

XÂY DỰNG QUY TRÌNH PHÂN TÍCH ĐỒNG THỜI MỘT SỐ HÓA CHẤT BẢO VỆ THỰC VẬT TRONG MẪU MÁU BẰNG SẮC KÍ LỒNG GHÉP NỐI HAI LẦN KHỐI PHỔ (LC-MS/MS)

Đặng Đức Khanh^{1*}, Nguyễn Việt Chính¹
Trần Thị Thúy², Trương Hoài Nam², Ngô Thị Vân²

TÓM TẮT

Mục tiêu: Xây dựng quy trình phân tích đồng thời một số hóa chất bảo vệ thực vật trong mẫu máu bằng sắc kí lồng ghép nối hai lần khối phổ.

Đối tượng và phương pháp: Nghiên cứu thực nghiệm đưa ra phương pháp phân tích đồng thời 8 hóa chất bảo vệ thực vật (imidacloprid, chlorpyrifos, dimethoat, fenobucarb, 2,4-D, nicosulfuron, metsulfuron methyl, nereistoxin) trong mẫu máu bằng kỹ thuật sắc kí lồng ghép nối hai lần khối phổ.

Kết quả: Phương pháp sắc kí lồng ghép nối hai lần khối phổ cho kết quả nhanh, chính xác và độ nhạy cao. Phương pháp sử dụng Warfarin-d5 làm nội chuẩn. Quy trình xử lý mẫu đơn giản, độ thu hồi của các chất lớn hơn 85% và độ lệch chuẩn tương đối dưới 10%. Giới hạn phát hiện các chất trong máu từ 0,1 ng/ml. Khoảng tuyến tính khảo sát các chất có hàm lượng từ 10 ng/ml đến 1.000 ng/ml, hệ số tương quan tuyến tính khảo sát 8 chất từ 0,9971 đến 0,9997.

Từ khóa: Hóa chất bảo vệ thực vật, sắc kí lồng ghép nối hai lần khối phổ, giám định mẫu máu.

ABSTRACT

Objectives: To develop a simultaneous analysis process for some selected pesticides in blood samples using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS).

Subjects and methods: This experimental study established a method for the simultaneous analysis of eight pesticides (imidacloprid, chlorpyrifos, dimethoate, fenobucarb, 2,4-D, nicosulfuron, metsulfuron methyl, nereistoxin) in blood samples using LC-MS/MS technology.

Results: The liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method provided rapid, accurate, and highly sensitive results. The method used Warfarin-d5 as an internal standard. The sample processing procedure was simple, with recovery rates of substances greater than 85% and relative standard deviations below 10%. The detection limits for the substances in blood were from 0.1 ng/ml. The linear range for the substance concentrations was from 10 ng/ml to 1,000 ng/ml, with linear correlation coefficients for the eight substances ranging from 0.9971 to 0.9997.

Keywords: Pesticides, liquid chromatography-tandem mass spectrometry, blood sample analysis.

Chịu trách nhiệm nội dung: Đặng Đức Khanh, Email: khanh.dangduc1604@gmail.com

Ngày nhận bài: 20/11/2023; mời phản biện khoa học: 11/2023; chấp nhận đăng: 12/3/2024

¹Viện Pháp y Quân đội

²Đại học Bách khoa Hà Nội

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ở Việt Nam, hàng năm số vụ ngộ độc, tử tử hoặc bị đầu độc do hóa chất bảo vệ thực vật (HCBVTV) vẫn xảy ra. Tuy nhiên, các kỹ thuật dùng để phân tích HCBVTV trong máu phục vụ cấp cứu, giám định còn hạn chế. Thiết bị được sử dụng chủ yếu là sắc kí lỏng, sắc kí khí khối phổ. Thiết bị sắc kí lỏng ghép nối hai lần khối phổ chưa được ứng dụng nhiều trong lĩnh vực này.

