnh hưởng đáng kể đến kết quả phân tích. Do đó, khi phân tích chlorate và perchlorate trên mẫu thực đường chuẩn phải được xây dựng kết hợp với nền mẫu.

**3.3.4. Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ)**

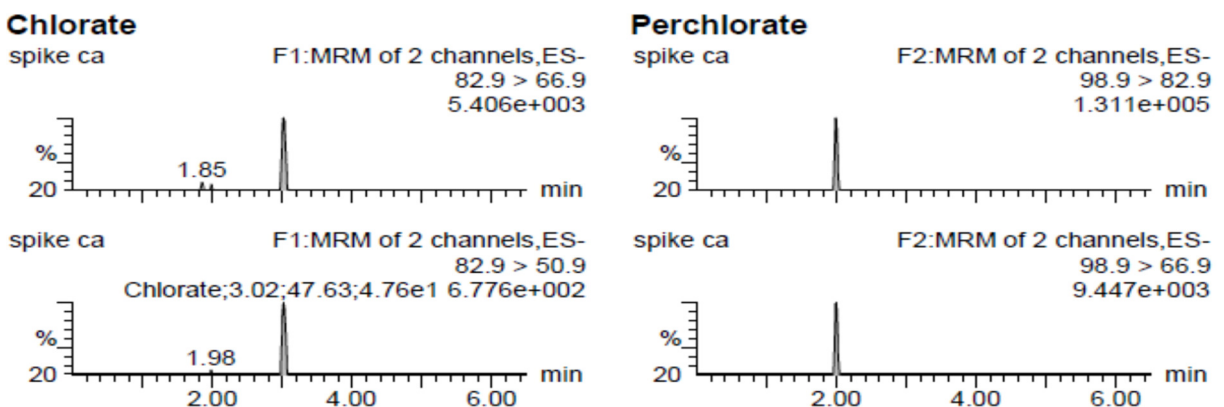
Giới hạn phát hiện được xác định trên cơ sở phân tích lặp lại 20 mẫu trắng, tính tín hiệu nhiễu trung bình của mẫu trắng. Giới hạn phát hiện bằng tín hiệu trung bình cộng với 3 lần độ lệch chuẩn của 20 mẫu trắng. Sau đó, thẩm tra giá trị LOD bằng cách thêm chuẩn vào mẫu trắng ở nồng độ tính toán được, LOQ được xác định trong khoảng từ 2 đến 3 lần LOD. Kết quả cho thấy tại nồng độ thẩm tra  $LOD = 0,0025$  mg/kg,  $LOQ = 0,005$  mg/kg; tỉ lệ S/N của mỗi ion tại  $LOD > 3$ , tại  $LOQ > 10$  và tỉ lệ ion tương đối so với chuẩn nhỏ hơn  $\pm 30\%$ ,



các kết quả thu được đều đáp ứng yêu cầu của SANTE [15]. Vì vậy, LOD và LOQ của phương pháp lần lượt là 0,0025 mg/kg và 0,005 mg/kg cho mỗi chất chlorate và perchlorate.



**Hình 6.** Đường chuẩn của chlorate và perchlorate pha trong pha động và trên nền mẫu cá



**Hình 7.** Sắc ký đồ của mẫu cá thêm chuẩn tại LOQ = 0,005 µg/kg

### 3.3.5. Độ chụm và độ đúng

Độ chụm của phương pháp được đánh giá thông qua độ lặp lại và độ tái lập nội bộ (thực hiện bởi hai kiểm nghiệm viên khác nhau). Tiến hành thực hiện đánh giá bằng cách thêm chuẩn vào mẫu trắng ở ba mức nồng độ 0,005, 0,01 và 0,05 mg/kg, mỗi nồng độ phân tích ít nhất 5 lần lặp lại và theo quy trình đã được xây dựng.

Kết quả tổng hợp đánh giá độ chụm và độ đúng được trình bày trong Bảng 3. Các kết quả cho thấy: độ lặp lại trong khoảng 3,90 đến 6,70% và từ 3,92 đến 6,19% lần lượt cho chlorate và perchlorate; độ tái lập khoảng từ 6,37 đến 9,50% và từ 5,62 đến 7,23% lần lượt cho chlorate và perchlorate.

Độ đúng được đánh giá thông qua độ thu hồi. Độ thu hồi được xác định bằng cách thêm chuẩn vào mẫu trắng ở ba mức nồng độ 0,005, 0,01 và 0,05 mg/kg, mỗi nồng độ phân tích ít nhất 5 lần lặp lại và theo quy trình đã được xây dựng.

Kết quả độ thu hồi của chlorate đạt từ 91,35 đến 109,05% và perchlorate từ 94,16 đến 103,52% (Bảng 3).

