



BƯỚC ĐẦU NGHIÊN CỨU KHẢO SÁT HÀM LƯỢNG ACRYLAMIDE TRONG MỘT SỐ LOẠI THỰC PHẨM GIÀU TINH BỘT CHẾ BIẾN SẴN TRÊN ĐỊA BÀN THÀNH PHỐ HÀ NỘI

Nguyễn Thị Hoàng, Vũ Thị Bích Phương, Nguyễn Văn Long, Đào Thị Thanh Dịu, Chu Mạnh Linh, Đặng Thế Hưng¹
Trung Tâm Xét Nghiệm, Trường Đại học Y tế Công cộng

(Ngày đến tòa soạn: 26/6/2018; Ngày sửa bài sau phản biện: 31/7/2018; Ngày chấp nhận đăng: 8/8/2018)

Tóm tắt

Đặt vấn đề:

Acrylamide là một chất độc hình thành trong thực phẩm giàu tinh bột khi chế biến ở nhiệt độ cao (ví dụ snack khoai tây, mì tôm, ...). Các nghiên cứu đã chứng minh rằng acrylamide là một tác nhân có khả năng gây ung thư ở người và động vật. Để bước đầu đánh giá tình trạng nhiễm acrylamide trong một số thực phẩm, nghiên cứu sử dụng sắc ký lỏng ghép nối khối phổ (LC-MS/MS) để xác định hàm lượng acrylamide trong một số thực phẩm giàu tinh bột chế biến sẵn đang lưu hành trên địa bàn Hà Nội được thực hiện.

Mục tiêu:

- Thẩm định phương pháp xác định acrylamide trong thực phẩm bằng LC-MS/MS
- Ứng dụng phương pháp đã được xây dựng để xác định hàm lượng acrylamide trong một số sản phẩm giàu tinh bột chế biến sẵn đang lưu hành trên địa bàn thành phố Hà Nội

Phương pháp nghiên cứu: Đây là phương pháp nghiên cứu mô tả cắt ngang. Mẫu được lấy ngẫu nhiên tại một số cửa hàng trên địa bàn thành phố Hà Nội. Hàm lượng acrylamide được xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng ghép nối khối phổ (LC-MS/MS).

Kết quả: Nghiên cứu đã xây dựng được phương pháp định lượng acrylamide trong mẫu snack khoai tây chiên bằng LC-MS/MS. Với giá trị giới hạn định lượng LOQ là 24,82 ng/mL; khoảng tuyến tính từ 25 đến 2500 ng/mL, độ đúng và độ lặp lại đạt theo yêu cầu của AOAC, phương pháp phân tích đã được sử dụng để xác định acrylamide trong một số mẫu snack khoai tây chiên thu thập trên địa bàn Hà Nội. Hàm lượng acrylamide trong mẫu được xác định dao động từ 58 mg kg⁻¹ đến 1830 mg kg⁻¹.

Kết luận: Kết quả khảo sát cho thấy 100% mẫu snack khoai tây kiểm tra có chứa acrylamide, nhưng hàm lượng trong mẫu khảo sát thấp hơn so với kết quả khảo sát năm 2009 ở châu Âu.

Từ khóa: Acrylamide, LC-MS/MS, Snack khoai tây chiên

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Acrylamide là một hợp chất được hình thành trong quá trình chế biến thực phẩm giàu tinh bột ở nhiệt độ cao. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh rằng acrylamide là một tác nhân gây ung thư ở động vật và được WHO xếp loại vào nhóm chất có khả năng gây ung thư với con người. Các nghiên cứu gần đây đã chỉ ra nguy cơ phơi nhiễm của con người với chất này trong thực phẩm có khả năng liên quan đến một số bệnh ung thư như ung thư vú, ung thư thực quản, nội mạc tử cung, buồng trứng. Ngoài ra, chất này cũng được xếp vào nhóm chất có khả năng gây độc thần kinh với giả thuyết là làm thay đổi hàm lượng các chất dẫn truyền thần kinh hay ức chế sự dẫn truyền thần kinh¹⁻⁴.

