

Đóng góp vào việc phát triển quy trình phân tích pentaclophenol trong mẫu thức ăn chăn nuôi bằng sắc ký lỏng ghép nối khối phổ hai lần (LC-MS/MS)

Nguyễn Thị Quỳnh, Nguyễn Thúy Ngọc*, Phạm Hùng Việt

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

Ngày nhận bài 22/10/2018; ngày chuyển phản biện 25/10/2018; ngày nhận phản biện 26/11/2018; ngày chấp nhận đăng 30/11/2018

Tóm tắt:

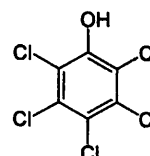
Pentaclophenol (PCP) đã từng được dùng phổ biến làm thuốc diệt cỏ, chất khử trùng, chất chống mối mọt. PCP độc với con người, có thể gây ung thư và đã bị hạn chế từ những năm 1980, nhưng PCP vẫn còn tồn tại rộng rãi trong môi trường. Nghiên cứu này tiến hành khảo sát quy trình phân tích PCP trong thức ăn chăn nuôi trên thiết bị LC-MS/MS. PCP được chiết bằng phương pháp QuEChERS sử dụng dung môi chiết là axetonitril cho hiệu suất cao nhất so với dung môi chiết là nước và metanol. Dịch chiết được phân tích bằng sắc ký lỏng 2 lần khối phổ với chế độ ion hóa âm. Hiệu suất thu hồi PCP trong nền thức ăn chăn nuôi đạt 91% tại giới hạn phát hiện của PCP trong mẫu là 0,33 ng/g và giới hạn định lượng là 1,1 ng/g, sai số phép đo CV% là 6,1. Áp dụng quy trình phân tích được khảo sát vào phân tích 28 mẫu thức ăn chăn nuôi thu thập ngoài thị trường và hàm lượng PCP đều nhỏ hơn giới hạn phát hiện của phương pháp.

Từ khóa: LC-MS/MS, Pentaclophenol, QuEChERS, thức ăn chăn nuôi.

Chỉ số phân loại: 1.4

Giới thiệu chung

Pentaclophenol (PCP) là hợp chất phenol được clo hóa, có công thức phân tử là C_6HCl_5O (hình 1). PCP tinh khiết tồn tại dưới dạng tinh thể không màu hoặc màu trắng [1]. PCP từng được sử dụng làm thuốc diệt cỏ, chất khử trùng và tác nhân kháng khuẩn. Trước đây, PCP thường được thêm vào chất kết dính, sơn, lớp phủ giấy, hộp chứa đựng, đặc biệt là thực phẩm và cũng được sử dụng trong da giày, sản xuất giấy [2]. Tuy nhiên, từ những năm 1980, do phát hiện một số ảnh hưởng xấu đến động vật và con người, PCP đã bị hạn chế sử dụng [3]. PCP gây ức chế tổng hợp ATP và amino axit tự do, phá vỡ sự trao đổi chất của sinh vật và ảnh hưởng đến khả năng sinh sản của một số động vật không xương sống [3]. PCP độc đối với con người khi tiếp xúc qua đường ăn uống và hô hấp. Hít phải PCP gây ảnh hưởng đến thần kinh, máu, gan và gây kích ứng mắt. Tiếp xúc với PCP trong thời gian dài gây tác động lên đường hô hấp, máu, thận, gan, hệ miễn dịch, mắt, mũi và da. Cơ quan Bảo vệ môi trường Mỹ (EPA) đã phân loại pentaclophenol vào nhóm B2, chất có thể gây ung thư ở người [1, 3].



Hình 1. Công thức cấu tạo của pentaclophenol.

Hiện nay, thức ăn chăn nuôi phần lớn đều dùng các loại cám đóng gói sẵn với nhiều chất phụ gia và chất bảo quản, chống nấm mốc thay cho các loại thức ăn có nguồn gốc từ thiên nhiên như thóc, cám gạo hay rau trước đây. Thức ăn chăn nuôi được xem là nguồn gốc chính gây ô nhiễm thực phẩm có nguồn gốc từ động vật [4]. Thực phẩm bị ô nhiễm các chất hóa học ảnh hưởng lớn đến sức khỏe của con người, các chất này sẽ bị tích lũy liên tục qua chuỗi thức ăn và đi vào cơ thể qua đường ăn uống. PCP là một chất gây ô nhiễm hữu cơ khó phân hủy trong môi trường được công bố trong Công ước Stockholm [5]. Nhiều nghiên cứu đã tìm thấy PCP ở nước mặt, nước ngầm và trong đất [6]. Nghiên cứu trong trầm tích nước ngọt và sữa mẹ được thu thập từ châu thổ sông Châu Giang, Trung Quốc, PCP với hàm lượng trung bình trong trầm tích sông là 7,93 ng/g, trong sữa mẹ là 2,15 ng/g [7]. Sử dụng PCP sẽ làm chúng tồn tại trong môi

