

Nghiên cứu phát triển quy trình xác định dư lượng glyphosat bằng phương pháp điện di mao quản và ứng dụng trong phân tích một số loại đồ uống

Nguyễn Mạnh Huy^{1*}, Trần Thị Hà², Vũ Minh Tuấn³, Nguyễn Thanh Đàm³, Dương Hồng Anh^{1,3}, Phạm Hùng Việt³

¹Trung tâm Nghiên cứu Công nghệ môi trường và Phát triển bền vững (CETASD), Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

²Trường Đại học Thành Đô

³Phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ phân tích phục vụ kiểm định môi trường và an toàn thực phẩm, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

Ngày nhận bài 17/5/2021; ngày chuyển phản biện 21/5/2021; ngày nhận phản biện 25/6/2021; ngày chấp nhận đăng 2/7/2021

Tóm tắt:

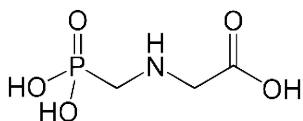
Ngày nay, vấn đề thực phẩm và đồ uống sạch hay phân tích dư lượng các hợp chất độc hại trong thực phẩm, đồ uống được xã hội ngày càng quan tâm. Trong nghiên cứu này, một quy trình phân tích dư lượng glyphosat (N-phosphonomethyl glycine) trong một số loại đồ uống như nước trà và bia đã được phát triển trên cơ sở sử dụng phương pháp điện di mao quản (CE), detector đo độ dẫn không tiếp xúc kết hợp với kỹ thuật chiết pha rắn (SPE). Các điều kiện phân tích đã được tối ưu trên thiết bị CE, bao gồm: dung dịch điện ly nền (BGE) histidin (His)/axit axetic với nồng độ His 1 mM và pH được điều chỉnh đến 2,75 bằng axit axetic; điện thế tách 20 kV, bơm điện hoạt động ở điện thế 20 kV trong 10 s. Quy trình đã thu được kết quả giới hạn phát hiện (LOD) của glyphosat tương đối thấp (0,42 µg/l), độ lặp lại và tái lặp xác định qua độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của diện tích pic và thời gian di chuyển đều nhỏ hơn 10%, khoảng tuyến tính rộng, giá trị hiệu suất thu hồi của glyphosat trên các nền mẫu đồ uống khác nhau đạt 88,7-96,3%.

Từ khóa: bia, detector đo độ dẫn không tiếp xúc, điện di mao quản, glyphosat, nước trà.

Chỉ số phân loại: 2.10

Đặt vấn đề

Glyphosat (hình 1) là hoạt chất chính trong nhiều loại thuốc diệt cỏ, được sử dụng rộng rãi trên toàn thế giới với nhu cầu hàng năm ước tính khoảng 800.000 tấn [1]. Đồng thời, hoạt chất này cũng được đánh giá là chất độc có nguy cơ tiềm tàng tới sức khỏe con người [2].



Hình 1. Công thức cấu tạo glyphosat.

Glyphosat diệt cỏ theo cơ chế ức chế enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphat tổng hợp axit amin thơm thiết yếu cho sự sinh trưởng của cỏ (tyrosin, tryptophan, phenylalanin), ngăn chặn quá trình sinh trưởng và gây chết cỏ [3]. Dựa vào cơ chế này, glyphosat có khả năng diệt được hầu hết các loại cỏ với hiệu quả cao, thời gian tác dụng dài và có tính chọn lọc, không tác động đối với những cây trồng biến đổi gen kháng glyphosat.

Trong quá trình diệt cỏ, glyphosat cũng bị hấp thụ vào cây trồng (chủ yếu qua lá) [3]. Tuy rằng, lượng glyphosat này sẽ bị chuyển hóa và đào thải nhưng vẫn còn một lượng nhỏ được lưu

giữ lại trong cây trồng, gây nên nguy cơ đối với con người khi sử dụng. Bởi vậy, việc nghiên cứu và phát triển quy trình phân tích glyphosat trong thực phẩm hay đồ uống có nguồn gốc từ cây trồng nông nghiệp là cần thiết.

Trong nghiên cứu này, đối tượng được lựa chọn là trà và bia, đây là các loại đồ uống phổ biến nhất thế giới. Trong khi trà có nguồn gốc từ cây trà thì nguyên liệu sản xuất bia cũng có nguồn gốc từ cây trồng nông nghiệp - cây đại mạch. Trên thế giới, một số quốc gia như Trung Quốc và Nhật Bản đã đưa ra giới hạn dư lượng glyphosat tối đa trong các sản phẩm trà thương mại nhỏ hơn 1 mg/kg [4]. Hiện nay chưa có tiêu chuẩn về dư lượng glyphosat tối đa cho phép trong bia, tuy nhiên qua nghiên cứu đã công bố của K. Cook (2019) [5], dư lượng này có thể dao động từ 5,7 đến 49,7 µg/l.