Cho đến nay, sắc kí lỏng ghép nối hai lần khối phổ (LC-MS/MS) đang được nhiều chuyên gia

khuyến cáo là thiết bị hiện đại, có độ ổn định, chính xác, độ nhạy cao và thao tác đơn giản để phân tích các HCBVTV trong mẫu máu. Thiết bị LC-MS/MS sử dụng trong nghiên cứu cho phép chuyển đổi phân cực nhanh, có thể quét ở chế độ dương và âm trong thời gian ngắn, tốc độ va chạm cao sẽ cho tín hiệu mạnh hơn và giới hạn phát hiện thấp hơn.

Xây dựng quy trình phân tích đồng thời, chính xác 8 HCBVTV trong mẫu máu, sử dụng thiết bị LC-MS/MS kết hợp với kỹ thuật xử lý mẫu nhanh và đơn giản, lượng mẫu dùng trong phân tích ít

có ý nghĩa thực tiễn cao, giúp cho công tác điều trị cấp cứu chống độc cũng như giám định độc chất nhanh, chính xác. Chúng tôi thực hiện nghiên cứu này nhằm xây dựng quy trình phân tích đồng thời một số HCBVTV trong mẫu máu bằng thiết bị LC-MS/MS.

2. ĐỐI TƯỢNG, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng, hóa chất, thiết bị nghiên cứu

- Đối tượng nghiên cứu: mẫu máu của người không nhiễm HCBVTV để khảo sát quy trình; mẫu máu thực tế của các trường hợp giám định.

- Hóa chất: các hóa chất chuẩn gồm Warfarin-d5 (chất nội chuẩn), imidacloprid, chlorpyrifos, dimethoat, fenobucarb, 2,4-D, nicosulfuron, metsulfuron methyl, nereistoxin của hãng LGC, các hóa chất phân tích là methanol, acetonitril, axit clohydric, axit formic, nước loại ion, khí argon, khí nitơ 99,999%, màng lọc 0,22 μ m, micropipet, các dụng cụ thủy tinh cần thiết khác.

- Thiết bị nghiên cứu: thiết bị sắc kí lỏng kết nối detector 2 lần khối phổ 8045 của hãng Shimadzu. Cột Shimadzu C18 (150 mm x 2,1 mm; 3,0 μ m, Part No. 28103-152130).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Khảo sát tìm mảnh mẹ, mảnh con của hoạt chất nghiên cứu: khảo sát trên hệ thống sắc kí lỏng kết nối detector khối phổ triple quadrupole (hãng Shimadzu 8045). Mẫu chuẩn đơn chất có nồng độ 2.000 ng/ml mỗi chất dùng để khảo sát tìm mảnh mẹ, mảnh con. Phương pháp xác định mảnh mẹ bằng cách quét toàn phổ. Sau khi xác định được mảnh mẹ, tiến hành xác định mảnh con bằng cách quét toàn phổ bắn phá mảnh mẹ.

- Khảo sát tìm điều kiện tối ưu của khối phổ (MS): hỗn hợp mẫu chuẩn có nồng độ 100 ng/ml mỗi chất dùng để khảo sát tìm điều kiện tối ưu của khối phổ. Quá trình khảo sát tối ưu điều kiện MS được thao tác trên phần mềm chuyên dụng. Thiết bị sẽ tự động tối ưu điều kiện khối phổ.

- Quy trình xử lý mẫu: lấy 1 ml mẫu máu vào ống nghiệm, thêm 1 ml dung môi acetonitril/2% HCl, lắc vortex 15 phút, li tâm tốc độ 10.000 vòng/phút trong 5 phút. Lấy toàn bộ lớp dung dịch lọc qua màng lọc 0,22 μ m vào lọ vial chia vạch loại 2 ml, thêm 50 μ l dung dịch nội chuẩn warfarin-d5 có nồng độ 1.000 ng/ml. Làm bay hơi dung môi đến còn khoảng 1 ml. Dung dịch này dùng để phân tích trên LC-MS/MS.

