

XÁC ĐỊNH ĐỒNG THỜI CHLORATE VÀ PERCHLORATE TRONG SỮA BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG GHEP NỐI KHỐI PHỔ LC-MS/MS

Đến tòa soạn 05-03-2021

Lưu Thị Huyền Trang, Vũ Thị Trang, Đinh Viết Chiến, Lê Thị Hồng Hảo

Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm quốc gia

Lê Thị Hồng Hảo, Đỗ Minh Huế

Khoa Hóa học – Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà nội

SUMMARY

SIMULTANEOUS DETERMINATION OF CHLORATE AND PERCHLORATE IN MILK BY LIQUID CHROMATOGRAPHY-TANDEM MASS SPECTROMETRY

A simple, selective, and sensitive method using hydrophilic interaction chromatography combined with tandem mass spectrometry (HILIC–MS/MS) for simultaneous determination of perchlorate and chlorate in milk was developed. The analysis was conducted on an HILIC column (150 mm × 4.6 mm, 3.5 μm) using a mobile phase consisting of acetonitril and 0.1% formic acid with gradient elution. The detection was performed by MS/MS via electrospray ionization. The sample was extracted using ACN: AcOH 1% (4:1). The extract was cleaned using C18 sorbent. Linear calibration curves were obtained in the concentration range of 1 to 100 μg/L. The method detection limit was 0.15 μg/kg. The recoveries of perchlorate and chlorate were all >80%. This method was successfully applied to the quantitative determination of perchlorate and chlorate in 50 milk samples (milk powder, liquid milk and yogurt).

Keywords: HILIC-MS/MS, perchlorate, chlorate, milk.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sữa và các sản phẩm từ sữa là nguồn cung cấp nhiều chất dinh dưỡng quan trọng, cần thiết cho sự tăng trưởng và phát triển của trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ cũng như lợi ích duy trì sức khỏe ở người lớn. Việc vệ sinh thiết bị trong quy trình chế biến sữa có tầm quan trọng lớn trong chuỗi cung ứng sữa, nhằm ngăn chặn sự bùng phát của các bệnh từ thực phẩm [1]. Có nhiều chất khử trùng khác nhau được sử dụng trong ngành công nghiệp thực phẩm nói chung, công nghiệp sản xuất sữa nói riêng. Trong đó, nhóm chất khử trùng Chlorine được sử dụng phổ biến [2]. Việc sử dụng nước trong tất cả các khâu của sản xuất sữa vẫn là một trong những nguyên nhân chính lý giải sự có mặt của Chlorate và Perchlorate trong sữa [1,3].

Chlorate và Perchlorate gây ảnh hưởng không tốt đến sức khỏe con người đặc biệt là trẻ nhỏ. Việc phơi nhiễm các dẫn xuất Chlorine vô cơ có thể dẫn đến nguy cơ ngộ độc máu, thận và ức chế chức năng tuyến giáp [4]. Thai nhi và trẻ sơ sinh dễ bị ảnh hưởng bởi độc tính Perchlorate hơn vì chúng nhạy cảm hơn khi phơi nhiễm Perchlorate [5]. Khi nồng độ Chlorite và Chlorate tăng cao (> 700 μg/L) trong nước uống của phụ nữ mang thai làm tăng nguy cơ đối với các dị tật đường tiết niệu, hô hấp, gai cột sống và khuyết tật về trí não [6]. Theo quy định châu Âu (EC) số 2020/749 [7] và 2020/685 [8], giới hạn dư lượng tối đa cho phép của Chlorate và Perchlorate trong sữa công thức cho trẻ em lần lượt là 0,1 mg/kg và 0,01 mg/kg.

Các nghiên cứu đã được công bố về việc xác định hàm lượng Chlorate và Perchlorate sử dụng các phương pháp như: quang phổ hồng ngoại FTIR [9], sắc ký ion ghép nối khối phổ IC-MS/MS [10], điện di ghép sắc ký ion với detector UV (CE-IC-UV) [11], sắc ký lỏng khối phổ LC-MS/MS [5][12][13] với các nền mẫu như: nước, muối, rau, quả...

