

XÁC ĐỊNH ĐỒNG THỜI NHÓM ACID BÉO 2-CHLORO-1,3-PROPANDIOL (2-MCPD), 3-CHLORO-1,2-PROPANDIOL (3-MCPD) VÀ GLYCIDOL TRONG DẦU THỰC VẬT BẰNG SẮC KÝ KHÍ G HÉP KHỐI PHỔ GC-MS/MS

Lê Thanh Tâm, Nguyễn Thành Duy*, Lý Tuấn Kiệt, Phú Minh Tấn,
Nguyễn Quốc Hùng, Chu Văn Hải

Trung tâm dịch vụ phân tích thí nghiệm Tp. Hồ Chí Minh

(Ngày đến tòa soạn: 2/7/2019; Ngày sửa bài sau phản biện: 17/9/2019;

Ngày chấp nhận đăng: 27/9/2019)

Tóm tắt

Trong những năm gần đây, một số chất gây ô nhiễm thực phẩm như 3-chloro-1,2-propanediol (3-MCPD) và ester acid béo 3-MCPD đã được tìm thấy trong nhiều loại thực phẩm. Trong đó, một lượng đáng kể các hợp chất acid béo 2-chloro-1,3-propanediol (2-MCPD) đã được phát hiện trong các loại dầu tinh chế.

Kỹ thuật sắc ký khí ghép khối phổ được sử dụng để định lượng các acid béo dạng ester bao gồm 2-Chloro-1,3-propandiol (2-MCPD), 3-Chloro-1,2-propandiol (3-MCPD) và glycidol trong dầu. Mẫu được chuẩn bị bằng cách sử dụng các nội chuẩn bao gồm 3-MCPD-ester-d5 (rac 1,2-bis-palmitoyl-3-chloropropanediol-d5), 2-MCPD-ester-d5 (1,3-Distearoyl-2-chloropropanediol-d5) và Glycidyl stearate-d5, tiến hành 2 bước ủ mẫu bằng dung dịch NaBr/H₂SO₄ và H₂SO₄/MeOH, trích ly với dung môi ethyl acetate, n-hexan để chuyển đổi Glycidyl ester thành MCPD và glycidol dạng tự do trong mẫu trước khi sử dụng dẫn xuất phenylboronic acid. Giới hạn định lượng là 0,1 mg/kg tương ứng, hiệu suất thu hồi ở nồng độ 0,1 mg/kg khoảng 80 - 120% với độ lặp lại và độ tái lập thấp hơn 10%.

Từ khóa: 2-Chloro-1,3-propandiol (2-MCPD), 3-Chloro-1,2-propandiol (3-MCPD), glycidol, phenylboronic acid, sắc ký khí ghép khối phổ GC-MS/MS.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

3-MCPD là chất gây ô nhiễm phổ biến nhất trong nhóm các chất chloropropanos. Đầu tiên được xác định là một chất gây ô nhiễm của protein thực vật thủy phân acid và nước tương, sau đó 3-MCPD đã được tìm thấy trong các thực phẩm khác. 3-MCPD và các ester của nó có thể được tạo thành trong các thực phẩm chứa chất béo được xử lý nhiệt từ glycerol hoặc acyl glyceride với sự có mặt của các ion clorua. 3-MCPD và Glycidyl Ester (GE) chủ yếu được tìm thấy trong chất béo, dầu tinh chế và thực phẩm có chứa chất béo. Ban đầu, người ta cho rằng các ester 3-MCPD và GE được hình thành bởi các quá trình tương tự, nhưng giờ đây người ta đã biết rằng cơ chế hình thành của chúng là khác nhau [6]. Cả hai chất 3-MCPD and glycidol là 2 chất thuộc nhóm 2A theo cơ quan nghiên cứu quốc tế về ung thư (IARC), là nhóm có khả năng gây ung thư cho con người [4]. Theo quy định của Ủy ban Châu Âu (Commission Regulation (EU) 2018/290) giới hạn tối đa cho phép của glycidol là 0,5 mg/kg trong mẫu dầu thực vật và chất béo dành cho sản xuất thực phẩm trẻ em và thực phẩm chế biến từ ngũ cốc cho trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã xây dựng quy trình xác định đồng thời các ester acid béo của 2-Chloro-1,3-propandiol (2-MCPD), 3-Chloro-1,2-propandiol (3-MCPD) và glycidol trong dầu bằng phương pháp sắc ký khí ghép khối phổ GC-MS/MS.