- Khảo sát độ chọn lọc của phương pháp phân tích: độ chọn lọc của thiết bị LC-MS/MS được thực hiện trên 05 mẫu máu trắng khác nhau không có

HCBVTV và 05 mẫu trắng được thêm HCBVTV. Mẫu được xử lý và phân tích theo quy trình đã lựa chọn. Phương pháp đạt yêu cầu về độ chọn lọc khi sắc kí đồ mẫu trắng không xuất hiện pic, m/z trùng lặp với mẫu trắng thêm chất chuẩn và nội chuẩn.

- Khảo sát độ ổn định của hệ thống:

+ Hệ thống sắc kí lỏng ghép nối 2 lần khối phổ được đánh giá độ ổn định trong 1 ngày. Khảo sát ở 03 mức nồng độ chất là 50 ng/ml, 125 ng/ml và 500 ng/ml, nồng độ chất nội chuẩn trong các mức là 50 ng/ml. Thí nghiệm lặp lại 06 lần.

+ Kết quả đánh giá thông qua độ lệch chuẩn tương đối của thời gian lưu tương đối và tỉ lệ diện tích pic của các chất phân tích so với nội chuẩn.

- Khảo sát khoảng tuyến tính, giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ) của quy trình:

+ Khảo sát khoảng tuyến tính dựa vào 6 điểm chuẩn của imidacloprid, chlorpyrifos, dimethoate, fenobucarb, 2,4-D, nicosulfuron, metsulfuron methyl, nereistoxin pha trong acetonitril có cùng nồng độ chất là 10 ng/ml, 50 ng/ml, 125 ng/ml, 250 ng/ml, 500 ng/ml, 1.000 ng/ml. Mỗi điểm chuẩn đều có nồng độ chất nội chuẩn 50 ng/ml. Mỗi điểm phân tích lặp lại 6 lần, lấy giá trị trung bình.

+ Giá trị LOD và LOQ của quy trình được thực hiện trên mẫu máu thêm hỗn hợp chuẩn có nồng độ giảm dần. Giá trị LOD được tính khi S/N = 3 và LOQ = 3,3 LOD [1].

- Đánh giá độ thu hồi và độ lặp lại của quy trình phân tích mẫu: độ thu hồi và độ lặp lại của quy trình được đánh giá trên mẫu máu trắng thêm chuẩn, hỗn hợp chuẩn imidacloprid, chlorpyrifos, dimethoate, fenobucarb, 2,4-D, nicosulfuron, metsulfuron methyl, nereistoxin thêm vào 1 ml mẫu có cùng hàm lượng ở 3 mức lần lượt là 50 ng, 250 ng và 1.000 ng, lượng chất nội chuẩn trong các mức là 50 ng. Mỗi mức nồng độ tiến hành thí nghiệm 06 lần lặp lại.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

3.1. Kết quả khảo sát điều kiện phân tích LC-MS/MS

Mẫu chuẩn được ion hóa phun điện tử (ESI) bắn phá ở hai điều kiện ion dương và ion âm. Sau khi tìm được điều kiện sắc kí lỏng và khối phổ ở chế độ MRM (Multiple Reaction Monitoring) sẽ tiến hành tối ưu hóa điều kiện MRM trên phần mềm tự động của thiết bị. Kết quả khảo sát điều kiện phân tích trên LC-MS/MS như sau:

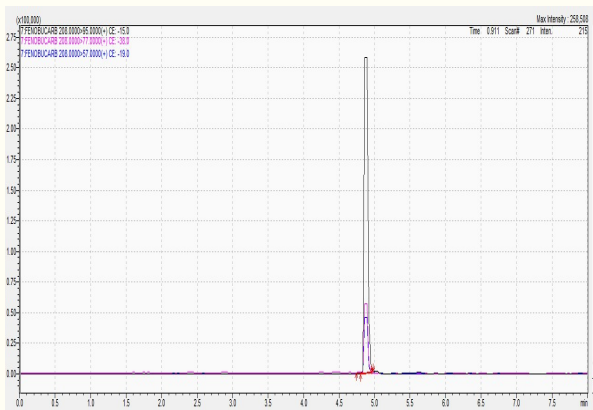
- Pha động: kênh A là dung dịch axit formic 0,1% trong nước loại ion và kênh B là dung dịch axit formic 0,1% trong methanol.

