

Xác định đồng thời ethylene oxide và 2-chloroethanol trong thực phẩm bằng sắc ký khí ghép khối phổ ba tứ cực kết hợp với chiết mẫu QuEChERS

Dương Nguyên Nguyễn Nữ^{1, 2}, Trương Văn Nhân¹, Lê Thanh Tâm¹,

Nguyễn Thành Duy¹, Lý Tuấn Kiệt^{1*}, Nguyễn Văn Đông²

¹Trung tâm Dịch vụ Phân tích Thí nghiệm Tp. HCM, Việt Nam

²Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - Đại học Quốc gia Tp. HCM, Việt Nam

(Ngày đến tòa soạn: 19/07/2022; Ngày chấp nhận đăng: 13/09/2022)

Tóm tắt

Trong nghiên cứu này, ethylene oxide (EO), một chất hun trùng cho nông sản, và dẫn xuất của nó (2-chloroethanol, 2-CE), được chiết và làm sạch bằng phương pháp QuEChERS, sau đó định lượng trên thiết bị sắc ký khí ghép khối phổ ba tứ cực (GC-MS/MS). Mẫu được chiết bằng acetonitrile, làm sạch bằng kỹ thuật chiết pha rắn phân tán (d-SPE) gồm hỗn hợp MgSO₄, PSA, C₁₈, và GCB, với thời gian chuẩn bị mẫu ngắn hơn 20 phút. Phương pháp đã được thẩm định trên các thành phần của gói mì như gia vị, dầu, vớt mì, và bao bì. Kết quả thẩm định cho thấy phương pháp có độ chính xác cao ở các nồng độ khảo sát, với hiệu suất thu hồi từ 80 - 120% và độ lệch chuẩn tương đối (RSD) thấp hơn 20%. Giới hạn định lượng của phương pháp là 0,01 mg/kg cho cả hai chất, hoàn toàn đáp ứng yêu cầu với giới hạn dư lượng tối đa cho phép (MRL) của châu Âu (EU) cho các nền mẫu thực phẩm ở ngưỡng 0,01 mg/kg. Phương pháp này đã được áp dụng cho việc kiểm soát qui trình sản xuất mì gói, với 125 mẫu nguyên liệu (gia vị, rau sấy, dầu, bao bì), mì gói và thực phẩm khác. Trong số đó, có 13 mẫu nguyên liệu phát hiện 2-CE, và 1 mẫu gia vị phát hiện đồng thời cả hai chất, chiếm tỷ lệ 11,2%. Tất cả các mẫu phát hiện đều vượt ngưỡng MRL của EU.

Từ khóa: Ethylene oxide (EO), 2-chloroethanol (2-CE), GC-MS/MS, QuEChERS, d-SPE.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ethylene oxide (EO) có công thức hoá học là C₂H₄O, có tên IUPAC là epoxyethane hoặc với tên gọi khác là oxiran, dimethylene oxide, oxacyclopropane. EO là một hợp chất hữu cơ thường được tìm thấy ở dạng khí không màu, dễ cháy ở nhiệt độ phòng. EO được sử dụng chủ yếu trong hai ngành công nghiệp chính là: i) công nghiệp sản xuất hoá chất, dùng làm chất trung gian trong sản xuất ethylene glycol (chất chống đông), hàng dệt, sợi polyester, bột polyurethane, thuốc, nguyên liệu cho sản xuất nhựa Polyethylene terephthalate (PET) và các sản phẩm khác; ii) hun trùng, khử trùng cho các thiết bị y tế, sản phẩm thực phẩm, gia vị (đặc biệt như bột ớt, hành lá sấy, tiêu, ...). Với cấu trúc dạng vòng linh hoạt, sau khi tiếp

* Điện thoại: 0908293434

Email: kietlt@case.vn

xúc với thực phẩm, hợp chất EO dễ dàng tạo thành các chất chuyển hoá với sự có mặt của các phân tử nước, ion chloride và bromide như ethylene glycol, 2-chloroethanol (2-CE) và 2-bromoethanol tương ứng. Quá trình này có thể xảy ra ngay khi hun trùng hoặc trong suốt quá trình sản xuất và chế biến nguyên liệu. Đối với 2-CE, sản phẩm phân huỷ của EO, hiện chưa có đủ bằng chứng nào về đặc điểm gây ung thư của 2-CE. Tuy nhiên, vẫn có nhiều thí nghiệm cho thấy khả năng gây độc ở gen, mức độ phơi nhiễm phụ thuộc vào liều lượng, thời gian và công việc tiếp xúc [1-2]. Cục Bảo vệ Môi trường Hoa kỳ (USEPA) kết luận đặc tính EO là chất gây ung thư ở người là cao, giá trị đơn vị rủi ro hít phải (IUR) cao nhất được công bố là $3 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\text{m}^3$, IUR càng cao dự đoán khả năng gây ung thư đáng báo động trong các môi trường, cơ sở sử dụng và tiếp xúc EO [3].

Ngày nay, có nhiều phương pháp xác định EO bằng các kỹ thuật sắc ký khí khác nhau như GC-ECD, GC-FID, GC-MS, và GC-MS/MS [4-6]. Bên cạnh đó, việc kiểm định EO trong thực phẩm được tiến hành dựa trên hai phương pháp chính. Một là phương pháp phân tích GC-MS [5] dựa trên sự chuyển hoá của EO thành 2-CE, định lượng qui về 2-CE, ưu điểm của phương pháp này là khả năng ổn định, chính xác cao, thiết bị tương đối phổ biến dễ sử dụng nhưng nhược điểm là tốn thời gian, điều kiện chuyển hoá khá phức tạp. Phương pháp khác là sử dụng kỹ thuật GC-MS/MS phân tích đồng thời EO và 2-CE bằng phương pháp QuEChERS EN 15662:2008 [6-8]. Ưu điểm nổi bật của phương pháp này là xử lý mẫu đơn giản, nhanh chóng, tiết kiệm thời gian, phân tích đồng thời được cả hai chất (EO và 2-CE) với độ nhạy rất cao. Điểm đáng lưu ý là khi sử dụng phương pháp này là tính ổn định, sự nhầm lẫn khi phân tách của EO và acetaldehyde, một chất đồng phân của EO.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành xây dựng quy trình xác định đồng thời EO và 2-CE trong gói mì (như gia vị, dầu, vớt mì, và bao bì thực phẩm) bằng phương pháp QuEChERS kết hợp với kỹ thuật sắc ký khí ghép khối phổ ba tứ cực GC-MS/MS. Phương pháp được thẩm định với các thông số độ hiệu suất thu hồi, độ lặp lại và độ tái lập, độ phân giải acetaldehyde và EO. Bên cạnh đó, giới hạn định lượng của phương pháp cũng được thẩm định nhằm đánh giá khả năng đáp ứng quy định mức giới hạn dư lượng tối đa cho phép (MRL) chung cho EO và 2-CE trong các thị trường khác nhau (Bảng 1), trong đó thị trường châu Âu đưa ra tiêu chuẩn rất nghiêm ngặt cho tổng EO ở mức 0,01 mg/kg.

