

Xây dựng phương pháp sàng lọc một số chất tồn dư và ô nhiễm trong gạo

Đặng Thu Hiền*, Kiều Thị Lan Phương, Đỗ Thị Thu Hằng

Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm Quốc gia, Hà Nội, Việt Nam

(Ngày đến tòa soạn: 29/09/2022; Ngày chấp nhận đăng: 27/12/2022)

Tóm tắt

Phương pháp sắc ký lỏng khối phổ phân giải cao (LC-HRMS) được sử dụng để sàng lọc một số chất tồn dư và ô nhiễm trong gạo. Phương pháp được tối ưu để phát hiện các hóa chất bảo vệ thực vật (HCBVTV), các chất hoạt động bề mặt amoni bậc 4 của Clo, aflatoxin B1, aflatoxin B2, aflatoxin G1, aflatoxin G2. Mẫu gạo được chiết và làm sạch theo phương pháp QuEChERS và phân tích trên hệ thống Q-Exactive, nguồn ion hóa HESI với cả chế độ âm và dương. Cột tách sử dụng cột pha đảo C₁₈, pha động gồm H₂O và Methanol có chứa acid formic 0,1%, amoni format 10 mM. Phương pháp được ứng dụng để phân tích 60 mẫu gạo được lấy trên địa bàn thành phố Hà Nội, kết quả phát hiện 5 loại HCBVTV trong 30 mẫu gạo với hàm lượng từ 10,3 - 160 µg/kg.

Từ khóa: LC-HRMS, HCBVTV, Aflatoxin, chất hoạt động bề mặt amoni bậc 4, QuEChERS, gạo.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay gạo trở thành nông sản xuất khẩu quan trọng trong nền kinh tế nước ta, với diện tích sản xuất lúa xếp hạng 5 và xuất khẩu gạo đứng thứ 2 trên thế giới. Lúa gạo còn là nguồn lương thực chính của đại đa số người dân Việt Nam. Tuy nhiên, giống các loại lương thực và thực phẩm khác trong quá trình trồng cấy, thu hoạch và bảo quản, gạo cũng có nguy cơ nhiễm các chất như hóa chất bảo vệ thực vật (HCBVTV), độc tố vi nấm, các hóa chất bảo quản...

Để tăng sản lượng lúa gạo ngoài việc sử dụng các giống lúa mới, kỹ thuật canh tác, phân bón... còn phải kể đến việc sử dụng hóa chất bảo vệ thực vật để diệt sâu bệnh trên lúa. Theo Phạm Văn Toàn (2013) nghiên cứu về việc sử dụng HCBVTV trong sản xuất lúa ở đồng bằng Sông Cửu Long cho thấy, người dân thường sử dụng các loại thuốc có độ độc loại II và III theo phân loại của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO). Thuốc thường không được sử dụng hợp lý về tần suất, thời gian và liều lượng. Các loại thuốc được sử dụng có 97 thuốc bảo vệ thực vật thương phẩm, thuộc 55 hoạt chất khác nhau của 20 nhóm hóa học [1]. Từ thực trạng này, việc sử dụng gạo tồn dư HCBVTV có thể ảnh hưởng đến sức khỏe

*Điện thoại: 0912016181 Email: hiendt@nifc.gov.vn

người tiêu dùng như kích thích các tế bào ung thư phát triển, gây đẻ quái thai, dị dạng, suy giảm trí nhớ, ảnh hưởng đến hệ thần kinh, gây tổn hại cho gan, thận và não.

Bên cạnh đó, một số nghiên cứu cho thấy trong quá trình bảo quản gạo còn có nguy cơ nhiễm độc tố vi nấm. Tác giả Nguyễn Minh Trí và cộng sự (2006) đã đánh giá tình hình nhiễm độc tố nấm (aflatoxin B1, ochratoxin A, citrinin) trong 64 mẫu gạo thu thập từ 04 chợ lớn ở Nha Trang. Kết quả gạo nhiễm aflatoxin B1 trong mùa mưa là 84% cao hơn mùa khô và hàm lượng cao nhất là 7,2 ng/g [2]. Các độc tố aflatoxin này được IARC xếp vào nhóm IA, là nhóm gây ung thư trên người [3].

Ngoài HCBVTV và độc tố vi nấm, trong quá trình sản xuất gạo còn có nguy cơ nhiễm các hóa chất dùng trong bảo quản. Hiện nay, các chất hoạt động bề mặt nhóm amin bậc 4 của Clo (quaternary ammonium compounds - QAC) được dùng trong công nghiệp thực phẩm để diệt khuẩn và làm thuốc diệt cỏ trong nông nghiệp. Một số chất điển hình của nhóm này gồm dodecyltrimethylamoni bromua (DTAB), dodecyl(etylbenzyl)dimethylamoni clorua (C12-BAC), benzyldimethyltetradecylamoni clorua (C14-BAC), hexadecyldimethyl(etylbenzyl)amoni clorua (C16-BAC) và dimetyldidecylamoni clorua (DDAC). Các chất này có thể dẫn đến việc kháng chất diệt khuẩn và có thể gây ngộ độc với hàm lượng cao. Theo EU No 1119/2014, quy định tổng BAC (C₈, C₁₀, C₁₂, C₁₄, C₁₆, C₁₈) là 0,1 mg/kg; tổng DDAC (C₈, C₁₀, C₁₂) là 0,1 mg/kg trong thực phẩm.

Sử dụng gạo có các chất tồn dư và ô nhiễm lâu dài có thể ảnh hưởng đến sức khỏe người tiêu dùng nếu không được kiểm soát. Do đó việc xác định các nhóm chất này trong gạo là điều cần thiết. Có rất nhiều phương pháp để phân tích từng nhóm hợp chất này, tuy nhiên để tăng tính hiệu quả đòi hỏi một phương pháp có thể sàng lọc và phát hiện đồng thời các nhóm chất. Hiện nay, phương pháp sắc ký lỏng khối phổ phân giải cao kết hợp xử lý mẫu bằng QuEChERS đang trở thành xu hướng trong phân tích sàng lọc các hợp chất chưa biết, do đó được lựa chọn sử dụng trong nghiên cứu này. Kỹ thuật LC-HRMS dựa trên sự phân tích khối chính xác và xác nhận lại cấu trúc bằng các mảnh con tương ứng, sau đó dựa vào thư viện phổ để dự đoán cấu trúc các hợp chất. Từ đó phát hiện các hợp chất chưa biết có trong mẫu. Phương pháp này thường có độ đặc hiệu cao hơn so với phương pháp sắc ký lỏng khối phổ hai lần.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng chất phân tích: nhóm HCBVTV (azoxystrobin, acetamiprid, difenoconazole, tebuconazole, propiconazole, hexaconazole, tricyclazole, isoprothiolane); Nhóm độc tố vi nấm (aflatoxin B1, aflatoxin B2, aflatoxin G1, aflatoxin G2); nhóm chất hoạt động bề mặt amoni bậc 4 (Dodecyl(etylbenzyl)dimethylamoni clorua (C12-BAC), benzyldimethyltetradecylamoni clorua (C14-BAC), hexadecyldimethyl(etylbenzyl)amoni clorua (C16-BAC) và dimetyldidecylamoni clorua (C10-DDAC)). Đối tượng mẫu gồm 60

mẫu gạo được lấy trên địa bàn thành phố Hà Nội trong khoảng từ tháng 8 đến tháng 10 năm 2021.

