

DOI: 10.59715/pntjmp.4.2.13

Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng dung môi toluen và trichloroethylen tồn dư trong đất vùng trồng dược liệu bằng phương pháp sắc ký khí với đầu dò khối phổ sử dụng kỹ thuật hóa hơi mẫu headspace

Trần Thị Thanh Ngân¹, Nguyễn Đức Quỳnh Châu¹, Nguyễn Thu Thảo¹, Trương Quốc Kỳ¹

¹Khoa Dược, Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch, Thành phố Hồ Chí Minh

Tóm tắt

Đặt vấn đề: Toluene và trichloroethylen là hai loại dung môi phổ biến được sử dụng rộng rãi trong ngành công nghiệp hóa chất với số lượng lớn thải ra hệ sinh thái, trong đó có môi trường đất đặc biệt là đất vùng trồng dược liệu. Việt Nam có sản lượng dược liệu được sản xuất ra hàng năm chiếm quy mô lớn tại các vùng trồng dược liệu trọng điểm trên khắp đất nước, tuy nhiên vẫn chưa có tiêu chuẩn định lượng dung môi tồn dư trong đất do các chất ô nhiễm trong đất có thể ảnh hưởng đến chất lượng cây trồng dược liệu. Do đó xây dựng quy trình định lượng dung môi toluen và trichloroethylen tồn dư trong đất vùng trồng dược liệu là một vấn đề cần thiết.

Đối tượng - Phương pháp: Dung môi toluen và trichloroethylen tồn dư trong đất vùng trồng dược liệu được định lượng bằng kỹ thuật hóa hơi mẫu headspace kết hợp với hệ thống sắc ký khí với đầu dò khối phổ. Quy trình được thẩm định theo hướng dẫn của ICH và tiêu chuẩn HJ642 - 2013 của Bộ Sinh thái và Môi trường Trung Quốc.

Kết quả: Quy trình định lượng dung môi toluen và trichloroethylen tồn dư trong đất vùng trồng dược liệu bằng phương pháp HS-GC/MS được xây dựng. Sau khi khảo sát, điều kiện headspace gồm thời gian ủ 30 phút, nhiệt độ ủ 70°C; điều kiện sắc ký gồm cột mao quản Elite - 5MS (30 m x 0.25 mm, 0.25 µm) với chương trình nhiệt độ gradient; khối phổ sử dụng chế độ ion hóa va chạm điện tử (EI) với dãy số khối 50 - 200 m/z. Kết quả thẩm định cho thấy quy trình có độ chọn lọc cao, khoảng tuyến tính từ 25 - 500 µg/kg, tỷ lệ phục hồi nằm trong khoảng 70 - 130% và độ chính xác có RSD < 20%, giới hạn định lượng của toluen và trichloroethylen lần lượt là 20 và 25 µg/kg.

Kết luận: Đề tài đã xây dựng thành công quy trình định lượng dung môi tồn dư trong đất vùng trồng dược liệu bằng phương pháp HS - GC/MS. Quy trình đã được thẩm định và có thể dùng để phân tích dung môi tồn dư trong đất vùng trồng dược liệu tại Việt Nam.

Từ khóa: Đất, headspace, sắc ký khí khối phổ.

Ngày nhận bài:

01/6/2023

Ngày phản biện:

20/6/2023

Ngày đăng bài:

20/10/2023

Tác giả liên hệ:

Trần Thị Thanh Ngân

Email: tranthithanhngan.pnt.

tn@gmail.com

ĐT: 0898530215

Abstract

The development and validation of an HS - GC/MS method to simultaneously analyze residual toluene and trichloroethylene contaminations in herbal planting soils

Background: Toluene and trichloroethylene are common solvents widely used in the chemical industry and considerably discharged into the ecosystem including the soil environment, especially herbal planting soils. Vietnam has a large annual

production of herbal medicines in key planting areas across the country, but there is still no standard available to quantify residual solvents in soils because the uptake of residual solvents into plants influences herbal medicines' quality. Therefore, it is necessary to develop and validate a method for the quantification of residual solvents in soils.