Trên thế giới, nhiều nghiên cứu về phát triển phương pháp phân tích glyphosat đã được công bố: sắc ký khí ghép nối với các loại detector như detector quang kế ngọn lửa (FPD) [6], detector nitơ-phospho (NPD) [7], detector khối phổ (MS) [8]; sắc ký lỏng ghép nối với detector khối phổ hai lần (MS/MS) [9], detector quang phổ hấp thụ phân tử vùng tử ngoại (UV) [10] hay phương pháp CE kết hợp với detector UV [11], detector đo độ dẫn không tiếp xúc (C⁴D) [12]. Theo TVCN 11492:2016 [13], phương pháp sắc ký khí khối phổ được sử

*Tác giả liên hệ: Email: manhhuy162dhkhtn@gmail.com

Study on development of an analytical procedure to quantify glyphosate by capillary electrophoresis method and its application for beverage

Manh Huy Nguyen^{1*}, Thi Ha Tran², Minh Tuan Vu³,
Thanh Dam Nguyen³, Hong Anh Duong^{1,3}, Hung Viet Pham³

¹Research Centre for Environmental Technology and Sustainable Development, University of Science, Vietnam National University (VNU), Hanoi

²Thanh Do University

³Key Laboratory of Analytical Technology for Environmental Quality and Food Safety Control (KLATEFOS), University of Science, VNU, Hanoi

Received 17 May 2021; accepted 2 July 2021

Abstract:

Nowadays, the issue of fresh food, drinks, and residue analysis of toxic compounds in food and drinks is increasingly interested in society. In this study, an analytical procedure for quantitative analysis of the glyphosate residue in beverages such as tea infusion and beer was developed based on the capillary electrophoresis method with capacitively-coupled contactless conductivity detector combined with sample preparation using solid phase extraction technique. The analytical conditions optimised for capillary electrophoresis equipment included: histidine/acetic acid background electrolyte solution with histidine concentration of 1 mM and pH value was adjusted to 2.75 by acetic acid; a separation voltage was 20 kV was applied and a high voltage injection at 20 kV for 10 seconds was chosen. The optimised analytical procedure has resulted in a low detection limit of glyphosate (0.42 µg/l), the repeatability and reproducibility expressed by the relative standard deviation of the peak area and migration time were both less than 10%, a wide linear range, and the obtained recovery efficiency of glyphosate on different drinks were achieved to values ranging from 88.7 to 96.3%.

Keywords: beer, capacitively-coupled contactless conductivity detector, capillary electrophoresis, glyphosate, tea infusion.

Classification number: 2.10

dùng để xác định hàm lượng glyphosat trong thực phẩm có nguồn gốc từ thực vật. Trong phương pháp này, glyphosat được dẫn xuất trực tiếp bằng hỗn hợp của trifluoroacetic anhydrit và heptafluorobutanol để giảm độ phân cực và tăng khả năng bay hơi. TCVN 12473:2018 [14] sử dụng sắc ký lỏng hiệu năng cao detector UV để phân tích trực tiếp glyphosat trong thuốc bảo vệ thực vật. Tuy nhiên, để có thể phân tích dư lượng glyphosat với một hàm lượng rất nhỏ thì phương pháp này cũng phải dẫn xuất hóa mẫu với các hợp chất mang màu do glyphosat có tính chất quang kém [15-17]. Ngoài hai phương pháp nêu trên, CE được biết đến là phương pháp có khả năng tách chất tốt, vận hành thiết bị đơn giản. Đặc biệt, khi kết hợp sử dụng với detector C⁴D, phương pháp này có thể trực tiếp phân tích glyphosat mà không cần dẫn xuất hóa mẫu [12]. Điều này mang lại những lợi thế lớn bởi việc dẫn xuất hóa mẫu khiến cho quy trình phân tích phức tạp, thời gian chuẩn bị mẫu kéo dài và hiệu suất thu hồi không cao. Do vậy, phương pháp CE với detector C⁴D đã được sử dụng để xây dựng quy trình xác định dư lượng glyphosat và ứng dụng cho phân tích một số loại đồ uống là trà (cụ thể là nước trà) và bia.

Ngoài ra, để phân tích glyphosat với hàm lượng nhỏ (cỡ µg/l) trong nền mẫu phức tạp như các mẫu đồ uống bằng thiết bị CE, nghiên cứu đã sử dụng kỹ thuật SPE là phương pháp để làm sạch và giàu mẫu.

Thực nghiệm

Hóa chất, thiết bị

Chất chuẩn glyphosat là loại tinh khiết đạt 99,1±0,1% (CPAChem). Các hóa chất được sử dụng để chuẩn bị BGE bao gồm: His>99,5% (Sigma-Aldrich, Mỹ); axit axetic 100%, lactic >99%, clohydric đặc 37%, xitric >99,5% (Merck, Đức), fomic (Sigma-Aldrich, Mỹ). Các dung môi được sử dụng cho quy trình chiết như MeOH, EtOH, isopropanol (IPA) là loại tinh khiết cho HPLC (Merck, Đức). Nước deion từ máy lọc nước tinh khiết điện trở 18 MΩ (Milipore - Simplicity UV, Pháp). Dung dịch chuẩn gốc của glyphosat 1000 mg/l được chuẩn bị trong nước deion, các dung dịch chuẩn nồng độ thấp hơn được pha loãng từ chuẩn gốc bằng nước deion.

Cột chiết được sử dụng là Oasis - WAX (Mixed - Mode Weak Anion eXchange) 225 mg loại cột ngắn. Màng lọc lỵnon có kích thước lỗ 0,2 và 0,45 µm (Whatman, Anh). Hệ thiết bị cô quay chân không của Hãng BUCHI (Thụy Sĩ). Hệ thiết bị SPE của Supelco (Mỹ).

Nghiên cứu sử dụng hệ thiết bị CE vận hành bằng tay (CE Manual) tự chế của CETASD có khối lượng dưới 9 kg, dùng nguồn điện một chiều 12 V, có thể đặt trong phòng thí nghiệm cũng như mang ra ngoài hiện trường. Hệ sử dụng nguồn cao thế EMCO ±25 kV (XP Power, Mỹ). Detector C⁴D thương phẩm của Hãng eDAQ (Úc) bao gồm: đầu dò ET120 sử dụng cho các mao quản đường kính ngoài nhỏ hơn 380 µm, bộ khuếch đại EA 120 và ghi tín hiệu e-corder 410. Cột mao quản fused-silica

của Hãng Agilent với đường kính trong 50 μm , đường kính ngoài 375 μm , độ dài tổng 70 cm và độ dài hiệu dụng 64 cm.