*Điện thoại: 0909610128 Email: duynt@case.vn



2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Mẫu dầu thực vật được phân tích từ khách hàng tại trung tâm dịch vụ phân tích thí nghiệm TPHCM.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thiết bị, dụng cụ, hóa chất

2.2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

- Thiết bị sử dụng là detector khối phổ TSQ 8000 Triplequad của hãng Thermo Scientific;
- Cột phân tích DB-5 MS 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m;
- Các dụng cụ và thiết bị phụ trợ khác trong phòng thí nghiệm.

2.2.1.2. Hóa chất

- Nước cất 2 lần loại ion, methanol, n-hexan, ethyl acetat, isooctan, tetrahydrofuran, diethyl ether, toluen, tert-butyl methyl ether (tBME), muối natri hydrocacbonat > 99%, sulphuric acid > 95%, muối natri sulfat khan > 99%, amoni sunfat > 99%, muối kali bromua > 99%, phenylboronic acid (PBA) > 99% của Merck hoặc tương đương.

- Chuẩn rac-1,3-Distearoyl-2-chloropropanediol (2-MCPD ester) \geq 97% (Product No.: D493510. Lot No.: 3-DTS-17-3) được cung cấp bởi TRC.

- Chuẩn rac 1,2-Bis-palmitoyl-3-chloropropanediol (3-MCPD ester) \geq 98% (Product No.: B515200. Lot No.: 1-EJB-84-1) được cung cấp bởi TRC.

- Chuẩn glycidyl Stearate (3-MBPD ester) \geq 96% (Product No.: G615985 Lot No.: 2-JLW-104-1) được cung cấp bởi TRC.

- Nội chuẩn 1,3-Distearoyl-2-chloropropanediol-d5 \geq 98% (Product No.: D493512. Lot No.: 10-MP-99-3) được cung cấp bởi TRC.

- Nội chuẩn rac 1,2-Bis-palmitoyl-3-chloropropanediol-d5 \geq 98% (Product No.: B515202. Lot No.: 3-ALN-28-3) được cung cấp bởi TRC.

- Nội chuẩn Glycidyl Stearate-d5 \geq 98% (Product No.: G615988. Lot No.: 4-JES-24-1) được cung cấp bởi TRC.

2.2.2. Tiến hành

2.2.2.1. Chuẩn bị chất chuẩn

Dung dịch chuẩn gốc nồng độ 100 ppm (mg/L) trong dung môi toluen, được lưu trữ nhiệt độ < -18°C.

Dung dịch nội chuẩn gốc nồng độ 100 ppm (mg/L) trong dung môi toluen, được lưu trữ nhiệt độ < -18°C.

Dung dịch chuẩn trung gian hỗn hợp (2-MCPD, 3-MCPD và 3-MBPD) nồng độ 1,0 và 10 ppm (mg/L) được pha từ các chuẩn gốc trong dung môi toluen, được lưu trữ nhiệt độ < -18°C, được sử dụng để xây dựng đường chuẩn.

Dung dịch nội chuẩn trung gian hỗn hợp (2-MCPD-d5, 3-MCPD-d5 và 3-MBPD-d5) nồng độ 1,0 ppm (mg/L) được pha từ các nội chuẩn gốc trong dung môi toluen, được lưu trữ nhiệt độ < -18°C, được sử dụng để xây dựng đường chuẩn.

Xây dựng các điểm chuẩn hỗn hợp 0,1 ppm, 0,5 ppm, 1,0 ppm, 1,5 ppm, 2,0 ppm có sử dụng nội chuẩn hỗn hợp ở nồng độ 0,1 ppm trong các dung dịch chuẩn.

