

XÁC NHẬN GIÁ TRỊ SỬ DỤNG CỦA PHƯƠNG PHÁP UPLC/MS/MS ĐỂ PHÂN TÍCH HÀM LƯỢNG TINOPAL CBS-X TRONG GẠO

Đến tòa soạn 03-10-2023

Nguyễn Kiều Hưng*, Lê Văn Cường, Nguyễn Thu Hằng, Trần Văn Lương

Cục Cảnh sát phòng, chống tội phạm về môi trường, Bộ Công an

*Email: hungfly.77@gmail.com

SUMMARY

VALIDATION OF UPLC/MS/MS METHOD FOR DETERMINATION OF TINOPAL CBS - X IN RICE PRODUCTS

A method based on ultra high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (UPLC/MS/MS) as development for simple and rapid determination of the residues of tinopal CBS - X in rice products. The sample were extracted by 4 % phosphoric acid in acetonitrile and then analyzed in multiple reaction monitoring (MRM) mode. The mobile phase was composed of solvent A (water) and solvent B (acetonitrile). Gradient program was performed as follows: 0 - 0.5 min, 80% A; 0.5 - 4.0 min, 20% A and at initial condition. Total run time is 8 min. The flow rate was settled at 0.3 ml/min with an injection volume of 10 μ l. Under the optimized conditions, the linear range for tinopal CBS - X is 1.0 – 10 ng/g, the linear correlation coefficients are more than 0.99. The limits of quantification of tinopal CBS - X are 2.20 ng/g. The recoveries of tinopal CBS - X ranged from 93.50 % - 118.3 % with relative standard deviation (RSD) between 0.96 – 12.06 %. The method was validated according to the Directive 2002/657/EC and subsequently applied to 18 samples of rice products.

Keywords: tinopal CBS - X; rice products; UPLC/MS/MS.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong thời gian qua, tình hình sử dụng chất cấm trong thực phẩm vẫn diễn biến phức tạp, gây nhiều bức xúc cho người tiêu dùng. Các chất cấm được sử dụng chủ yếu như auramine O, salbutamol, clenbuterol, ractopamine, vat yellow, hàn the, tinopal, formol ... gây ảnh hưởng xấu đến sức khỏe người dân. Tinopal được biết đến là một loại hóa chất chỉ được phép sử dụng trong một số ngành công nghiệp và không được phép sử dụng trong thực phẩm. Tinopal CBS-X là một chất làm trắng quang học có tên khoa học là 4,4-bis (2-sulfostyryl)biphenyl, công thức phân tử là $C_{28}H_{20}Na_2O_6S_2$. Tinopal CBS - X là chất làm trắng huỳnh quang có khả năng phát huỳnh quang và gây ra hiệu ứng tán xạ trên bề mặt sản phẩm mà chúng bám vào làm cho sản phẩm có cảm giác trắng hơn. Chính vì vậy, nhiều cơ sở sản xuất đã

sử dụng chất tinopal CBS-X trong sản xuất bún hoặc một số sản phẩm chế biến từ gạo để làm tăng độ trắng sáng, cải thiện độ bóng bề mặt làm cho sản phẩm hấp dẫn hơn, bền hơn. Theo nhiều nghiên cứu, tinopal có thể gây nhiều tác hại cho con người khi ăn những loại thực phẩm chứa tồn dư chất này có thể gây hại đường tiêu hóa, niêm mạc thành ruột, có nguy cơ đưa đến tình trạng viêm loét dạ dày, ung thư.

Để kiểm soát triệt để việc sử dụng tinopal CBS - X trong sản xuất, kinh doanh bún, bánh phở, bánh canh tươi, ngày 16/8/2013 Cục An toàn thực phẩm, Bộ Y tế đã có văn bản số 1731/ATTP-KN yêu cầu Sở Y tế các tỉnh, thành phố trực thuộc Trung ương phối hợp truy nguyên nguồn gốc nguyên liệu, kiểm soát tinopal CBS - X trong sản xuất bún; chỉ đạo các đơn vị chức năng trên địa bàn tiếp tục phối hợp kiểm tra, giám sát, lấy mẫu nghi ngờ để kiểm nghiệm chất tinopal CBS - X đối