2.2. Hóa chất, chất chuẩn

Các chất chuẩn HCBVTV được cung cấp từ LGC Anh, Sigma Aldrich (Mỹ), Toronto Research Chemicals Canada, Fluka (Mỹ) có độ tinh khiết > 90%; các chuẩn aflatoxin được cung cấp từ Pribolab (Singapore) có độ tinh khiết \geq 98%; các chất hoạt động bề mặt amoni bậc 4 được cung cấp từ LGC (Anh), Sigma Aldrich (Mỹ), HPC (Đức) có độ tinh khiết \geq 89%. Các dung môi tinh khiết dùng cho phân tích sắc ký gồm methanol, acetonitril, acid formic, acid acetic và các hóa chất natri citrate, natri hydrogen citrate sesquihydrate, magie sulphat khan, natri clorua, natri acetat, amoni format được cung cấp bởi hãng Merck (Mỹ); nước deion được lấy từ máy lọc nước siêu tinh khiết Milli-Q; bột PSA và C₁₈ được cung cấp bởi Agilent (Mỹ).

Các dung dịch chuẩn gốc 1.000 $\mu\text{g/mL}$ được chuẩn bị trong acetonitril (đối với HCBVTV); methanol (đối với chất hoạt động bề mặt amoni bậc 4, độc tố vi nấm) và được bảo quản ở -18°C . Dung dịch hỗn hợp chuẩn trung gian nồng độ 10 $\mu\text{g/mL}$ đối với các HCBVTV, các chất hoạt động bề mặt amoni bậc 4; nồng độ 0,5 $\mu\text{g/mL}$ đối với aflatoxin B1, aflatoxin B2, aflatoxin G1, aflatoxin G2.

2.3. Thiết bị, dụng cụ

Hệ thống sắc ký lỏng khối phổ phân giải cao gồm sắc ký lỏng siêu hiệu năng Ultimate 3000 kết nối với khối phổ Q-exactive Plus của Thermo Scientific. Các thiết bị khác bao gồm: máy đồng nhất mẫu (Phillips); cân phân tích chính xác đến 0,01 mg (MS105, Mettler Toledo); cân kỹ thuật, chính xác đến 0,01 g (ME2002T, Mettler Toledo); máy ly tâm (Mikro 200R, Hettich); máy lắc xoay (Vortex 3, IKA); bộ thổi khô bằng khí Nitơ (N-EVAP 112, Organomation).

Cột sắc ký pha đảo BEH C₁₈ (2,1 \times 100 mm; 1,7 μm) và tiền cột tương ứng (Waters). Các dụng cụ cơ bản trong phòng thí nghiệm: micropipet (Eppendorf), bình định mức các loại, ống ly tâm, lọ đựng mẫu 1,8 mL có nắp kín.

2.4. Khảo sát và thẩm định phương pháp

2.4.1. Điều kiện LC-HRMS

Các điều kiện khối phổ được cài đặt cố định cho thiết bị sắc ký lỏng khối phổ phân giải cao gồm sắc ký lỏng siêu hiệu năng Ultimate 3.000 kết nối với khối phổ Q-exactive Plus của Thermo Scientific. Điều kiện phương pháp sàng lọc bao gồm: Điều kiện MS với nguồn ion hóa HESI ở chế độ dương và âm, nhiệt độ đầu phun cố định ở 300°C , thế phun 5.000 V. Sử dụng chế độ quét toàn bộ mảnh khối (Fullscan-datadependent-MS) để tìm mảnh mẹ với phạm vi quét m/z từ 100 đến 1.100, độ phân giải 70.000 FWHM. Mảnh con của chất phân tích được tìm kiếm bằng chế độ quét tất cả các phân mảnh ion (All ion

fragmentation - AIF) với độ phân giải 17.500 FWHM. Năng lượng bắn phá tương đối ở các mức 40, 70, và 100%.

Điều kiện sắc ký lỏng: cột sắc ký pha đảo UPLC BEH C18 (2,1 × 100 mm; 1,7 μm), pha động hai kênh H₂O và MeOH cùng chứa acid formic 0,1% và amoni format 10 mM. Tốc độ dòng 0,3 mL/phút, nhiệt độ buồng cột ở 40°C.

Các mảnh phổ lý thuyết của chất phân tích được tra cứu dựa vào công thức phân tử của các hợp chất. Sau đó, xác định mảnh phổ thực nghiệm bằng cách tiêm 500 μL dung dịch chuẩn hỗn hợp nồng độ 1 μg/mL bằng bộ tiêm tự động vào khối phổ Q-exactive.

Chương trình gradient pha động được tham khảo từ các nghiên cứu phương pháp sàng lọc trước đây [4] và được trình bày tại Bảng 1.

Bảng 1. Chương trình gradient pha động

Thời gian (phút)	Kênh A (Amoni format 10 mM, acid formic 0,1% trong nước)	Kênh B (Amoni format 10 mM, acid formic 0,1% trong methanol)
0 ÷ 5,0	98%	2,0%
5,0 ÷ 15,0	98 - 60%	2,0 - 40%
15,0 ÷ 22,0	60 - 5,0%	40 - 95%
22,0 ÷ 25,0	5,0%	95%
25,0 ÷ 26,0	5,0 - 98%	95 - 2,0%
26,0 ÷ 29,0	98%	2,0%