Bảng 1. Giới hạn dư lượng tối đa cho phép (MRL) của Ethylene oxide trong một số loại thực phẩm của một số nước [9]

Thị trường	Hợp chất	MRL (mg/kg)
Châu Âu [10]	Tổng EO và 2-CE, quy theo EO	0,01* - 0,1 (tùy loại)
Mỹ và Canada [11-12]	EO	7
	2-CE	940

(*) Mức giới hạn 0,01 mg/kg áp dụng cho các mẫu không có trong EC 396/2005 của châu Âu.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Các mẫu gia vị (hỗn hợp bột nêm và rau sấy), dầu, vớt mì, và bao bì được lựa chọn để phân tích dư lượng EO và 2-CE, nhằm kiểm soát dư lượng tồn dư trong mì thành phẩm. 125 mẫu kiểm soát dư lượng EO và 2-CE được các công ty gửi đến phòng thí nghiệm trong năm 2021; bao gồm 90 mẫu gia vị (chiếm 72%), 13 mẫu dầu (10,4%), 10 mẫu mì (8%), 9 mẫu bao bì (7,2%), và 3 mẫu thực phẩm khác (chả giò và tôm sấy, 2,4%).

2.2. Hóa chất, chất chuẩn, và thiết bị

Các hoá chất là loại tinh khiết dùng trong phân tích: acetonitrile, methanol, acetone, ethylacetate, dichloromethane, acetaldehyde, muối sodium chloride $\geq 99\%$, muối magie sulfate khan $\geq 99\%$ của hãng Merck, nước cất 2 lần loại ion và d-SPE (150 mg MgSO_4 , 50 mg C_{18} , 50 mg PSA, 50 mg GCB) của hãng CNW. Chuẩn ethylene oxide (EO) $\geq 99,5\%$ (Product No: CRM 48891, Lot No: LRA7352), chuẩn 2-chloroethanol (2-CE) $\geq 99,6\%$ (Product No: CRM 48085, Lot No: LRAC9961) của Sigma.

Dung dịch chuẩn gốc EO (2000 mg/L trong dichloromethane) và 2-CE (2000 mg/L trong methanol) được chứa trong các ống riêng. Dung dịch chuẩn trung gian hỗn hợp (gồm EO và 2-CE) nồng độ 100 và 1 mg/L (C_{1g1} và C_{1g2} , tương ứng) được pha từ các chuẩn gốc bằng acetonitrile. Đường chuẩn hỗn hợp hai chất được pha loãng từ dung dịch C_{1g2} (1 mg/L) bằng dung môi acetonitrile gồm 6 nồng độ: 4, 10, 25, 50, 100, và 200 $\mu\text{g/L}$. Tất cả các dung dịch chuẩn được bảo quản ở nhiệt độ mát (4 - 8 °C).

Hệ sắc ký khí ghép khối phổ hai lần (GC-MS/MS, Thermo Fisher) bao gồm máy sắc ký khí Trace 1310 nối với detector khối phổ ba tứ cực TSQ 9000 và vận hành ở chế độ ion hóa điện tử (electron ionization mode, 50 eV). EO và 2-CE được tách trên cột DB-624 (60 m \times 0,32 mm \times 1,8 μm). Các thiết bị phụ trợ gồm cân phân tích 4 số (A&D, GH200), máy vortex (Talboys), máy lắc (IKA, KS 4000i), máy siêu âm (Elma, Elmasonic S), và máy ly tâm (Hettich, Universal 320).

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp xử lý mẫu (tham khảo và có bổ sung [6])

Đồng nhất mẫu: EO là hợp chất dễ bay hơi nên phải bảo quản mẫu ở các điều kiện thích hợp để tránh mất mẫu. Với các mẫu dạng lỏng phải lắc, trộn kỹ trước khi phân tích. Các mẫu dạng rắn lưu ở -20°C ít nhất 60 phút trước khi đồng nhất mẫu bằng máy xay.

Chiết và làm sạch: Cân khoảng 2 g chính xác đến 0,1 mg; thêm 5 mL acetonitrile/nước (95/5, v/v), vortex và lắc trong 15 phút; ly tâm (5 phút, 7000 vòng/phút); 1 mL dung dịch lớp trên được làm sạch bằng d-SPE, vortex, và ly tâm (3 phút, 7000 vòng/phút); lọc dung dịch sau ly tâm qua màng lọc PTFE 0,22 μm vào vial; bảo quản ở 8 °C đến khi phân tích trên thiết bị GC-MS/MS.

2.3.2. Phương pháp phân tích

EO và 2-CE được tách trên cột sắc ký DB-624 và phát hiện trên detector khối phổ hai lần theo chế độ SRM (Selected Reaction Monitoring), chi tiết được trình bày trong Bảng 2 và Bảng 3.

Bảng 2. Thông số cài đặt GC và MS/MS dành cho phân tích EO và 2-CE

GC	Khối phổ MS/MS
- Tốc độ dòng: 1,5 mL/phút	- Tốc độ quét: 7scan/ giây
- Thể tích tiêm mẫu: 1 µL, chia dòng (1:10)	- Nhiệt độ transferline: 240°C
- Nhiệt độ cổng tiêm: 250°C	- Nhiệt độ nguồn ion: 270°C
- Chương trình nhiệt độ: 45°C (giữ 2 phút), tăng 15°C/phút đến 150°C/phút, tăng 20°C/phút đến 240°C (giữ 5 phút).	- Chế độ ion hoá: EI
	- Năng lượng ion hoá: 50 eV

2.3.3. Đánh giá ảnh hưởng nền

Các mẫu trắng (vất mì, gia vị, dầu, và bao bì) sau khi chiết mẫu như Mục 2.3.1 được dung dịch mẫu trắng. Dùng dung dịch này để pha dung dịch chuẩn hỗn hợp 100 µg/L và so sánh với dung dịch chuẩn tương ứng pha bằng dung môi ACN. Hiệu ứng nền (ME) được tính theo công thức sau:

$$ME (\%) = (As'/As) \times 100$$

Với: *As* là diện tích peak của chuẩn pha bằng dung môi

As' là diện tích peak của chuẩn pha bằng dung dịch chiết mẫu trắng

Phương pháp được đánh giá là không bị ảnh hưởng nền khi ME nằm trong khoảng 80 - 120% [13].