¹ Điện thoại: 0968668198 Email: dth3@huph.edu.vn

Mặc dù được cảnh báo là một chất độc trong thực phẩm và có nguy cơ ảnh hưởng tới sức khỏe của con người, nhưng việc xác định acrylamide trong các loại thực phẩm giàu tinh bột chế biến sẵn còn chưa được quan tâm nhiều ở Việt Nam. Để bước đầu đánh giá về tình trạng nhiễm acrylamide trong thực phẩm tại Hà Nội, chúng tôi tiến hành nghiên cứu khảo sát hàm lượng acrylamide trong một số thực phẩm giàu tinh bột chế biến sẵn đang lưu hành trên địa bàn Hà Nội với mục tiêu sau: 1) Thăm định phương pháp xác định acrylamide trong thực phẩm bằng phương pháp LC-MS/MS, 2) Ứng dụng phương pháp đã được thăm định để xác định hàm lượng acrylamide trong một số sản phẩm giàu tinh bột chế biến sẵn đang lưu hành trên địa bàn thành phố Hà Nội.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Hợp chất acrylamide, chất gây ung thư thuộc nhóm IIB theo tổ chức nghiên cứu ung thư quốc tế IARC.

Đối tượng mẫu nghiên cứu là 28 mẫu snack khoai tây chiên.

2.2. Hóa chất thiết bị

2.2.1. Hoá chất

* **Chất chuẩn:** Acrylamide 99,5%; Nội chuẩn Acrylamide (2,3,3-D3) 98%.

* **Hóa chất dung môi:** Methanol, n-Hexane, Acetonitril, Formic acid và Acetone đều đạt chuẩn tinh khiết phân tích của hãng Merk.

* Pha dung dịch chuẩn:

- Dung dịch chuẩn gốc acrylamide 500 µg/mL: cân chính xác khoảng 25,0 mg acrylamide vào cốc có mỏ 5 mL, thêm nước siêu sạch để hoà tan và chuyển dung dịch này vào bình định mức 50 mL, tráng rửa cốc nhiều lần, định mức đến vạch bằng nước siêu sạch. Dung dịch này được bảo quản ở 4°C, trong chai tối màu, ổn định trong 1 năm.

- Dung dịch nội chuẩn acrylamide (2,3,3-D3) 500 µg/mL: cân chính xác khoảng 12,5 mg acrylamide vào cốc có mỏ 5mL, thêm nước siêu sạch để hòa tan và chuyển dung dịch này vào bình định mức 25 mL, tráng rửa cốc nhiều lần, định mức đến vạch bằng nước siêu sạch. Dung dịch này được bảo quản ở 4°C, trong chai tối màu, ổn định trong 1 năm.

- Chuẩn làm việc: chuẩn bị các dung dịch có nồng độ acrylamide từ 10; 50; 100; 200; 500; 1000 và 2500 ng/mL và nồng độ cuối cùng của nội chuẩn acrylamide là 100 ng/mL được pha từ dung dịch gốc ở trên qua các dung dịch trung gian.

2.2.2. Thiết bị-dụng cụ

Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao của hãng Perkin Elmer; Detector khối phổ 2 lần (MS/MS) AB Sciex TripleQuad 3200 Turbo V source: kỹ thuật ion hóa phun điện tử (ESI); Cột Phenomenex, 5 µm, 150 mm x 4,6 mm; Máy lọc nước siêu sạch; Máy đồng nhất mẫu, tốc độ 3000 – 8000 vòng/phút; Cân phân tích Metler-Toledo có độ chính xác 0,01 mg; Máy lắc ngang; Máy lắc Vortex; Máy ly tâm; Máy siêu âm.