2.2.2.2. Chuẩn bị các dung dịch

Dung dịch muối kali bromua đã acid hóa (3mg/ml): Cân 1g muối kali bromua cho vào bình định mức 10 ml, định mức đến vạch bằng nước cất. Chuyển 0,18 ml dung dịch sang bình định mức 10 ml. Thêm 5,5 ml nước 2 lần loại ion và sau đó thêm 0,3 ml sulphuric acid, lắc mạnh.

Dung dịch muối natri hydrocacbonat (0,6%, v/v): Cân 0,6 g muối natri hydrocacbonat trong bình định mức 100 ml và định mức đến vạch bằng nước cất. Sử dụng bồn siêu âm để đảm bảo sự hòa tan hoàn toàn của thuốc thử.

Dung dịch sulphuric acid/methanol (1,8% v/v): Lấy 50 ml methanol vào bình định mức 100 ml, thêm vào 1,8 ml sulphuric acid và định mức đến vạch bằng bằng methanol.

Dung dịch muối amoni sunfat: Cân 20 g amoni sunfat cho vào bình định mức 50 ml và định mức đến vạch bằng nước cất. Sử dụng bồn siêu âm để đảm bảo hòa tan thuốc thử.

Dung dịch phenylboronic acid (PBA): Hòa tan 0,4 g phenylboronic acid (PBA) trong 10 ml diethyl ether. Lắc mạnh.

2.2.2.3. Xử lý mẫu

Mẫu dầu: Cân khoảng 0,1 g mẫu, thêm 0,05 ml nội chuẩn 1 ppm, thêm 2 ml dung môi tetrahydrofuran, lắc 1 phút.

Quá trình chuyển đổi: Thêm 0,03 ml dung dịch muối kali bromua đã acid hóa vào mẫu, lắc mạnh và ủ hỗn hợp ở 50°C trong 15 phút. Dừng lại phản ứng bằng cách thêm 3 ml dung dịch muối natri hydrocacbonat (0,6%, v/v). Dầu mỡ được tách ra khỏi pha nước bằng cách thêm 2 ml hexan và lắc mạnh. Sau khi tách hai pha, chuyển lớp trên vào một ống nghiệm khác và bay hơi đến khô dưới nitơ dòng (ở 40°C). Hòa tan cặn bằng 1 ml tetrahydrofuran khan.

Quá trình ester hóa acid: Thêm 1,8 ml dung dịch sulphuric acid/methanol (1,8% v/v) vào mẫu và lắc mạnh trong 10 giây. Đậy kín nắp ống nghiệm và ủ hỗn hợp ở 40°C trong 16 giờ. Sau thời gian ủ, sự phân tách ester dừng lại bằng cách thêm 0,5 ml dung dịch muối natri hydrocacbonat bão hòa vào mẫu. Lắc trong 10 giây. Làm bay hơi dung môi hữu cơ (methanol) của hỗn hợp dưới dòng nitơ ở 40°C.

Quá trình loại béo: Thêm 1,3 ml dung dịch amoni sunfat vào mẫu, lắc 10 giây. Thêm 1 ml n-hexan và lắc trong 10 giây. Loại bỏ pha trên có chứa các methyl ester của acid béo hòa tan trong n-hexan bằng cách sử dụng pipet pasteur. Lặp lại bước này với 1 ml n-hexan khác.

Quá trình chiết bằng ethylacetat: Chiết 2 và 3-MCPD tự do, 3-MBPD từ pha nước với 0,6 ml ethyl acetat 3 lần, lắc mỗi lần trong 10 giây và chuyển các lớp trên sang một ống nghiệm thủy tinh khác có chứa một lượng nhỏ natri sunfat khan dạng hạt.