2.3.4. Thẩm định phương pháp

Phương pháp phân tích EO và 2-CE được tiến hành thẩm định theo hướng dẫn của tiêu chuẩn SANTE/11945/2015 gồm các thông số khoảng tuyến tính ($R^2 \geq 0,99$), độ chính xác (thông qua hiệu suất thu hồi trong khoảng 70 - 120%, độ tái lập và độ lặp lại với $RSD \leq 20\%$), và giới hạn định lượng. Các nền mẫu dùng để thẩm định gồm vất mì, gói gia vị, dầu, và bao bì. Các mẫu không chứa EO và 2-CE sẽ được dùng làm mẫu trắng, thêm chuẩn hỗn hợp ở các nồng độ 0,01; 0,03; và 0,05 mg/kg (mỗi nồng độ chuẩn bị 12 mẫu/nền, lần lượt phân tích bởi 2 kiểm nghiệm viên trong 2 ngày khác nhau). LOQ thẩm định tại nồng độ 0,01 thông qua hiệu suất thu hồi và độ tái lập, phải thỏa tiêu chí định lượng (độ thu hồi (Recovery) trong khoảng 70 - 120%, RSD_R nhỏ hơn 20%).

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Tối ưu thông số detector và điều kiện sắc ký

Nhằm tối ưu thông số MS/MS của EO và 2-CE, dung dịch chuẩn 1,0 ppm của từng chất được sử dụng với phần mềm AutoSRM (Thermo Scientific) nhằm tối ưu các thông số ion mẹ, ion con, và năng lượng phân mảnh. Kết quả được trình bày ở Bảng 3.

Bảng 3. Thông số cài đặt khối phổ GC-MS/MS

Tên	Thời gian lưu (phút)	Ion mẹ (m/z)	Ion con (m/z)	Năng lượng phân mảnh (eV)
<i>Ethylene oxide</i>	4,78	44,1	14,1	20
<i>Ethylene oxide</i>	4,78	44,1	29,1*	5
<i>2-Chloroethanol</i>	9,27	80,1	31,1*	5
<i>2-Chloroethanol</i>	9,27	80,1	43,1	5

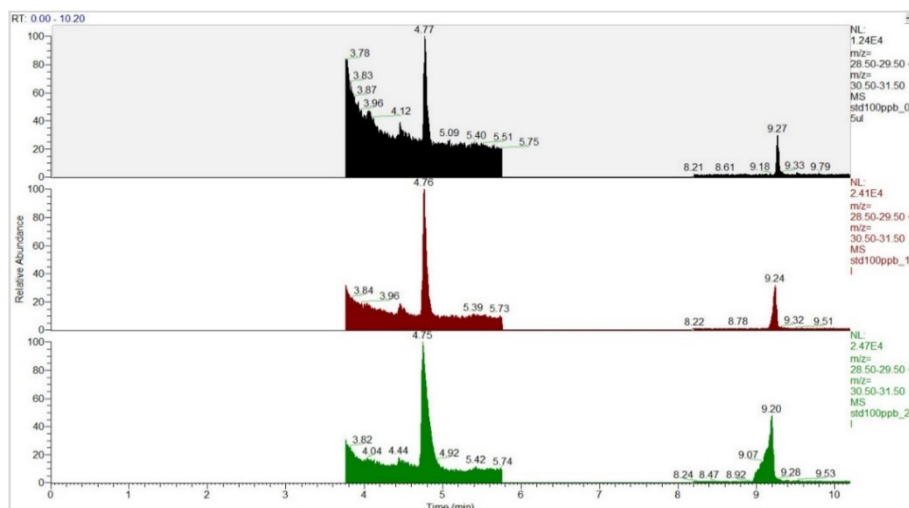
*: ion định lượng

Trong nghiên cứu này, do khó khăn trong việc đặt hàng, chúng tôi không sử dụng nội chuẩn EO-D4 và 2-CE-D4, nội chuẩn đồng vị tương ứng cho EO và 2-CE. Đối với phương pháp GC-MS/MS, việc sử dụng nội chuẩn đồng vị có hai mục đích: (1) hiệu chỉnh hệ số đáp ứng của tín hiệu trong trường hợp xảy ra sự mất mát ở cổng tiêm GC và/hoặc quá trình ion hóa ở detector khối phổ, dẫn đến phương trình hồi quy không tuyến tính; (2) hiệu chỉnh hiệu suất thu hồi do quá trình chiết mẫu không hoàn toàn. Tuy nhiên, qua các khảo sát về khoảng tuyến tính ($R^2 > 0,99$ cho cả hai chất) và hiệu suất thu hồi (trong khoảng từ 80 - 120% cho các nền mẫu khảo sát), chúng tôi nhận thấy rằng phương pháp này có thể chấp nhận được khi không sử dụng nội chuẩn đồng vị cho mục đích định lượng.

3.2. Khảo sát thể tích tiêm mẫu

EO là một hợp chất dễ bay hơi, khi phân tách trên cột sắc ký khí, sẽ xuất hiện ở vùng của các hợp chất hữu cơ dễ bay hơi, trong đó có sự hiện diện của acetonitrile. Do đó, trong nghiên cứu này kỹ thuật chia dòng (split) được sử dụng để tránh hiện tượng tạt dung môi quá nhiều đi vào cột phân tích. Bên cạnh đó, chúng tôi cũng tiến hành nghiên cứu thể tích tiêm khác nhau (0,5; 1 và 2 μL) để đảm bảo đạt được yêu cầu về mặt đối xứng peak, cũng như độ nhạy của phương pháp. Kết quả được trình bày như trong Hình 1.