**Bảng 3.** Dữ liệu độ chụm và độ đúng của phương pháp

Nồng độ	Chlorate			Perchlorate		
	0,005 mg/kg	0,01 mg/kg	0,05 mg/kg	0,005 mg/kg	0,01 mg/kg	0,05 mg/kg
<b>Độ lặp lại (RSD<sub>r</sub>), %</b>	6,70	5,44	3,90	6,19	4,71	3,92
<b>Độ tái lập (RSD<sub>R</sub>), %</b>	9,50	6,80	6,37	7,23	6,52	5,62
<b>Độ thu hồi, %</b>	91,35	96,33	109,05	94,16	97,33	103,52

### 3.3.6. Độ lệch tỉ lệ ion tương đối

Từ các mẫu phân tích đánh giá độ chụm và độ đúng, tính tỉ lệ ion tương đối (phần trăm diện tích của ion định tính chia cho diện tích ion định lượng). Kết quả cho thấy, độ lệch tỉ lệ ion tương đối của chlorate nằm trong khoảng từ -9,70 đến 7,46% và của perchlorate từ -12,12 đến 6,06% (Bảng 4), đều nằm trong khoảng cho phép  $\pm 30\%$  theo SANTE [15].

**Bảng 4.** Kết quả độ lệch tỉ lệ ion tương đối so với chất chuẩn

Nồng độ (mg/kg)	Độ lệch tỉ lệ ion tương đối (%)	
	Chlorate	Perchlorate
0,005	- 9,70 ÷ 2,24	- 12,12 ÷ 1,52
0,01	- 8,96 ÷ 7,46	- 6,06 ÷ 6,06
0,05	- 2,24 ÷ 6,72	- 7,58 ÷ 1,52

### 3.3.7. Tổng hợp kết quả xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp và bàn luận

Kết quả đánh giá các thông số độ đặc hiệu; độ tuyến tính của đường chuẩn; ảnh hưởng của nền mẫu; giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng; độ chụm thông qua độ lặp lại, độ tái lập nội bộ; độ đúng thông qua độ thu hồi và tỉ lệ ion được tổng hợp tại Bảng 5.

**Bảng 5.** Tổng hợp kết quả xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp

TT Thông số	Kết quả		Theo quy định của SANTE/ 11312/2021	Đánh giá kết quả
	Chlorate	Perchlorate		
1 Độ đặc hiệu	-	< 10 %	$\leq 30\%$ của LOQ	Đáp ứng yêu cầu
2 Độ tuyến tính của đường chuẩn - Độ chệch nồng độ tính ngược cho mỗi mức nồng độ	< 10 %	< 10 %	$\leq \pm 20\%$	Đáp ứng yêu cầu
2 Ảnh hưởng của nền mẫu	47,90 %	52,94 %	$\leq \pm 20\%$	Có sự ảnh hưởng của nền mẫu đến quá trình phân tích. Nên khi

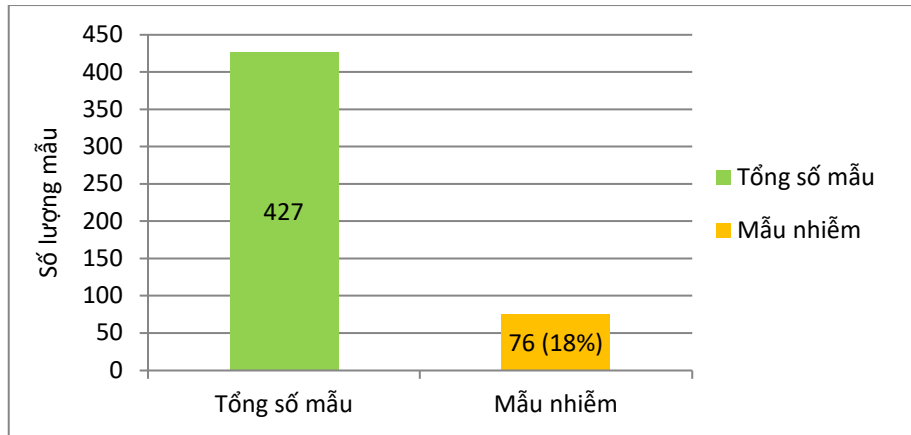
TT	Thông số	Kết quả		Theo quy định của SANTE/11312/2021	Đánh giá kết quả
		Chlorate	Perchlorate		
4	Giới hạn định lượng - LOQ	0,005 mg/kg	0,005 mg/kg	≤ MRL (0,01 mg/kg)	phân tích chlorate và perchlorate đường chuẩn phải được xây dựng kết hợp với nền mẫu Đáp ứng yêu cầu
5	Độ chụm				
5.1	Độ lệch chuẩn lặp lại tương đối - (RSDr) (%)	3,90 - 6,70	3,92 - 6,19	≤ ± 20	Đáp ứng yêu cầu
5.2	Độ lệch chuẩn tái lập tương đối - (RSDR) (%)	6,37 - 9,50	5,62 - 7,23	≤ ± 20	Đáp ứng yêu cầu
6	Độ thu hồi (%)	91,4 - 109	94,2 - 104	70 - 120	Đáp ứng yêu cầu
7	Tỉ lệ ion				
7.1	Số ion con	2	2	2	
7.2	Độ lệch tỉ lệ ion tương đối (%)	-9,70 ÷ 7,46	-12,12 ÷ 6,06	± 30	Đáp ứng yêu cầu

