

PHÂN TÍCH VÀ ĐÁNH GIÁ HÀM LƯỢNG PATULIN TRONG CÁC LOẠI NƯỚC UỐNG TRÁI CÂY BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

NGÔ VĂN TỬ

HÀ THÙY TRANG, NGUYỄN THỊ MINH TUỔI

Khoa Hóa học, Trường Đại học Sư phạm, Đại học Huế

Tóm tắt: Trong bài báo này, mô tả phương pháp xác định patulin trong các mẫu nước ép trái cây khác nhau. Mẫu phân tích được chiết bằng etyl axetat và dịch chiết được làm sạch bằng dung dịch natri cacbonat. Sau đó, Patulin được xác định bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao pha đảo (HPLC) sử dụng cột nhồi C18 (150 mm × 4,6 mm, 5μm) và detector UV, phép xác định ở bước sóng 276 nm, thí nghiệm được tiến hành ở nhiệt độ phòng. Pha động acetonitrile : nước (90:10 v/v) với tốc độ dòng chảy 1mL/phút. Giới hạn phát hiện là 0,016 ppm và giới hạn định lượng là 0,053 ppm. Mỗi quan hệ tuyến tính được thiết lập giữa nồng độ của patulin và diện tích pic trong khoảng 0,02 ÷ 2 ppm với $R^2 = 0,9999$. Kết quả đánh giá độ đúng cho thấy phương pháp có độ đúng tốt với độ thu hồi là 95,01% đến 100,64%.

Từ khóa: Patulin, sắc ký lỏng hiệu năng cao, nước trái cây.

1. MỞ ĐẦU

Patulin là một độc tố nấm mốc được sản sinh bởi một số loài *Penicillium*, *Aspergillus* và *Byssoschlamys*. Patulin có thể phát triển trên nhiều loại thực phẩm khác nhau bao gồm ngũ cốc, trái cây và pho mát [9].

Patulin được tìm thấy phổ biến trong các loại trái cây bị hỏng, thường trong nước trái cây và đáng chú ý là trong nước uống táo; không tìm thấy patulin trong đồ uống có cồn do nó bị ức chế trong quá trình lên men [4],[12].