Kết quả (Hình 1) cho thấy khi tiêm vào một thể tích lớn ở 2 μL , tạo ra thể tích hơi dung môi quá lớn nên peak bị bè rộng, hơi kéo đuôi ở EO và đổ đầu ở peak 2-CE, kết quả do các chất này bị giữ lại nhiều trên cổng tiêm (injector) trước khi hóa hơi đi vào đầu cột sắc ký khí. Khi giảm thể tích tiêm xuống còn 1 và 0,5 μL , độ đối xứng của cả 2 peak EO và 2-CE đã cải thiện đáng kể, peak đối xứng hơn và đảm bảo cho việc định lượng chính xác. Ngoài ra, khi tiêm 1 μL còn đảm bảo độ nhạy của thiết bị (diện tích của EO và 2-CE lớn hơn khi tiêm với 0,5 μL), giới hạn phát hiện cũng như giới hạn định lượng đáp ứng được các ngưỡng MRL qui định của các thị trường. Vì vậy kỹ thuật tiêm chia dòng (1 : 10) với thể tích tiêm 1 μL là phù hợp cho ứng dụng trong nghiên cứu này.



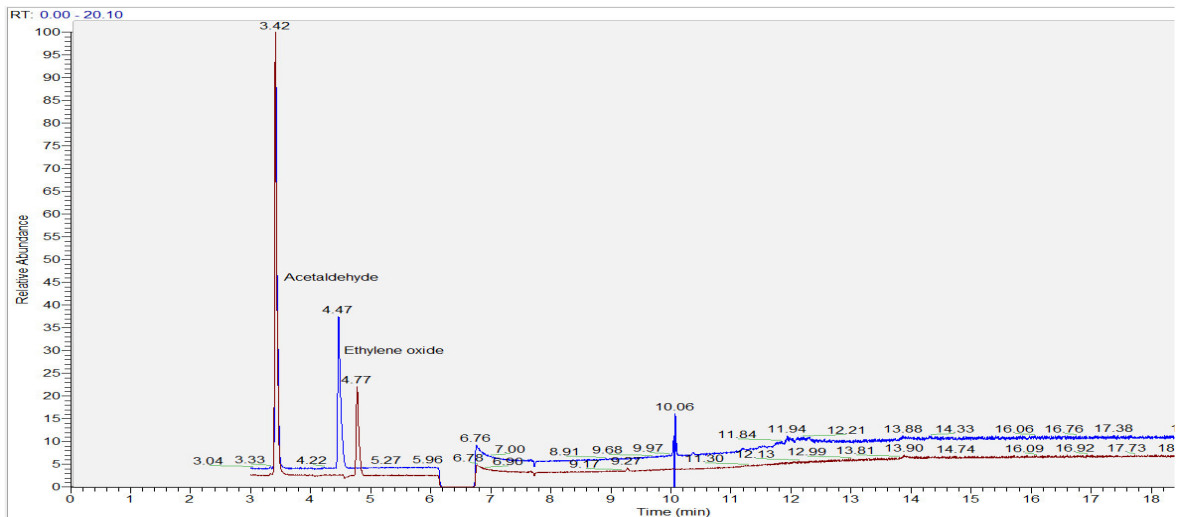
Hình 1. Sắc ký đồ của Ethylene oxide (4,77 phút) và 2-Chloroethanol (9,27 phút) của dung dịch chuẩn 100 µg/L khi tiêm với các thể tích khác nhau: 0,5 µL (màu đen), 1 µL (màu đỏ), và 2 µL (màu xanh lá)

Với các nghiên cứu đã công bố trên thế giới, công tiêm mẫu PTV hoặc MMI được ưu tiên sử dụng do khả năng tiêm mẫu thể tích lớn (2 - 4 µL) để đảm bảo độ nhạy của thiết bị. Tuy nhiên với kỹ thuật chiết mẫu QuEChERS, dung môi cuối cùng để định mức là ACN, một dung môi hữu cơ với thể tích giãn nở lớn, và có ảnh hưởng tiêu cực đến cột phân tích và sợi filament. Thông thường, đối với việc phân tích dư lượng thuốc trừ sâu bằng kỹ thuật QuEChERS và GC-MS/MS, dung dịch chiết mẫu sau cùng thường được thổi khô và định mức lại bằng ethyl acetate (dung môi phù hợp với hệ GC-MS/MS). Tuy nhiên, vì EO làm một hợp chất dễ bay hơi nên dung dịch chiết ACN sau cùng không thể thổi khô, mà phải tiêm trực tiếp vào hệ thống GC. Do đó, càng tiêm nhiều thể tích dung dịch mẫu, sẽ làm tăng độ nhạy của chất phân tích, nhưng sẽ làm giảm tuổi thọ của cột phân tích và sợi filament. Trong nghiên cứu này, hệ sắc ký khối phổ 3 tứ cực mới của Thermo (TSQ 9000) với cải tiến mới là nguồn AEI (Advanced Electron Ionization) với kỹ thuật ion hóa “mềm” ở 50 eV (thay vì 70 eV), giúp giữ lại nhiều hơn mảnh ion mẹ cho quá trình phân mảnh, làm tăng độ nhạy của thiết bị [14]. Chính vì vậy, chúng tôi có thể áp dụng kỹ thuật tiêm mẫu bằng kỹ thuật chia dòng 1 : 10 (thể tích tiêm 1 µL), nhằm đẩy hơi dung môi ACN ra khỏi hệ thống, nhưng vẫn đảm bảo phát hiện được EO và 2-CE ở nồng độ 0,01 mg/kg trên mẫu (Hình 2).

3.3. Khảo sát khả năng phân tách acetaldehyde và EO

Acetaldehyde (AA) là hợp chất hữu cơ với công thức hoá học là C_2H_4O , một đồng phân của EO, tồn tại phổ biến trong tự nhiên hay được sản xuất trong công nghiệp. Trong thực phẩm, đặc biệt là mè có chứa AA ở hàm lượng cao, dễ hình thành ở nhiệt độ cao từ EO hoặc 2-CE nên gây nhầm lẫn với EO khi phân tích trên sắc ký đồ. AA và EO thường có chung các ion mẹ và ion con trong điều kiện khối phổ hai lần ($44,1 > 29,1$), do đó việc tách biệt được 2 chất này trên cột sắc ký khí bằng thời gian lưu là điều kiện bắt buộc [6]. Trong điều kiện sắc ký, khối phổ đã trình bày ở Mục 2.2.2 và các thông số điều kiện chạy SRM (Bảng 3), hai hợp chất AA và EO đã được tách biệt và định danh từng chất (Hình 3).