Ống ly tâm nhựa 2 mL, 50 mL; Giá đựng ống ly tâm nhựa 2 mL, 50 mL; Micropipette: 10-100 µL, 100-1000 µL, 1000-10000 µL; Lọ thủy tinh màu nâu 1,5 mL; Bình định mức pha dung dịch chuẩn 10 mL, 25 mL, 50 mL; Màng lọc millipore millex 0,45 µm.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp thu thập và xử lý mẫu

Chuẩn bị và xử lý mẫu sơ bộ: mẫu snack khoai tây được thu thập ngẫu nhiên tại một số cửa hàng ở Hà Nội và đồng nhất bằng máy xay trước khi xử lý mẫu.

Xử lý mẫu: Cân chính xác một lượng mẫu 1g cho vào ống falcon 30 mL và thêm nội chuẩn acrylamide (để nồng độ nội chuẩn cuối cùng trong mẫu là 100 ng/mL). Lắc đều bằng vortex và để yên 15 phút. Thêm 5 mL hexane và lắc xoáy bằng vortex trong 5 phút, loại lớp hexane rồi làm khô phần bột rắn bằng khí Nitơ. Tiếp theo, thêm 5 mL dung môi acetonitril, lắc xoáy 10 phút sau đó ly tâm



3500 vòng/phút trong vòng 5 phút. Lặp lại quá trình 3 lần và lấy dịch chiết thu được và cho vào ống ly tâm chứa hỗn hợp PSA 50 mg và MgSO₄ 150 mg, lắc xoáy 1 phút, ly tâm 3500 vòng/5 phút. Hút dịch chiết và lọc qua màng lọc 0,45 µm rồi phân tích bằng LC-MS/MS.

2.3.2. Phương pháp phân tích bằng sắc ký khối phổ

Trên cơ sở tham khảo tài liệu 5 - 6 và khảo sát tìm ra các điều kiện để xác định acrylamide tại phòng thí nghiệm, việc tách và xác định acrylamide bằng LC-MS/MS trong nghiên cứu này được thực hiện với các điều kiện bao gồm: Hệ sắc ký lỏng Perkin Elmer; Detector khối phổ ABX Sciex 3200; Cột sắc ký Phenomenex, 5 µm, 150 mm x 4,6 mm; Pha động sử dụng theo chế độ gradient gồm hai kênh A (Methanol) và B (Acetonitrile: Nước chứa 0,01% HCOOH với tỷ lệ 5:95): Từ 0-4 phút: 100% kênh B, từ 4-6 phút: 50% kênh B, từ 7-8 phút: 100% kênh A; Tốc độ dòng: 0,8 mL/phút; Thể tích tiêm mẫu: 10 µL; Nhiệt độ cột: 30°C; Các điều kiện khối phổ: Nguồn ion hóa ESI, chế độ ion dương (+). Các giá trị ion phân tử, ion sản phẩm và năng lượng bắn phá được lựa chọn và tối ưu bằng cách tiêm trực tiếp dung dịch acrylamide 100 ng/mL vào thiết bị MS. Với nguồn ion hoá ESI+, acrylamide được cung cấp proton bởi acid trong pha động để tạo ion mẹ có m/z = 72 tương ứng với ion [M+H]⁺ ([CH₂=CH - CO - NH₂ + H]⁺) và nội chuẩn acrylamide-d₃ tạo ion mẹ có m/z = 75 ([CD₂ = CD - CO - NH₂ + H]⁺). Khi phân tích ở chế độ “Product ion scanning”, ion mẹ [AA+H]⁺ bị phân thành các ion thứ cấp, trong đó ion có m/z = 55 [CH₂=CH - C=O]⁺ nhạy nhất và được sử dụng để định lượng và ion có m/z = 44 để xác nhận lại. Tương tự cho nội chuẩn acrylamide-d₃, ion thứ cấp có m/z = 58 [CD₂=CD - C=O]⁺ là nhạy nhất và dùng để định lượng, ion có m/z = 44 để xác nhận lại.