Quá trình dẫn xuất: Thêm 0,15 ml thuốc thử dẫn xuất phenylboronic acid (PBA) vào dung môi hữu cơ (1,8 ml ethyl acetat), lắc trong 15 giây và ủ trong bể siêu âm trong 5 phút. Đến khi hoàn thành phản ứng dẫn xuất, làm bay hơi các chất chiết xuất đến khô ở 40°C dưới dòng nitơ thấp.

Phân tích trên thiết bị GC-MS/MS: Hòa tan cặn trong 0,5 ml isoctan bằng cách lắc hỗn hợp trong 10 giây, ly tâm 3500 vòng/phút và chuyển phần nổi phía trên sang một lọ và phân tích trên thiết bị GC-MS/MS.

2.2.2.4. Điều kiện sắc ký

Để xây dựng quy trình phân tích đồng thời 2-Chloro-1,3-propandiol (2-MCPD), 3-Chloro-1,2-propandiol (3-MCPD) và glycidol, các điều kiện sắc ký dưới đây đã được sử dụng:

- Cột DB-5MS 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm.
- Tốc độ dòng pha động: 1,2 mL/phút.



- Chu trình nhiệt độ: 85°C (giữ 0,5 phút) tăng 8,5°C/phút đến 150°C, tăng 12°C/phút đến 180°C, tăng 25°C/phút đến 300°C (giữ 5 phút).

- Thể tích tiêm mẫu: 2µL

- Thông số detector MS: Các thông số SRM (Selected Reaction Monitoring) khảo sát cho các hợp chất được liệt kê trong bảng 1.

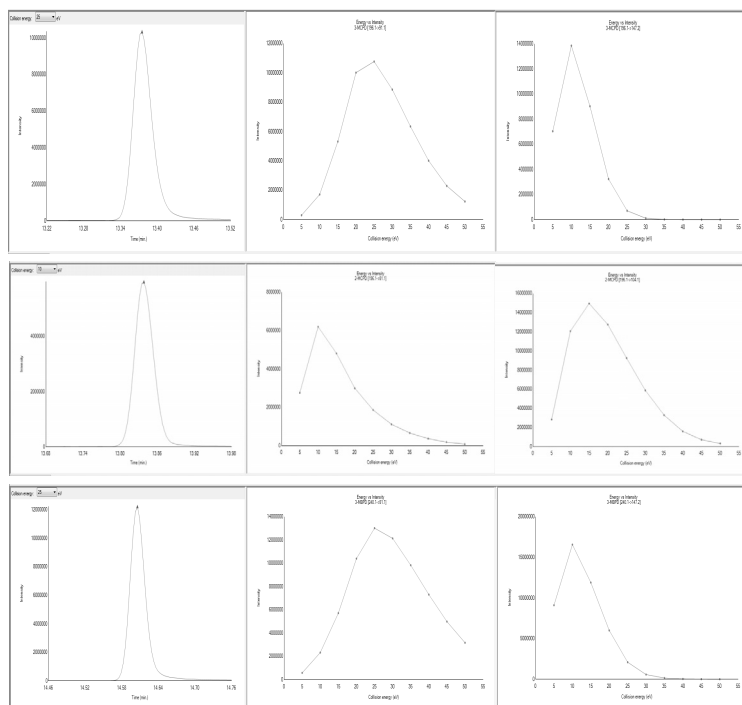
Bảng 1. Các thông số khối phổ ở chế độ SRM

Peak	Component Name	t _R (min)	Q1 ion (m/z)	Q3 ion (m/z)	CE (V)*
1	3-MCPD-d5 ester	13,31	201,2	93,1	25
	3-MCPD-d5 ester	13,31	201,2	150,2	10
2	3-MCPD ester	13,37	196,1	91,1	25
	3-MCPD ester	13,37	196,1	104,2	10
3	2-MCPD-d5 ester	13,78	201,2	93,1	10
	2-MCPD-d5 ester	13,78	201,2	107,1	10
4	2-MCPD ester	13,83	196,1	91,1	10
	2-MCPD ester	13,83	196,1	104,1	15
5	3-MBPD-d5 ester	14,56	245,1	93,1	25
	3-MBPD-d5 ester	14,56	245,1	150,2	10
6	3-MBPD ester	14,61	240,1	91,1	25
	3-MBPD ester	14,61	240,1	147,2	10

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

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

Qua tham khảo các tài liệu [1], [2], [3], và khảo sát tại phòng thí nghiệm, chúng tôi dùng dung dịch chuẩn 1,0 ppm để tìm các thông số tối ưu cho khối phổ ở chế độ phân mảnh ion MS/MS như tìm ion mẹ, ion con, năng lượng va chạm. Sau khi thực hiện ta có thông số detector khối phổ được thiết lập theo bảng 1.