Kết quả đánh giá các thông số cơ bản của phương pháp đều đáp ứng yêu cầu của SANTE [15] và giá trị LOQ của phương pháp nhỏ hơn mức MRL theo quy định của Liên minh EU tại Chỉ thị số (EU) 2020/749 ngày 04/6/2020. Điều này khẳng định phương pháp thích hợp để sử dụng phân tích chlorate và perchlorate trong mẫu cá tra.

### 3.4. Kết quả phân tích mẫu thực tế

Trên cơ sở phương pháp đã được xác nhận giá trị sử dụng đạt theo yêu cầu của SANTE, nhóm nghiên cứu đã tiến hành phân tích mẫu từ các nhà máy chế biến thủy sản để xác định dư lượng chlorate và perchlorate tồn dư trong sản phẩm cá tra phi lê. Tổng số mẫu phân tích là 427 mẫu phân bố như sau: ở An Giang 281 mẫu, Bến Tre 5 mẫu, Cần Thơ 32 mẫu, Đồng Tháp 82 mẫu, Hậu Giang 5 mẫu, Tiền Giang 13 mẫu và Vĩnh Long 9 mẫu.

Kết quả phân tích cho thấy (Hình 8) có 76 mẫu phát hiện chlorate trong tổng số 427, chiếm tỉ lệ 18 %. Nồng độ chlorate được phát hiện trong khoảng từ 0,43 mg/kg đến 253 mg/kg và hàm lượng các mẫu nhiễm chlorate đều vượt ngưỡng MRL cho phép tại chỉ thị số (EU) 2020/749.



**Hình 8.** Kết quả phân tích mẫu thực tế

#### 4. KẾT LUẬN

Nhóm nghiên cứu đã thành công trong việc xây dựng phương pháp sắc ký lỏng ghép khối phổ hai lần (LC-MS/MS) để phân tích dư lượng chlorate và perchlorate tồn dư trong cá tra ở mức giới hạn định lượng đáp ứng yêu cầu kiểm soát theo ngưỡng quy định MRL. Kết quả thẩm định cho thấy phương pháp có độ đặc hiệu/độ chọn lọc cao, độ tuyến tính của đường chuẩn, độ chụm và độ đúng đáp ứng các yêu cầu của SANTE [15]. Phương pháp đã được áp dụng phân tích chlorate và perchlorate trong các mẫu cá tra phi lê ở các tỉnh An Giang, Bến Tre, Cần Thơ, Đồng Tháp, Hậu Giang, Tiền Giang và Vĩnh Long. Kết quả phân tích đã phát hiện 18% mẫu bị nhiễm vượt ngưỡng MRL cho phép tại chỉ thị số (EU) 2020/749.

#### LỜI CẢM ƠN

Nhóm nghiên cứu xin chân thành cảm ơn Ban Giám đốc, các phòng ban Trung tâm Chất lượng nông lâm thủy sản vùng 6 đã tạo điều kiện và hỗ trợ nhóm thực hiện đề tài.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. European Commission, "Chlorate," 2015. [Online]. Available: [https://ec.europa.eu/food/plants/pesticides/maximum-residue-levels/chlorate\\_en](https://ec.europa.eu/food/plants/pesticides/maximum-residue-levels/chlorate_en). [Accessed 15/06/2022].
- [2]. European Commission, "Perchlorate," 2015. [Online]. Available: [https://ec.europa.eu/food/safety/chemical-safety/contaminants/catalogue/perchlorate\\_en](https://ec.europa.eu/food/safety/chemical-safety/contaminants/catalogue/perchlorate_en). [Accessed 15/06/2022].
- [3]. Chain. ESFA Panel on Contaminants in the Food, "Risks for public health related to the presence of chlorate in food," *EFSA Journal.*, vol. 13, no. 6, p. 4135, 2015.
- [4]. National Agro-Forestry-Fisheries Quality Assurance Department, *Report on results of investigation, monitoring to determine the cause and remedy of chorate contamination in frozen pangasius processing*, Hanoi, 2020.