Methods: Residual toluene and trichloroethylene in soil was detected by headspace gas chromatography mass spectrometry (HS - GC/MS). The method was validated based on ICH guideline and Chinese standards HJ642 - 2013.

Results: A method for quantification and validation of residual toluene and trichloroethylene in soils was investigated. Under Optimized headspace conditions, equilibration temperature of 70°C, equilibration time of 30min; GC conditions of Elite - 5MS capillary column (30 m x 0.25 mm, 0.25 μ m) with gradient temperature programming; MS conditions using electron ionization type of mass range 50 - 200 m/z. The method was shown with high selectivity and regression with a wide range from 25 - 500 μ g/kg and average recoveries range was 80 - 120% and precision was below 20% and limit of quantification of toluene and trichloroethylene was 20 and 25 μ g/kg, respectively.

Conclusions: The method for determination and validation of residual toluene and trichloroethylene in herbal planting soils was successfully developed. This validated method was easily applicable for analyzing the level of residual solvents in herbal soils in Vietnam.

Keyword: GC-MS, headspace, soil.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Các ngành công nghiệp đã và đang thải một lượng lớn dung môi vào môi trường và hệ sinh thái. Ngày càng có nhiều dung môi thải ra môi trường và việc xử lý vẫn chưa được quan tâm triệt để. Lượng dung môi tồn dư có thể làm ức chế hoạt động của vi sinh vật trong đất, hạn chế quá trình phân hủy các chất độc hại trong đất từ đó ảnh hưởng đến quá trình phát triển của [1]. Sự tác động của các dung môi hữu cơ như toluen và tricloroethylen (TCE) đối với môi trường đang là một trong những mối quan tâm của xã hội, đặc biệt là khi các hợp chất này liên kết với đất và trầm tích gây ô nhiễm, đòi hỏi thời gian và các biện pháp xử lý tốn kém để có thể trở về nồng độ an toàn cho phép. Bộ Sinh thái và Môi trường Trung Quốc đã đưa ra tiêu chuẩn HJ642 - 2013 dùng để xác định 36 loại hợp chất hữu cơ bay hơi có trong đất và trầm tích. Việt Nam hiện vẫn chưa có tiêu chuẩn riêng để định lượng dung môi tồn dư có trong đất, từ đó có biện pháp xử lý đất phù hợp với mục đích sử dụng.

Sắc ký khí (gas chromatography) là kỹ thuật được sử dụng trong phân tích các hợp chất hữu cơ bay hơi kết hợp với kỹ thuật hóa hơi mẫu

headspace mang lại nhiều lợi ích trong việc định lượng các hợp chất bay hơi trong nền mẫu phức tạp như mẫu đất. Bên cạnh đó hệ thống sắc ký khí còn kết hợp với đầu dò khối phổ (mass spectrometry) là công cụ hiệu quả để xác định khối lượng và cấu trúc của phân tử hữu cơ dựa trên việc đo chính xác khối lượng phân tử của các cấu tử. Hai kỹ thuật riêng biệt như sắc ký khí và khối phổ khi được kết hợp với nhau để tạo thành một hệ thống GC/MS hoàn chỉnh đã khắc phục được nhược điểm của mỗi kỹ thuật riêng lẻ. Sắc ký khí có thể tách nhiều hợp chất bay hơi nhưng độ đặc hiệu thấp, trong khi đó khối phổ có thể phát hiện nhiều hợp chất với độ đặc hiệu cao nhưng không tách được chất cần phân tích có trong hỗn hợp [2].

Trong nghiên cứu này, quy trình định lượng dung môi toluen và tricloroethylen tồn dư được xây dựng và thẩm định theo hướng dẫn của Hội nghị Quốc tế về hài hòa các thủ tục đăng ký dược phẩm sử dụng cho con người (International Conference on Harmonization) [3] và tiêu chuẩn HJ642 - 2013 của Bộ Sinh thái và Môi trường Trung Quốc (The China's Ministry of Environmental Protection standards HJ642 - 2013) [4], sau đó được sử dụng vào

định lượng dung môi tồn dư có trong đất vùng trồng dược liệu tại Việt Nam.

Nghiên cứu được thực hiện tại Khoa Dược, Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch từ tháng 06/2022 - 04/2023.