Tối ưu hóa quy trình phân tích glyphosat trên hệ thiết bị CE-C⁴D

Nghiên cứu lựa chọn BGE: để có thể phân tích được trên CE-C⁴D, đầu tiên cần lựa chọn BGE có thành phần và pH thích hợp để đảm bảo chất phân tích nằm dưới dạng mang điện (cation hoặc anion). Glyphosat có 4 giá trị pK_a , lần lượt là 0,8, 2,2, 5,4 và 10,2. Với tính chất axit - bazơ như vậy, dạng tồn tại trong dung dịch của glyphosat sẽ phụ thuộc mạnh vào pH của BGE: ở $pH < pK_{a1}$ (0,8), glyphosat nằm dưới dạng cation (do sự proton hóa của nhóm amino trong phân tử); $pH > pK_{a2}$ (2,2), glyphosat sẽ nằm dưới dạng anion (do sự phân ly của các nhóm chức photphonic và cacboxylic). Việc phân tích dưới dạng anion sẽ thuận lợi hơn do điều kiện để chuyển glyphosat về dạng cation ($pH < 0,8$) không thuận lợi với CE-C⁴D. See và cs (2010) [12] đã sử dụng BGE với thành phần His 12 mM ở pH 6,3 để phân tích glyphosat. Tuy nhiên, ở pH này, ảnh hưởng cản trở của dòng điện di thẩm thấu (EOF) tới sự phân tích các anion là khá lớn và cần phải sử dụng thêm các chất hỗ trợ để điều chỉnh dòng EOF, cụ thể là CTAB. Trong nghiên cứu này, glyphosat cũng được phân tích dưới dạng anion nhưng ở pH thấp hơn (pH 3) để hạn chế ảnh hưởng của EOF. Các BGE với thành phần His (hợp phần bazơ) tiếp tục được lựa chọn, nhưng ở nồng độ thấp hơn (1 mM) do có khả năng phân tách tốt đối với nhóm chức photphat [18]. Việc điều chỉnh pH của BGE tới giá trị mong muốn được thực hiện bằng cách thêm các hợp phần axit hữu cơ mạch ngắn thông thường (fomic, axetic, lactic, xitric) và thu được các BGE tương ứng là His/For, His/Ace, His/Lac và His/Cit. Ngoài ra, các điều kiện khác trong khảo sát được cố định là: dung dịch chuẩn glyphosat có nồng độ 10 mg/l, thời gian bơm mẫu kiểu xi-phông được giữ trong 60 s. Điện thế tách ở các khảo sát ban đầu được đặt là 17,5 kV. Điều kiện phân tích được lựa chọn trên cơ sở cho đường nền ổn định, tín hiệu phân tích của glyphosat lớn, hình dạng sắc nét.

Tiếp theo là khảo sát ảnh hưởng của His trong BGE với các nồng độ được khảo sát là 1, 2, 3, 4, 5 và 8 mM. Sau đó, khảo sát ảnh hưởng của pH trong BGE với các giá trị pH được khảo sát từ 2,5 đến 3,5.

Nghiên cứu lựa chọn điện thế tách: điều kiện này được khảo sát với các giá trị điện thế tách thay đổi từ 12,5 tới 22,5 kV.

Khảo sát điều kiện bơm mẫu: thay vì sử dụng kỹ thuật bơm mẫu kiểu xi-phông như các khảo sát nêu trên, kỹ thuật bơm điện được khảo sát ở khoảng điện thế bơm 5-20 kV với thời gian giữ cố định là 10 s.

Tối ưu quy trình xử lý và làm giàu mẫu bằng phương pháp SPE

Quy trình xử lý mẫu sơ bộ: các mẫu sau khi thu thập về phòng thí nghiệm được xử lý sơ bộ với quy trình riêng biệt trước quá trình chiết. Với các mẫu nước trà, thực hiện cân

chính xác 1 g trà khô vào cốc thủy tinh, thêm 100 ml nước sôi và thực hiện hãm trà trong 10 phút, lọc qua màng lọc 0,45 μm . Với các mẫu bia, 100 ml mẫu được đem đi rung siêu âm khử bọt khí và lọc qua màng lọc 0,45 μm . Quá trình tối ưu các điều kiện SPE được thực hiện trên nền mẫu giả - mẫu trà được pha trong 100 ml nước đun sôi, để nguội có thêm chuẩn glyphosat sao cho nồng độ là 5 $\mu\text{g/l}$. Sau đó, mẫu cũng được lọc qua màng lọc 0,45 μm trước khi qua cột SPE.

Quy trình chiết: cột chiết được hoạt hóa bằng 5 ml MeOH và 5 ml nước deion với tốc độ dòng 1 ml/phút. 100 ml dung dịch mẫu được qua cột với tốc độ dòng 1 ml/phút. Sau đó, rửa cột bằng 5 ml nước deion và 5 ml MeOH, để khô cột khoảng 10 phút. Rửa giải chất phân tích trên cột bằng dung dịch HCl 0,5 M trong MeOH với tốc độ dòng 0,5 ml/phút. Dịch chiết được cô cạn bằng máy cất quay chân không, sau đó tiếp tục được cô tới khô bằng khí N_2 . Mẫu sau khi cô khô được hòa tan trong 1 ml nước deion, lọc qua màng lọc 0,2 μm trước khi tiến hành phân tích trên thiết bị CE-C⁴D.