với các sản phẩm chế biến bột, tinh bột truyền thống như bún, bánh phở, bánh canh tươi... Điều tra, truy nguyên ô nhiễm tinopal CBS - X đối với sản phẩm, chú ý đối với cơ sở sản xuất nguyên liệu “bột ướt”, lấy mẫu và kiểm nghiệm đối với nguyên liệu nghi ngờ ô nhiễm tinopal, trong giai đoạn chưa xây dựng được phương pháp phân tích cho phòng thí nghiệm của đơn vị, có thể áp dụng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) sử dụng đầu dò huỳnh quang để kiểm nghiệm xác định tinopal CBS-X trong thực phẩm. Các cơ quan/đơn vị trước khi sử dụng phải thực hiện xác nhận hiệu lực của phương pháp theo quy định của tiêu chuẩn ISO/IEC 17025.

Tại Việt Nam hiện chưa thấy công bố nào nghiên cứu phát hiện tinopal bằng kỹ thuật HPLC-MS/MS. Phương pháp này hiện đang được các phòng thí nghiệm quan tâm nghiên cứu để tận dụng ưu điểm của detector MS/MS so với detector UV. Trên thế giới, năm 2014, nhóm tác giả Kyung YuK Ko và cộng sự [2] đã công bố phương pháp xác định tinopal CBS - X trong nền mẫu gạo và bún gạo với độ thu hồi dao động trong khoảng từ 70,3 - 83,3% và 63,4 - 78,7%, giới hạn định lượng lần lượt là 1,58 và 1,51 ng/g tương ứng. Phương pháp này đã áp dụng phân tích 5 mẫu thực tế là các mẫu gạo và bún gạo của Việt Nam, Thái Lan, Hàn Quốc, trong đó phát hiện có 01 mẫu bún gạo của Việt Nam dương tính với tinopal CBS - X (hàm lượng 2,1 mg/kg). Năm 2020, nhóm tác giả Trần Thái Thành và cộng sự [3] cũng nghiên cứu khảo sát ảnh hưởng của các phương pháp làm giảm nồng độ tinopal CBS - X của thực phẩm, kết quả cho thấy phương pháp đo trên máy sắc ký lỏng hiệu năng cao có độ nhạy cao, chính xác với tỷ lệ 98,4% so với 105,6% của phương pháp đo quang phổ UV.

Phương pháp UPLC/MS/MS trong nghiên cứu này đạt độ nhạy và độ chọn lọc cao, quy trình chiết mẫu đơn giản, dung môi thông dụng, thời gian phân tích nhanh. Mẫu được chiết bằng hỗn hợp dung môi acid phosphoric 4% trong acetonitrile, sau đó định lượng trên UPLC- MS/MS. Kháng định chất nghiên cứu bằng 4 ion đặc trưng, phương pháp đã được thẩm định về độ phù hợp của hệ thống sắc ký, tính đặc hiệu, khoảng tuyến tính, độ đúng, giới hạn phát hiện, giới hạn định

lượng đạt yêu cầu theo các quy định của cộng đồng chung Châu Âu [5].

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Hoá chất

Tất cả các hóa chất dùng trong nghiên cứu này đều thuộc loại tinh khiết phân tích. Acetonitrile (ACN); metanol (MeOH); nước tinh khiết dùng cho HPLC đều của Merck, Đức; acid phosphoric 85% (Trung Quốc); chuẩn tinopal CBS-X 96% (CAS 27344-41-8, Canada); dung dịch chuẩn gốc có nồng độ 100 µg/mL, bảo quản -20°C. Dung dịch ACN:H₃PO₄ (6:4) được chuẩn bị bằng cách hút 40 mL dung môi H₃PO₄, cho vào bình định mức 100 mL, định mức đến vạch bằng ACN. Dung dịch chuẩn làm việc được pha từ chuẩn gốc có các nồng độ lần lượt là 1,0; 2,0; 3,0, 5,0, 7,0 và 10 ng/mL. Dung dịch chuẩn gốc và dung dịch làm việc đều được pha trong dung môi ACN:H₃PO₄ (6:4), dung dịch làm việc pha trước khi sử dụng. Pha động: Kênh A là nước, kênh B là ACN. Chương trình pha động bắt đầu 80% A trong 0,5 phút, giảm xuống 20% A tại 1,0 phút, giữ trong 4 phút và kết thúc tại điều kiện ban đầu, tổng thời gian phân tích mẫu là 8 phút, tốc độ dòng 0,3 ml/phút, thể tích hút là 10 µL.