Việc phân tích sữa và các sản phẩm từ sữa gặp phải nhiều thách thức. Các mẫu sữa có nhiều thành phần gây ảnh hưởng tới quá trình phân tích, như protein, chất béo và đường. Nghiên cứu này phát triển phương pháp sắc ký lỏng khối phổ LC-MS/MS để xác định đồng thời Chlorate và Perchlorate trong sữa.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên vật liệu

Hóa chất, chất chuẩn: chất chuẩn Chlorate từ Sigma Aldrich, Perchlorate từ Merck; các hóa chất tinh khiết phân tích: methanol (MeOH), acetonitrile (ACN), acid formic (FA), acid acetic (AcOH) từ Merck, bột C18 từ Agilent.

Mẫu nghiên cứu: các mẫu sữa được lấy ngẫu nhiên trên địa bàn Hà Nội từ tháng 8 đến tháng 10 năm 2020.

2.2. Thiết bị

Hệ thống sắc ký lỏng ghép nối khối phổ Waters Xevo TQ-XS, cột sắc ký HILIC (150 mm x 4,6 mm x 3,5 μ m).

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1 Phương pháp xử lý mẫu

Cân chính xác khoảng 5 g mẫu đồng nhất, thêm 20 ml dung môi chiết (ACN: AcOH 1%, 4:1), lắc vortex 1 phút, lắc ngang 30 phút, định mức 25 ml bằng dung môi chiết. Lấy 1 ml dung dịch chiết trộn với 100 mg bột C18, lọc và phân tích trên LC-MS/MS.

2.3.2 Phương pháp định lượng

Khảo sát điều kiện khối phổ: tìm các điều kiện tối ưu của MS để xác định ion mẹ; lựa chọn các ion con phù hợp.

Khảo sát điều kiện sắc ký lỏng: lựa chọn cột tách, khảo sát dung môi pha động, tỉ lệ pha động, chương trình rửa giải.

2.3.3 Thẩm định phương pháp

Đánh giá các thông số sau: Độ đặc hiệu, giới hạn phát hiện LOD, giới hạn định lượng LOQ,

khoảng tuyến tính, độ lặp lại và độ thu hồi.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tối ưu điều kiện xác định đồng thời

Chlorate và Perchlorate bằng LC-MS/MS

3.1.1. Điều kiện khối phổ

Chọn chế độ khảo sát tự động để bắn phá ion phân tử thành các ion con, lựa chọn ion con có cường độ cao nhất để định lượng và ion có cường độ thấp hơn để định tính. Tối ưu hóa năng lượng bắn phá và điện thế đầu ra tự động theo phần mềm của thiết bị. Các kết quả được trình bày trong bảng 1.

Điều kiện khối phổ hoàn toàn phù hợp với công thức phân tử của chlorate và perchlorate với ion mẹ có số khối là $[M-H]^-$, mỗi chất đều thu được 2 ion con, phù hợp với quy định của châu Âu về số điểm IP [14].

Bảng 1. Điều kiện MS/MS tối ưu

Chất phân tích	Khối lượng phân tử	Mảnh mẹ (m/z)	Mảnh con (m/z)	Thế ion hóa (V)	Năng lượng bắn phá (E)
Chlorate	83,451	82,87	51,06	32	16
			66,98*	32	10
Perchlorate	99,451	98,93	82,98	62	6
			67,03*	62	54

Ghi chú: (*) là ion định lượng

3.1.2. Điều kiện sắc ký

Cột HILIC chứa hạt nhồi có bản chất phân cực, cho phép lưu giữ tốt các chất phân cực mạnh, thích hợp cho việc phân tích chlorate và perchlorate nên được lựa chọn trong nghiên cứu này.

Dựa trên một số công bố [5][12][13] và các pha động được khuyến nghị sử dụng trên cột HILIC, một số dung môi pha động được khảo sát gồm: acid formic 0,1% – ACN; amoni format 10 mM – ACN; acid formic 0,1% – methanol. Kết quả cho thấy: khi sử dụng pha động chứa muối amoni format các chất phân tích chưa tách được hoàn toàn, pic sắc ký không cân xứng. Hai pha động còn lại chứa acid formic cho pic sắc ký cân xứng, chân pic gọn. Hệ pha động chứa acid formic – ACN cho

pic cân xứng, 2 chất tách rõ rệt, tín hiệu chất phân tích cao hơn pha động có chứa methanol. Do đó hệ pha động acid formic – ACN được lựa chọn cho các khảo sát tiếp theo.