Tối ưu quy trình chiết: các yếu tố được khảo sát bao gồm loại cột chiết, dung môi rửa giải và thể tích dung môi rửa giải. Qua tham khảo các công trình nghiên cứu về phân tích glyphosat [19] và đặc tính của các loại cột SPE, cột Oasis - WAX được lựa chọn làm cột chiết trong nghiên cứu.

Sau đó, các yếu tố khác ảnh hưởng tới quy trình chiết lần lượt được tối ưu. Đầu tiên là lựa chọn loại dung môi rửa giải: dựa vào đặc tính glyphosat và cột WAX, dung môi rửa giải được đề xuất là dung dịch HCl pha trong các dung môi hữu cơ có khả năng solvat hóa cao. Trong nghiên cứu này, các loại dung môi hữu cơ được khảo sát là MeOH, EtOH và IPA. Sau đó, khảo sát thể tích dung môi rửa giải được tiến hành với các thể tích khảo sát trong khoảng 10-50 ml.

Đánh giá phương pháp và phân tích mẫu thực

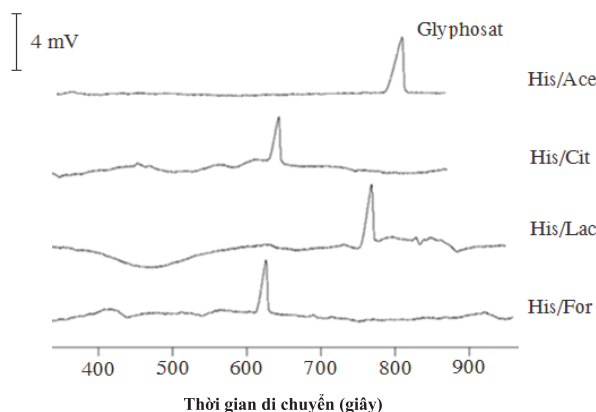
Giá trị LOD và giới hạn định lượng (LOQ) được xác định bằng 3 và 10 lần tỷ lệ tín hiệu/nhiều nền. Khoảng tuyến tính được xác định bằng cách cách đo một dãy dung dịch chuẩn glyphosat có nồng độ tăng dần, khoảng tuyến tính là khoảng nồng độ mà các kết quả đo vẫn còn tuyến tính tốt với nhau (hệ số tương quan tuyến tính $R^2 \geq 0,99$). Độ chụm được đánh giá thông qua độ lặp lại và tái lặp. Độ lặp lại của phương pháp được xác định thông qua giá trị RSD của thời gian di chuyển và diện tích pic khi đo lặp lại 7 lần; độ tái lặp được thực hiện trong 5 ngày liên tục với nồng độ glyphosat là 0,1 mg/l. Độ đúng được xác định bằng hiệu suất thu hồi của mẫu thêm chuẩn glyphosat trên nền mẫu thực với nồng độ 5 $\mu\text{g/l}$.

Đường chuẩn đo mẫu thực được xây dựng dựa trên khoảng tuyến tính. Mẫu thực là mẫu nước trà tươi (từ lá trà tươi) và 2 mẫu nước trà từ các loại trà thương phẩm bán trên thị trường (trà đen loại túi lọc, trà xanh loại nguyên búp). Các mẫu bia là các loại bia phổ biến trên thị trường. Sau khi tiến hành xử lý và làm giàu, các mẫu này được đo trên thiết bị CE-C⁴D rồi xác định nồng độ qua phương pháp đường chuẩn.

Kết quả và thảo luận

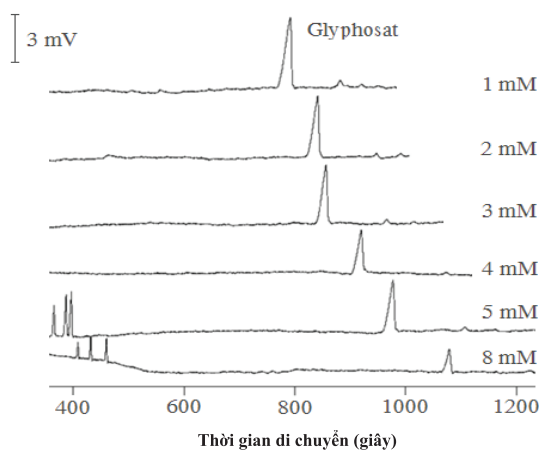
Tối ưu hóa quy trình phân tích glyphosat trên hệ thiết bị CE-C⁴D

Lựa chọn BGE: các BGE là dung dịch đệm His/For, His/Ace, His/Lac và His/Cit với nồng độ His 1 mM ở pH 3. Theo các kết quả thu được ở hình 2, điều kiện đệm His/Ace cho đường nền ổn định và tín hiệu glyphosat lớn nhất, bởi vậy His/Ace được lựa chọn làm BGE.



Hình 2. Điện di đồ khảo sát lựa chọn BGE.

Khảo sát nồng độ His trong BGE: sau khi lựa chọn được BGE là đệm His/Ace, ảnh hưởng của nồng độ His được khảo sát thông qua các dung dịch đệm có nồng độ tăng dần là 1, 2, 3, 4, 5 và 8 mM, pH được giữ cố định ở 3.