*Tác giả liên hệ: Tel: 0917655657; Email: ngthngoc@yahoo.com

Contribution to the development of analysis methods of pentachlorophenol in animal feeding stuffs by liquid chromatography hyphenated with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

Thi Quynh Nguyen, Thuy Ngoc Nguyen*,
Hung Viet Pham

University of Science, Vietnam National University, Hanoi

Received 22 October 2018; accepted 30 November 2018

Abstract:

Pentachlorophenol (PCP) was popularly used as herbicides, disinfectants and protectors from wood-eaters and white ants. PCP is a toxic substance that might cause cancer in humans. Although it has been restricted since 1980, the PCP is still existing in the environment widely. The research was implemented to investigate the optimal conditions for analytical methods of PCP in animal feeding stuffs on LC-MS/MS equipment. PCP was extracted by the QuEChERS method using acetonitrile with a high extraction efficiency in comparison with methanol and water solvents. The final extract was analysed by liquid chromatography coupled to double mass spectrometry which was operated in the negative electro-spray ionisation mode. The recovery of PCP in animal feeding stuffs was 91% at the PCP levels for the detection limit of 0.33 ng/g and the quantification limit of 1.1 ng/g with a coefficient variation of 6.1%. This study applied the optimal analytical method to analyse 28 feeding stuff samples collected in the market and results showed that PCP concentrations of all samples were below the detection limit.

Keywords: animal feeding stuffs, LC-MS/MS, Pentachlorophenol, QuEChERS.

Classification number: 1.4

trường, thực phẩm và cuối cùng là tích lũy trong cơ thể con người. Do đó, việc kiểm soát sự có mặt của PCP trong thức ăn chăn nuôi và thực phẩm là thực sự cần thiết.

Hiện tại, Việt Nam chưa có phương pháp tiêu chuẩn nào để phân tích PCP trong thực phẩm cũng như thức ăn chăn nuôi. Nghiên cứu này tiến hành khảo sát quy trình phân tích PCP trên thiết bị sắc ký lỏng hai lần khối phổ (LC-MS/MS) cho nền mẫu thức ăn chăn nuôi và áp dụng quy trình phân tích một số thức ăn cho lợn, gà, cá, chó, mèo... đang được bán trên thị trường.

Thực nghiệm

Hóa chất, thiết bị

Tất cả các dung môi và hóa chất sử dụng trong nghiên cứu này đều có độ tinh khiết phù hợp cho việc phân tích trên thiết bị LC-MS/MS như axetonitril, metanol, nước deion, muối magê sulphat, muối natri clorua, axit fomic, ammoni formate. Chất chuẩn pentachlorophenol (PCP, độ tinh khiết 95%), chất nội chuẩn pentachlorophenol -¹³C₆ (100 ng/μl) của hãng Cambridge Isotope Laboratories (CIL), Mỹ.

Mẫu sau khi xử lý được phân tích trên thiết bị sắc ký lỏng ghép nối hai lần khối phổ LC-MS/MS 8040 của hãng Shimadzu, Nhật Bản.

Lấy mẫu và chuẩn bị mẫu

Mẫu thức ăn chăn nuôi (28 mẫu) bao gồm cám cho lợn, gà, chim, cá và thức ăn cho chó và mèo được mua ngẫu nhiên ở các chợ trên địa bàn Hà Nội. Mẫu mua về được nghiền nhỏ bằng cối sứ, sau đó trộn đều. Các dụng cụ trước khi sử dụng được rửa sạch, tráng bằng nước deion, axeton và metanol. Mẫu sau khi nghiền nhỏ được bảo quản lạnh ở nhiệt độ -18°C chờ phân tích. Mẫu dùng để khảo sát quy trình được chọn là thức ăn cho lợn. Thức ăn cho lợn là loại hỗn hợp của nhiều thành phần dinh dưỡng bao gồm cám, bột ngô, chất đạm từ bột cá, bột đậu, khoáng chất... khá đại diện cho thức ăn chăn nuôi.