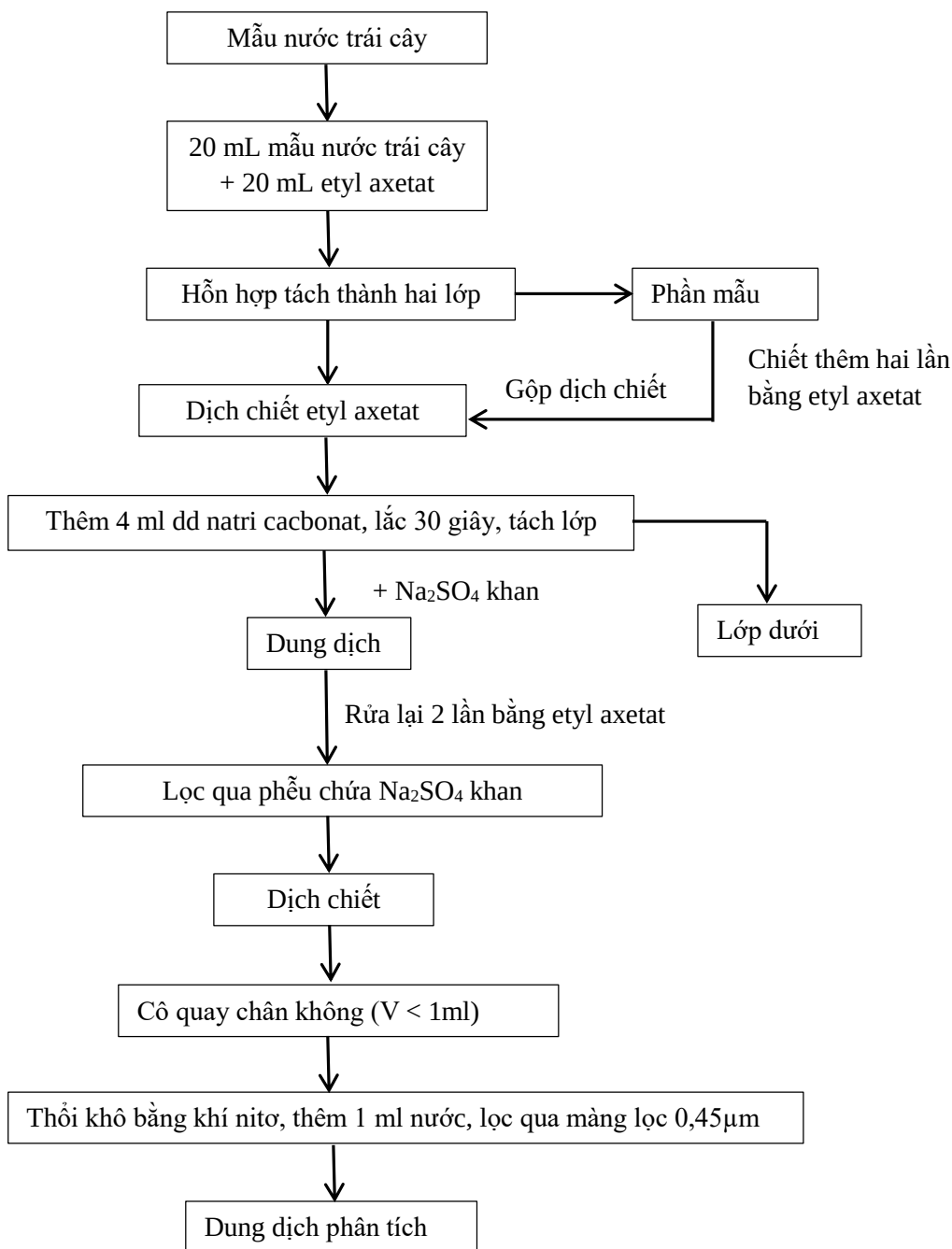
Patulin ảnh hưởng nghiêm trọng đến sức khỏe con người (De Champdore et al., 2007). Một loạt thí nghiệm trên chuột cho thấy tác dụng có hại của việc tiếp xúc lâu dài với patulin trên gan chuột (Gashlan, 2008). Nghiên cứu khác cho thấy rằng patulin còn gây ảnh hưởng đến DNA (Saxena et al., 2008) [10].

Trên thế giới đã có nhiều công trình nghiên cứu về patulin trong nước uống trái cây [6],[9],[10] ; trong rau [8], trong ngũ cốc [3], trong phô mai [11] bằng một số phương pháp như phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC [9], phương pháp sắc ký khí ghép khối phổ GC-MS [7] hay là dựa trên kỹ thuật chiết pha rắn SPE [5].

Tuy nhiên, ở Việt Nam việc nghiên cứu xác định hàm lượng patulin còn hạn chế, vẫn chưa được quan tâm đúng mức.

Bài báo này trình bày các kết quả nghiên cứu xác định hàm lượng patulin trong các loại nước uống trái cây bằng HPLC, từ đó đưa ra điều kiện thích hợp để tiến hành phân tích patulin ở một số loại nước uống trái cây trên địa bàn thành phố Huế.

2. THỰC NGHIỆM



Hình 1. Sơ đồ xử lý mẫu

2.1. Thiết bị và dụng cụ

Thiết bị phân tích chính là máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Series 20A của hãng Shimadzu, Nhật Bản. Cột sắc ký C18 ($150 \times 4,5$ mm, $5\mu\text{m}$) của hãng GL Sciences Inc, Nhật Bản. Ngoài ra, còn một số thiết bị, dụng cụ của phòng thí nghiệm gồm cân phân tích, máy cô quay, máy ly tâm, bộ lọc hút chân không của hãng Gast, Mỹ cũng đã được sử dụng trong nghiên cứu.

2.2. Hóa chất và thuốc thử

Tất cả hóa chất đều là loại tinh khiết phân tích: ethanol 99,7%; axit percloric; axit axetic; axetonitril.