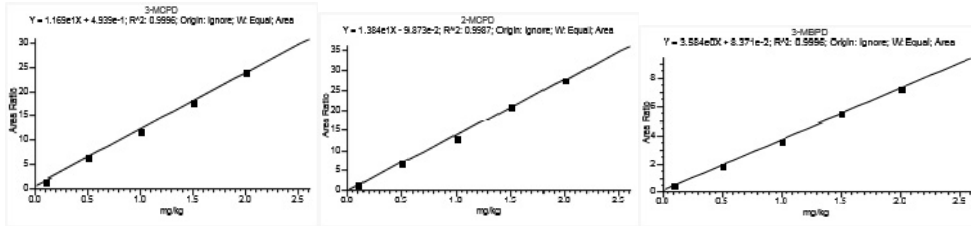
Hình 1. Sắc ký đồ tối ưu và lựa chọn các thông số detector khối phổ

Từ kết quả khảo sát trên, chúng tôi lựa chọn điều kiện xử lý mẫu tại mục 2.2.2.2 và điều kiện sắc ký tại mục 2.2.2.3 để thẩm định 2-Chloro-1,3-propandi-ol (2-MCPD), 3-Chloro-1,2-propandi-ol (3-MCPD) và glycidol trong dầu.

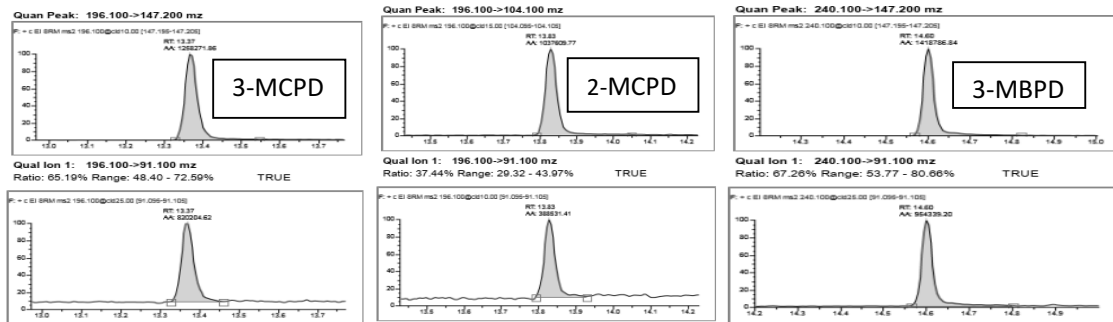
3.2. Thẩm định phương pháp

3.2.1. Đường chuẩn

Đường chuẩn được xây dựng trên mẫu dựa vào các điểm có nồng độ nằm trong khoảng 0,1 - 2 ppm