Tỉ lệ pha động trong sắc ký lỏng ảnh hưởng tới mức độ ion hóa, độ phân cực, khả năng lưu giữ trên cột của chất phân tích. Trong MS, tỉ lệ các thành phần pha động cũng gây ảnh hưởng tới nhiều nền và cường độ tín hiệu phân tích. Khi sử dụng chế độ rửa giải đẳng dòng chứa 60% ACN, chất phân tích kém lưu giữ, chlorate và perchlorate có thời gian rửa giải ngắn. Ngược lại, chế độ rửa giải đẳng dòng chứa 90% ACN, các chất phân tích tách tốt nhưng thời gian phân tích quá dài. Khi sử dụng chương trình rửa giải gradient (bảng 2), bắt đầu từ tỉ lệ ACN cao (90%) để tách 2 chất phân tích, sau đó giảm dần tỉ lệ ACN về 60% để tăng tốc độ rửa giải, rút ngắn được thời gian phân tích, các chất phân tích được tách và rửa giải trong thời gian phù hợp (10 phút).

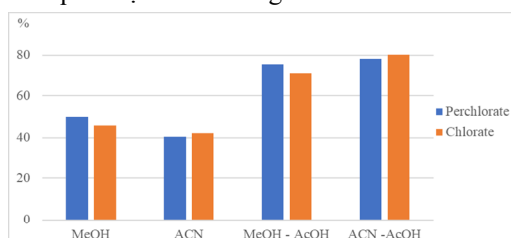
Bảng 2 Chương trình gradient pha động

Thời gian (phút)	Acid formic 0,1% (%)	ACN (%)
0,0	10	90
3,0	40	60
6,0	40	60
6,5	10	90
10,0	10	90

3.2. Tối ưu điều kiện xử lý mẫu

3.2.1. Khảo sát thành phần dung môi chiết mẫu

Để loại bỏ protein và chất béo trong nền mẫu sữa, tiến hành khảo sát ảnh hưởng của dung môi chiết: Methanol (MeOH); ACN; MeOH – AcOH 1%, ACN – AcOH 1% sử dụng mẫu trắng thêm chuẩn và đánh giá hiệu suất thu hồi. Kết quả được chỉ ra trong hình 1.

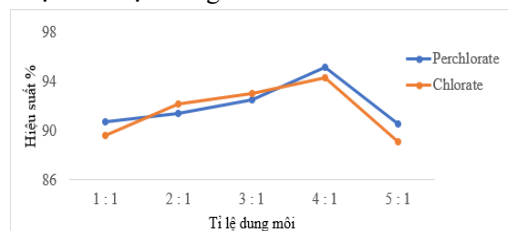


Hình 1. Ảnh hưởng của dung môi chiết đến hiệu suất thu hồi Perchlorate và Chlorate

Khi dung môi chiết hoàn toàn là dung môi hữu cơ, hiệu suất thu hồi giảm do chất phân tích có tính phân cực mạnh. Khi bổ sung thêm acid acetic, độ phân cực của dung môi chiết tăng thêm. Do đó, hiệu suất thu hồi cải thiện rõ rệt ở cả MeOH và ACN. Tuy nhiên, hiệu suất thu hồi của chlorate và perchlorate trong dung môi chiết ACN-AcOH cao hơn cho cả chlorate và perchlorate nên hỗn hợp dung môi này được lựa chọn cho các khảo sát tiếp theo.

3.2.2. Khảo sát tỉ lệ dung môi chiết

Việc bổ sung thêm acid acetic vào thành phần dung môi chiết cải thiện khả năng chiết mẫu nhờ tăng mức độ phân cực của dung môi chiết. Tuy nhiên, khi tỉ lệ acid acetic trong dung môi chiết tăng lên có thể gây ảnh hưởng tới tín hiệu chất phân tích do tăng số lượng ion đi vào detector làm giảm độ nhạy của phương pháp. Tiến hành khảo sát độ thu hồi của mẫu thêm chuẩn đối với dung môi chiết ACN – AcOH 1% ở các tỉ lệ 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1. Kết quả được thể hiện trong hình 2.