2. ĐỐI TƯỢNG - PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

Dung môi toluen và TCE tồn dư trong đất vùng trồng dược liệu tại Việt Nam.

Địa điểm và thời gian nghiên cứu

Tiêu chuẩn chọn mẫu

Mẫu là mẫu đất vùng trồng dược liệu có nguy cơ nhiễm dung môi tồn dư.

2.2. Trang thiết bị, hóa chất, dung môi

Trang thiết bị

Các trang thiết bị dùng trong nghiên cứu được trình bày trong Bảng 1.

Bảng 1. Trang thiết bị sử dụng trong nghiên cứu

Trang thiết bị, dụng cụ	Model	Nhà sản xuất
Máy sắc ký khí	Clarus ® 690	Perkin Elmer
Đầu dò khối phổ	Clarus ® SQ 8T	Perkin Elmer
Bộ hóa hơi headspace	Turbo Matrix 40	Perkin Elmer
Cột sắc ký	Cột mao quản Elite-5MS (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm)	Perkin Elmer
Bình khí heli	-	Messer
Máy đo pH	Orion star A211	Thermo Fisher
Cân phân tích	Sartorius QUYNTIX224	Sartorius
Túi nhựa kín chứa mẫu đất		
Các dụng cụ thủy tinh và dụng cụ hỗ trợ khác		

Hóa chất, dung môi

Các hóa chất và dung môi sử dụng trong nghiên cứu được trình bày trong Bảng 2.

Bảng 2. Hóa chất, dung môi sử dụng trong nghiên cứu

Hóa chất, dung môi	Tiêu chuẩn	Nhà sản xuất/ Nước sản xuất
Chuẩn toluen, TCE và nội chuẩn IS (internal standard) clorobenzen	HPLC (High - performance liquid chromatography)	Sigma - Aldrich
Nước khử ion	ISO 3696-1987	Mỹ
Methanol	HPLC	Merck
Acid phosphoric	HPLC	Merck
Natri clorid	Phân tích	Merck

2.3. Chuẩn bị mẫu

Cách lấy mẫu đất đại diện

Theo ISO 10381-2 (2002), sử dụng phương pháp lấy mẫu đào thủ công bằng xẻng trong khoảng diện tích đất 1 m² với mắt cắt lấy mẫu tại 10 mm và chiều sâu lấy mẫu là 10 cm. Thực hiện lấy 200,0 g mẫu đất nguyên cho vào túi nhựa sạch, có miệng kín và bảo quản ở nhiệt độ dưới 5°C.

Cách bảo quản mẫu đại diện

Mẫu đại diện cần phải được bảo quản trong túi kín và sạch ở nhiệt độ dưới 5°C để hạn chế khuếch tán chất cần phân tích ra khỏi pha nước và sự thủy phân của mẫu. Để đạt hiệu quả, cho vào

thùng lạnh ngay tại thời điểm lấy mẫu và vận chuyển mẫu tới phòng thí nghiệm, sau đó bảo quản trong tủ mát ở nhiệt độ dưới 5°C.

Dung dịch gốc

Các dung dịch gốc của toluen, TCE và clorobenzen được hòa tan trong methanol để được nồng độ 1000 ppm và các dung dịch này được bảo quản trong tủ mát ở nhiệt độ dưới 5°C.

Dung dịch chuẩn

Từ dung dịch gốc, tiến hành pha loãng với methanol để được hỗn hợp dung dịch chuẩn nồng độ 1 ppm dùng cho khảo sát và thẩm định.

Dung dịch ổn định nền

Dung dịch ổn định nền chứa 500,0 ml nước khử ion được điều chỉnh đến pH ≤ 2 bằng acid phosphoric hòa tan với natri clorid đến mức bão hòa và dung dịch này được trong lọ đậy kín ở khu vực thoáng, không có hóa chất hữu cơ, nhiệt độ dưới 5°C.

Mẫu trắng

Mẫu đất không có chất cần phân tích, trong nghiên cứu này sử dụng mẫu trắng là mẫu đất vùng trồng được liệu được sấy khô 2 lần ở nhiệt độ 200°C và nghiền mịn.