Hình 2. Đường chuẩn 3-MCPD, 2-MCPD và 3-MBPD



Hình 3. Sắc ký đồ chuẩn 3-MCPD, 2-MCPD và 3-MBPD

3.2.2. Độ thu hồi, độ lặp lại, độ tái lập và độ không đảm bảo đo

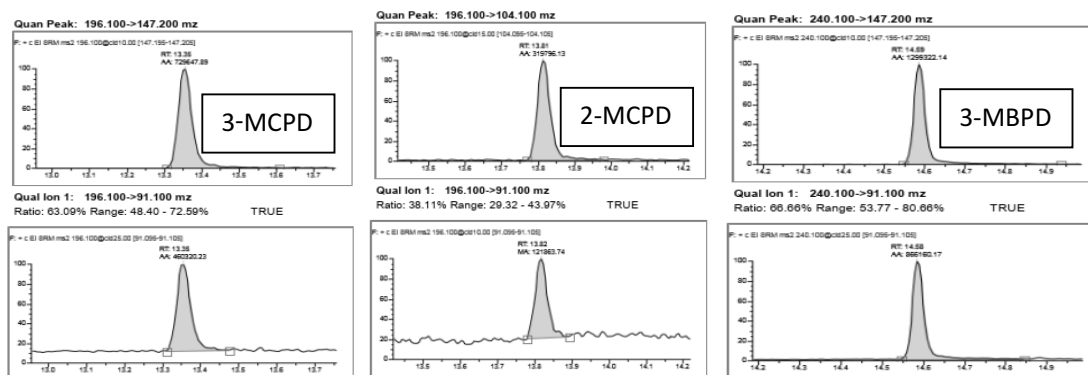
Độ lặp lại của phương pháp được thể hiện thông qua độ lệch chuẩn lặp lại (RSD_r), còn độ tái lập được đánh giá thông qua độ lệch chuẩn tái lập (RSD_R) của các kết quả nghiên cứu ở hai ngày thực hiện phân tích khác nhau.

Bảng 2. Kết quả độ thu hồi, độ lặp lại và độ tái lập, độ không đảm bảo đo

Chất phân tích	Nồng độ thêm mẫu (mg/kg)	Recovery (%) n = 12	RSD_r (%) n = 6	RSD_R (%) n = 12	Độ không đảm bảo đo U_{exp} (%)
3-MCPD	0,1	80 - 120 %	14,0	12,7	25,86
2-MCPD	0,1	90 - 110 %	4,5	5,1	10,89
3-MBPD	0,1	90 - 120 %	10,2	10,9	24,81

3.2.3. Giới hạn định lượng

Theo SANCO/12571/2013 [5], MQL là nồng độ thêm chuẩn ở nồng độ nhỏ nhất mà phương pháp có thể xác định với độ lặp lại, độ tái lập nhỏ hơn 20%, hiệu suất thu hồi đạt từ 80 - 120%, phương pháp có ý nghĩa khi MQL nên bằng hoặc nhỏ hơn giới hạn chất cấm nhỏ nhất cho phép. Trong phần nghiên cứu này, mẫu dầu không có chất phân tích thêm chuẩn ở nồng độ 0,1 ppm để xác định giá trị MQL. Kết quả phân tích thu được tất cả các chất đều có hiệu suất thu hồi trên 80%, độ tái lập nhỏ hơn 20%. Như vậy, MQL của phương pháp đối với nền mẫu dầu là 0,1 ppm.



Hình 4. Sắc ký đồ giới hạn định lượng MQL 3-MCPD, 2-MCPD và 3-MBPD

3.3. Ứng dụng phân tích mẫu dầu thực vật tại trung tâm dịch vụ phân tích TPHCM

Sau khi thẩm định, phương pháp phân tích được áp dụng để phân tích 2-Chloro-1,3-propandiol (2-MCPD), 3-Chloro-1,2-propandiol (3-MCPD) và glycidol trong dầu thực vật. Kết quả 22 mẫu dầu thực vật (04-08/2019) đa số phát hiện thấy cả 3 chất với hàm lượng rất lớn: hàm lượng 3-Chloro-1,2-propandiol (3-MCPD) từ 1,5 - 16 mg/kg, hàm lượng 2-Chloro-1,3-propandiol (2-MCPD) từ 0,4 - 9,4 mg/kg và hàm lượng glycidol từ 1,2 - 39 mg/kg.