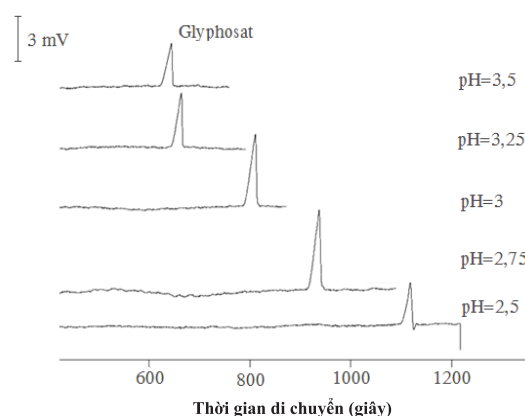


Hình 3. Điện di đồ khảo sát ảnh hưởng của nồng độ His.

Tín hiệu glyphosat xuất hiện trên điện di đồ (hình 3) dựa trên nguyên tắc đo sự chênh lệch độ dẫn của glyphosat so với BGE. Bởi vậy, khi nồng độ His tăng dần (1-8 mM), độ dẫn của BGE tăng dần, dẫn tới tín hiệu của glyphosat trong khảo sát có xu hướng giảm. Mặt khác, khi nồng độ His tăng dần cũng làm độ nhớt của BGE tăng lên, tốc độ di chuyển của các ion glyphosat trong mao quản giảm, dẫn tới thời gian di chuyển của ion glyphosat tới detector lâu hơn và thời

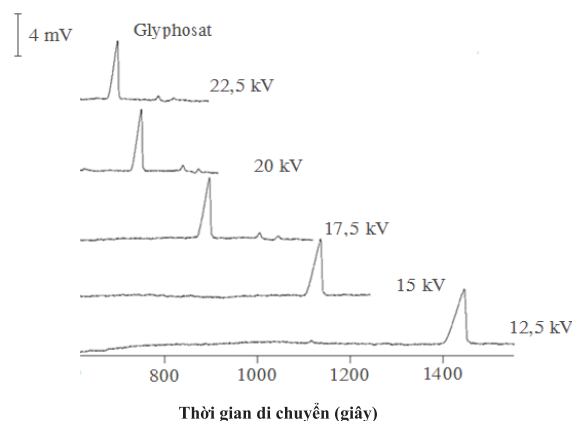
gian phân tích kéo dài hơn. Điều kiện nồng độ His 1 mM cho tín hiệu glyphosat lớn nhất và thời gian phân tích ngắn nên được lựa chọn để tiếp tục khảo sát các yếu tố khác.

Khảo sát ảnh hưởng của pH BGE: pH là một trong các yếu tố quan trọng cần được khảo sát, bởi nó ảnh hưởng đến thời gian di chuyển và độ lớn của tín hiệu phân tích trên CE. Các điều kiện pH được khảo sát là 2,5, 2,75, 3, 3,25 và 3,5. Kết quả thu được ở hình 4 cho thấy, theo chiều pH tăng dần (từ 2,5 đến 3,5), nồng độ axit axetic thêm vào để điều chỉnh pH giảm dần, độ nhớt của dung dịch giảm dần dẫn tới thời gian phân tích ngắn hơn. Tuy nhiên, ở điều kiện pH 2,75 là lớn nhất với đường nền ổn định. Bởi vậy, điều kiện pH 2,75 được lựa chọn.



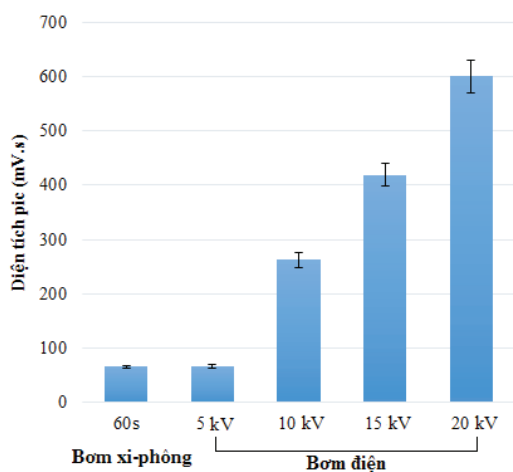
Hình 4. Điện di đồ khảo sát ảnh hưởng của pH BGE.

Khảo sát ảnh hưởng của điện thế tách: sau khi đã tối ưu BGE là His/Ace 1 mM ở pH 2,75, điều kiện điện thế tách được khảo sát là 12,5, 15, 17,5, 20 và 22,5 kV. Khi điện thế tách tăng dần, điện trường tăng lên dẫn tới ion phân tích di chuyển nhanh hơn, thời gian phân tích ngắn hơn và pic sắc nét hơn (hình 5). Điều kiện điện thế tách 17,5 và 20 kV đều cho tín hiệu phân tích cao, nhưng thời gian phân tích tại 20 kV ngắn hơn nên điều kiện điện thế 20 kV được lựa chọn.



Hình 5. Điện di đồ khảo sát ảnh hưởng của điện thế tách.

Khảo sát ảnh hưởng của bơm mẫu: mục đích của khảo sát bơm điện là để tăng độ nhạy của kỹ thuật phân tích. Một điện thế xác định được áp vào trong quá trình bơm mẫu, dưới tác dụng của điện thế, trong thời gian ngắn, lượng mẫu đưa vào mao quản sẽ tăng lên, từ đó tăng được tín hiệu của chất phân tích. Các điều kiện được khảo sát bao gồm bơm mẫu kiểu xi-phông trong 60 s và các điều kiện bơm điện tăng dần từ 5, 10, 15 và 20 kV, thời gian áp thế là 10 s. Nhìn vào biểu đồ so sánh diện tích pic thu được (hình 6) có thể thấy, khi tăng điện thế bơm mẫu thì tín hiệu glyphosat tăng dần. Như vậy, trong cùng một thời gian, khi điện thế càng lớn, lượng mẫu đi vào mao quản càng nhiều, tín hiệu thu được càng cao. So sánh diện tích pic khi bơm xi-phông trong thời gian 60 s và bơm điện 10 s ở 20 kV thì tín hiệu thu được đã tăng lên đến 9,2 lần. Bởi vậy, điều kiện bơm mẫu được lựa chọn là bơm điện ở điện thế 20 kV trong 10 s.