2.2. Thiết bị

Thiết bị sắc ký lỏng khối phổ UPLC-MS/MS (Waters, Mỹ), gồm các bộ phận chính như bơm, bộ tiêm mẫu tự động, bộ điều nhiệt cột, bộ khử khí, bộ ghép nối khối phổ Waters Acquity TQ Detector và phần mềm xử lý Masslynx 4.1. Cột sắc ký Acquity UPLC[®]BEH C18 2.1x100 mm, 1,7 µm, (Waters, Mỹ). Nhiệt độ cột 40°C. Chế độ phân tích MRM, kiểu ion hóa âm, nhiệt độ nguồn 120°C, nhiệt độ khử dung môi 350°C, dòng khử khí 800 L/hr. Điện thế mao quản 3,0 kV, điện thế cone 94V, áp suất chân không 3,82.e⁻³ mbar.

2.3. Quy trình xử lý mẫu

Chuẩn bị mẫu trắng: mẫu trắng được chuẩn bị như mẫu thử, sau đó phân tích trên hệ UPLC/M/MS. Mẫu không phát hiện thấy tinopal CBS - X được sử dụng làm mẫu trắng.

Chuẩn bị mẫu thử: Cân chính xác 5,0 g ± 0,05 g mẫu thử đã được đồng nhất cho vào ống ly tâm 50 mL. Thêm chính xác 10 mL ACN:H₃PO₄ (6:4), lắc

đều 10 phút trên máy vortex cho đều mẫu, giữ trong bể siêu âm đúng 30 phút, ly tâm 5000 vòng/phút trong 10 phút (t^o phòng), sau đó gạn lấy phần dịch trong. Tiếp tục chiết lặp lại lần nữa, gộp toàn bộ dịch chiết, ly tâm 5000 vòng/phút trong 10 phút, gạn lấy phần dịch trong, định mức chính xác đến 20 mL bằng dung môi ACN:H₃PO₄ (6:4), hút 1mL lọc qua màng lọc 0,22 µm, khử khí và tiến hành đo trên máy UPLC/MS/MS [3].

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả khảo sát tính đặc hiệu, chọn lọc

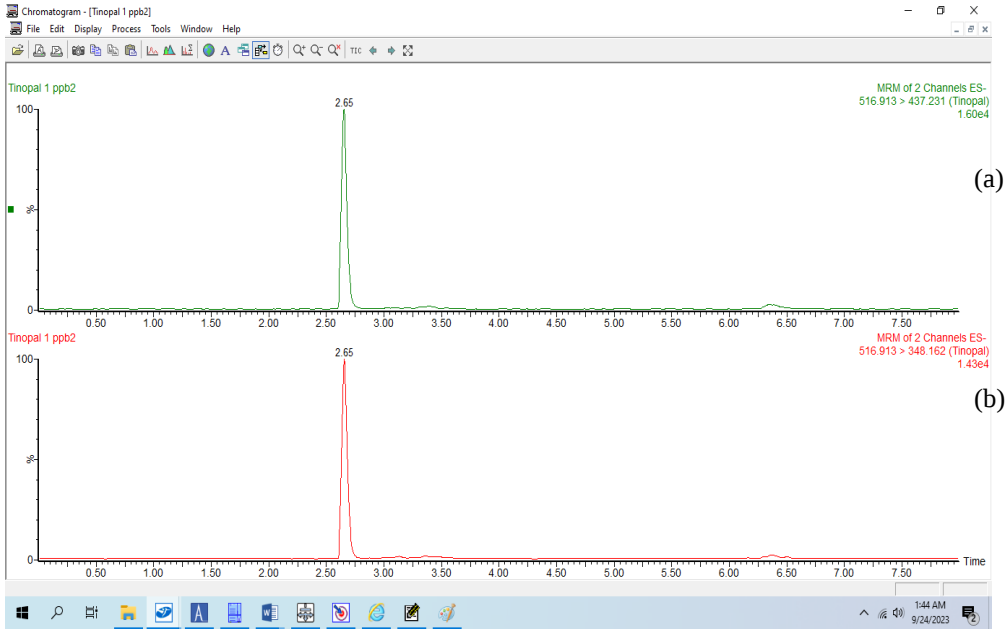
Áp dụng các điều kiện phân tích nêu ở mục 2 để phân tích dung dịch chuẩn tinopal CBS - X ở mức nồng độ 1,0 ng/mL, thu được tín hiệu với thời gian lưu của tinopal CBS - X là 2,65 phút (hình 1). Năng lượng phân mảnh các ion đặc trưng được trình bày trong bảng 1. Ảnh hưởng của nền mẫu