- + Điều kiện khối phổ: nhiệt độ interface, DL, desolvate hóa lần lượt là 300°C, 250°C, 526°C.
- + Tốc độ dòng khí làm khô 10 lít/phút.
- + Tốc độ dòng khí phun sương 3 lít/phút.
- + Tốc độ dòng khí làm nóng 3 lít/phút.

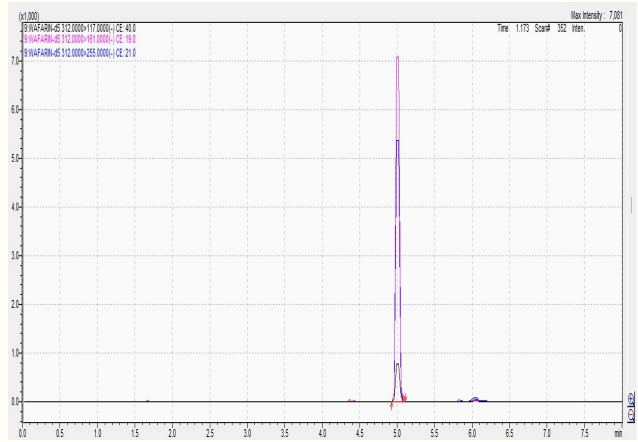
Bảng 1. Chương trình gradient pha động

Thời gian (phút)	%A	%B	Tốc độ dòng (ml/phút)
0,0-3,0	40	60	0,16
3,01-5,0	10	90	0,20
5,01-8,0	10	90	0,16

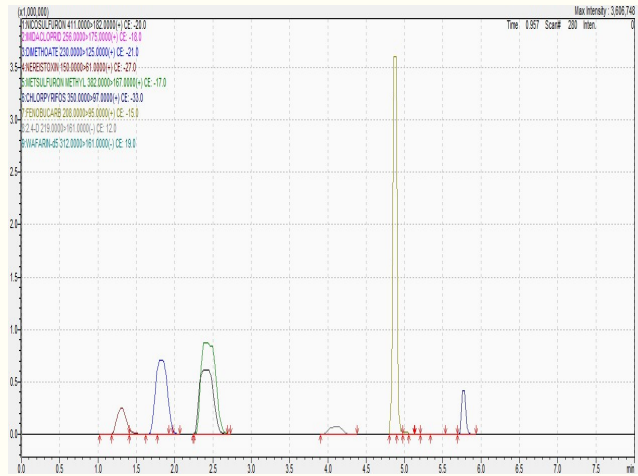
- Sắc kí đồ đại diện: Sắc kí đồ đại diện chất Fenobucarb và chất nội chuẩn được chỉ ra lần lượt trên hình 1 và hình 2. Sắc kí đồ hỗn hợp 8 chất chuẩn và nội chuẩn thêm vào mẫu nước tiểu được chỉ ra trên hình 3.



Hình 1. Sắc kí đồ của chuẩn Fenobucarb.



Hình 2. Sắc kí đồ của chuẩn warfarin-d5.



Hình 3. Sắc kí đồ mẫu máu trắng thêm 8 chất chuẩn.

Kết quả tối ưu hóa điều kiện khối phổ phân tích imidacloprid, chlorpyrifos, dimethoate, 2,4-D, fenobucarb, nicosulfuron, metsulfuron methyl, nereistoxin, warfarin-d5 được chỉ ra trên bảng 2.