Hình 2. Ảnh hưởng của tỉ lệ dung môi chiết đến hiệu suất thu hồi Perchlorate và Chlorate

Kết quả cho thấy khả năng chiết mẫu hiệu quả nhất đối với cả Perchlorate và Chlorate ở tỉ lệ ACN: AcOH 1% (4:1). Vì vậy, tỉ lệ dung môi chiết này được lựa chọn cho quy trình chiết mẫu tối ưu.

3.2.3. Khảo sát quá trình làm sạch mẫu

Sau khi chiết mẫu, để loại bỏ tối đa sự ảnh hưởng của nền mẫu, chất hấp phụ làm sạch mẫu được sử dụng gồm: bột C18, bột PSA và bột carbon hoạt tính (GCB). Thí nghiệm được tiến hành trên mẫu trắng thêm chuẩn, chiết bằng dung môi chiết đã tối ưu, sau đó được làm sạch với 3 loại bột trên với khối lượng 100 mg cho mỗi bột. Kết quả cho thấy: bột PSA làm giảm mạnh khả năng thu hồi của chất phân tích do có bản chất là các nhóm amin. Ngược lại, bột C18 và GCB cho hiệu suất thu hồi cao hơn. Bột C18 ít phân cực, chỉ hấp phụ và loại

bỏ các tạp chất kém phân cực mà không gây ảnh hưởng tới Perchlorate – Chlorate, cho hiệu suất thu hồi tốt và được lựa chọn cho quy trình chiết tối ưu. Tiến hành khảo sát khả năng làm sạch mẫu của bột C18 ở các mức khối lượng từ 50 – 150 mg cho thấy: khi tăng khối lượng bột C18 từ 50 tới 100 mg, độ thu hồi của chất phân tích tăng lên. Tuy nhiên, khi lượng bột C18 sử dụng nhiều hơn 100 mg, độ thu hồi có xu hướng giảm xuống do bột C18 dư có thể hấp phụ chất phân tích. Do đó, 100 mg bột C18 là khối lượng tối ưu cho quá trình làm sạch.

3.3. Thẩm định phương pháp

3.3.1. Độ đặc hiệu

Tiến hành phân tích mẫu trắng, mẫu chuẩn và mẫu trắng thêm chuẩn tại mức nồng độ 50 µg/kg. Mẫu trắng không có tín hiệu của chất phân tích, mẫu trắng thêm chuẩn có pic của Perchlorate và Chlorate ở thời gian trùng khớp với thời gian lưu của chuẩn tương ứng (chênh lệch thời gian lưu không quá 2%). Theo cách tính điểm IP [14] khi sử dụng MS/MS, mỗi ion mẹ được tính 1 điểm, mỗi ion con là 1,5 điểm. Kết quả thu được trong bảng 1 cho thấy perchlorate và chlorate đều có số điểm IP = 4 thỏa mãn yêu cầu về số điểm IP tối thiểu. Bên cạnh đó, tỉ lệ ion là tiêu chí để khẳng định sự có mặt của chất phân tích. Kết quả tính toán tỉ lệ ion của Perchlorate và Chlorate được thể hiện trong bảng 3.

Bảng 3. Tỉ lệ ion của Perchlorate và Chlorate

Chất Phân tích	Perchlorate	Chlorate
Mẫu chuẩn	69,5	12,1
Mẫu thêm chuẩn	67,3	11,5
% sai lệch	± 13,9 %	± 4,96 %
Khoảng cho phép	± 20 %	± 30 %

Như vậy, phương pháp đảm bảo tính đặc hiệu để phân tích Perchlorate và Chlorate.

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

Tiến hành phân tích mẫu trắng thêm chuẩn với nồng độ thấp nhất có thể xuất hiện tín hiệu chất phân tích. Phân tích lặp lại 6 lần, LOD của phương pháp là nồng độ tại đó tín hiệu chất phân tích bằng khoảng 3 lần tín hiệu nhiễu đường nền, LOQ là nồng độ tại đó tín hiệu chất phân tích bằng khoảng 10 lần tín hiệu nhiễu đường nền. Phương pháp có giá trị LOD là 0,15 µg/kg và LOQ là 0,5 µg/kg cho cả

perchlorate và chlorate.