trong quá trình phân tích cũng đã được khảo sát. Kết quả bảng 2 cho thấy các diện tích pic của mỗi ion lần lượt trong dung dịch chuẩn và dung dịch thêm chuẩn vào nền mẫu sau xử lý tương tự nhau, điều này chứng tỏ không có hiệu ứng nền trong giai đoạn tạo ion ở đầu dò khối phổ. Khoảng dao động ion của tinopal CBS - X trong dung dịch mẫu đều nằm trong khoảng cho phép, phù hợp với quyết định 657/2002/EC của Châu Âu [4].

Bảng 1. Năng lượng phân mảnh ion của tinopal CBS - X

Tên chất	Ion sơ cấp (m/z)	Ion thứ cấp (m/z)	Thời gian Dwell (s)	Điện thế Cone (V)	Năng lượng Cone (eV)
Tinopal CBS-X	516,91	437,23	0,161	94	38
		348,16	0,161	94	36

Ghi chú: ion gạch chân là ion dùng để định lượng



Hình 1. Sắc đồ chuẩn tinopal CBS - X tại nồng độ 1,0 ng/mL
(a) Sắc đồ ion định lượng 516,91 > 437,23, (b) sắc đồ ion xác nhận 516,91 > 348,16.

Bảng 2: Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nền mẫu và khoảng dao động ion

Chất phân tích	Nồng độ (ng/ml)		3,0	5,0	10	Khoảng dao động ion (%)
Tinopal CBS - X	Dung dịch chuẩn	S ₄₃₇	3166	5903	8696	0,87 – 0,93
		S ₃₄₈	2915	5502	8121	
	Thêm vào mẫu sau xử lý	S ₄₃₇	2839	3396	8151	
		S ₃₄₈	2534	3084	7152	

3.2. Khảo sát khoảng tuyến tính và đường chuẩn

Đường chuẩn được thực hiện trên nền mẫu trắng, sau đó thêm chuẩn tại các nồng độ 1,0; 2,0; 3,0;