2.4.2. Phương pháp xử lý mẫu

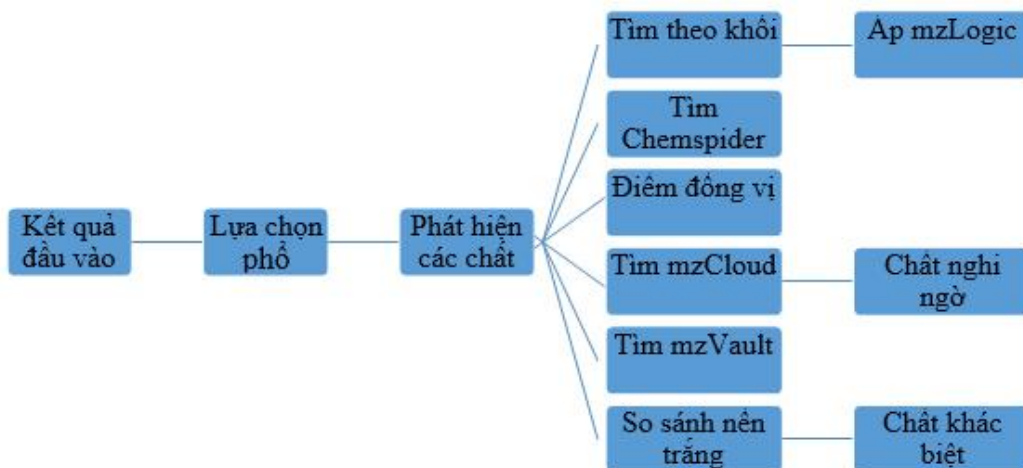
Với mục tiêu sàng lọc, quy trình xử lý mẫu phải chiết được nhiều hợp chất nhất có thể, do đó phương pháp QuEChERS được lựa chọn trong nghiên cứu này. Mẫu gạo sau khi nghiền mịn bằng máy đồng nhất được cân chính xác khoảng 5 g bằng cân phân tích vào ống ly tâm 50 mL. Mẫu sau đó được thêm lần lượt: 10 mL nước khử khoáng và lắc xoáy trong 1 phút, để yên 15 phút; thêm 15 mL dung môi chiết acid acetic 1% trong ACN và lắc xoáy trong 1 phút, lắc ngang trong 45 phút; thêm hỗn hợp muối chiết gồm 6 g MgSO₄ khan và 1,5 g CH₃COONa và lắc ngang trong 15 phút. Sau đó, mẫu được ly tâm ở tốc độ 6.000 vòng/phút trong 5 phút, 10 mL dịch phía trên sau ly tâm được chuyển vào ống 15 mL có chứa hỗn hợp chất làm sạch 1,5 g MgSO₄, 750 mg PSA, 500 mg C18. Lắc xoáy trong 1 phút và ly tâm ở tốc độ 6.000 vòng/phút trong 5 phút. Lấy 5 mL dịch chiết phía trên cô dung môi bằng khí Nitơ ở 45°C. Hòa cân bằng 0,5 mL dung dịch acid formic 0,1% trong ACN. Dịch lọc qua màng 0,2 μm được phân tích bằng LC-HRMS.

Các khảo sát phương pháp chiết thực hiện trên mẫu gạo đã được xác định không có các chất mục tiêu sử dụng trong khảo sát. Cân 5,0 g mẫu gạo đã được nghiền mịn vào ống falcon 50 mL thêm chuẩn để thực hiện các bước khảo sát. Nồng độ thêm chuẩn ở mức 100 µg/kg với các chất HCBVTV, chất hoạt động bề mặt amoni bậc 4 và ở mức 5,0 µg/kg đối với các chất độc tố vi nấm.

2.4.3. Phân tích mẫu

Phương pháp sàng lọc được thực hiện bao gồm phân tích các mẫu: Mẫu trắng sử dụng mẫu trắng dung môi, mẫu thử, mẫu kiểm soát dương (sử dụng mẫu gạo không chứa chất phân tích, sau đó thêm vào mẫu đồng nhất với các mức 15 µL dung dịch chuẩn nồng độ 10.000 ng/mL đối với hoá chất bảo vệ thực vật, nhóm chất hoạt động bề mặt và 500 ng/mL đối với nhóm độc tố vi nấm tương đương 30 - 1,5 µg/kg trên mẫu và trên dịch phân tích 100 - 5,0 ng/mL).

Các số liệu thu được xử lý bằng phần mềm Compound Discoverer 3.1 với các bước đánh giá tìm các nhóm chất như ở Hình 1.



Hình 1. Quy trình sàng lọc bằng phần mềm Compound Discoverer

Dữ liệu khối phổ được so sánh với thư viện phổ online Mzcloud, thư viện Spiderchem, thư viện Mass List và dự đoán các hợp chất. Sau khi sử dụng phần mềm để dự đoán các chất, độ chính xác của chất có mặt trong mẫu được thể hiện qua độ khớp với từng thư viện phổ. Các chất có mảnh phổ khớp nhất với thư viện và có độ chính xác cao nhất được thể hiện qua chỉ số Mzcloud best match ($\geq 80\%$) và ưu tiên dự đoán dựa vào diện tích peak.

Hai lần phân tích lặp lại của cùng một mẫu phải cho cùng một kết quả dự đoán và mẫu kiểm soát dương phải tìm lại được các chất đã thêm vào.

2.4.4. Thẩm định phương pháp

Phương pháp định lượng được thẩm định các thông số độ đặc hiệu, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng, đường chuẩn và khoảng tuyến tính, độ thu hồi và độ lặp lại. Các

thông số thẩm định được đối chiếu theo quy định bởi AOAC [5] và theo SANTE/2019/12682 [6].

2.5. Ứng dụng phương pháp

Phương pháp ứng dụng để phân tích 60 mẫu gạo lấy ngẫu nhiên tại các chợ, siêu thị và cửa hàng ở Hà Nội.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Điều kiện LC-HRMS

Thành phần pha động kênh (A) amoni format 10 mM và acid formic 0,1% trong nước, kênh (B) khảo sát các dung môi MeOH, ACN và ACN : MeOH (50 : 50, v/v). Kết quả cho thấy khi sử dụng thành phần pha động có ACN thì các chất hoạt động bề mặt amoni bậc 4 cho tín hiệu thấp và hình dạng pic không cân đối, do đó lựa chọn kênh (B) là MeOH. Tiếp tục bổ sung thêm acid formic 0,1% và amoni format 10 mM vào kênh (B) MeOH cho thấy tín hiệu các chất phân tích ổn định do có sự xuất hiện của hai chất acid formic và amoni format ở cùng nồng độ trong cả hai kênh. Thành phần pha động tối ưu gồm kênh (A) nước và kênh (B) MeOH cùng có amoni format 10 mM và acid formic 0,1% trong nước.