Dung dịch natri cacbonat, nồng độ $\approx 15\text{g/L}$: Hòa tan 1,5 g natri cacbonat khan trong 100 ml nước.

Dung dịch chuẩn gốc Patulin 100mg/L (Merck).

2.3. Tiến trình phân tích

Quy trình xử lý mẫu theo AOAC 2000.02, được tóm tắt trong hình 1. Mẫu chuẩn và mẫu phân tích được xử lý bằng dung dịch etyl axetat, dung dịch natri cacbonat và được làm khô bằng natri sulfat khan [2].

Patulin được định lượng bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) với detector UV phát hiện ở bước sóng 276 nm, cột pha đảo C18.

Điều kiện sắc ký: nhiệt độ phòng, pha động là $\text{H}_2\text{O} : \text{CH}_3\text{CN}$ (90:10), thể tích tiêm mẫu $20\ \mu\text{L}$, tốc độ dòng: $1,0\ \text{mL/phút}$, thời gian lưu 6,0 phút, ghi lại sắc ký đồ của mẫu chuẩn và mẫu phân tích.

Nồng độ patulin được tính bằng cách so sánh diện tích pic của patulin trong các mẫu phân tích với những mẫu tiêu chuẩn.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Theo [9] để phát hiện và định lượng patulin sử dụng detector UV với bước sóng 276 nm, chúng tôi cũng chọn bước sóng này để nghiên cứu.