Compound name: Tinopal

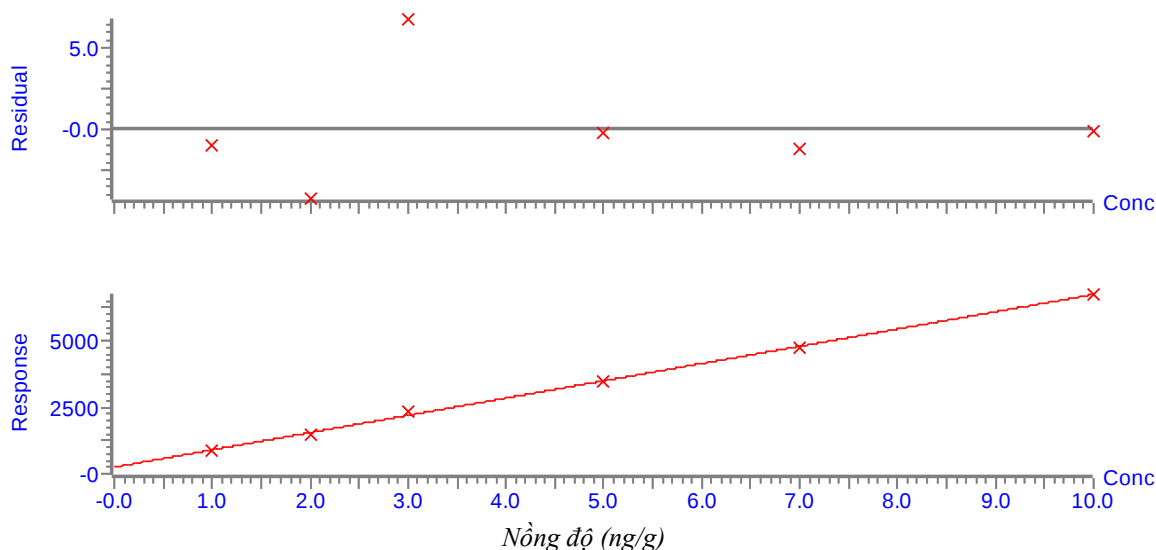
Correlation coefficient: $r = 0.999241$, $r^2 = 0.998482$

Calibration curve: $650.173 \cdot x + 248.23$

Response type: External Std, Area

Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

5,0; 7,0 và 10 ng/g. Kết quả cho thấy đường chuẩn tinopal CBS - X tuyến tính trong khoảng từ 1,0 - 10 ng/g, $R^2 > 0,99$, độ thu hồi ở các điểm chuẩn thỏa mãn yêu cầu ($\leq 10\%$).



Hình 2. Đường chuẩn định lượng tinopal CBS - X

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

Trong nghiên cứu này, đề tài tiến hành khảo sát LOD tại mức nồng độ thấp là 1,0 ng/g và 3 ng/g. Chuẩn bị 10 mẫu trắng thêm chuẩn tại các nồng độ trên, xử lý mẫu và phân tích theo các điều kiện đã chọn, tính hàm lượng tinopal CBS - X theo phương trình đường chuẩn (hình 3) để xác định nồng độ của tinopal CBS - X trong dung dịch. Từ các giá trị sai khác này thu được giá trị SD, và xác định giá trị LOD và LOQ. Đánh giá độ tin cậy LOD thông qua giá trị R ($R = X_{tb} \text{ mẫu thử} / LOD$). Kết quả khảo sát cho thấy đối với mẫu thêm chuẩn tại nồng độ 1,0 ng/g, kết quả cho giá trị $R_{\text{tính toán}} = 2,73$ nằm ngoài khoảng cho phép $4 \leq R_{\text{tính toán}} \leq 10$ nên nồng độ dung dịch thêm chuẩn không phù hợp. Tại nồng độ dung dịch là 3,0 ng/g, kết quả đo được $R_{\text{tính toán}} = 5,47$ là phù hợp, LOD tính được là

0,69 ng/g và LOQ là 2,20 ng/g. Kết quả này cũng tương tự với nghiên cứu của nhóm tác giả Kyung YuK Ko và cộng sự [2] và thấp hơn rất nhiều so với các nghiên cứu xác định tinopal CBS - X sử dụng detector huỳnh quang [3-4].

3.4. Khảo sát độ chính xác

Đánh giá độ chính xác dựa vào mẫu thêm chuẩn, thực hiện bằng cách hút lần lượt 200 μL , 375 μL và 500 μL dung dịch chuẩn 100 ng/mL để có được nồng độ tinopal CBS - X trong mẫu lần lượt là 4,0; 7,5 và 10 ng/g. Sử dụng đường chuẩn để tính toán. Tại mỗi nồng độ, thực hiện chiết độc lập, mỗi nồng độ phân tích 3 lần, trong 3 ngày khác nhau. Kết quả ở bảng 3 cho thấy hiệu suất thu hồi tinopal CBS - X khá cao, dao động trong khoảng 93,50 % đến 118,3 % với độ lệch chuẩn tương đối từ 0,96 đến 12,06 % tương ứng, đáp ứng yêu cầu theo quy định của cộng đồng chung Châu Âu [5].