Qua phương pháp sàng lọc, các chất được phát hiện sẽ tiến hành phân tích định lượng để xác định hàm lượng. Các chất được xác định bằng phương pháp định lượng đều có dạng ion phân tích $[M-H]^+$ và phân tích với nguồn ion hóa HESI ở chế độ dương. Kết quả xác định mảnh thực nghiệm được trình bày ở Bảng 2.

Bảng 2. Kết quả xác định mảnh mẹ và mảnh con thực nghiệm

Chất phân tích	Ion mẹ (m/z)	Ion con (m/z)	Chất phân tích	Ion mẹ (m/z)	Ion con (m/z)
Aflatoxin B1	313,07066	285,07559	Propiconazole	342,07706	158,97628
		213,05453			69,0699
Aflatoxin B2	315,08631	287,09137	Hexaconazole	314,08214	70,04132
		115,05420			158,97628
Aflatoxin G1	329,06558	311,05501	Tricyclazole	190,04334	163,03244
		243,06523			136,02156
Aflatoxin G2	331,08123	313,07072	Isoprothiolane	291,07193	231,0056
		285,07581			85,1064
Azoxystrobin	404,12410	372,09790	BAC (C12)	304,82335	91,10982
		329,07953			212,30765

<i>Chất phân tích</i>	<i>Ion mẹ (m/z)</i>	<i>Ion con (m/z)</i>	<i>Chất phân tích</i>	<i>Ion mẹ (m/z)</i>	<i>Ion con (m/z)</i>
<i>Acetamiprid</i>	223,07450	126,01050 89,99961	<i>BAC (C14)</i>	332,85465	90,01536 240,0895
<i>Difenoconazole</i>	406,07197	251,00253 188,03873	<i>BAC (C16)</i>	360,88595	91,10985 268,30984
<i>Tebuconazole</i>	308,15242	70,03997 125,0153	<i>DDAC (C10)</i>	326,90160	57,02405 186,10896

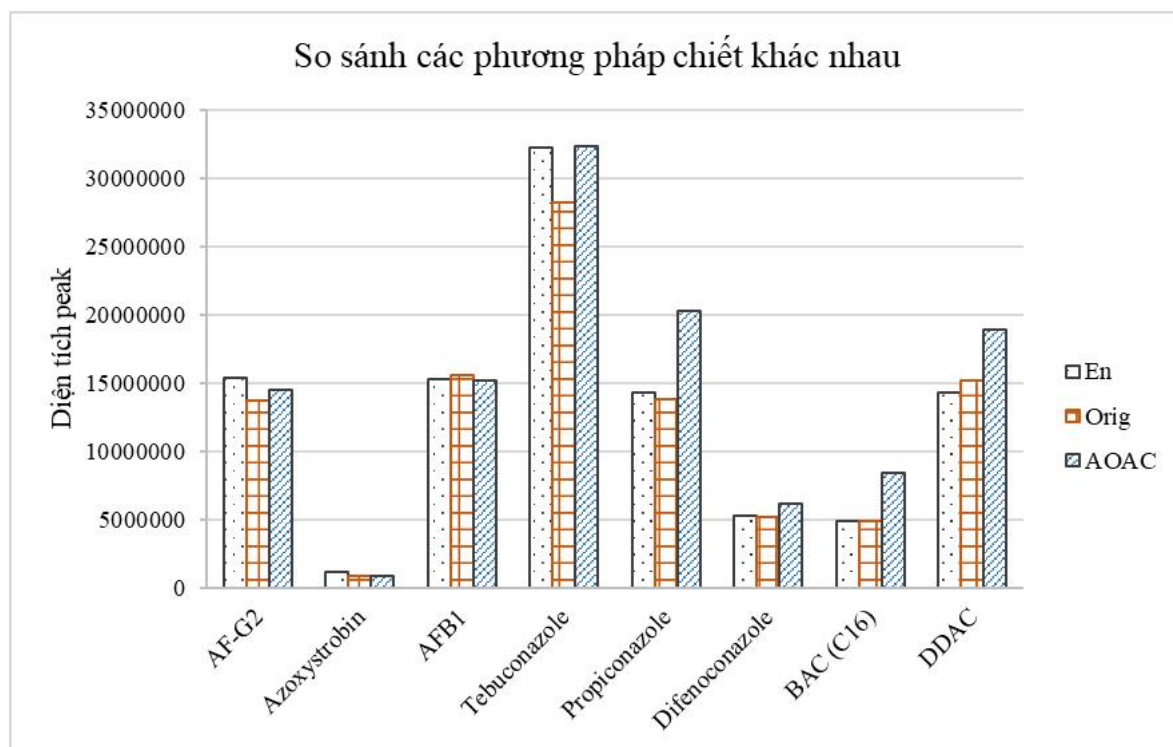
Từ Bảng 2 cho thấy, các chất phân tích đều có một ion mẹ và hai ion con, theo quy định của hội đồng Châu Âu (EU 2021/808) số điểm IP của mỗi chất là 7,5 đáp ứng yêu cầu phân tích.

3.2. Quy trình xử lý mẫu

Phương pháp QuEChERS thường sử dụng để chiết và làm sạch mẫu trong phân tích HCBVTV và phương pháp được phát triển và ứng dụng trong phân tích nhiều các nhóm chất khác như độc tố vi nấm [7], chất hoạt động bề mặt amoni bậc 4 [8]. Trong các nghiên cứu sàng lọc phương pháp QuEChERS cũng được ứng dụng [7, 9] do ưu điểm có thể chiết được đồng thời nhiều nhóm chất nên được lựa chọn sử dụng trong nghiên cứu này. Hiện nay, phương pháp QuEChERS được cải tiến trong đó 3 phương pháp phổ biến được áp dụng trong nghiên cứu để lựa chọn phương pháp tối ưu: phương pháp QuEChERS EN 15662 [10], phương pháp QuEChERS truyền thống không sử dụng đệm [11] và phương pháp QuEChERS AOAC 2007.01 [12]. Bảng tóm lược điều kiện chiết được thể hiện trong Bảng 3. Kết quả so sánh diện tích pic của một số chất đại diện được trình bày ở Hình 2.