2.3.3. Xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp

Cách xác định một số thông số cơ bản:

* Xác định tính chọn lọc/đặc hiệu

Sử dụng phương pháp xác nhận (confirmation method): Hội đồng châu Âu quy định cách tính điểm IP (điểm nhận dạng – identification point) đối với các phương pháp khác nhau để khẳng định chắc chắn sự có mặt của một chất.

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

Giới hạn của phương pháp được xác định bằng phương pháp ước lượng bằng tỉ lệ R:

- Phân tích nhiều lần mẫu thử thêm chuẩn ở nồng độ thấp (khoảng 5-7 lần LOD ước lượng có được từ phương pháp thử tương đương theo tài liệu tham khảo).

- Tính giá trị trung bình (TB) và độ lệch chuẩn (SD) từ các kết quả thu được

- LOD được tính theo công thức $LOD = 3 \times SD$; $LOQ = 3,3 \times LOD$

- Đánh giá LOD đã tính được: $R = TB/LOD$

+ Nếu $4 < R < 10$ thì nồng độ dung dịch thử là phù hợp và LOD tính được là đáng tin cậy

+ Nếu $R < 4$ thì LOD của phương pháp lớn hơn giới hạn tính toán, cần phân tích lại với việc thêm chuẩn nhiều hơn và tính lại R.

+ Nếu $R > 10$ thì LOD của phương pháp nhỏ hơn giới hạn tính được, cần phân tích lại với việc thêm chuẩn ít hơn và tính lại R.

* Độ lặp lại

Tiến hành làm thí nghiệm lặp lại nhiều lần trên cùng một mẫu (mẫu thêm chuẩn), tính % RSD. Theo AOAC, RSD % tính được không được lớn hơn giá trị RSD trong bảng ở hàm lượng chất tương ứng.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Kết quả xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp

Xác định tính chọn lọc/đặc hiệu

Tính đặc hiệu được đánh giá thông qua số điểm nhận dạng (IP), mỗi ion mẹ được tính là 1 điểm, mỗi ion con được tính 1,5 điểm. Như vậy, theo các kết quả thu được số điểm IP có thể đạt được trong phương pháp này là 4 điểm, đáp ứng được yêu cầu cách tính điểm IP (Bảng 1).

Bảng 1. Điểm IP nhận dạng Acrylamide Xây dựng đường chuẩn

Chuẩn	Ion mẹ	Ion con	Số điểm IP
Acrylamide	72	55	4
		44	

Xây dựng đường chuẩn

Đường chuẩn được xây dựng từ nồng độ 10 ng/mL đến 2500 ng/mL ở các điểm 10, 25, 50, 100, 200, 500, 1000 và 2500 ng/mL. Trong trong khoảng nồng độ từ 25 ng/mL đến 2500 ng/mL có sự phụ thuộc tuyến tính giữa diện tích pic và nồng độ tương ứng với hệ số tương quan trên 0,99 (Bảng 2).

Bảng 2. Khoảng tuyến tính và đường chuẩn

Chất phân tích	Khoảng tuyến tính	Đường chuẩn	R
Acrylamide	25-2500 ng/mL	$y = 5,5997 \times 10^{-4} + 0,0206125x$	0,996

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

LOD và LOQ được xác định bằng phương pháp ước lượng theo tỷ lệ R. Kết quả xác định được: LOD là 7,52 ng/mL và LOQ là 24,82 ng/mL.

Xác định độ lặp lại và độ thu hồi

Tiến hành phân tích lặp lại 6 lần mẫu snack khoai tây và thêm chuẩn ở 3 mức nồng độ trong cùng ngày phân tích. Kết quả thu được trình bày ở Bảng 3.