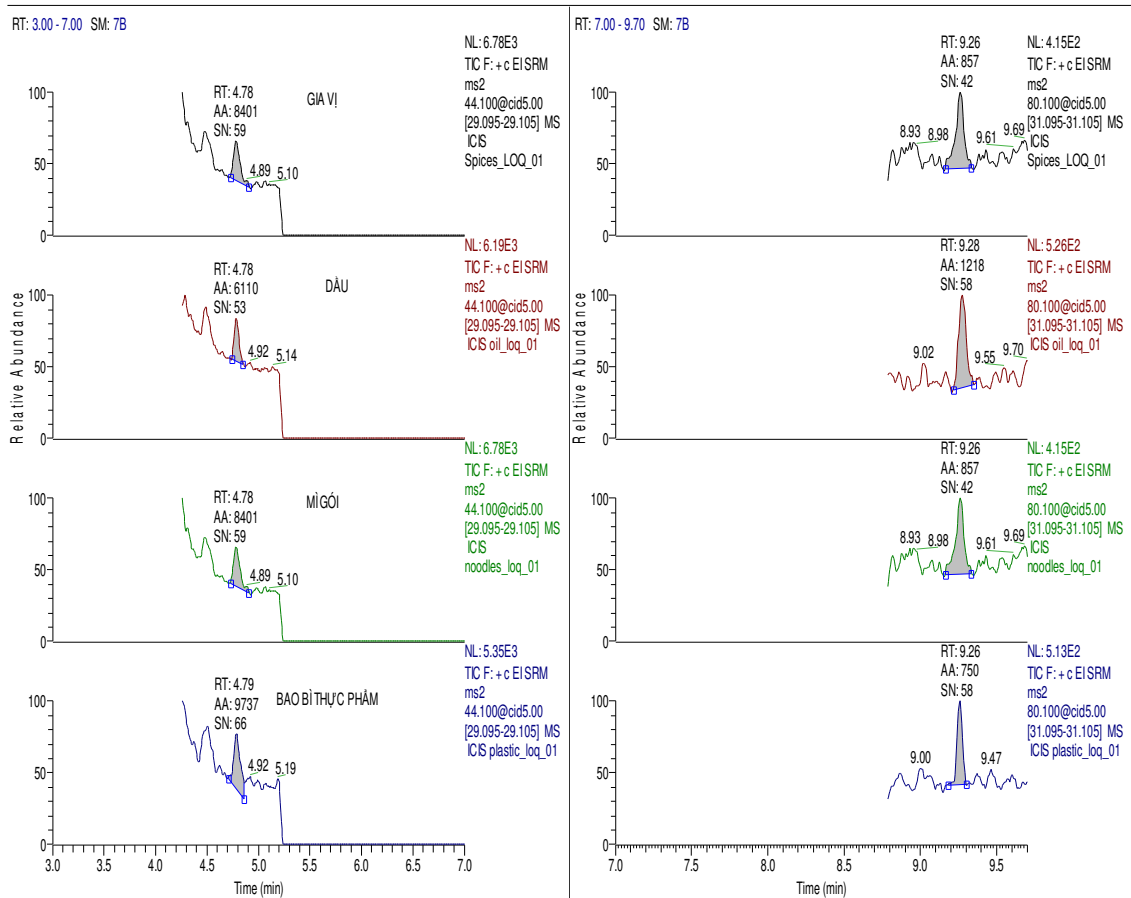
Xác định đồng thời ethylene oxide và 2-chloroethanol trong thực phẩm...



Hình 2. Độ chọn lọc của chuẩn acetaldehyde (4,47 phút) và ethylene oxide (4,77 phút)

d:\data_20221...\plastic_loq_01

11/05/21 02:04:53



Hình 3. Sắc ký đồ LOQ của các mẫu gia vị, dầu, mì gói, và bao bì thêm chuẩn tại nồng độ 0,01 mg/kg; EO (bên trái) và 2-CE (bên phải)

3.4. Khảo sát ảnh hưởng của nền mẫu

Tạp chất trong dung dịch chiết mẫu sau cùng ảnh hưởng rất lớn đến việc định lượng chất phân tích. Dung dịch chiết mẫu nếu không được làm sạch để loại bỏ các tạp chất có thể gây ra việc nhận danh sai (đối với sắc ký thường) hoặc làm tăng, giảm cường độ tín hiệu sắc ký của chất phân tích (đối với detector khối phổ), được biết đến là hiệu ứng nền (matrix effect, ME) [13]. Kết quả đánh giá hiệu ứng nền tương ứng với từng nền mẫu (Mục 2.3.3) được trình bày trong Bảng 4.

Kết quả tổng hợp trong Bảng 4 cho thấy ME của EO và 2-CE đều nằm trong khoảng 80 - 120% theo tiêu chuẩn của SANTE [13], cho thấy cả hai chất ít bị ảnh hưởng trên cả 04 nền mẫu. Vì vậy, chúng tôi sử dụng đường chuẩn dung dịch để định lượng cho cả EO và 2-CE cho cả 04 loại nền mẫu này. So với dụng đường chuẩn trên mẫu, đường chuẩn dung môi sẽ tiện hơn rất nhiều do giảm thời gian chuẩn bị đường chuẩn và áp dụng một đường chuẩn trên tất cả nền. Bên cạnh đó, khi mẫu phát hiện hàm lượng EO hoặc 2-CE vượt khoảng đường chuẩn, ta có thể pha loãng mẫu bằng dung môi ACN, hoàn toàn không ảnh hưởng đến kết quả định lượng so với việc xây dựng đường chuẩn trên mẫu. Riêng đối với nền mẫu mì, ME đối với EO và 2-CE lần lượt là 81,35 và 87,03%, tương đương với sai lệch do ảnh hưởng nền là gần 19 và 13%. Do đó, đối với các mẫu mì phát hiện ở gần điểm định lượng (8 - 12 µg/kg), cần phải xây dựng đường chuẩn trên dung dịch mẫu để đảm bảo kết quả chính xác hơn.