Xử lý mẫu

Áp dụng phương pháp QuEChERS cho xử lý mẫu thức ăn chăn nuôi. Cân mẫu 2,5 g (±0,10 g) cho vào ống chiết polypropylene (PP) chia vạch có nắp 50 ml. Thêm 20 μl dung dịch chất nội chuẩn ¹³C₆-PCP nồng độ 1 ng/μl và thêm 7,5 ml nước deion rồi để yên trong 1 giờ. Sau đó, thêm 10 ml dung môi chiết lắc trong 1 phút. Tiếp đến, thêm muối 4 g magê sulphate và 1 g natri clorua vào ống PP và lắc đều bằng thiết bị lắc rung vortex trong 1 phút. Cuối cùng dung dịch được ly tâm trong 5 phút với tốc độ 1500 vòng/phút. Lớp dung dịch hữu cơ ở phía trên được hút ra 1 ml và cho vào ống PP chia vạch 15 ml. Mẫu được cô cạn gần hết bằng khí nitơ và định mức trở lại 1 ml bằng dung môi chiết. Mẫu được lắc vortex trong 30 giây và lọc qua màng lọc nylon kích thước lỗ 0,2 μm và chuyển sang lọ bơm mẫu cho sắc ký lỏng.

Phân tích LC/MS-MS

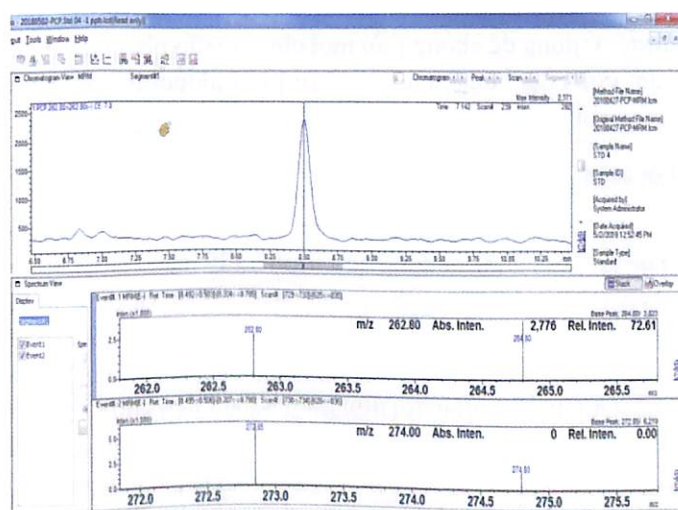
Mẫu thức ăn chăn nuôi sau khi xử lý được xác định bằng thiết bị sắc ký lỏng ghép nối hai lần khối phổ LC-MS/MS 8040, Shimadzu, Nhật Bản. 2 µl dịch chiết được bơm vào thiết bị với cột Poroshell 120-EC18 (Agilent, Mỹ) (2,1 mm I.D. × 150 mm × 2,7 µm), tiền cột Zorbax Eclipse Plus - C18 (2,1 × 12,5 mm × 5 µm) với kênh A là hỗn hợp gồm 1 ml dung dịch muối ammonium (1M), định mức đến 1000 ml bằng nước deion và 20 µl axit formic. Kênh B là hỗn hợp gồm 1 ml dung dịch muối ammonium (1M), 50 ml nước deion, định mức đến 1000 ml bằng metanol và 20 µl axit formic. Tốc độ dòng 300 µl/phút, chương trình dung môi bắt đầu với 45% pha động B (0÷1 phút) tăng dần đến 92% pha động B (4÷9 phút) trước khi giảm về 45% pha động B (9,5÷16 phút), nhiệt độ cột tách được duy trì ở 40°C. PCP được ion hóa nhờ kỹ thuật ion hóa phun điện tích (ESI) với chế độ âm tại thế 3,5 kV. Tốc độ khí phun sương 3 l N₂/phút; tốc độ khí làm khô 15 l N₂/phút; nhiệt độ thanh dẫn ion (DL) 250°C và áp suất khí buồng va chạm ion (CID) 230 kPa Argon. Thông số MS/MS cho PCP và PCP-¹³C₆ được liệt kê trong bảng 1.

Bảng 1. Các thông số MS/MS cho phân tích pentaclophenol.