Bảng 3. Kết quả độ lặp lại và độ thu hồi

Số lần	Hàm lượng Acrylamide (ng/mL)			
	Trước khi Thêm chuẩn	Thêm chuẩn 100	Thêm chuẩn 200	Thêm chuẩn 500
Lần 1	98,43	180,08	279,05	498,16
Lần 2	97,65	174,05	281,65	500,01
Lần 3	95,91	202,03	259,95	550,05
Lần 4	101,09	198,36	251,36	485,37
Lần 5	95,86	179,63	300,01	575,68
Lần 6	94,51	172,84	271,98	476,63
RSD (%)	2,42	6,80	6,34	7,66
Tiêu chí chấp nhận	RSD < 20%	RSD < 20%	RSD < 20%	RSD < 20%
Độ thu hồi		87,3%	86,7%	83,4%
Đánh giá kết quả theo AOAC	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt

Bảng 3 cho thấy khi thực hiện phương pháp này trên nền mẫu snack khoai tây đều cho độ lặp lại và độ thu hồi khá tốt. Các thông số đạt yêu cầu đề ra theo AOAC, chứng tỏ phương pháp ổn định trong cùng điều kiện thực nghiệm.



3.2. Kết quả khảo sát hàm lượng Acrylamide trong một số mẫu snack khoai tây thu thập tại các cửa hàng trên địa bàn thành phố Hà Nội

Với điều kiện phân tích đã được thiết lập, chúng tôi áp dụng quy trình để phân tích một số nền mẫu snack khoai tây (28 mẫu) được bán trên thị trường và kết quả được trình bày ở Bảng 4. Kết quả phân tích cho thấy hàm lượng acrylamide trong các mẫu snack khoai tây chiên dao động từ 58 – 1829 mg kg⁻¹ (hàm lượng trung bình: 466 mg kg⁻¹), thấp hơn so với kết quả khảo sát năm 2009 ở châu Âu (hàm lượng trung bình: 628 mg kg⁻¹; hàm lượng lớn nhất: 4180 mg kg⁻¹)⁷. Sự khác nhau về kết quả là số mẫu được phân tích trong nghiên cứu này của chúng tôi còn ít (28 mẫu) so với số mẫu được phân tích ở châu Âu (hàng nghìn mẫu), nên kết quả này cũng chưa đại diện cho hàm lượng của acrylamide trong các sản phẩm snack khoai tây chiên trên thị trường ở Hà Nội.

Bảng 4. Hàm lượng Acrylamide trong một số mẫu snack khoai tây

Mẫu	Hàm lượng (mg kg ⁻¹)	Mẫu	Hàm lượng (mg kg ⁻¹)	Mẫu	Hàm lượng (mg kg ⁻¹)	Mẫu	Hàm lượng (mg kg ⁻¹)
KTC1	1542	KTC8	375	KTC15	67	KTC22	354
KTC2	292	KTC9	233	KTC16	58	KTC23	262
KTC3	173	KTC10	769	KTC17	1586	KTC24	238
KTC4	248	KTC11	570	KTC18	329	KTC25	169
KTC5	685	KTC12	285	KTC19	171	KTC26	559
KTC6	98	KTC13	382	KTC20	319	KTC27	329
KTC7	1830	KTC14	562	KTC21	108	KTC28	248

4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Nghiên cứu đã xây dựng được phương pháp định lượng acrylamide trong mẫu khoai tây chiên bằng LC/MS-MS. Với giá trị giới hạn định lượng LOQ là 24,82 ng/mL; khoảng đường chuẩn tuyến tính từ 25 đến 2500 ng/mL, độ đúng và độ lặp lại đạt theo yêu cầu của AOAC, phương pháp phân tích đã được áp dụng để xác định acrylamide trong 28 mẫu snack khoai tây chiên thu thập trên địa bàn Hà nội. Kết quả khảo sát ban đầu cho thấy, một số mẫu snack khoai tây (28 mẫu) được bán trên thị trường Hà nội đều chứa acrylamide với hàm lượng từ 58 mg kg⁻¹ đến 1830 mg kg⁻¹, thấp hơn so với kết quả khảo sát năm 2009 ở châu Âu. Tuy nhiên, với số lượng mẫu khảo sát còn nhỏ nên kết quả khảo sát hàm lượng acrylamide trong nghiên cứu này chưa đại diện cho hàm lượng acrylamide trong nền mẫu snack khoai tây có mặt trên thị trường Hà Nội.