Bảng 3. Các điều kiện khảo sát phương pháp chiết

<i>Phương pháp</i>	<i>Dung môi chiết</i>	<i>Muối chiết</i>	<i>d-SPE</i>
<i>QuEChERS không đệm</i>	ACN	4,0 g MgSO ₄ khan + 1,0 g NaCl	25 mg PSA + 150 mg MgSO ₄ khan
<i>QuEChERS (AOAC 2007.1)</i>	ACN/ 1% acid acetic	6,0 g MgSO ₄ khan + 1,5 g CH ₃ COONa	25 mg PSA + 150 mg MgSO ₄ khan
<i>QuEChERS (EN 15662)</i>	ACN	1,0 g NaCl + 4,0 g MgSO ₄ + 1,0 g Na ₃ Cit.2H ₂ O + 0,5 g Na ₂ Cit.1,5H ₂ O	25 mg PSA + 150 mg MgSO ₄ khan

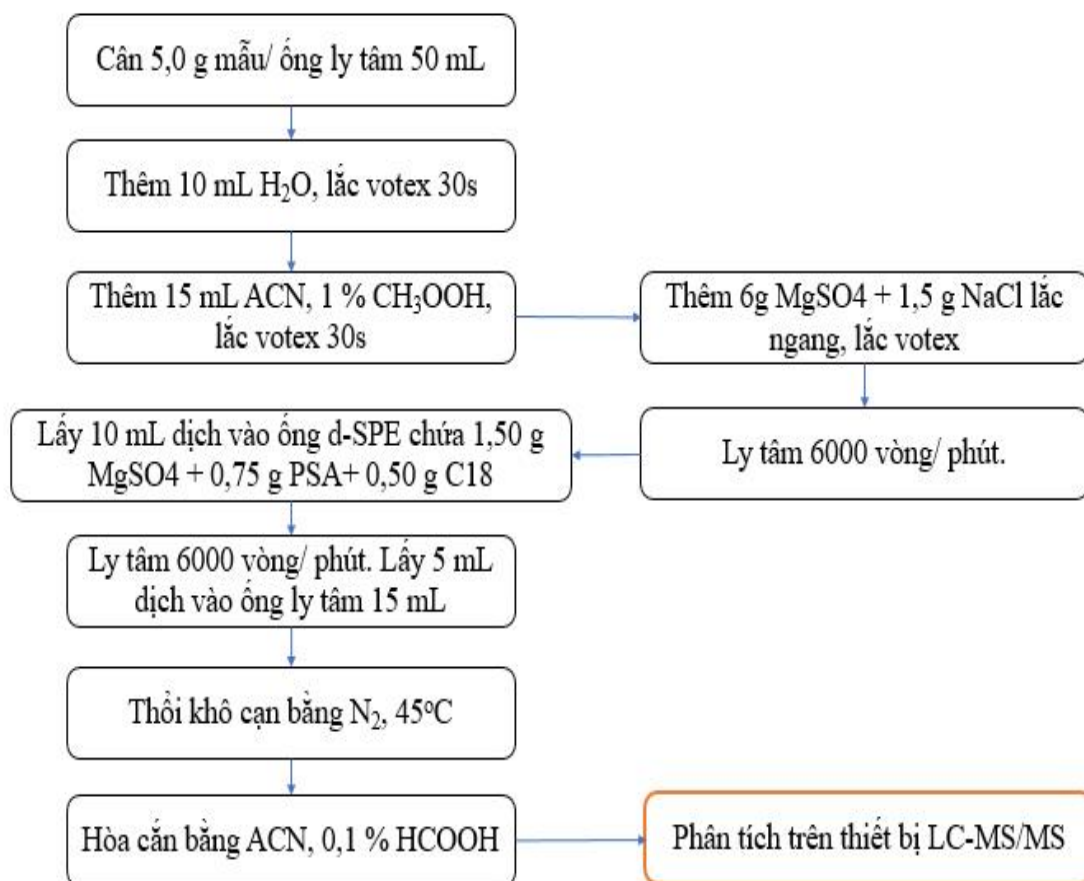


Hình 2. Biểu đồ so sánh 03 phương pháp chiết của một số chất đại diện các nhóm hóa chất bảo vệ thực vật, chất hoạt động bề mặt amoni bậc 4 và chất độc tố vi nấm

Biểu đồ ở Hình 2 cho thấy, 03 quy trình xử lý mẫu khác nhau cho kết quả khá tương đồng với các chất nhóm HCBVTV và nhóm độc tố vi nấm nhưng với nhóm chất hoạt động bề mặt thì phương pháp xử lý mẫu theo AOAC 2007.01 cho diện tích pic các chất cao hơn. Vì vậy, phương pháp chiết QuEChERS theo tiêu chuẩn AOAC được lựa chọn làm phương pháp tối ưu.

Thành phần của hỗn hợp bột làm sạch d-SPE cũng được khảo sát với hỗn hợp gồm 150 mg MgSO₄, 50 mg PSA, thành phần C₁₈ được thay đổi lần lượt 25, 50, 75 mg và hỗn hợp gồm 150 mg MgSO₄, 50 mg C₁₈, thành phần PSA được thay đổi lần lượt 25, 50, 75, và 90 mg. Kết quả cho thấy, khi sử dụng 50 mg C₁₈ và 75 mg PSA để làm sạch 1 mL dịch chiết sẽ cho tín hiệu diện tích pic các chất phân tích tốt nhất. Để tăng độ nhạy của phương pháp, nghiên cứu đã tiến hành làm giàu bằng cô dung môi sử dụng khí Nitơ (N₂) nên nghiên cứu sử dụng 10mL dịch chiết được làm sạch bằng d-SPE với khối lượng các chất tăng 10 lần (1,5 g MgSO₄ + 0,75 g PSA + 0,5 g C₁₈). 5 mL dịch thu được sau bước làm sạch d-SPE tiến hành cô dung môi và hòa cạn bằng ACN chứa HCOOH 0,1%.

Quy trình tối ưu của phương pháp được thể hiện trong Hình 3.