Mẫu giả định

Mẫu giả định chứa 2,0 g mẫu trắng và 5,0 ml dung dịch ổn định nền với hỗn hợp dung dịch chuẩn ở nồng độ định lượng và nội chuẩn tại nồng độ 250 µg/kg.

Mẫu chuẩn

Thêm một lượng hỗn hợp dung dịch chuẩn và nội chuẩn thích hợp vào lọ mẫu headspace chứa 2,0 g mẫu đất trắng và 5,0 ml dung dịch ổn định nền.

2.3. Khảo sát điều kiện sắc ký

Thời gian ủ headspace và chương trình nhiệt độ cột được khảo sát. Chương trình nhiệt độ cột khảo sát được trình bày trong Bảng 3.

Bảng 3. Chương trình nhiệt độ cột khảo sát

Chương trình nhiệt độ	Nhiệt độ (°C)	Thời gian giữ (phút)	Mức tăng (°C/phút)
Chương trình 1	35	3,0	5
	120	0,0	10
	170	0,0	10
	220	0,0	Kết thúc
Chương trình 2	35	3,0	4
	80	0,0	10
	120	3,0	10
	220	0,0	Kết thúc
Chương trình 3	35	2,0	10
	60	0,0	15
	120	0,0	20
	220	0,0	Kết thúc

2.4. Thẩm định quy trình

Sau khi tìm được điều kiện sắc ký thích hợp, sẽ tiến hành thẩm định theo hướng dẫn của ICH và tiêu chuẩn HJ642 - 2013, bao gồm khảo sát tính phù hợp hệ thống, độ đặc hiệu, khoảng tuyến tính, độ chính xác, độ đúng, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng.

Sau đó quy trình được sử dụng để áp dụng vào định lượng dung môi tồn dư trong đất vùng trồng dược liệu tại Việt Nam.

3. KẾT QUẢ

3.1. Khảo sát điều kiện sắc ký

Khảo sát điều kiện sắc ký

Tiến hành khảo sát thời gian ủ headspace tại thời gian 30, 40 và 50 phút. Kết quả khảo sát được trình bày trong Bảng 4.

Bảng 4. Kết quả khảo sát thời gian ủ headspace

Thời gian ủ	Diện tích pic TCE trung bình	Diện tích pic toluen trung bình	Tỷ lệ diện tích pic TCE/IS (RSD%)	Tỷ lệ diện tích pic toluen/IS (RSD%)
30 phút	671	778	9,67	8,27
40 phút	546	645	8,90	22,44
50 phút	611	579	19,98	15,09

Thời gian ủ tại 30 phút đạt diện tích pic lớn nhất và độ lệch chuẩn tương đối nhỏ nhất, do đó chọn thời gian ủ 30 phút.

Tiến hành khảo sát chương trình nhiệt độ cột. Kết quả thời gian lưu của nhiệt độ cột được trình bày tại Bảng 5.

Bảng 5. Kết quả khảo sát chương trình nhiệt

Chương trình nhiệt	TCE	Toluen	IS
Chương trình 1	Không phát hiện pic	2,90	4,76
Chương trình 2	3,15	4,66	7,06
Chương trình 3	2,99	4,05	5,40

Chương trình nhiệt 3 cho thời gian lưu ngắn và phù hợp, do đó chọn chương trình nhiệt độ cột 3. Điều kiện sắc ký tối ưu

Các kết quả khảo sát cho thấy điều kiện tối ưu để định lượng toluen và TCE như sau: cột mao quản Elite - 5MS (30 m x 0,25 mm, 0,25 μ m), thời gian ủ headspace 30 phút, nhiệt độ ủ 70°C, chương trình nhiệt độ cột nhiệt độ đầu ở 35°C trong 2 phút, tăng lên 60°C với tốc độ 10 °C/phút, sau đó tăng lên 120°C với tốc độ 15°C/phút, cuối cùng tăng 220°C với tốc độ thay đổi 20°C/phút, khối phổ với chế độ ion hóa điện tử, thời gian lưu dung môi 2 phút với dây số khối 50 - 200 m/z.