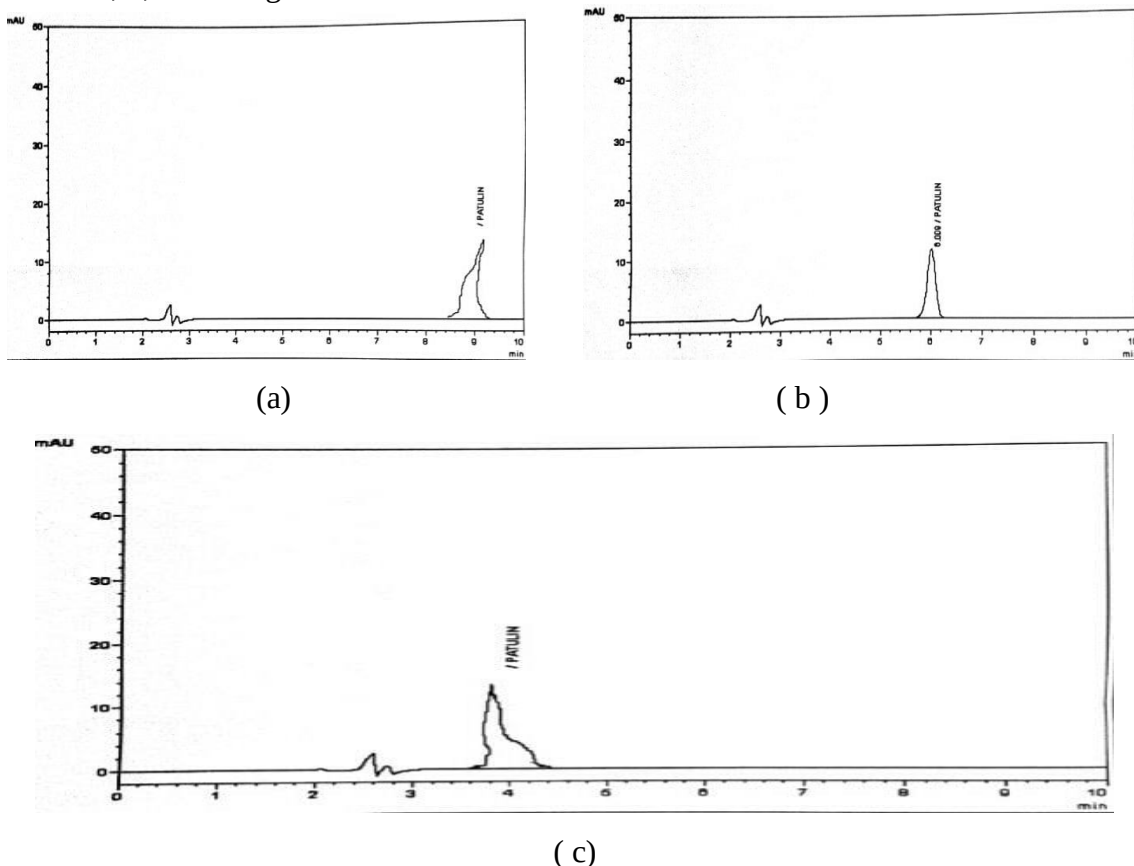
3.1. Khảo sát ảnh hưởng của pha động

Bảng 1. Hệ số đối xứng pic với các tỷ lệ về dung môi pha động

Ký hiệu	Hệ dung môi	Tỷ lệ pha động	Hệ số đối xứng
(a)	Nước : axetonitril	100 : 0	1,21
(b)	Nước : axetonitril	90 : 10	0,94
(c)	Nước : axetonitril	80 : 20	0,75

Thành phần pha động được khảo sát bao gồm: nước (H_2O) : axetonitril (CH_3CN). Chúng tôi tiến hành khảo sát các tỷ lệ thể tích pha động nước : axetonitril = 100 : 0; nước : axetonitril = 90 : 10; nước : axetonitril = 80 : 20; với dung dịch chuẩn patulin có

nồng độ 1 ppm; tốc độ dòng 1 mL/phút; $V_{\text{tiêm}} = 20\mu\text{L}$. Kết quả được thể hiện qua các hình 2 a, b, c và bảng 1.



Hình 2. Sắc ký đồ của tốc độ dòng 1 mL/phút ở các hệ pha động: a. nước : axetonitril = 100 : 0; b. nước : axetonitril = 90 : 10; c. nước : axetonitril = 80 : 20

Kết quả ở hình 2 cho thấy trong cùng điều kiện tốc độ dòng, thể tích bơm mẫu và dung dịch chuẩn patulin có nồng độ 1 ppm, thì hệ dung môi (a) và (c) xuất hiện pic nghiên cứu có hình dạng không cân xứng với hệ số đối xứng xa giá trị 1, ứng với thời gian lưu này sắc ký đồ bị ảnh hưởng nhiều của tạp chất...

Trong khi đó, ứng với hệ dung môi (b) thì hình dáng pic được cải thiện rõ rệt, pic đối xứng hơn và hệ số đối xứng gần giá trị 1.

Từ kết quả khảo sát cho phép chúng tôi chọn hệ dung môi pha động nước : axetonitril với tỉ lệ thể tích là 90 : 10 để tiếp tục khảo sát cho các bước tiếp theo.

3.2. Khảo sát tốc độ dòng

Tiến hành khảo sát trên hệ dung môi pha động nước : axetonitril (90 : 10), với các tốc độ dòng 1,5 mL/phút; 1 mL/phút; 0,5 mL/phút. Kết quả được thể hiện qua các hình 3 a, b, c và bảng 2.

3.3. Tính tương thích của hệ thống sắc ký

Tiến hành tiêm 6 lần của cùng một mẫu vào hệ thống sắc ký HPLC ở điều kiện đã chọn và ghi diện tích pic thu được. Độ ổn định của hệ thống sắc ký được biểu thị bằng sai số tương đối (RSD%) của kết quả sau 6 lần tiêm mẫu. Kết quả được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Các thông số sắc ký của pic patulin

Hoạt chất	Lần đo	Thời gian lưu (t_R)	Diện tích pic	Hệ số đối xứng
Patulin	1	5,700	73602	1,200
	2	5,689	73677	1,203
	3	5,680	75606	1,209
	4	5,673	75580	1,181
	5	5,659	72977	1,108
	6	5,639	76322	1,102
	TB	5,673	74627	1,167
	RSD (%)	0,4	1,8	4,2

ĐKSK: Cột C18, Detector UV, bước sóng phát hiện 276 nm, tốc độ dòng 1 mL/phút, dung môi pha động là $H_2O : CH_3CN = 90 : 10$; thể tích tiêm 20 μL .