Kiến nghị: tiếp tục xây dựng quy trình và khảo sát thêm số lượng mẫu snack khoai tây và thực phẩm giàu tinh bột chế biến sẵn khác (mì tôm, bánh quy, sản phẩm dinh dưỡng...) để có số liệu tổng thể hơn về hàm lượng acrylamide trong các sản phẩm có khả năng chứa chất này đang được tiêu thụ ở Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. K. Svensson, , L. Abramsson, W. Becker, A. Glynn, K.-E. Hellenäs, Y. Lind, J. Rosén (2003). Dietary intake of acrylamide in Sweden. Food and Chemical Toxicology, Volume 41, Issue 11, Pages 1581–1586.
2. Marta Mesías, Francisco J. Morales (2015). Acrylamide in commercial potato crisps from Spanish market: Trends from 2004 to 2014 and assessment of the dietary exposure. Food and

- Chemical Toxicology, Volume 81, Pages 104-110.
3. Joanna Wyka, Agnieszka Tajner-Czopek, Anna Broniecka, Ewa Piotrowska, Monika Bronkowska, Jadwiga Biernat(2015). Estimation of dietary exposure to acrylamide of Polish teenagers from an urban environment. Food and Chemical Toxicology, Volume 75, Pages 151-155.
 4. Hanna Mojska, Iwona Gielecińska, Katarzyna Stoś (2012). Determination of acrylamide level in commercial baby foods and an assessment of infant dietary exposure. Food and Chemical Toxicology, Volume 50, Issue 8, Pages 2722-2728.
 5. Zhang, Y.; Jiao, J.; Cai, Z.; Zhang, Y.; Ren, Y (2007). An improved method validation for rapid determination of acrylamide in foods by ultra-performance liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry, Journal of Chromatography A, Volume 1142, Issue 2, Pages 194-198.
 6. Swedish Standard, SS-EN 16618:2015 (2015). Food analysis - Determination of acrylamide in food by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS). Article no: STD-8014019, Edition: 1. Pages 3-24.
 7. European Food Safety Authority (EFSA) (2009). Result on the monitoring of acrylamide levels in food. EFSA Scientific, Report 285. Pages.1-26. Swedish Standard, SS-EN 16618:2015 (2015). Food analysis - Determination of acrylamide in food by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS). Article no: STD-8014019, Edition: 1. Pages 3-24.

Summary

DETERMINATION OF ACRYLAMIDE CONTENT IN PROCESSED STARCHY FOODS IN HANOI

Nguyen Thi Huong, Vu Thi Bich Phuong, Nguyen Van Long, Dao Thi Thanh Diu, Chu Manh Linh, Dang The Hung

Laboratory Center, Hanoi University of Public Health

Acrylamide is a toxic chemical formed in high temperature-processed foods (e.g., Potato snacks, instant noodle, etc.). Previous studies showed that acrylamide is a carcinogenic agent in human and animals. Evaluation of acrylamide contents in some processed starchy foods has been performed in order to investigate the presence of acrylamide in foods in Hanoi. This study is to validate a LC-MS/MS method for determination of acrylamide in food and to determine the acrylamide content in some processed starchy foods available in Hanoi, Vietnam. Samples of potato chips collected from food shops in Hanoi were tested. The acrylamide content was determined by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. The method was validated for accuracy, precision, linearity, and recovery. The assay was linear over the entire range of calibration standards i.e., a concentration range from 1 ng/mL to 2500 ng/mL ($r^2 > 0.996$). The precision and recoveries were obtained based on the AOAC guidelines. The lower limit of quantification of the analytical method of acrylamide was 24,82 ng/mL. The validated method was successfully applied to determine acrylamide in 28 samples of potato snacks. The content of acrylamide ranged from 58.0 to 1829.6 mg/kg. Acrylamide was detected in all samples, nevertheless, the acrylamide content was lower than that from other studies published in 2009 in Europe.

Keywords: *Acrylamide, potato snack, LC-MS/MS*