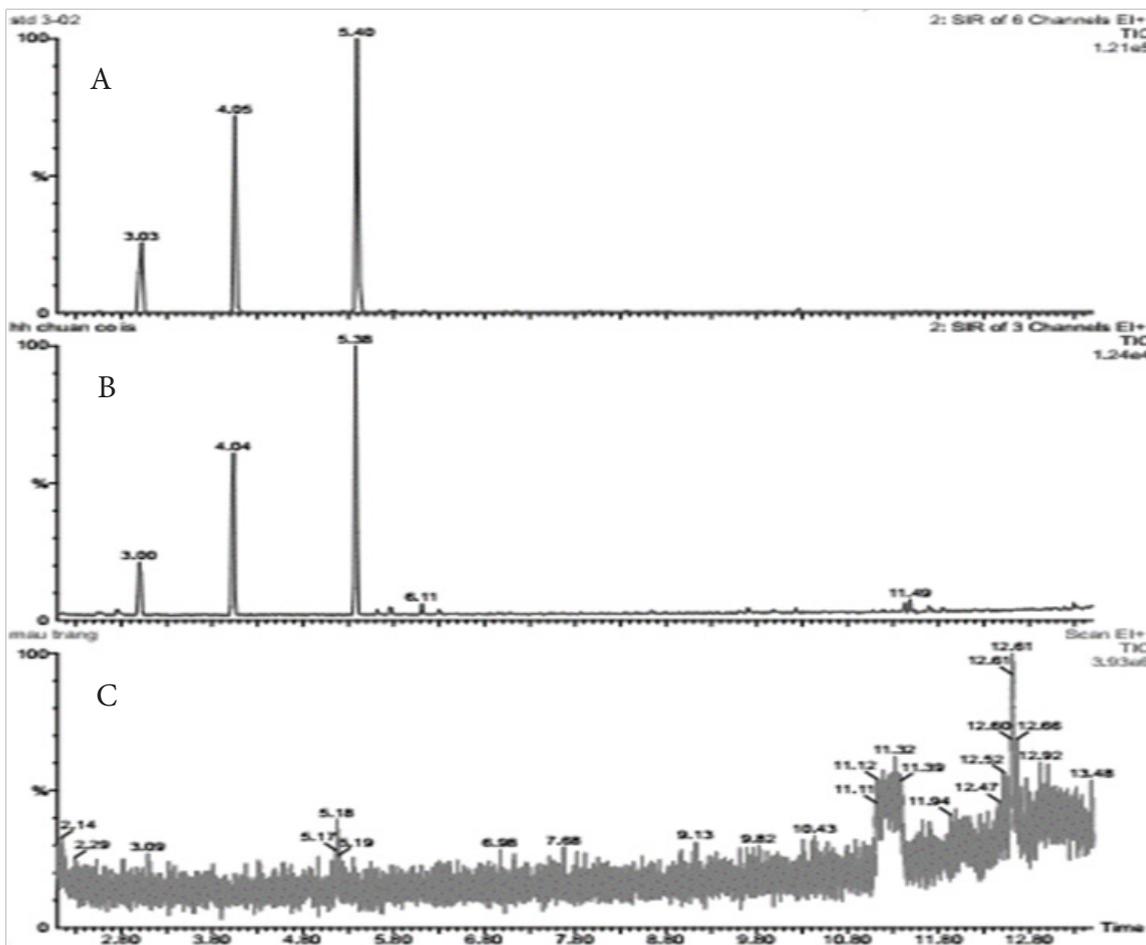
3.2. Thẩm định quy trình

Tính phù hợp hệ thống

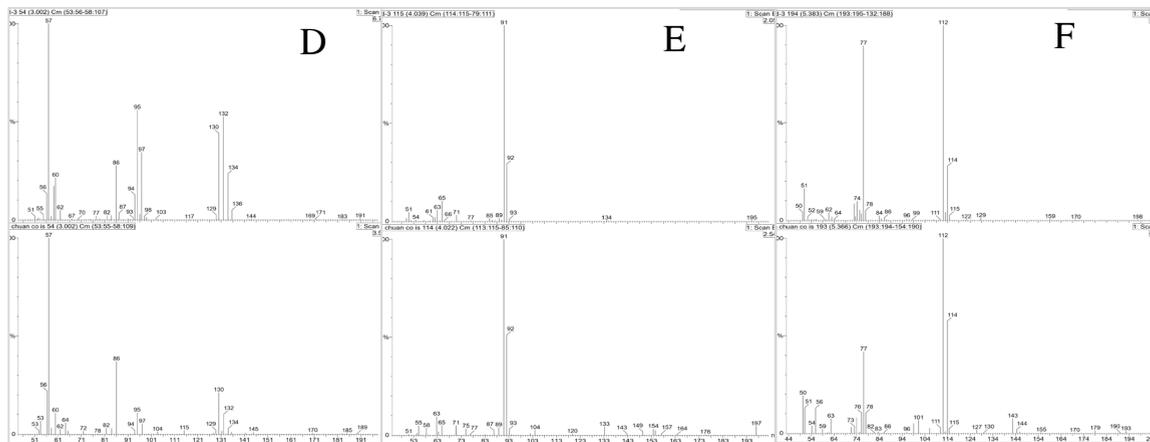
Tiến hành sắc ký mẫu giả định hỗn hợp chuẩn toluen và TCE tại nồng độ MQC (100 μ g/kg), sau 6 lần tiêm thu được các kết quả sau: Độ lệch chuẩn tương đối RSD% (Relative Standard Deviation) của tR của toluen và TCE lần lượt 0 và 0,44%, RSD% tỷ lệ diện tích pic toluen/IS là 10,54%, tỷ lệ diện tích pic TCE/IS là 19,34%. Các số liệu thu được cho thấy: RSD% của tỷ lệ diện tích pic các chất phân tích với nội chuẩn nhỏ hơn 20,0%. Như vậy điều kiện sắc ký phù hợp cho việc định tính, định lượng toluen và TCE.

Độ đặc hiệu

Tiến hành sắc ký mẫu giả định, mẫu chuẩn và mẫu trắng, thu được sắc ký đồ và các dữ liệu phổ như Hình 1 và Hình 2.



Hình 1. Sắc ký đồ của các mẫu: (A) Mẫu giả định, (B) Mẫu chuẩn, (C) Mẫu trắng



Hình 2. Phổ khối mẫu giả định và chuẩn của: (D) TCE, (E) Toluene, (F) IS