Bảng 2. Điều kiện khối phổ

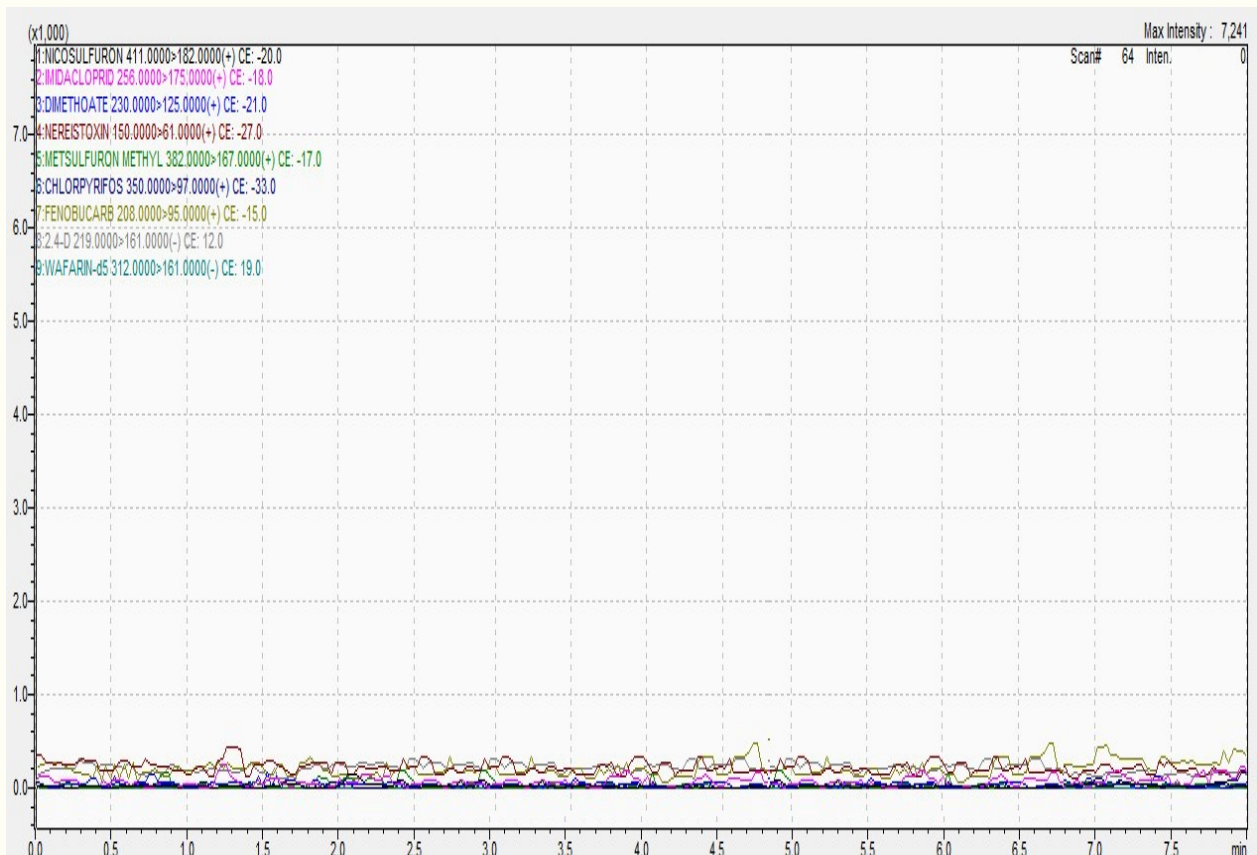
TT	Chất	Chế độ phân tích	Precursor m/z	Product m/z	Dwell time (msec)	Q1 Pre Bias (V)	CE (eV)	Q3 Pre Bias (V)
1	2,4-D	Negative	219	161* (100)	100	10	12	17
				125 (8)	100	14	26	22
				89 (3)	100	10	36	10
2	Nicosulfuron	Positive	411	182* (100)	100	-11	-20	-18
				106 (35)	100	-11	-36	-18
				139 (20)	100	-11	-44	-25
3	Metsulfuron Methyl	Positive	382	167* (100)	50	-10	-17	-17
				135 (9)	50	-11	-35	24
				56 (5)	50	-11	-42	-15
4	Nereistoxin	Positive	150	105* (100)	50	-10	-27	-23
				61 (25)	50	-10	-18	-18
				89 (13)	50	-10	-33	-26