Bảng 4. Kết quả ME của EO và 2-CE trong các nền mẫu khảo sát

Loại mẫu	ME (%)	
	EO	2-CE
Gia vị	91,17	86,50
Dầu	91,21	108,76
Mì	81,35	87,03
Bao bì	82,66	97,04

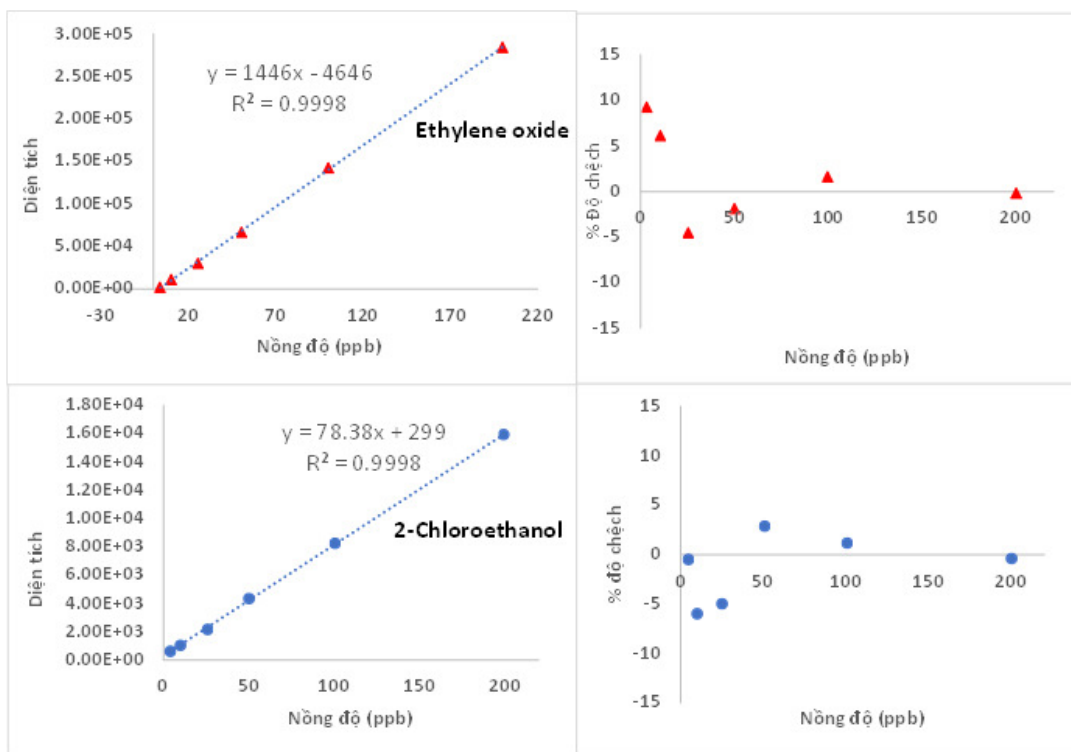
3.5. Thẩm định phương pháp

3.5.1. Đường chuẩn

Đường chuẩn được xây dựng trên chuẩn dung dịch gồm 6 điểm, có nồng độ nằm trong khoảng 4 - 200 µg/L cho phương trình hồi quy lần lượt là $Y = 1446X - 4646$ đối với EO, và $Y = 78.38X + 299$ đối với 2-CE (Hình 4). Hệ số tương quan (R^2) lần lượt là 0,9998 cho cả hai chất, cao hơn tiêu chuẩn 0,99 [13]. Bên cạnh đó, % độ chệch của từng điểm chuẩn đều nhỏ hơn 15% đối với cả 2 chất, đáp ứng với các tiêu chuẩn của đường chuẩn định lượng [15]. Do đó, thiết bị GC-MS/MS cho thấy khoảng tuyến tính tốt đối với cả hai chất trong khoảng nồng độ khảo sát, phù hợp cho mục đích định lượng.

3.5.2. Độ thu hồi, độ lặp lại, và độ tái lập

Các mẫu mì gói, gia vị, dầu, và bao bì được thêm chuẩn ở 3 nồng độ 0,01; 0,03; và 0,05 mg/kg nhằm đánh giá độ lặp lại (RSD_r , $n = 6$, 1 ngày), độ tái lập (RSD_R , $n = 12$, 2 ngày), và độ thu hồi (Recovery, $n = 12$, 2 ngày). Kết quả được trình bày trong Bảng 5.



Hình 4. Đường chuẩn (bên trái) và độ chệch của từng điểm chuẩn (bên phải) của Ethylene oxide (trên) và 2-Chloroethanol (dưới) pha trong dung môi acetonitrile ở 6 nồng độ 4, 10, 25, 50, 100 và 200 $\mu\text{g/L}$

Bảng 5. Kết quả độ thu hồi, độ lặp lại và độ tái lập

Mẫu	Chất phân tích	Nồng độ thêm mẫu (mg/kg)								
		0,01			0,03			0,05		
		Recovery (%)	RSD _r (%)	RSD _R (%)	Recovery (%)	RSD _r (%)	RSD _R (%)	Recovery (%)	RSD _r (%)	RSD _R (%)
Mì gói	EO	92,77	9,36	7,40	86,92	5,03	5,04	90,47	4,88	3,44
	2-CE	101,32	2,29	3,18	89,24	5,97	4,78	89,71	4,68	4,61
Gia vị	EO	89,90	7,10	7,60	88,47	2,62	3,46	93,38	3,73	2,94
	2-CE	94,50	4,60	6,90	91,36	3,84	3,87	92,72	3,92	3,11
Dầu	EO	94,15	11,15	9,27	90,88	4,40	4,82	89,09	2,94	3,06
	2-CE	103,51	5,75	5,22	90,41	3,68	4,18	89,48	1,14	2,11
Bao bì	EO	90,71	5,63	6,78	87,73	4,55	6,88	88,99	5,62	5,50
	2-CE	104,81	1,74	2,94	91,41	7,74	6,55	89,88	7,70	7,55

Ghi chú: Recovery, RSD_r, và RSD_R được tính với n lần lượt bằng 12, 6, và 12 (tương ứng)

Kết quả tại Bảng 5 cho thấy phương pháp có độ chụm cao (RSD_r và RSD_R đều nhỏ hơn 20%), và độ chính xác cao (hiệu suất thu hồi trong khoảng 80 - 120%) theo hướng dẫn của tiêu chuẩn SANTE/11945/2015 [13]. Việc này do phương pháp chiết mẫu QuEChERS với dung môi acetonitrile ($K_{ow} = -0,34$), phù hợp để chiết EO ($K_{ow} = -0,3$) và 2-CE ($K_{ow} = 0,14$) ra khỏi pha nước. Hơn nữa, bước làm sạch không có giai đoạn thổi khô dung môi, sẽ

hạn chế việc giảm nồng độ của EO (là một chất dễ bay hơi, nhiệt độ sôi 10,4°C, áp suất bay hơi 1,45 bar ở 20°C). Bên cạnh đó, trong nghiên cứu này chúng tôi chỉ sử dụng hỗn hợp ACN/nước với tỷ lệ 95/5 thay vì 1/1 như phương pháp EN 15662. Lý do là EO tan hoàn toàn trong nước và K_{ow} thấp (- 0,34) nên rất khó chuyển lên pha hữu cơ nếu tỷ lệ nước quá cao. Các khảo sát ban đầu của nhóm ở tỷ lệ 1/1 cho thấy hiệu suất thu hồi của EO rất thấp, thường nhỏ hơn 10%. Chính vì vậy, hỗn hợp ACN/nước với tỷ lệ 95/5 (v/v) được dùng làm dung môi chiết, đảm bảo cho việc hydrat hóa các mẫu khô ở giai đoạn chiết và chuyển pha dung môi cho EO ở giai đoạn tách pha.