Tên chất	Ký hiệu	MRM định lượng (m/z)	MRM định tính (m/z)	Thế Q1 (V)	Thế CE (V)	Thế Q3 (V)
Pentaclophenol	PCP	262,8	264,8	30	7	15
Pentaclophenol-C13	PCP- ¹³ C ₆	272,85	274,8	30	7	15

MRM (multiple reaction monitoring): chế độ quan trắc phổ khối 2 lần.

Đường chuẩn được lập 7 điểm theo phương pháp nội chuẩn, nồng độ PCP từ 0÷40 ng/ml, nồng độ chất nội chuẩn ¹³C₆-PCP: 20 ng/ml, hệ số tương quan của đường chuẩn thu được là rất tốt R²>0,999 (hình 2).



Hình 2. Sắc đồ chuẩn PCP (1 ng/ml) và đường chuẩn.

Kết quả nghiên cứu

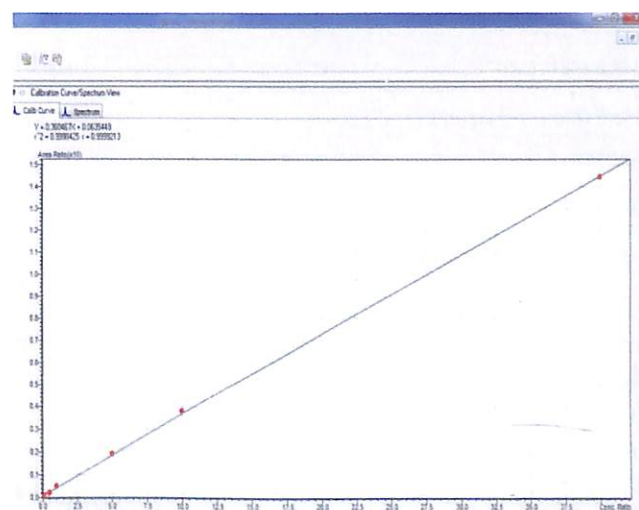
Khảo sát dung môi chiết mẫu

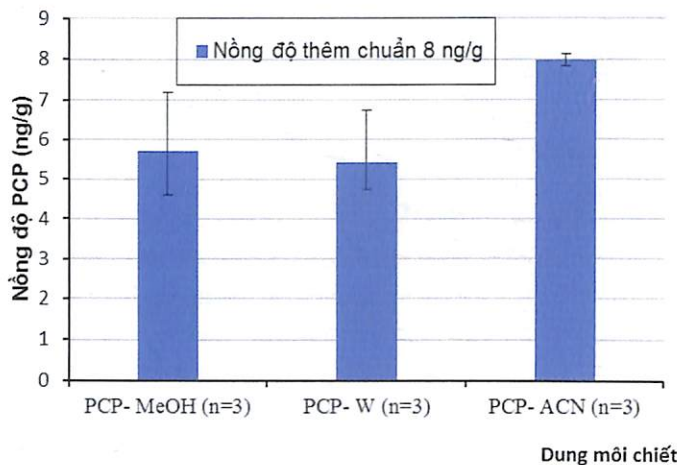
Cân mẫu thức ăn chăn nuôi lợn cho vào 10 ống chiết polypropylene (PP) 50 ml có chia vạch và nắp, mỗi ống khoảng 2,5 g mẫu. Thêm 20 µl ¹³C₆-PCP dung dịch làm việc 1 ng/µl và thêm 7,5 ml nước deion rồi để yên trong 1 giờ. Vì pentaclophenol là chất phân cực và phương pháp phân tích lựa chọn là sắc ký lỏng khối phổ nên chúng tôi lựa chọn các dung môi phân cực như axetonitril, metanol và nước để khảo sát. Thêm mỗi loại dung môi chiết vào 3 ống chiết PP với thể tích mỗi ống 10 ml, và lắc trong 1 phút. Thực hiện các bước chiết tiếp theo như trong quy trình xử lý mẫu ở trên. Hàm lượng PCP trong mẫu thức ăn chăn nuôi cho lợn với dung môi chiết được thể hiện trong hình 3. Với dung môi chiết là axetonitril kết quả thu được cho hiệu suất và độ lặp tốt nhất trong cả 3 dung môi chiết. Điều này có thể giải thích là do nước và metanol là các dung môi rất phân cực, trong khi đó axetonitril là dung môi phân cực trung bình, có thể hòa trộn với nước và nhiều dung môi hữu cơ. Axetonitril có thể phân tách nhiều hợp chất ion và chất phân cực vừa, do đó nó có khả năng chiết tách PCP tốt hơn nước và metanol.