Hình 3. Quy trình xử lý mẫu tối ưu

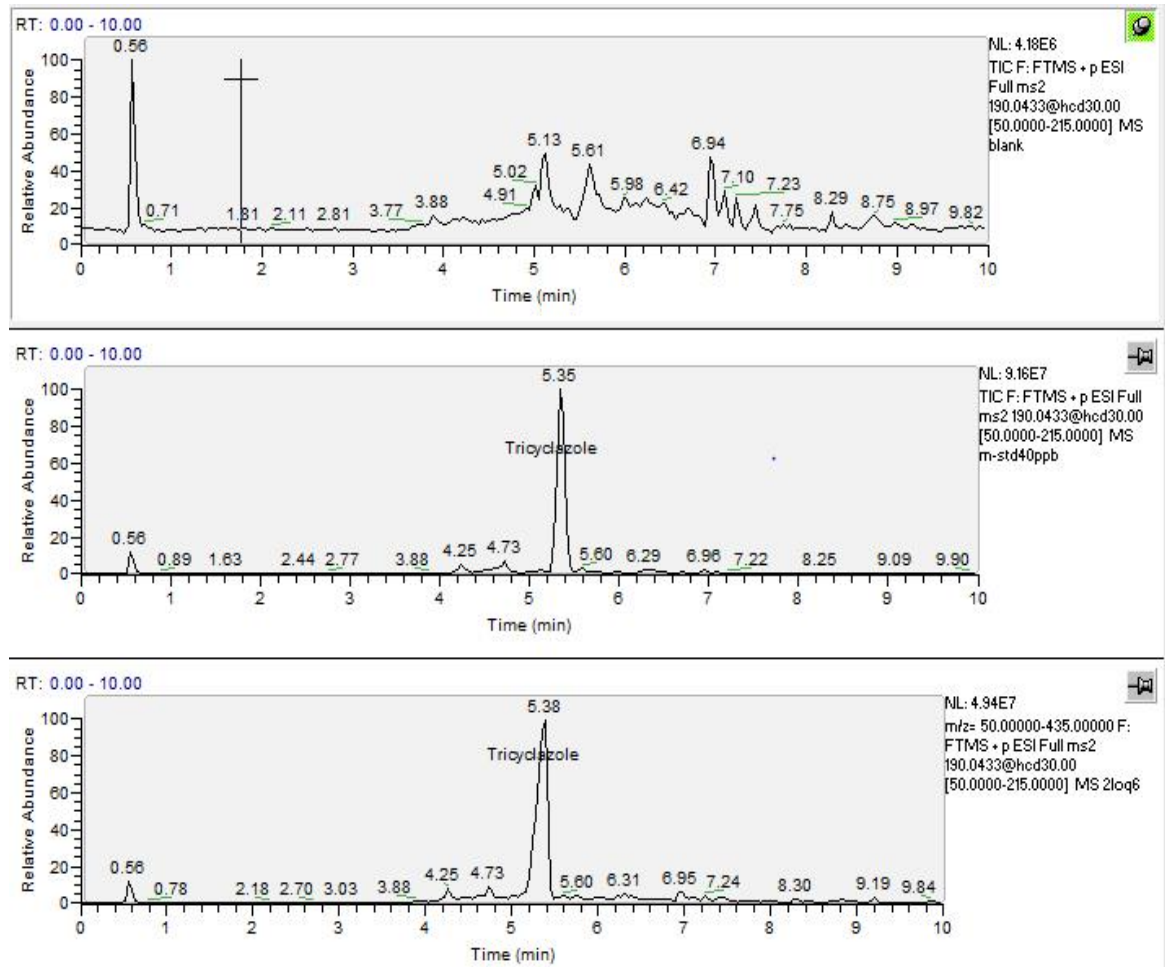
3.3. Thẩm định phương pháp

3.3.1. Độ đặc hiệu

Nghiên cứu tiến hành thẩm định thông số độ đặc hiệu của phương pháp phân tích, được xác định thông qua dung dịch chuẩn, dung dịch thêm chuẩn trên nền mẫu gạo và mẫu gạo trắng. Từ kết quả Hình 4, mẫu trắng không xuất hiện tín hiệu chất phân tích. Mẫu chuẩn và mẫu thêm chuẩn xuất hiện tín hiệu với thời gian lưu lần lượt là 5,35 và 5,38 phút đạt yêu cầu theo tiêu chuẩn của hội đồng Châu Âu (không quá 2,5% đáp ứng yêu cầu) [6]. Ngoài ra độ đặc hiệu của phương pháp HRMS còn thể hiện qua độ chính xác của mảnh khối thực tế trong mẫu thử so với mảnh khối lý thuyết. Kết quả cho thấy các chất phân tích đều có độ lệch khối nhỏ hơn 5×10^{-6} , đáp ứng yêu cầu theo AOAC [5].

Tiến hành phân tích mẫu trắng thêm chuẩn ở nồng độ thấp còn có thể xuất hiện tín hiệu chất phân tích, xử lý mẫu theo quy trình phân tích đã tối ưu, làm lặp lại 03 lần. Xác định tỷ lệ tín hiệu trên nhiễu (S/N) theo phần mềm của thiết bị. Giới hạn phát hiện là nồng độ mà tại đó có $S/N = 3$. Giới hạn định lượng là giới hạn mà tại đó $S/N = 10$ hay $LOQ = 3,3 \times LOD$. Kết quả phương pháp có giới hạn phát hiện nhóm HCBVTV, nhóm chất hoạt

động bề mặt amoni bậc 4 là 3,0 µg/kg và nhóm độc tố vi nấm là 0,15 µg/kg. Giới hạn định lượng của nhóm HCBVTV và nhóm chất hoạt động bề mặt amoni bậc 4 là 10 µg/kg và nhóm độc tố vi nấm là 0,5 µg/kg.



Hình 4. Sắc ký đồ mẫu trắng, mẫu chuẩn và mẫu thêm chuẩn tại nồng độ 40 µg/kg của tricyclazole

Đường chuẩn được xây dựng trên nền mẫu trắng để loại bỏ ảnh hưởng nền mẫu với các mức nồng độ từ 10 - 200 µg/kg đối với nhóm HCBVTV, nhóm chất hoạt động bề mặt amoni bậc 4 và ở các mức nồng độ từ 0,5 - 10 µg/kg đối với nhóm độc tố vi nấm. Các phương trình đường chuẩn thu được đều có hệ số tương quan $R^2 \geq 0,995$ và độ lệch tại các điểm không quá 15%.

Độ đúng và độ lặp lại được thực hiện phân tích các mẫu thêm chuẩn ở 03 mức nồng độ: 10, 20, và 100 µg/kg đối với nhóm hóa chất bảo vệ thực vật và nhóm chất hoạt động bề mặt amoni bậc 4 và nồng độ 0,5; 1,0 và 5,0 µg/kg với nhóm độc tố vi nấm. Mỗi mức nồng độ làm lặp lại 6 lần riêng biệt. Kết quả phân tích độ đúng và độ lặp lại được thể hiện trong Bảng 4.