3.3.3. Đường chuẩn

Tiến hành thêm chuẩn vào dịch chiết mẫu trắng ở các mức nồng độ 1; 5; 10; 20; 50; 100 µg/kg và phân tích trên LC-MS/MS với các điều kiện đã được tối ưu. Xây dựng đường phụ thuộc giữa diện tích pic và nồng độ tương ứng thu được đường chuẩn và hệ số tương quan trong bảng 4.

Bảng 4. Đường chuẩn và hệ số tương quan của Perchlorate và Chlorate

Chất phân tích	Đường chuẩn	Hệ số tương quan R ²
Perchlorate	y = 547,75x – 194,4	0,9997
Chlorate	y = 184,04x + 97,672	1,0000

3.3.4. Độ lặp lại và độ thu hồi

Phân tích các mẫu trắng thêm chuẩn ở 3 mức nồng độ khác nhau 10; 20; 50 µg/kg. Lặp lại 6 lần cho mỗi nồng độ. Độ lệch chuẩn và hiệu suất thu hồi được thể hiện trong bảng 5.

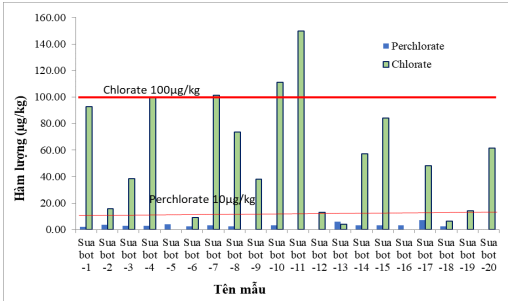
Bảng 5. Độ lặp lại và độ thu hồi của Perchlorate và Chlorate

Chất phân tích	Độ lệch chuẩn tương đối (RSD, %)	Hiệu suất thu hồi (%)
Perchlorate	3,0 – 10,4	80,3 – 103
Chlorate	2,7 – 3,0	89,0 – 99,7

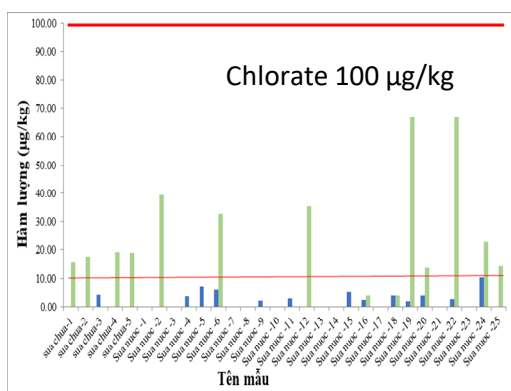
Kết quả cho thấy phương pháp có độ chính xác đáp ứng yêu cầu của AOAC [15] (độ thu hồi 60 - 115% và độ lệch chuẩn tương đối ≤ 21% tại nồng độ 10 µg/kg).

3.4. Ứng dụng phương pháp để phân tích Chlorate và Perchlorate trong một số sản phẩm sữa có trên thị trường

Kết quả khảo sát 50 mẫu sữa (20 mẫu sữa bột, 5 mẫu sữa chua và 25 mẫu sữa lỏng) được thể hiện trong hình 3 và hình 4.

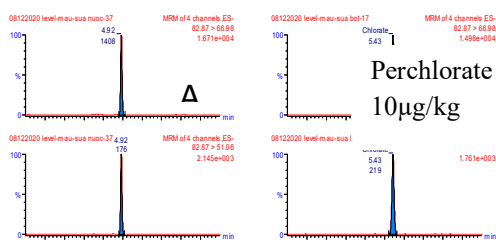


Hình 3. Đối chiếu kết quả chlorate và perchlorate trong mẫu sữa bột với MRLs theo quy định EC



Hình 4. Đối chiếu kết quả chlorate và perchlorate trong mẫu sữa nước với MRLs theo quy chuẩn EC

Kết quả cho thấy có 28/50 mẫu phát hiện Perchlorate và 32/50 mẫu phát hiện Chlorate. Trong đó, có 10/50 mẫu không phát hiện đối với cả Chlorate và Perchlorate. Ngoài ra, 2 mẫu sữa bột có hàm lượng Chlorate vượt quá MRLs theo quy định của EC. Hàm lượng của Perchlorate trong mẫu sữa khoảng 1,92-9,70 µg/kg. Điều này mang đến nhiều lo ngại về dư lượng Chlorate và Perchlorate trong thực phẩm ảnh hưởng đến sức khỏe người tiêu dùng. Sắc ký đồ mẫu sữa lỏng và sữa bột chứa Chlorate được thể hiện trong hình 5.