Sắc ký đồ cũng như dữ liệu về các thông số sắc ký cho thấy, thời gian lưu của pic chính trên mẫu giả định và mẫu chuẩn tương đương nhau. Trong sắc ký đồ của mẫu trắng không phát hiện pic có thời gian lưu trùng với pic của mẫu chuẩn. Phổ khối của mẫu giả định giống với phổ khối của mẫu chuẩn cho từng chất phân tích. Do đó, quy trình có tính đặc hiệu.

Khoảng tuyến tính

Chuẩn bị 5 mẫu dung dịch chuẩn trên nền mẫu thực có nồng độ từ 25 - 500 µg/kg. Tiến hành sắc ký ở điều kiện khảo sát thu được diện tích pic và tỉ lệ diện tích pic chuẩn/nội chuẩn tương ứng

với từng nồng độ. Xử lý dữ liệu bằng Excel 2016 cho thấy sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ và tỉ lệ diện tích pic chuẩn/nội chuẩn với hệ số tương quan của cả 2 chất phân tích $R^2 \geq 0,999$. Kết quả được thể hiện trong Bảng 6. Do đó, quy trình có tính tuyến tính.

Độ đúng và độ chính xác

Độ phục hồi trung bình của cả toluen và TCE từ 94,13 - 110,10%, độ phục hồi của phương pháp nằm trong khoảng cho phép từ 70 - 130% đồng thời có $RSD \leq 20,0\%$ và quy trình có độ đúng nằm trong khoảng cho phép dưới 20%. Từ kết quả Bảng 7 và Bảng 8 thấy rằng quy trình đạt độ đúng và độ chính xác trên nền mẫu thực.