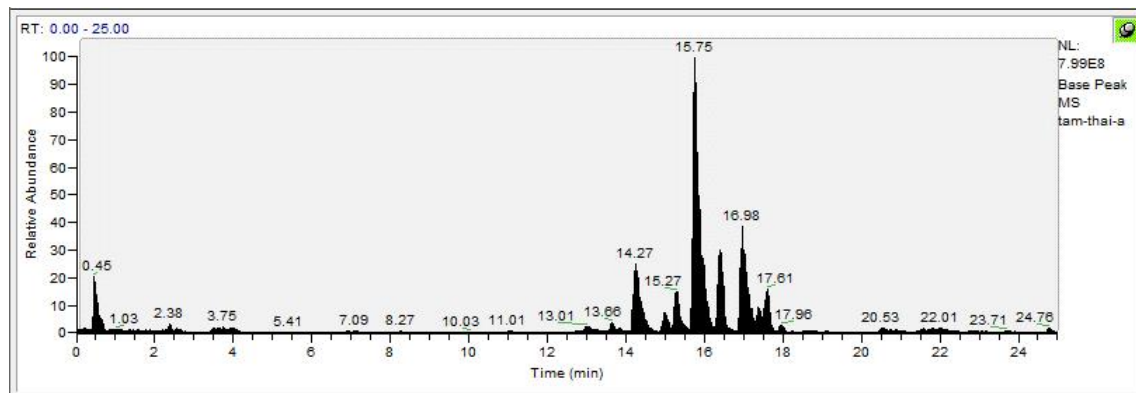
Bảng 4. Kết quả độ thu hồi và độ lặp lại

<i>Chất phân tích</i>	<i>Độ thu hồi R (%)</i>	<i>Độ lặp lại RSD (%)</i>
<i>Nhóm hóa chất bảo vệ thực vật</i>	84,5 - 107,0	0,87 - 14,02
<i>Nhóm chất hoạt động bề mặt amino bậc 4</i>	86,4 - 99,7	4,39 - 9,88
<i>Nhóm độc tố vi nấm</i>	88,9 - 102,3	2,06 - 8,38

Từ kết quả tại Bảng 4 cho thấy phương pháp có độ thu hồi và độ lặp lại đạt theo yêu cầu của AOAC [5] và theo SANTE/2019/12682 [6] do đó phương pháp được áp dụng để phân tích các mẫu thực tế.

3.4. Ứng dụng phương pháp phân tích trong mẫu thực tế

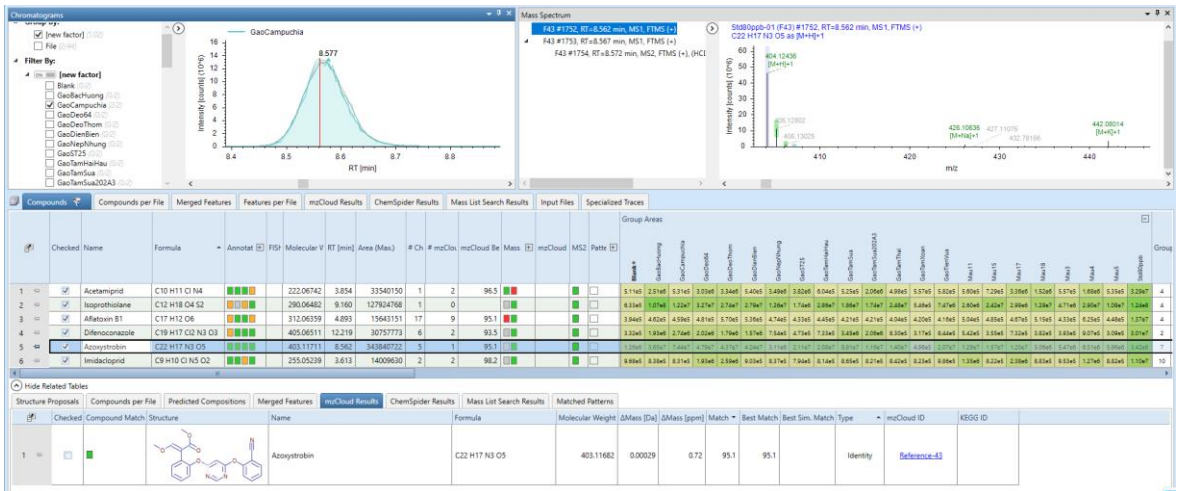
Phương pháp được ứng dụng để phân tích 60 mẫu gạo thực được mua ngẫu nhiên từ các chợ và siêu thị trên địa bàn Hà Nội trong khoảng thời gian từ tháng 8 đến tháng 10 năm 2021. Kết quả phân tích sàng lọc phát hiện Acetamiprid trong 1 mẫu, Tebuconazole trong 2 mẫu, Propiconazole trong 8 mẫu, Tricyclazole trong 5 mẫu, Isoprothiolane trong 14 mẫu được thể hiện trong Hình 5 và Hình 6.



Hình 5. Sắc ký đồ tổng của mẫu phân tích bằng phương pháp sàng lọc

Đối với việc xác định các chất dương tính trong phương pháp sàng lọc cần thỏa mãn các tiêu chí: Có sự trùng khớp với một trong các thư viện phổ (thư viện phổ online Mzcloud, thư viện Spiderchem, thư viện Mzvault), chỉ số Mzcloud cho kết quả trùng khớp $\geq 80\%$, với mẫu sàng lọc có mục tiêu mẫu dương tính phải có thời gian lưu với trùng với thời gian lưu của chất chuẩn. Ngoài ra, các mẫu phát hiện bằng phương pháp sàng lọc được khẳng định lại bằng phương pháp định lượng LC-MS/MS được thể hiện trong Bảng 5. Kết quả định lượng trùng khớp với kết quả sàng lọc cho thấy phương pháp có độ tin cậy cao. Bên cạnh đó độ tin cậy còn thể hiện ở kết quả mẫu kiểm soát dương tìm lại được 100% các chất thêm vào.

Xây dựng phương pháp sàng lọc một số chất tồn dư...



Hình 6. Kết quả sàng lọc mẫu gạo dương tính Azoxystrobin bằng phần mềm Compound Discoverer 3.1

Bảng 5. Kết quả phân tích các chất nhóm hóa chất bảo vệ thực vật, nhóm chất hoạt động bề mặt amino bậc 4 và nhóm độc tố vi nấm

Nhóm phân tích	Kết quả phân tích 40 mẫu gạo trong nước	Kết quả phân tích 20 mẫu gạo nhập khẩu
Nhóm chất hoạt động bề mặt amino bậc 4	KPH	KPH
Nhóm độc tố vi nấm	KPH	KPH
Nhóm hóa chất bảo vệ thực vật	Acetamidrid 1/40 mẫu (10,3 mg/kg)	KPH
	Tebuconazole 1/40 mẫu (13,2 mg/kg)	1/20 mẫu (11,2 mg/kg)
	Propiconazole 5/40 mẫu (10,7 - 39,9 mg/kg)	3/20 mẫu (13,7 - 86,5 mg/kg)
	Tricyclazole 5/40 mẫu (12,8 - 65,2 mg/kg)	KPH
Isoprothiolane 10/40 mẫu (19,6 - 160,1 mg/kg)	4/20 mẫu (15,1 - 44,1 mg/kg)	