4. KẾT LUẬN

Phương pháp xác định đồng thời các ester acid béo của 2-Chloro-1,3-propandiol (2-MCPD), 3-Chloro-1,2-propandiol (3-MCPD) và glycidol trong dầu bằng phương pháp sắc ký khí ghép khối phổ GC-MS/MS. Định lượng các chất phân tích được thực hiện bằng cách sử dụng 3-MCPD-ester-d5 (rac 1,2-bis-palmitoyl-3-chloropropanediol-d5), 2-MCPD-ester-d5 (1,3-Distearoyl-2-chloropropanediol-d5) và Glycidyl stearate-d5 làm chất nội chuẩn. Kết quả được thể hiện dưới dạng tự do các dạng 2-MCPD, 3-MCPD và glycidol với giới hạn định lượng MQL = 0,1 mg/kg.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Tiêu chuẩn quốc gia TCVN 12081-1:2017 (ISO 18363-1:2015) về Dầu mỡ động vật và thực vật.
2. European Food Safety Authority (EFSA) 2015: EN-779.
3. Stefanka Bratinova Gerhard Buttinger Lubomir Karasek, "Determination of the MCPD fatty acid esters and glycidyl fatty acid esters in food", Report on the collaborative trial organised by the EURL-PAH and Process Contaminants, EUR 29109 EN; Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2018, ISBN 978-92-79- 79386-8.
4. Jenny Aasa , Efstathios Vryonidis , Lilianne Abramsson-Zetterberg and Margareta Törnqvist, "Internal Doses of Glycidol in Children and Estimation of Associated Cancer Risk", Department of Environmental Science and Analytical Chemistry, Stockholm University, 106 91 Stockholm, Sweden, 2019.
5. Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed, SANCO/12571/2013 (2014).
6. FEDIOL Q&A on 2- and 3-MCPD and Their Esters and Glycidyl Esters, Brussels, 15 March 2017 16SAF083.
7. AOAC SMPR® 2017.017- Standard Method Performance Requirements (SMPRs®) for Determination of 2- and 3-MCPD, 2- and 3-MCPD Esters, and Glycidyl Esters in Infant and Adult/Pediatric Nutritional Formula.

*Summary***SIMULTANEOUS DETERMINATION OF FATTY ACID ESTERS
2-CHLORO-1, 3-PROPANDIOL(2-MCPD), 3-CHLORO-1,2-PROPANDIOL(3-MCPD)
AND GLYCIDOL IN VEGETABLE OILS BY GAS CHROMATOGRAPHY
MASS SPECTROMETRY GC-MS/MS**

Le T. Tam, Nguyen T. Duy, Phu M. Tan, Ly T. Kiet, Chu V. Hai

Center of analytical services and experimentation of Ho Chi Minh City

The food contaminants including 3-chloro-1,2-propanediol (3-MCPD) and 3-MCPD fatty acid esters have been a matter of great concern in the past few years due to their toxicity and their occurrence in numerous foods. Recently, significant amounts of the isomeric compounds 2-chloro-1,3-propanediol (2-MCPD) fatty acid esters have been detected in refined oil samples.

Gas Chromatography (GC) coupled with mass spectroscopy (MS) was used for the quantification of fatty acid esters of 2-Chloro-1,3-propandiol (2-MCPD), 3-Chloro-1,2-propandiol (3-MCPD) and glycidol in oil. Internal standards including 3-MCPD-ester-d5 (rac 1,2-bis-palmitoyl-3-chloropropanediol-d5), 2-MCPD-ester-d5 (1,3-Distearoyl-2-chloropropanediol-d5) and Glycidyl stearate-d5 were added to samples. Spiked samples were, then, incubated in NaBr/H₂SO₄ and H₂SO₄/MeOH solutions. They were, eventually, extracted with ethyl acetate and n-hexane solvents in order to convert Glycidyl esters to free MCPD and glycidol in samples before using phenylboronic acid derivative. The limit of quantitation was of 0.1 ppm (mg/kg). The recoveries at the concentration of 0.1 mg/kg ranged from 80 to 120% and the repeatability and reproducibility were less than 10%.

Keywords: *2-Chloro-1,3-propandiol (2-MCPD), 3-Chloro-1,2-propandiol (3-MCPD), glycidol, phenylboronic acid, gas chromatography mass spectrometry.*