Trên cơ sở khảo sát 3 loại dung môi chiết, chúng tôi lựa chọn dung môi axetonitril làm dung môi chiết hợp chất PCP. Dung dịch chuẩn PCP được thêm vào nền mẫu thức ăn chăn nuôi cho lợn. Tiến hành xử lý 5 lần mẫu lặp để xác định hiệu suất thu hồi, độ lặp của phương pháp tại một số nồng độ khác nhau.

Giới hạn phát hiện của thiết bị

Bơm lặp lại 7 lần dung dịch chuẩn nồng độ 0,5 ng/ml với các điều kiện phân tích LC-MS/MS. Giới hạn phát hiện





Hình 3. Hàm lượng PCP trong mẫu thức ăn chăn nuôi với dung môi chiết là methanol (MeOH), nước (W) và axetonitrile (ACN).

(LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) của thiết bị được tính 3 và 10 lần độ lệch chuẩn kết quả của các lần bơm. Bảng 2 trình bày kết quả giới hạn phát hiện của thiết bị LOD là 0,035 ng/ml và giới hạn định lượng LOQ của thiết bị là 0,115 ng/ml.

Bảng 2. Xác định giới hạn phát hiện của thiết bị.

Tên mẫu	Diện tích (A_{PCP})	Diện tích (A_{IS})	A_{PCP}/A_{IS}
PCP.Std 03-0,5 ppb007.lcd	6,048	30,814	0,196
PCP.Std 03-0,5 ppb006.lcd	6,325	30,758	0,206
PCP.Std 03-0,5 ppb005.lcd	6,189	31,298	0,198
PCP.Std 03-0,5 ppb004.lcd	6,223	31,914	0,195
PCP.Std 03-0,5 ppb003.lcd	6,210	30,329	0,205
PCP.Std 03-0,5 ppb002.lcd	6,270	30,333	0,207
PCP.Std 03-0,5 ppb001.lcd	6,341	30,912	0,205
Trung bình			0,202
Độ lệch chuẩn (SD)			0,005
Độ lệch chuẩn - SD (ng/ml)			0,012
LOD (3SD) (ng/ml)			0,035
LOQ (10SD) (ng/ml)			0,115

Hiệu suất thu hồi, độ lặp lại, MDL

Dựa trên nồng độ LOQ của thiết bị, kết quả khảo sát dung môi chiết, hiệu suất thu hồi, độ lặp lại và giới hạn phân tích của thiết bị được thực hiện trên nền 5 mẫu thức ăn cho lợn được thêm chuẩn 50 µl nồng độ 100 ppb và 20 µl IS nồng độ 1 ppm. Mẫu trắng là mẫu thức ăn chỉ thêm chất nội chuẩn IS. Giới hạn phát hiện của phương pháp (MDL) là 0,33 ng/g mẫu với sai số CV 6,1%. Hiệu suất thu hồi được thể hiện trong bảng 3.

Bảng 3. Hiệu suất thu hồi, độ lặp lại và MDL.

	Nồng độ trong dịch chiết (ng/ml)	Khối lượng mẫu (g)	Nồng độ trong mẫu (ng/g)	Hiệu suất H (%)
PCP- MDL-01.lcd	0,409	2,50	1,64	81,8
PCP- MDL-02.lcd	0,446	2,51	1,78	89,2
PCP- MDL-03.lcd	0,459	2,51	1,83	91,8
PCP- MDL-04.lcd	0,464	2,50	1,86	92,8
PCP- MDL-05.lcd	0,485	2,51	1,93	97,0
Trung bình			1,81	90,5
Độ lệch chuẩn (SD)			0,11	
MDL (3SD) (ng/g)			0,33	
CV(%)			6,1	

Từ giới hạn phát hiện của phương pháp là 0,33 ng/g mẫu, chúng tôi kiểm tra lại độ lặp lại, hiệu suất thu hồi của nền mẫu với nồng độ PCP trong mẫu cỡ 40 ng/g mẫu. Mẫu thức ăn cho lợn được thêm 100 µl dung dịch chuẩn PCP nồng độ 1 ppm và 20 µl IS nồng độ 1 ppm. Thực hiện toàn bộ quy trình xử lý mẫu với 5 mẫu lặp và một nền mẫu thức ăn không được thêm chuẩn. Hiệu suất thu hồi thu được dao động từ 89 đến 96% với sai số CV 2,7%.