3.5.3. Giới hạn định lượng (MQL)

Theo SANTE/11945/2015 [13], MQL là nồng độ nhỏ nhất của chất phân tích mà phương pháp có thể định lượng với độ lặp lại, độ tái lập nhỏ hơn 20%, hiệu suất thu hồi đạt từ 80 - 120%. Ngoài ra, phương pháp chỉ có ý nghĩa khi MQL bằng hoặc nhỏ hơn giới hạn tối đa cho phép được qui định bởi các tổ chức thế giới như FAO, EU. Theo kết quả trình bày ở phần 3.5.2, tại nồng độ 0,01 mg/kg, cả EO và 2-CE đều đáp ứng qui định này. Vậy MQL cho cả hai chất là 0,01 mg/kg, hoàn toàn đáp ứng yêu cầu với giới hạn dư lượng tối đa cho phép (MRL) của các thị trường được trình bày trong Bảng 1.

3.6. Kiểm soát dư lượng EO và 2-CE trong qui trình sản xuất mì gói

Kết quả phân tích 125 mẫu nguyên liệu, thành phẩm mì và thực phẩm khác (Bảng 6) do khách hàng gửi đến Trung tâm Dịch vụ phân tích thí nghiệm thành phố Hồ Chí Minh (CASE) cho thấy có 14 mẫu nguyên liệu phát hiện tổng ethylene oxide, chiếm tỷ lệ 88,8% (Bảng 7). Đa số các mẫu chỉ phát hiện 2-CE, chỉ có duy nhất một mẫu gia vị phát hiện đồng thời 2-CE và EO. Điều này cho thấy EO đã chuyển hóa hoàn toàn sang 2-CE trong quá trình bảo quản, và kết quả tổng EO đều vượt ngưỡng qui định 0,01 mg/kg của thị trường Châu Âu. Do đó, khả năng cao các sản phẩm mì gói nếu sử dụng các nguyên liệu này sẽ không đáp ứng được qui định về dư lượng tồn dư EO trong thực phẩm của châu Âu.

Bảng 6. Thống kê số lượng 125 mẫu theo nền mẫu đã phân tích dư lượng EO và 2-CE tại CASE trong năm 2021

Nền mẫu	Số lượng
Gia vị	54
Phụ gia thực phẩm	18
Dầu	13
Rau sấy	10
Bao bì	9
Nông sản	8
Bột mì	7
Mì gói	3
Thực phẩm sấy	2
Thực phẩm khác	1
Tổng	125

Bảng 7. Kết quả 14 mẫu nguyên liệu phát hiện tổng Ethylene oxide, trên tổng số 125 mẫu (tỷ lệ 11,2%)

Mã mẫu	Đối tượng mẫu	2-Chloroethanol (mg/kg)	Ethylene oxide (mg/kg)	Tổng Ethylene oxide* (mg/kg)
MM12109_00181	Rau sấy	0,987	-	0,539
MM12109_00182	Rau sấy	0,768	-	0,419
MM12109_00320	Gia vị	0,384	-	0,210
MM12109_00330	Gia vị	0,056	-	0,031
MM12109_00341	Gia vị	1,053	0,116	0,695
MM12109_00357	Dầu	0,101	-	0,056
MM12109_00362	Rau sấy	0,421	-	0,230
	Thực phẩm			
MM12109_00363	sấy	0,065	-	0,036
MM12109_00364	Rau sấy	0,103	-	0,056
MM12109_00365	Rau sấy	0,702	-	0,384
MM12109_00369	Bột mì	0,042	-	<LOQ
	Thực phẩm			
MM12109_00375	sấy	0,054	-	0,030
	Phụ gia thực			
MM12109_00420	phẩm	0,068	-	0,037
MM12109_00675	Rau sấy	0,103	-	0,057

(*): Tổng Ethylene oxide = EO + 0,55 x 2-CE

-: Không phát hiện

Xét theo nền mẫu, các sản phẩm sấy cho thấy tỷ lệ phát hiện rất cao như thực phẩm sấy là 100% (ruốc sấy và tôm sấy, 2/2 mẫu nhiễm), và rau sấy là 60% (6/10 mẫu nhiễm). Các mẫu này có thể đã được phun EO sau giai đoạn sấy khô nhằm kéo dài thời gian bảo quản sản phẩm. Các nền mẫu khác có tỷ lệ phát hiện nhỏ hơn 20%, lần lượt là 14,2% (bột mì), 7,7% (dầu), 6,3% (phụ gia thực phẩm), và 5,7% (gia vị). Trong nghiên cứu này, tỷ lệ mẫu dương tính với tổng EO là 11,2%, tương đối thấp so với các nghiên cứu trước đây, do số lượng mẫu chỉ tập trung vào nguyên liệu và thành phẩm của mì gói. Năm 1985, một cuộc điều tra về hàm lượng dư lượng EO trong thực phẩm của Đan Mạch đã được thực hiện cho thấy tỷ lệ nhiễm lên đến 47% (96/204 mẫu), với hàm lượng từ 0,05 đến 1800 mg/kg. Trong đó, hầu như các loại thực phẩm đều phát hiện dư lượng EO (thảo mộc và gia vị, sản phẩm sữa, sản phẩm cá, sản phẩm thịt, sản phẩm chứa gia vị, sản phẩm ca cao, và trà). Bên cạnh đó, theo trang cảnh báo an toàn về thực phẩm và thức ăn của cộng đồng Châu Âu, từ 09/2020 đến 08/2022 có 864 cảnh báo liên quan đến thực phẩm nhiễm EO vượt mức an toàn cho phép đến từ nhiều quốc gia trên thế giới [16]. Trong đó, riêng Việt Nam có 8 trường hợp bị cảnh báo, bao gồm gói rau sấy (3 trường hợp), mì gói thành phẩm (3), quế xay (1), và bột sữa dừa (1). Do đó, việc tăng cường kiểm soát dư lượng EO và 2-CE cần phải đẩy mạnh hơn nữa, nhằm đảm bảo an toàn sức khỏe cho người tiêu dùng.