Ghi chú: KPH - Không phát hiện

Kết quả phân tích đưa ra tại Bảng 5 cho thấy không phát hiện các chất trong nhóm độc tố vi nấm và nhóm chất hoạt động bề mặt trong tất cả các mẫu, nhưng đối với nhóm HCBVTV đã phát hiện acetamidrid trong 1/40 mẫu gạo trong nước (gạo nếp nhưng) với hàm lượng 10,3 µg/kg, vượt mức quy định của Châu Âu (0,01 mg/kg); tebuconazole trong 1/40 mẫu gạo trong nước và 1/20 mẫu gạo nhập khẩu với hàm lượng 13,23 và 11,2 µg/kg; propiconazole trong 5/40 mẫu gạo trong nước (10,7 - 39,9 µg/kg), 3/20 mẫu gạo nhập khẩu

(13,7 - 86,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) đều vượt ngưỡng quy định của Châu Âu (0,01 mg/kg); tricyclazole trong trong 5/40 mẫu gạo trong nước (12,8 - 65,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$), đều vượt ngưỡng quy định của Châu Âu (0,01 mg/kg). Kết quả cũng cho thấy, isoprothiolane được phát hiện trong 10/40 mẫu gạo trong nước (19,6 - 160,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$), 4/20 mẫu gạo nhập khẩu (15,1 - 44,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Tất cả các chất bảo vệ thực vật được phát hiện thấy trong các mẫu phân tích đều không vượt mức quy định và một số chưa có trong quy định tại Việt Nam. Tuy nhiên theo quy định của Châu Âu [13], một số mẫu gạo cho kết quả vượt ngưỡng quy định.

4. KẾT LUẬN

Phương pháp sàng lọc các nhóm chất HCBVTV, các chất hoạt động bề mặt amoni bậc 4 và độc tố vi nấm bằng phương pháp sắc ký lỏng khối phổ phân giải cao trong mẫu gạo đã được xây dựng dựa trên phương pháp chiết mẫu và làm sạch sử dụng kỹ thuật QuEChERS. Phương pháp đã được thẩm định đạt theo các tiêu chuẩn của AOAC và theo SANTE/2019/1268. Phương pháp đã được ứng dụng để phân tích 60 mẫu trên các mẫu gạo cho thấy sự xuất hiện của một số hóa chất bảo vệ thực vật, tuy nhiên đều nằm trong mức cho phép và một số chất chưa có theo quy định tại Việt Nam, nhưng đã vượt quá ngưỡng cho phép theo quy định của Châu Âu.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm Quốc gia với đề tài mã số NIFC.ĐTCS.21.06

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. P. V. Toan, "The situation of pesticide use and several of reduced measures for improper pesticide use in rice production in the Mekong Delta," *Can Tho University Journal of Science*, vol. 28, pp. 47-53, 2013.
- [2]. N. M. Tri, "The situation of mycotoxin contamination (Aflatoxin B1, Ochratoxin A, Citrinin) on rice in Nha Trang," *Journal of Fisheries Science and Technology Nha Trang University*, pp. 26-30, 2006.
- [3]. C. P. Wild, M. Castegnaro, "IARC activities in mycotoxin research," *Natural Toxin*, vol. 3, no. 4, pp. 327-331, 1995.
- [4]. N. T. Oanh and T. C. Son, "Rapid Screening and Quantitative Determination of Illegal Phosphodiesterase Type 5 Inhibitors (PDE-5i) in Herbal Dietary Supplements," *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, vol. 2021, pp. 1-11, 2021.

- [5]. AOAC Official Methods of Analysis, “*Appendix F: Guidelines for standard method performance requirements*,” 2012.
- [6]. European Commission, *Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed*, SANTE/12682/2019, 2019.
- [7]. G. G. J. Tolosa, A. Gaspari, D. Chianese, E. Ferrer, J. Mañes, and A. Ritieni, “Multi-Mycotoxin Analysis in Durum Wheat Pasta by Liquid Chromatography Coupled to Quadrupole Orbitrap Mass Spectrometry,” *Toxins*, vol. 9, no. 59, pp. 1-12, 2017.
- [8]. H. Dong, Y. Xian, Y. Wu, X. Guo, X. Hou, and Wang B, “QuEChERS- based purification method coupled to ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) to determine six quaternary ammonium compounds (QACs) in dairy products,” *Food Chemistry*, vol. 212, pp. 96-103, 2016.
- [9]. Duedahl-Olesen Lene Wang Tingting, Lauritz Frandsen Henrik, “Targeted and non-targeted unexpected food contaminants analysis by LC/HRMS: Feasibility study on rice,” *Food Chemistry*, vol. 338, pp. 1-9, 2021.
- [10]. European Standard, “*EN 15662:2009 - Foods of plant origin, Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS - QuEChERS method*,” 2009.
- [11]. S. J. Lehotay, K. A. Son, H. Kwon, U. Koesukwiwat, W. Fu, K. Mastovska, E. Hoh, and N. Leepipatpiboon, “Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables,” *Journal of Chromatography*, pp. 2548-2560, 2010.
- [12]. AOAC International, “AOAC Official Method 2007.01 - Pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate,” *Official Method of Analysis of AOAC International*, 19th edition, USA, 2012.
- [13]. Commission Regulation (EU), “Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards maximum residue levels for acetamiprid in certain products,” *Official Journal of the European Union*, 2019.

Development of method for screening and quantification of some contaminants in rice

Dang Thu Hien, Kieu Thi Lan Phuong, Do Thi Thu Hang

National Institute for Food Control, Hanoi, Vietnam

Abstract

Liquid chromatography - high resolution mass spectrometry (LC-HRMS) developed to screen some residues in rice. Pesticides, aflatoxin B1, aflatoxin B2, aflatoxin G1, aflatoxin G2 and quaternary ammonium surfactants were detected by the optimized method. Rice samples were extracted and cleaned by QuEChERS then analyzed by Q-Exactive system with HESI ionization source for both negative and positive modes. The C₁₈ reversed phase column was used and the mobile phase consists of water and Methanol containing 0.1% formic acid and 10 mM ammonium formate. The method was applied successfully to analyze 60 rice samples collected in Hanoi city. The results showed that 5 pesticides in 30 rice samples from 10.3 to 160 µg/kg.

Keywords: *LC-HRMS, pesticides, aflatoxin, QAC, QuEChERS, rice.*