Phân tích mẫu thực tế

Mẫu thức ăn chăn nuôi được mua ngoài thị trường bao gồm thức ăn cho chim (8 mẫu), cá (4 mẫu), lợn (7 mẫu), gà (5 mẫu), chó (2 mẫu) và mèo (2 mẫu). Trong số đó, 22 loại thức ăn chăn nuôi được sản xuất tại Việt Nam và 6 loại thức ăn chăn nuôi được sản xuất tại Thái Lan. Áp dụng quy trình phân tích chiết mẫu bằng phương pháp QuEChERS với dung môi axetonitril và định tính, định lượng trên thiết bị LC-MS/MS. Tất cả các mẫu đều không phát hiện thấy pentaclophenol. Điều này chứng tỏ pentaclophenol không được sử dụng để chống mối mọt cho các sản phẩm như cám, gạo, ngũ cốc... hoặc không có sự phơi nhiễm từ các bao bì đóng gói.

Kết luận

Qua khảo sát quy trình phân tích pentaclophenol trong thức ăn chăn nuôi sử dụng quy trình xử lý mẫu bằng phương pháp QuEChERS với dung môi axetonitril và định lượng trên thiết bị sắc ký lỏng 2 lần khối phổ, cho hiệu suất thu hồi 90,5%, độ lệch CV 6,1% và giới hạn phát hiện 0,33 ng/g mẫu khô. Quy trình tương đối đơn giản, thuận tiện cho việc kiểm tra chính xác nồng độ pentaclophenol có trong mẫu thức ăn chăn nuôi nói chung và giới hạn phát hiện của phương pháp thấp hơn nhiều tiêu chuẩn cho phép của Ủy ban châu Âu (EC No. 396/2005) đối với dư lượng thuốc bảo vệ thực vật

trong thức ăn của con người và vật nuôi là 0,01 mg/kg [8]. PCP không được phát hiện thấy trong 28 mẫu thức ăn cho gia súc và vật nuôi tại Hà Nội, tuy nhiên cần có những khảo sát trên diện rộng hơn để có những đánh giá đầy đủ sự có mặt PCP trong thức ăn chăn nuôi hay không.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm nghiên cứu xin cảm ơn Trường Đại học và Nghiên cứu Rikilt Wageningen (Hà Lan) đã cung cấp chất chuẩn và mẫu kiểm tra cho nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] United States Environmental Protection Agency, *Consumer Factsheet on: Pentachlorophenol*.
- [2] Daniel Carrizosa, Joan O. Grimalta, Nuria Ribas-Fitob, Maties Torrentc, Jordi Sunyerb (2008), "Pentachlorobenzene, hexachlorobenzene, and pentachlorophenol in children's serum from industrial and rural populations after restricted use", *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **71**, pp.260-266.
- [3] R. Bettinetti, et al. (2018), "The European water-based environmental quality standard for pentachlorophenol is NOT protective of benthic organisms", *Science of the Total Environment*, **613-614**, pp.39-45.
- [4] Jadwiga Piskorska, Pliszczynska, PawelStrucinski, SzczepanMikolajczyk, SebastianMaszewski, JaroslawRachubik, MarekPajurek (2016), "Pentachlorophenol from an old henhouse as a dioxin source in eggs and related human exposure", *Environmental Pollution*, **208**, pp.404-412.
- [5] F. El Ghissassi, Y. Grosse, N. Guha, K.Z. Guyton, D. Loomis, H. Mattock, A. Shapiro, K. Straif (2016), "Carcinogenicity of pentachlorophenol and some related compounds", *The Lancet Oncology*, **17**, pp.1637-1638.
- [6] Chiu-Jung Liao, Tay-Lung Chung, Wen-Liang Chen, Shu-Lung Kuo (2007), "Treatment of pentachlorophenol-contaminated soil using nano-scale zero-valent iron with hydrogen peroxide", *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, **265**, pp.189-194.
- [7] H.C. Hong, H.Y. Zhou, T.G. Luan, C.Y. Lan (2005), "Residue of pentachlorophenol in freshwater sediments and human breast milk collected from the Pearl River Delta, China", *Environment International*, **31**, pp.643-649.
- [8] http://publications.europa.eu/resource/cellar/2d8be373-594c-4e6b-8094-807740c3c2ad.0005.02/DOC_4.