Nhận xét:

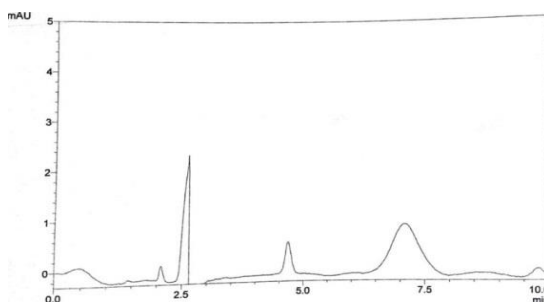
- Thời gian lưu trung bình của pic patulin là 5,673 (RSD% = 0,385%) là khoảng thời gian thích hợp cho quá trình phân tích sắc ký.
- Diện tích trung bình của pic patulin là 74627 (RSD% = 1,839%).

Những kết quả trên cho thấy quy trình sắc ký mà chúng tôi tiến hành là phù hợp và đảm bảo sự ổn định cho quá trình định lượng patulin.

3.4. Thẩm định phương pháp xây dựng

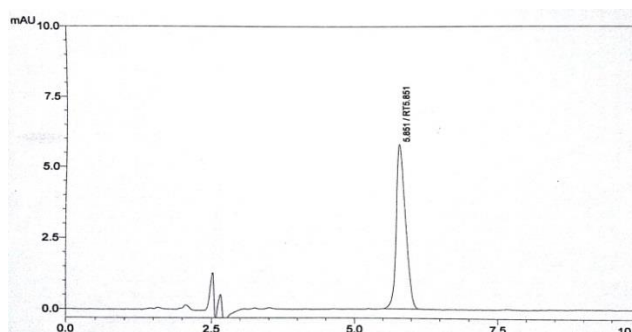
Quy trình phân tích patulin đã được chúng tôi thẩm định về tính đặc hiệu, khoảng tuyến tính, độ lặp lại, độ đúng, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng.

3.4.1. Tính đặc hiệu



Hình 4 . Sắc ký đồ khảo sát tính đặc hiệu của phương pháp trên mẫu trắng

ĐKSK: Cột C18, Detector UV, bước sóng phát hiện 276 nm, tốc độ dòng 1 mL/phút, dung môi pha động là $H_2O : CH_3CN = 90 : 10$; thể tích tiêm 20 μL



Hình 5. Sắc ký đồ khảo sát tính đặc hiệu của phương pháp trên mẫu chuẩn 0,5 ppm
ĐKSK: Cột C18, Detector UV, bước sóng phát hiện 276 nm, tốc độ dòng 1 mL/phút, dung môi pha động là $H_2O : CH_3CN = 90 : 10$; thể tích tiêm 20 μL

Để đánh giá tính đặc hiệu, chúng tôi đã tiến hành phân tích mẫu trắng (mẫu không chứa patulin), mẫu trắng thêm chuẩn patulin và so sánh với dung dịch chuẩn patulin. Kết quả thực nghiệm cho thấy, trên sắc ký đồ của mẫu trắng (hình 4) không xuất hiện pic vào thời điểm ($t=5,851$ phút) tương ứng với pic patulin trên sắc ký đồ dung dịch chuẩn patulin. Trên sắc ký đồ mẫu trắng thêm chuẩn (hình 5) xuất hiện pic ở cùng thời điểm ($t=5,851$ phút) với pic của patulin trên sắc ký đồ dung dịch chuẩn, pic này được tách riêng khỏi các pic khác trong nền mẫu. Như vậy, quy trình đã xây dựng đảm bảo tính đặc hiệu khi phân tích phát hiện patulin.

3.4.1. Khoảng tuyến tính của phương pháp định lượng

Chuẩn bị dãy dung dịch chuẩn patulin có nồng độ thay đổi trong khoảng từ 0,02 ppm đến 2 ppm để khảo sát khoảng tuyến tính.