- [5]. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), 2014, "Public health statement perchlorate," 2014. [Online]. Available: <https://atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp162-c1-b.pdf>. [Accessed 27/06/2022].
- [6]. European Food Safety Authority (EFSA), "Scientific Opinion on the risk to public health related to the presence of perchlorate in food, in particular fruits and vegetables," *EFSA Journal.*, vol. 12, no. 10, p. 3869, 2014.
- [7]. TCVN 6494-4:2000, Water quality - Determination of dissolved anions by liquid chromatography of ions. Part 4: Determination of chlorate, chloride and chlorite in water with low contamination, Directorate for standards, metrology and quality, *Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Ministry of Science and Technology*, 2000.
- [8]. D. V. Girenko, A. A. Girenko, and N. V. Nikolenko, "Potentiometric determination of Chlorate Impurities in Hypochlorite Solutions," *International Journal of Analytical Chemistry.*, vol. 2019, pp. 1-7.
- [9]. W. Tiyapongpattana, T. Chaida, and N. Youngvises, "Ion-Interaction Chromatography with Ion-Trap Mass Spectrometry Detection for the Analysis of Perchlorate in Drinking and Natural Waters," *Science & Technology Asia*, vol. 23, no. 3, pp. 35-43, 2018.
- [10]. M. Anastassiades, D. I. Kolberg, A. Benkenstein, E. Eichhorn, S. Zechmann, D. Mack, C. Wildgrube, I. Sigalov, D. Dörk, A. Barth, S. Gorrlich, and G. Cerchia, "Quick Method for the Analysis of Numerous Highly Polar Pesticides in Foods Involving Extraction with Acidified Methanol and LC-MS/MS Measurement, Food of Animal Origin (QuPpe-AO-Method), EU Reference Laboratory for Single Residue Methods," 2017. [Online]. Available: [https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/meth\\_QuPpe\\_AO\\_V3\\_2.pdf](https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/meth_QuPpe_AO_V3_2.pdf). [Accessed Jun 2022].
- [11]. J. De-Alwis, E. Ross, and S. Adams, "Determination of Chlorate and Perchlorate in Infant Milk Using a Waters BEH DEA Column and UPLC-MS/MS," Waters Corporation, September 2019. [Online]. Available: <https://gcms.cz/labrulez-bucke>. [Accessed 15/06/2022].
- [12]. European Commission, "RASFF Window," 20 June 2022. [Online]. Available: <https://webgate.ec.europa.eu/raff-window/screen/search>. [Accessed 01/07/2022].
- [13]. P. Constantinou, D. Louca-Christodoulou, and A. Agapiou, "LC-ESI-MS/MS determination of oxyhalides (chlorate, perchlorate and bromate) in food and water samples, and chlorate on household water treatment devices along with perchlorate in plants," *Elsevier, Chemosphere*, vol. 235, pp. 757-766, 2019.
- [14]. B. Wuyts, and E. Ross, "Overcoming the challenges of Anionic Polar Pesticides Analysis in Food," 2018. [Online]. Available: [https://www.waters.com/webassets/cms/events/EHQ\\_Polar\\_PesticidesIII\\_Webinar\\_Slides\\_2018](https://www.waters.com/webassets/cms/events/EHQ_Polar_PesticidesIII_Webinar_Slides_2018). [Accessed 23/08/2022].

- [15]. European Commission, *Guidance Document on Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticides Residues Analysis in Food and Feed*, SANTE/11312/2021, 2021.
- [16]. European Commission. 2021. Commission implementing regulation (EU) 2021/808 on the performance of analytical methods for residues of pharmacologically active substances used in food-producing animals and on the interpretation of results as well as on the methods to be used for sampling and repealing Decisions 2002/657/EC and 98/179/EC. Official Journal of the European Union. L180/84.

## **Determination of chlorate and perchlorate in pangasius samples by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)**

**Huỳnh Thị Ngọc Liên, Cô Hồng Sơn, Nguyễn Văn Luy**

*National Agro-Forestry-Fisheries Quality Assurance Department-Branch 6, Can Tho, Vietnam*

### **Abstract**

The LC-ESI-MS/MS method has been successfully developed for determination of chlorate and perchlorate in pangasius samples. Residues of chlorate and perchlorate in the sample were extracted with a methanolic solution acidified with 1% formic acid. Then, the extract was cleaned with C<sub>18</sub> powder, used a normal phase column to separate chlorate and perchlorate, and quantified on an LC-ESI-MS/MS instrument. The method was validated for good specificity, linear calibration curve in the range of 0.0005 - 0.015 mg/L; the limit of quantification (LOQ) was 0.005 mg/kg; the recovery and relative standard deviation was from 91 to 109% and from 6.4 to 9.5% respectively and all met the requirements of SANTE. The method was applied to the real analysis, a total of 427 pangasius fillet samples collected from seafood processing companies. There were 76 samples were detected chlorate equivalent to 18%. The concentration of chlorate ranged from 0.43 to 253 mg/kg.

**Keywords:** *Chlorate and Perchlorate, LC-MS/MS, pangasius.*