4. KẾT LUẬN

Phương pháp xác định đồng thời EO và 2-CE trong thực phẩm (như gia vị bột, dầu, bao bì thực phẩm) bằng phương pháp QuEChERS kết hợp với kỹ thuật sắc ký khí ghép khối phổ ba tứ cực GC-MS/MS đã được nghiên cứu, tối ưu, phê duyệt và áp dụng thành công tại Trung tâm Dịch vụ Phân tích Thí nghiệm (CASE) trên các đối tượng gia vị, dầu, mì gói, và bao bì thực phẩm. Kết quả thẩm định đã chứng minh là phương pháp đáng tin cậy dựa trên hiệu suất thu hồi ở 3 nồng độ (0,01; 0,03; và 0,05 mg/kg) tương ứng khoảng 80 - 120% với độ lặp lại và độ tái lập thấp hơn 20%, đồng thời cũng đưa ra kết luận khả năng không ảnh hưởng của acetaldehyde trong điều kiện phân tích này. Phương pháp này có triển vọng áp dụng thành công trên các nền mẫu khác như rau củ quả, trái cây, và các nền thực phẩm khác để phục vụ cho kiểm định đánh giá giới hạn cho phép EO và 2-CE ở mức an toàn thực phẩm tại Việt Nam cũng như xuất khẩu sang các thị trường nước ngoài.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. M. Floor, P. V. Massey, and E. S. Branch, "ARCHIVED-Canadian Environmental Protection Act, 1999: Priority Substances List Assessment Report: 2-Butoxyethanol," 1999.
- [2]. World Health Organization International Agency for Research on Cancer IARC, "1, 3-Butadiene, Ethylene Oxide and Vinyl Halides (Vinyl Fluoride, Vinyl Chloride and Vinyl Bromide)," vol. 97, 2008.
- [3]. M. J. Vincent, J. S. Kozal, W. J. Thompson, A. Maier, G. S. Dotson, E. A. Best, and K. A. Mundt, "Ethylene oxide: Cancer evidence integration and dose-response implications," *Dose Response*, vol. 17, no. 4, 2019.
- [4]. K. G. Jensen, "Determination of ethylene oxide residues in processed food products by gas-liquid chromatography after derivatization," *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, vol. 187, no. 6, pp. 535-540, 1988.
- [5]. F. Tateo and M. Bononi, "Determination of ethylene chlorohydrin as marker of spices fumigation with ethylene oxide," *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 19, no. 1, pp. 83-87, 2006.
- [6]. EURL-SRM - Analytical Observations Report, "Analysis of Ethylene Oxide and its Metabolite 2-Chloroethanol by the QuOil or the QuEChERS Method and GC-MS/MS (Version 1.1)," 2020.
- [7]. T. Bessaire, T. Stroheker, B. Eriksen, C. Mujahid, Y-A. Hammel, J. Varela, T. Delatour, A. Panchaud, P. Mottier, R. H. Stadler, "Analysis of ethylene oxide in ice creams manufactured with contaminated carob bean gum (E410)," *Food Additives & Contaminants: Part A*, vol. 38, no. 12, pp. 2116-2127, 2021.
- [8]. M. Stupák, F. Maria, V. Kocourek, and J. Hajšlová, "Gas Chromatography Tandem Mass Spectrometry Analysis of Ethylene Oxide: An Emerged Contaminant in Seeds and Spices," *Advances in Food and Beverage Analysis*, vol. 34, 2021.
- [9]. Food Safety Management Authority of HCM City. (18/07/2022). Useful information of Ethylene oxide. Available: <http://bqlattp.hochiminhcity.gov.vn/ArticleDetail.aspx?NewsID=4044>

- [10]. EC 396/2015. (18/07/2022). *Maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC*. Available: https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/mrls/?event=details&pest_res_ids=91&product_ids=&v=1&e=search.pr
- [11]. Health Canada Pest Management Regulatory Agency, "Proposed Maximum Residue Limit Ethylene Oxide," PMRL2019-29, 2019.
- [12]. EPA, "Ethylene Oxide (EtO) - Draft Human Health and Ecological Risk Assessment in Support of Registration Review," 2020.
- [13]. European Commission - SANTE/11945/2015, "Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed," 2015.
- [14]. Thermo Scientific, "TSQ 9000 triple quadrupole GC-MS/MS system, product specifications," 2018.
- [15]. DA, "Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation," 2013.
- [16]. RASFF. (01/09/2022), The Rapid Alert System for Food and Feed, 2022. Available: https://food.ec.europa.eu/safety/rasff-food-and-feed-safety-alerts_en

Determination of ethylene oxide and 2-chloroethanol in food by triple quadrupole GC-MS/MS, combined with QuEChERS extraction

Nguyen-Nu Duong-Nguyen^{1,2}, Van-Nhan Truong, Thanh-Tam Le¹,
Thanh-Duy Nguyen¹, Tuan-Kiet Ly¹, Van-Dong Nguyen²

¹Center of analytical services and experimentation HCMC, Ho Chi Minh, Vietnam

²University of Science - VNUHCM, Ho Chi Minh, Vietnam

Abstract

In this study, ethylene oxide (EO), a fumigant for agricultural products, and its metabolite (2-chloroethanol, 2-CE), were extracted by QuEChERS method, and then quantified by GC-MS/MS system. Samples were extracted with acetonitrile, and cleaned up with a mixture of dispersive solid phase extraction (d-SPE), including MgSO₄, PSA, C18 and GCB, within less than 20 min. The method has been validated on spices, oils, noodle, and food packaging. The results show that this method was high accuracy and precision at spike concentrations, with recovery ranged from 80 to 120%, and RSD lower than 20%. The limit of quantification was 0.01 mg/kg for both compounds, meeting the European (EU) maximum residue limit (MRL) at 0.01 mg/kg. This method has been applied to control the production of instant noodles, with 125 samples of ingredients (seasoning, dried vegetables, oil, flour, food packaging), instant noodles and other food. Among them, 13 ingredients detected 2-CE, and 1 spice detected both compounds, accounting for 11.2%. All 14 samples exceeded the EU MRL.

Keywords: Ethylene oxide (EO), 2-chloroethanol (2-CE), GC-MS/MS, QuEChERS, d-SPE.