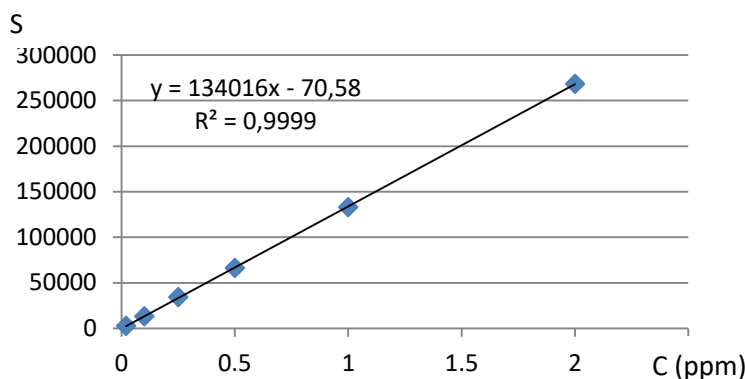
Bảng 4. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính

Nồng độ C (ppm)	0,02	0,1	0,25	0,5	1	2
Diện tích pic S	2718	13324	34382	66337	132986	268473

Từ kết quả thí nghiệm, xây dựng phương trình hồi quy tuyến tính bằng cách áp dụng phương pháp bình phương tối thiểu:

$$y = 134016x - 70,58$$

Trong đó: y: Diện tích pic; x: nồng độ patulin



Hình 6. Đường hồi quy tuyến tính

Trong khoảng nồng độ khảo sát từ 0,02 ppm đến 2 ppm giữa nồng độ C và diện tích pic S có mối quan hệ tuyến tính với nhau, hệ số tương quan $R^2 = 0,9999$. Có thể tăng C lớn hơn 2 ppm vẫn còn quan hệ tuyến tính này.

3.4.2. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng

Giới hạn phát hiện (LOD) của phương pháp được xác định theo quy tắc 3σ và áp dụng hồi quy tuyến tính. Đường hồi quy tuyến tính được xây dựng trong khoảng hẹp của nồng độ gần gốc tọa độ (0,02 ÷ 0,5 ppm). Kết quả được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5. Kết quả xác định giới hạn phát hiện (LOD)

Nồng độ C (ppm)	0,02	0,1	0,25	0,5
Diện tích pic S	2718	13324	34382	66337
Phương trình hồi quy	$132824x + 301,04$			

Như vậy giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của phương pháp là:

$$\text{LOD} = \frac{3 \times S_y}{b} = \frac{3,0 \times 718,21}{132824} = 0,016 \text{ ppm}$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 \cdot S_y}{b} \approx 3,3 \cdot \text{LOD} = 3,3 \cdot 0,016 = 0,053 \text{ ppm}$$

3.4.3. Xác định độ lặp lại của phương pháp

Bảng 6. Kết quả khảo sát độ lặp lại trên mẫu patulin

Diện tích trung bình (n = 6)	74627,333
Nồng độ trung bình (n = 6) (ppm)	0,557
RSD (%)	1,831
$\frac{1}{2} \cdot \text{RSD}_{\text{Horwitz}}$	8,7

Độ lặp lại của phương pháp được đánh giá dựa trên độ lệch chuẩn tương đối RSD (%) của 1 mẫu phân tích lặp lại 6 lần.

Kết quả khảo sát độ lặp lại của phương pháp phân tích bằng cách tiến hành phân tích lặp lại 6 lần trên cùng một mẫu chất. Kết quả được trình bày ở bảng 6.

Từ kết quả trên cho thấy phương pháp định lượng Patulin có độ chính xác cao với độ lệch chuẩn tương đối đều nằm trong giới hạn cho phép.

Vì $RSD(\%) < \frac{1}{2} RSD_{Horwitz}$ nên phương pháp phân tích có độ lặp lại cao, phù hợp để định lượng patulin trong các mẫu nước uống trái cây.