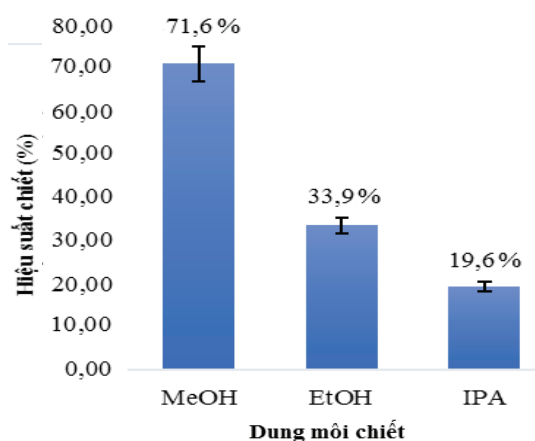


Hình 6. Biểu đồ khảo sát ảnh hưởng của điều kiện bơm mẫu.

Tối ưu quy trình xử lý và làm giàu mẫu bằng SPE

Khảo sát lựa chọn loại dung môi rửa giải: dung dịch rửa giải là HCl 0,5M trong các dung môi hữu cơ phân cực có khả năng solvat hóa cao. Khi đi qua cột chiết, ion Cl⁻ sẽ thay thế và đẩy ion glyphosat ra khỏi pha tĩnh của cột chiết rồi đi ra khỏi cột. Các dung môi khảo sát gồm MeOH, EtOH và IPA với thể tích dung dịch rửa giải cố định là 50 ml.

Khi rửa giải bằng dung dịch HCl 0,5M trong MeOH, EtOH và IPA thu được hiệu suất chiết tương ứng là 71,6, 33,9 và 19,6% (hình 7). Các kết quả hiệu suất chiết này giảm dần theo chiều cấu tạo phân tử các dung môi chiết phức tạp dần, nguyên nhân có thể là do dung môi có cấu trúc phân tử càng phức tạp (như IPA) làm giảm khả năng tương tác của tác nhân rửa giải (HCl) với pha tĩnh của cột chiết. Vì vậy, dung dịch HCl pha trong dung môi MeOH với hiệu suất chiết lớn nhất được sử dụng làm dung môi rửa giải glyphosat.



Hình 7. Biểu đồ khảo sát lựa chọn dung môi rửa giải.

Khảo sát thể tích dung môi rửa giải: các điều kiện được khảo sát là thể tích dung dịch rửa giải ở 10, 20, 30, 40 và 50 ml. Kết quả thu được hiệu suất chiết ở các thể tích 10, 20, 30, 40 và 50 ml tương ứng là 92,6, 80,3, 79,9, 74,5 và 71,6%. Từ các kết quả này, thể tích dung dịch rửa giải HCl 0,5 M/MeOH là 10 ml cho hiệu suất chiết cao nhất nên điều kiện này đã được lựa chọn.

Đánh giá phương pháp

Kết quả LOD của phương pháp MDL (Method detection limit) và LOQ của phương pháp MQL (Method quantification limit) (bảng 1) với mẫu nước trà thu được đều tốt, nồng độ cỡ ppb, lần lượt là 0,42 và 1,40 µg/l. Theo các tiêu chuẩn về trà [4], giới hạn tối đa cho phép trong mẫu trà là 1 mg/kg và với quy trình phân tích là pha 1 g trà trong 100 ml thì giới hạn này tương ứng với mẫu nước trà là 10 µg/l, giá trị giới hạn này lớn hơn nhiều so với MDL, MQL. Như vậy, từ các kết quả MDL, MQL đã thu được cho thấy, quy trình phân tích đáp ứng được mục tiêu của nghiên cứu là phát hiện và định lượng dư lượng glyphosat trong nước trà - phản ánh ảnh hưởng trực tiếp tới người sử dụng. Các giá trị MDL, MQL này cũng đáp ứng được việc phân tích dư lượng glyphosat trong các mẫu bia (với nồng độ glyphosat tìm thấy dao động trong khoảng 5,7-49,7 µg/l) [5].

Độ chụm của phương pháp được đánh giá thông qua độ lặp lại và tái lặp, các kết quả đo ở nồng độ 0,1 mg/l được trình bày ở bảng 1. Kết quả độ lặp lại của 7 lần đo liên tiếp thông qua RSD theo thời gian di chuyển là 3,7% và theo diện tích pic là 5,6%. Kết quả độ tái lặp trong 5 ngày liên tiếp thông qua RSD theo thời gian di chuyển là 5,6% và theo diện tích pic là 9,6%. Hầu hết, các giá trị độ lặp lại và tái lặp thu được đáp ứng tiêu chuẩn của Hiệp hội các nhà hoá phân tích chính thống (AOAC) về độ chụm [20].

Bảng 1. LOD, LOQ, độ chụm và khoảng tuyến tính, đường chuẩn của phương pháp phân tích.