Bảng 3. Kết quả khảo sát độ thu hồi (%) và độ lệch chuẩn (RSD%) tại các nồng độ khác nhau

Lần đo	Nồng độ và hiệu suất thu hồi					
	Ngày 1	H%	Ngày 2	H%	Ngày 3	H%
Nồng độ $C_1 = 4,0$ ng/g						
Lần 1	4,0	99,40	3,7	93,50	4,1	100,2
Lần 2	4,1	103,7	3,9	97,70	4,0	100,6
Lần 3	3,8	94,30	3,8	94,90	4,0	101,2
TB	3,9		3,8		4,0	
SD	0,15		0,10		0,05	
RSD%	3,85		2,63		1,43	
RSD _R	3,6					
Nồng độ $C_2 = 7,5$ ng/g						
Lần 1	8,5	113,6	8,0	106,5	8,1	108,5
Lần 2	8,0	106,4	8,2	109,7	8,2	108,7
Lần 3	8,6	115,1	6,9	91,90	8,3	110,6
TB	8,3		7,7		8,2	
SD	0,32		0,71		0,10	
RSD%	3,84		9,09		1,29	
RSD _R	6,1					
Nồng độ $C_3 = 10$ ng/g						
Lần 1	11,8	118,3	10,6	106,4	10,4	104,0
Lần 2	9,5	95,5	10,1	101,1	10,5	105,2
Lần 3	9,8	97,7	10,5	105,5	10,3	103,4
TB	10,4		10,4		10,4	
SD	1,25		0,26		0,11	
RSD%	12,06		2,54		0,96	
RSD _R	6,2					

4. KẾT QUẢ PHÂN TÍCH MẪU THỰC TẾ

Quy trình phân tích sau khi thẩm định đã được áp dụng để phân tích hàm lượng tinopal CBS - X trong 18 mẫu gạo lấy ngẫu nhiên trên thị trường Hà Nội. Các mẫu gạo đều được lựa chọn từ các thương hiệu gạo mà người dân hay sử dụng. Kết quả cho thấy không phát hiện thấy hàm lượng tinopal CBS - X trong tất cả các mẫu này. Việc sử dụng tinopal CBS - X trong gạo có chiều hướng giảm so với những năm trước đây, nguyên nhân có thể là do có sự vào cuộc của các lực lượng chức năng chuyên ngành, cùng với việc sửa đổi kịp thời văn bản quy phạm pháp luật về việc sử dụng chất cấm ở Việt Nam.

5. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã thẩm định để áp dụng quy trình xác định tinopal CBS - X trong gạo sử dụng kỹ thuật UPLC/MS/MS đạt độ nhạy và độ chọn lọc cao, quy trình chiết mẫu đơn giản, thời gian phân tích nhanh. Giá trị LOD và LOQ tương ứng là 0,69 và 2,20 ng/g. Phương pháp được thẩm định theo yêu cầu của quyết định 657/2002/EC [4]. Phương pháp

phù hợp để xác định chất cấm tinopal CBS - X trong gạo. Phương pháp đã được áp dụng phân tích 18 mẫu thực tế trên địa bàn Hà Nội.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Wei-Chuan S., Wang-Hsien D., (2009). Determination of Fluorescent Whitening Agents in Infant Clothes and Paper Materials by Ion- 60 pair Chromatography and Fluorescence Detection. *Journal of the Chinese Chemical Society*, **56**, 797-803.
- [2] Kyung Yuk K., Chae A L., Jae Chon C., Meehye K., (2014). Determination of Tinopal CBS-X in rice papers and rice noodles using HPLC with fluorescence detection and LC-MS/MS. *Food Additives and Contaminants, Part A*, **9**, 1451-1459.
- [3] Trần Thái Thành, Nguyễn Ngọc Hồng, Trần Minh Thái, Vũ Văn Nam, Phạm Văn Sơn, Phan Văn Giang, (2020). Khảo sát ảnh hưởng của các phương pháp làm giảm nồng độ tinopal CBS - X của thực phẩm, *Tạp chí Y học Cộng đồng*.
- [4] Commission Decision 2002/657/EC implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results.