3.4.4. Xác định độ đúng của phương pháp

Độ đúng được xác định bằng phương pháp thêm chuẩn. Chúng tôi lần lượt thêm chính xác một lượng chất chuẩn vào 3 mức ứng với nồng độ chuẩn thêm vào tương ứng là 0,04 ppm; 0,05 ppm; 0,06 ppm vào một mẫu nước trái cây có nồng độ patulin ban đầu là 0,045 ppm.

Ứng với mỗi mức thêm, phân tích định lượng lặp lại ba lần rồi lấy giá trị trung bình. Kết quả patulin tìm thấy so với nồng độ đã biết (nồng độ Patulin trong mẫu thử và nồng độ sau khi chất chuẩn thêm vào) được trình bày trong bảng 7.

Bảng 7. Kết quả khảo sát độ đúng trong mẫu nước uống trái cây

Mẫu	Nồng độ ban đầu C_0 (ppm)	Nồng độ thêm vào C_1 (ppm)	Nồng độ tìm thấy trung bình ($n = 3$) C_2 (ppm)	Tỷ lệ thu hồi Rev (%)	Kiểm tra
1	0,045	0,040	0,0853	100,75	Đạt
2		0,050	0,0944	98,80	Đạt
3		0,060	0,1020	95,00	Đạt

Kết quả ở bảng 7 cho thấy: Độ thu hồi của phương pháp dao động từ 95% - 101% đạt theo mức quy định của AOAC (80 – 110%). Chứng tỏ phương pháp phân tích xây dựng là hoàn toàn phù hợp để định lượng patulin trong mẫu nước uống trái cây.

3.5. Xác định hàm lượng patulin trong các mẫu nước uống trái cây trên địa bàn thành phố Huế

Bảng 8. Thông tin về các mẫu nước uống trái cây lấy

Mẫu	Vị trí lấy mẫu	Tên mẫu	Ngày sản xuất	Hạn sử dụng
M1	Siêu thị Coopmart, TP Huế	Nước uống táo	09/11/2017	09/10/2018
M2	Siêu thị Coopmart, TP Huế	Nước uống mơ	12/02/2018	12/02/2019
M3	Siêu thị Big C, TP Huế	Nước uống dứa	21/10/2017	21/10/2018
M4	Siêu thị Big C, TP Huế	Nước uống chanh dây	13/10/2017	12/04/2019

M5	Chợ Đông Ba, TP Huế	Nước uống nho	12/03/2017	12/09/2018
6	Chợ Đông Ba, TP Huế	Nước uống dừa	07/02/2018	07/02/2019

Qua khảo sát 6 mẫu nước uống trái cây đóng chai chúng tôi thu được kết quả hàm lượng patulin được trình bày như trong bảng 9.

Bảng 9. Kết quả phân tích hàm lượng patulin trong 06 mẫu nước uống trái cây

TT	Tên mẫu	Kết quả ($\pm$ khoảng tin cậy)	Hàm lượng theo Bộ Y tế (2011), QCVN 8-1:2011/BYT
		Patulin (ppb)	Patulin (ppb)
1	Nước uống táo	$1,311 \pm 0,027$	50
2	Nước uống mơ	$1,169 \pm 0,025$	50
3	Nước uống dừa	0	50
4	Nước uống chanh dây	0	50
5	Nước uống nho	$0,302 \pm 0,009$	50
6	Nước uống dừa	$0,296 \pm 0,009$	50

Nhận xét: Từ kết quả phân tích 06 mẫu nước uống trái cây chúng tôi thấy rằng hàm lượng patulin trong 06 mẫu nước uống trái cây đều nhỏ hơn giới hạn phát hiện LOD = 0,016 ppm và giá trị giới hạn phát hiện này nhỏ hơn giá trị quy định của Bộ Y tế.

4. KẾT LUẬN

Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao, sử dụng phân tích hàm lượng patulin trong các mẫu nước uống trái cây là phương pháp có độ nhạy cao, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng (theo quy tắc 3 σ) lần lượt là LOD = 0.016 ppm, LOQ = 0.053 ppm; giữa nồng độ patulin và diện tích pic có tương quan tuyến tính tốt trong khoảng 0.02 ÷ 2 ppm với R² = 0,9999.