Hình 5. Sắc ký đồ mẫu sữa lỏng (A) và sữa bột (B) phát hiện Chlorate

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã thành công trong việc xác định hàm lượng Chlorate và Perchlorate trong sữa bằng phương pháp sắc ký lỏng ghép nối khối phổ. Quy trình phân tích đơn giản, phương pháp cũng đã được thẩm định về độ đặc hiệu, đường chuẩn, độ lặp lại, độ thu hồi, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng. Kết quả thẩm

định phương pháp cho thấy quy trình đã xây dựng phù hợp để xác định hàm lượng Chlorate và Perchlorate trong sữa. Kết quả phân tích 50 mẫu thực cho hàm lượng Chlorate và Perchlorate khác nhau trên các nền mẫu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). (2015). Risks for public health related to the presence of chlorate in food. *EFSA Journal*, 13(6), 4135.
2. World Health Organization. (2009). Benefits and risks of the use of chlorine-containing disinfectants in food production and food processing: report of a joint FAO/WHO expert meeting, Ann Arbor, MI, USA, 27-30 May 2008.
3. Capuco, A. V., Rice, C. P., Baldwin, R., Bannerman, D. D., Paape, M. J., Hare, W. R., ... & Van Tassell, C. P. (2005). Fate of dietary perchlorate in lactating dairy cows: Relevance to animal health and levels in the milk supply. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(45), 16152-16157.
4. Righi, E., Bechtold, P., Tortorici, D., Lauriola, P., Calzolari, E., Astolfi, G., ... & Aggazzotti, G. (2012). Trihalomethanes, chlorite, chlorate in drinking water and risk of congenital anomalies: a population-based case-control study in Northern Italy. *Environmental Research*, 116, 66-73.
5. Chen, L., Chen, H., Shen, M., Zhou, Z., & Ma, A. (2010). Analysis of perchlorate in milk powder and milk by hydrophilic interaction chromatography combined with
6. tandem mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(6), 3736-3740.
7. Pereira, J. T., Costa, A. O., de Oliveira Silva, M. B., Schuchard, W., Osaki, S. C., de Castro, E. A., ... & Soccol, V. T. (2008). Comparing the efficacy of chlorine, chlorine dioxide, and ozone in the inactivation of

Cryptosporidium parvum in water from Parana State, Southern Brazil. *Applied biochemistry and biotechnology*, 151(2), 464-473.

8. Commission regulation (EU) 2020/749 of 4 June 2020 amending Annex III to Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards maximum residue levels for chlorate in or on certain products.

9. Commission Regulation (EU) 2020/685 of 20 May 2020 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of perchlorate in certain foods.

10. HosainyáDavarani, S. (1995). Quantitative analysis of binary aqueous sodium chlorate and sodium perchlorate solution in the presence of sodium dichromate using Fourier transform infrared spectrometry. *Analyst*, 120(7), 1945-1948.

11. Krynitsky, A. J., Niemann, R. A., & Nortrup, D. A. (2004). Determination of perchlorate anion in foods by ion chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytical chemistry*, 76(18), 5518-5522.

12. Breadmore, M. C., Haddad, P. R., & Fritz, J. S. (2001). Optimisation of the separation of

anions by ion chromatography–capillary electrophoresis using indirect UV detection. *Journal of Chromatography A*, 920(1-2), 31-40.

13. Savini, S., Bandini, M., & Sannino, A. (2019). An improved, rapid, and sensitive ultra-high-performance liquid chromatography-high-resolution orbitrap mass spectrometry analysis for the determination of highly polar pesticides and contaminants in processed fruits and vegetables. *Journal of agricultural and food chemistry*, 67(9), 2716-2722.

14. J.D.De-Alwis, Euan Ross, Stuart Adams (2019), “Determination of Chlorate and Perchlorate in Infant Milk using a waters BEH DEA column and UPLC-MS/MS”, *Waters the science of what's possible*, 1-5.

15. Commission Decision (2002/657/EC) of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results.

16. Latimer, G. W. (2016). Guidelines for standard method performance requirements (appendix F), off. *Off. Methods Anal. AOAC Int.(OMA)*, 1-18..