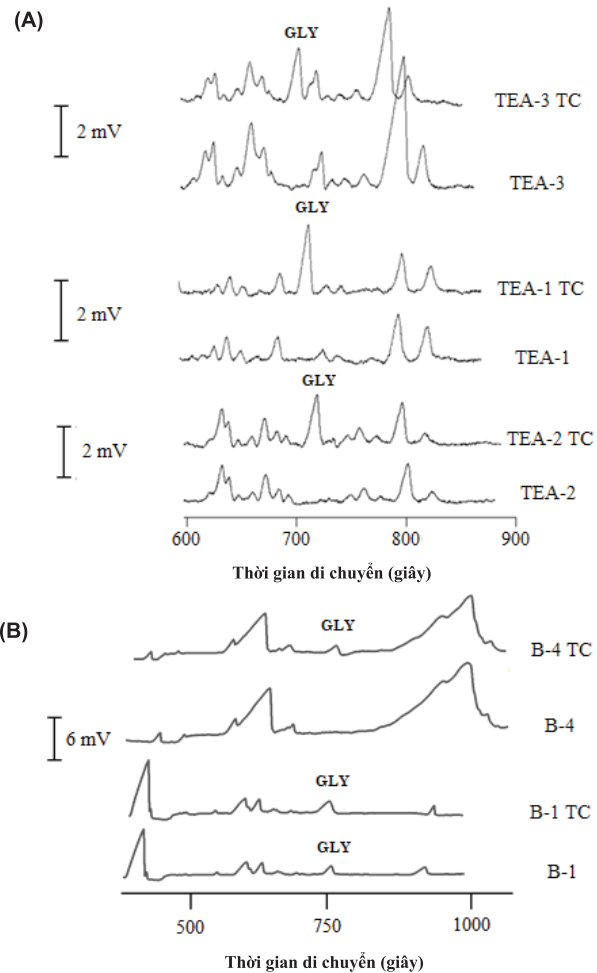
Chất phân tích		Glyphosat
Hiệu suất chiết (H%)		92,6±5,19
Hệ số làm giàu thực = (H%×100)/Hệ số làm giàu lý thuyết (lần)		92,6
LOD của phương pháp MDL (µg/l)		0,42
LOQ của phương pháp MQL (µg/l)		1,40
Độ lặp lại RSD% (n=7)	Thời gian di chuyển	3,7
	Diện tích pic tín hiệu	5,6
Độ tái lập RSD% (n=5)	Thời gian di chuyển	5,6
	Diện tích pic tín hiệu	9,6
Khoảng tuyến tính (µg/l)		1,40-216
Đường chuẩn	Khoảng đường chuẩn (µg/l)	2,16-108
	Phương trình đường chuẩn: $Y = 2,351X + 5,230$, $R^2 = 0,999$	

Theo bảng 1, kết quả đánh giá khoảng tuyến tính của phương pháp với glyphosat là tương đối tốt, khoảng tuyến tính rộng (1,40-216 µg/l). Dựa trên khoảng tuyến tính, đường chuẩn của glyphosat với 8 điểm chuẩn được xây dựng. Đường chuẩn thu được có hệ số tương quan tuyến tính tốt ($R^2 > 0,999$), đáp ứng được việc xác định glyphosat trong các mẫu nước trà và các mẫu bia.

Các mẫu nước trà bao gồm: nước trà tươi (từ lá trà tươi), nước trà đen (trà đen loại túi lọc) và nước trà xanh (trà xanh loại nguyên búp). Các mẫu bia gồm 5 loại phổ biến trên thị trường. Sau khi được xử lý và làm giàu, các mẫu này được đo trên hệ thiết bị CE-C⁴D. Kết quả phân tích các mẫu thực được thể hiện ở bảng 2 và hình 8. Chỉ có một mẫu bia phát hiện thấy glyphosat ở nồng độ 4,63±0,26 µg/l, các mẫu còn lại đều không phát hiện thấy glyphosat.

Bảng 2. Kết quả phân tích và hiệu suất thu hồi.

Mẫu	Mã mẫu thực	Kết quả phân tích (µg/l)	Mã mẫu thực thêm chuẩn	Hiệu suất thu hồi (%)
Nước trà tươi	TEA-1	<MDL	TEA-1 TC	94,1±5,27
Nước trà xanh	TEA-2	<MDL	TEA-2 TC	96,3±5,39
Nước trà đen	TEA-3	<MDL	TEA-3 TC	92,9±5,20
Mẫu bia 1	B-1	4,63±0,26	B-1 TC	95,6±5,35
Mẫu bia 2	B-2	<MDL	B-2 TC	94,1±5,27
Mẫu bia 3	B-3	<MDL	B-3 TC	89,5±5,01
Mẫu bia 4	B-4	<MDL	B-4 TC	88,7±4,97
Mẫu bia 5	B-5	<MDL	B-5 TC	90,3±5,07

**Hình 8. Điện di đồ kết quả phân tích glyphosat mẫu nước trà (A) và mẫu bia (B).**

Hiệu suất thu hồi của phương pháp được xác định khi phân tích các mẫu nước trà, bia và các mẫu thêm chuẩn 5 µg/l glyphosat vào nền thực. Kết quả hiệu suất thu hồi của glyphosat trong 3 mẫu nước trà và 5 mẫu bia đạt 88,7-96,3% (bảng 2), các kết quả này đã đáp ứng được tiêu chuẩn của AOAC về hiệu suất thu hồi (cho phép từ 70 đến 125%) [20], chứng tỏ phương pháp đạt được yêu cầu về độ đúng.