Bảng 6. Kết quả thẩm định tính tuyến tính

Chỉ tiêu thẩm định	TCE	Toluen
Phương trình hồi quy	$y = 0.0024x$ $R^2 = 0.9990$	$y = 0.0027x + 0.0332$ $R^2 = 0.9998$
Khoảng tuyến tính	25 - 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$	

Bảng 7. Kết quả thẩm định độ chính xác

Chất phân tích	Tỉ lệ diện tích pic chuẩn/IS	Tỷ lệ phục hồi (%)
TCE	$0,3158 \pm 0,0217$	$106,6539 \pm 8,0196$
Toluen	$0,2923 \pm 0,0322$	$95,9885 \pm 11,9135$

Bảng 8. Kết quả thẩm định độ đúng

Chất phân tích	Nồng độ chuẩn thêm vào	Tỉ lệ diện tích pic chuẩn/IS	Tỷ lệ phục hồi (%)
TCE	25 (LOQ)	$0,0605 \pm 0,0039$	$100,8556 \pm 6,5569$
	100 (MQC)	$0,2553 \pm 0,0258$	$106,3852 \pm 10,7468$
	250 (HQC)	$0,6481 \pm 0,1074$	$108,0150 \pm 17,9053$
Toluen	20 (LOQ)	$0,0840 \pm 0,0060$	$94,1260 \pm 11,1426$
	100	$0,3146 \pm 0,0226$	$104,2363 \pm 8,3587$
	250	$0,7763 \pm 0,1219$	$110,0943 \pm 18,0558$

Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng

Tiến hành pha loãng mẫu giả định, xác định tỉ lệ tín hiệu trên nền (S/N) để xác định giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của phương pháp. Kết quả giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng được thể hiện ở Bảng 9.

Bảng 9. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng

Chất phân tích	Giới hạn phát hiện ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Giới hạn định lượng ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
TCE	8,33	25
Toluen	6,67	20

4. BÀN LUẬN

Toluen và TCE là hai loại dung môi hữu cơ phổ biến được sử dụng trong ngành công nghiệp hóa chất với số lượng lớn thải ra môi trường hằng năm. Tại Việt Nam, việc định lượng hai loại dung môi này trong đất vùng trồng dược liệu đóng một vai

trò quan trọng, từ đó các biện pháp cải tạo thích hợp cũng như đảm bảo chất lượng cây trồng dược liệu, góp phần phát triển nền kinh tế nước nhà.

Kỹ thuật hóa hơi mẫu headspace kết hợp với hệ thống sắc ký khí với đầu dò khối phổ là công cụ hữu ích giúp phân tích các hợp chất hữu cơ có

trong môi trường với nền mẫu phức tạp, giúp tiết kiệm thời gian cũng như hạn chế lượng dung môi hữu cơ dùng trong việc tách chiết mẫu, đồng thời đầu dò khối phổ có tính chọn lọc cao giúp quy trình phân tích trở nên chính xác và đặc hiệu hơn. Quy trình đạt các chỉ tiêu thẩm định, có thể sử dụng quy trình để định lượng các loại dung môi tồn dư trong đất vùng trồng dược liệu tại Việt Nam.

5. KẾT LUẬN

Từ các kết quả thực nghiệm thấy rằng đã xây dựng thành công quy trình định lượng hai loại dung môi tồn dư trong đất vùng trồng dược liệu. Quy trình đạt yêu cầu về độ đặc hiệu, độ chính xác và độ đúng. Từ kết quả khảo sát tính tuyến tính cho thấy có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ và tỉ lệ diện tích pic chuẩn/nội chuẩn trong khoảng nồng độ khảo sát.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Klimkowicz-Pawlas, A. and B. Maliszewska-Kordybach, Effect of the selected

organic solvents on the activity of soil microorganisms. *Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny*, 2008. 59(1): p. 83-96.

2. Sneddon, J., S. Masuram, and J. Richert, Gas chromatography-mass spectrometry-basic principles, instrumentation and selected applications for detection of organic compounds. *Analytical letters*, 2007. 40(6): p. 1003-1012.
3. International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. 2005: p. 17.
4. The China's Ministry of Environmental Protection. Soil and sediment Determination of volatile organic compounds-Headspace-gas chromatography/mass spectrometry method, 2013. Available at http://english.mee.gov.cn/Resources/Standards/Soil/Method_Standard4/201307/t20130705_254899.shtml/. Accessed 1 July 2022.