Kết quả kiểm tra chất lượng của phương pháp trên mẫu thực tế cho thấy phương pháp đạt được độ lặp lại tốt với RSD% < 2%, độ đúng tốt với độ thu hồi từ 95% ÷ 101%.

Có thể sử dụng quy trình phân tích này để xác định hàm lượng patulin trong các mẫu nước uống trái cây.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Bộ Y tế (2011). QCVN 8-1:2011/BYT - Quy chuẩn quốc gia về giới hạn an toàn cho phép đối với ô nhiễm độc tố vi nấm trong thực phẩm.
- [2] AOAC official method 2000.02 (2002). *Patulin in Clear and Cloudy Apple Juices and Apple Puree by Liquid Chromatographic Method First Action 2000*, AOAC International.
- [3] Assuncao R, Martins C, Dupont D, Alvito P (2016). *Patulin and ochratoxin A co-occurrence and their bioaccessibility in processed cereal-based foods: A contribution for Portuguese children risk assessment*, Food and Chemical toxicology.

- [4] Andrew P. Zdzieble, Wilhad M. Reuter, PerkinElmer (2015). *Analysis of Patulin in Apple Juice by UHPLC with UV Detection*, 940 Winter Street, Waltham, MA 02451 USA.
- [5] Boonzaaijer G., Bobeldijk I., Osenbruggen W.A. van (2005). *Analysis of patulin in dutch food, an evaluation of a SPE based method*, *Food Control*, Vol 16, Issue 7, September 2005, pp 587-591.
- [6] Christy Swoboda (2014). *Patulin in Fresh Fruits*, Food Quality & Safety.
- [7] Cunha S.C., Faria M.A., Fernandes J.O. (2009). *Determination of patulin in apple and quince products by GC-MS using $^{13}\text{C}_{5-7}$ patulin as internal standard*, *Food Chemistry*, Vol 115, Issue 1, 1 July 2009, pp 352-359.
- [8] Frank HK (1977). *Occurrence of patulin in fruit and vegetables*, *Ann Nutr Aliment* 1977; 31(4-6);459-65.
- [9] John Martin (2008). *Rapid determination of patulin in apple juice*, USA.
- [10] Hana M. Gashlan (2009). *High performance liquid chromatographic determination of patulin in apple juice: Investigation of its contamination levels in Saudi Arabia*, *Scientific Research and Essay*, Vol.4 (2), pp. 069-072, February 2009.
- [11] Kadakal C, Arisoy S, Tepe TK, Otag FB, Batu S, Nizamlioglu NM and Ekinici R (2017). *High performance liquid chromatographic Method for the determination of patulin in oil-based products: Cheese Approach*, *Austin Chromatography*, Turkey.
- [12] Rev. Bras. Frutic (2007). *Patulin in food: state-of-the-art and analytical trends*, Vol.29 no.2 Jaboticabal Aug 2007.

Title: ANALYSIS AND ASSESSMENT OF PATULIN CONTENTS IN A VARIETY OF FRUIT DRINKS BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Abstract: In this study, a method is used for the determination of patulin in various fruit juice samples. The samples were extracted with ethyl acetate and the extract was cleaned up by using sodium carbonate solution. Patulin was then determined by reversed phase high performance liquid chromatography (HPLC) using C_{18} column (150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m) and a variable wavelength detector set at 276 nm, the experiment was carried out at room temperature. Water Acetonitrile (90:10) was used as the mobile phase with a flow rate of 1mL/min. Water-detection limit was 0.016 ppm and the quantitation limit was 0.053 ppm. A linear relationship was established between the concentration of patulin and peak area in the range 0.02 $\div$ 2 ppm with $R^2 = 0.9999$. The accuracy of the method was supported by recovery studies and found to be 95.01% to 100.64%.

Keywords: Patulin, HPLC, fruit juice.