Kết luận

Nghiên cứu đã phát triển được phương pháp phân tích dư lượng glyphosat trong mẫu nước trà tươi, một số mẫu nước trà từ các sản phẩm trà thương mại và bia phổ biến trên thị trường, sử dụng kỹ thuật SPE và định tính, định lượng bằng CE-C⁴D. Phương pháp phân tích có LOD thấp (0,42 µg/l), khoảng tuyến tính rộng (1,40-216 µg/l), độ chính xác cao (độ lặp lại và tái lập xác định qua RSD của diện tích pic và thời gian di chuyển đều nhỏ hơn 10%, giá trị hiệu suất thu hồi của glyphosat trên các nền đồ uống khác nhau đạt 88,7-96,3%). Với các kết quả trên, nghiên cứu bước đầu đã xây dựng được quy trình phân tích glyphosat trong một số

loại thức uống phổ biến như nước trà và bia, mở ra hướng phân tích dư lượng glyphosat ở nhiều loại đồ uống khác (cà phê, sữa đậu nành...) trong tương lai.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được tài trợ bởi Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội thông qua đề tài mã số TN.20.17. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] C.M. Benbrook (2016), "Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally", *Environmental Sciences Europe*, **28**(1), DOI: 10.1186/s12302-016-0070-0.
- [2] J.V. Tarazona, et al. (2017), "Glyphosate toxicity and carcinogenicity: a review of the scientific basis of the European union assessment and its differences with IARC", *Archives of Toxicology*, **91**(8), pp.2723-2743.
- [3] E. Grossbard, D. Atkinson (1985), *The Herbicide Glyphosate*, Butterworths, 490pp.
- [4] https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/Report/DownloadReportByFileName?fileName=National%20Food%20Safety%20Standard%20Maximum%20Residue%20Limits%20for%20Pesticides%20in%20Foods%20_Beijing_China%20-%20Peoples%20Republic%20of_11-18-2019.
- [5] K. Cook (2019), *Glyphosate in Beer and Wine*, CALPIRG Education Fund, 22pp.
- [6] H. Kataoka, et al. (1996), "Simple and rapid determination of the herbicides glyphosate and glufosinate in river water, soil and carrot samples by gas chromatography with flame photometric detection", *Journal of Chromatography A*, **726**(1-2), pp.253-258.
- [7] J.Y. Hu, et al. (2008), "A simple method for the determination of glyphosate residues in soil by capillary gas chromatography with nitrogen phosphorus", *Journal of Analytical Chemistry*, **63**(4), pp.371-375.
- [8] E. Börjesson, L. Torstensson (2000), "New methods for determination of glyphosate and (aminomethyl) phosphonic acid in water and soil", *Journal of Chromatography A*, **886**(1-2), pp.207-216.
- [9] D. Pupke, et al. (2016), "Optimization of an enrichment and LC-MS/MS method for the analysis of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) in saline natural water samples without derivatization", *J. Chromatogr. Sep. Tech.*, **7**(5), DOI: 10.4172/2157-7064.1000338.
- [10] F. Fang, et al. (2011), "Determination of glyphosate by high performance liquid chromatography with o-nitrobenzene sulfonyl chloride as derivatization reagent", *Journal of Instrumental Analysis*, **6**, pp.683-686.
- [11] S. Kodama, et al. (2008), "A fast and simple analysis of glyphosate in tea beverages by capillary electrophoresis with on-line copper (II)-glyphosate complex formation", *Journal of Health Science*, **54**(5), pp.602-606.
- [12] H.H. See, et al. (2010), "Rapid and direct determination of glyphosate, glufosinate, and aminophosphonic acid by online preconcentration CE with contactless conductivity detection", *Electrophoresis*, **31**(3), pp.575-582.
- [13] Bộ Khoa học và Công nghệ (2016), *TCVN 11492:2016 Thực phẩm có nguồn gốc thực vật - Xác định glyphosate và axit aminomethyl phosphonic (AMPA) - Phương pháp sắc ký khí*.
- [14] Bộ Khoa học và Công nghệ (2018), *TCVN 12473:2018 Thuốc bảo vệ thực vật - Xác định hàm lượng hoạt chất glyphosate bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao*.
- [15] M.P.G.D. Llasera, et al. (2005), "Matrix solid-phase dispersion extraction and determination by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection of residues of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in tomato fruit", *Journal of Chromatography A*, **1093**(1-2), pp.139-146.
- [16] M.V. Khrolenko, P.P. Wiczorek (2005), "Determination of glyphosate and its metabolite aminomethylphosphonic acid in fruit juices using supported-liquid membrane preconcentration method with high-performance liquid chromatography and UV detection after derivatization with p-toluenesulphonyl chloride", *Journal of Chromatography A*, **1093**(1-2), pp.111-117.
- [17] E.A. Hogendoorn, et al. (1999), "Rapid determination of glyphosate in cereal samples by means of pre-column derivatisation with 9-fluorenylmethyl chloroformate and coupled-column liquid chromatography with fluorescence detection", *Journal of Chromatography A*, **833**(1), pp.67-73.
- [18] Thanh Duc Mai, et al. (2013), "Portable capillary electrophoresis instrument with automated injector and contactless conductivity detection", *Analytical Chemistry*, **85**(4), pp.2333-2339.
- [19] N. Chamkasem, J.D. Vargo (2017), "Development and independent laboratory validation of an analytical method for the direct determination of glyphosate, glufosinate, and aminomethylphosphonic acid in honey by liquid chromatography/tandem mass spectrometry", *Journal of Regulatory Science*, **5**(2), pp.1-9.
- [20] AOAC (2002), *Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals*, https://members.aoac.org/AOAC_Docs/StandardsDevelopment/SLV_Guidelines_Dietary_Supplements.pdf.