TT	Chất	Chế độ phân tích	Precursor m/z	Product m/z	Dwell time (msec)	Q1 Pre Bias (V)	CE (eV)	Q3 Pre Bias (V)
5	Imidacloprid	Positive	256	209* ₍₁₀₀₎	50	-10	-15	-21
				175 ₍₈₅₎	50	-16	-18	-30
				84 ₍₁₅₎	50	-13	-15	-16
6	Chlorpyrifos	Positive	350	198* ₍₁₀₀₎	50	-11	-33	-17
				97 ₍₉₃₎	50	-11	-20	-20
				162 ₍₁₆₎	50	-11	-39	-29
7	Dimethoate	Positive	230	125* ₍₁₀₀₎	50	-11	-21	-21
				79 ₍₁₅₎	50	-11	-33	-28
				93 ₍₅₎	50	-12	-33	-17
8	Fenobucarb	Positive	208	95* ₍₁₀₀₎	50	-12	-15	-21
				77 ₍₁₉₎	50	-12	-39	-28
				57 ₍₁₅₎	50	-12	-19	-21
9	Warfarin-d5	Negative	312	161* ₍₁₀₀₎	100	15	19	17
				255 ₍₈₃₎	100	15	23	23
				117 ₍₂₎	100	15	37	23

(*) mảnh bôi đen dùng để định lượng chất

3.2. Kết quả khảo sát độ chọn lọc của phương pháp phân tích

Tiến hành khảo sát độ chọn lọc trên 05 mẫu máu trắng. Kết quả cho thấy, độ chọn lọc của quy trình rất tốt, không có pic tạp xuất hiện trùng với pic của chất phân tích và nội chuẩn được thêm vào mẫu trắng. Sắc kí đồ khảo sát độ chọn lọc mẫu nước tiểu trắng được chỉ ra trong Hình 4.



Hình 4. Sắc kí đồ phân tích mẫu máu trắng.

3.3. Kết quả khảo sát đánh giá độ ổn định của hệ thống

Tiến hành khảo sát độ ổn định trong một ngày ở 03 mức nồng độ chất là 50, 125, 500 ng/ml, tiêm lặp lại ở mỗi nồng độ là 6 lần. Kết quả chỉ ra (bảng 3) cho thấy giá trị độ lệch chuẩn (RSD) thống kê ở 2 yếu tố là tỉ lệ thời gian lưu và tỉ lệ diện tích pic của Imidacloprid, chlorpyrifos, dimethoate, fenobucarb, 2,4-D, nicosulfuron, metsulfuron methyl, nereistoxin trên nội chuẩn đều RSD < 3%.

Bảng 3. Kết quả khảo sát độ ổn định của hệ thống LC/MS/MS

Hoạt chất	Hàm lượng thí nghiệm (ng/ml)	Tỉ lệ diện tích peak/IS		Tỉ lệ thời gian lưu/IS	
		Giá trị trung bình (n = 6)	RSD (%)	Giá trị trung bình (n = 6)	RSD %
2,4-D	50	20,59	1,49	0,822	0,34
	125	54,18	0,83	0,821	0,56
	500	230,60	0,58	0,806	0,24
Nicosulfuron	50	205,35	2,02	0,483	0,91
	125	956,52	2,02	0,481	0,79
	500	2.028,95	1,05	0,469	0,80
Metsulfuron Methyl	50	304,39	2,34	0,488	1,18
	125	786,78	2,15	0,481	0,83
	500	2.995,96	1,25	0,477	0,61
Nereistoxin	50	181,36	2,53	0,262	0,01
	125	436,27	1,94	0,262	0,01
	500	1.474,57	1,05	0,262	0,01
Imidacloprid	50	2,16	2,99	0,326	0,15
	125	4,24	1,14	0,326	0,85
	500	15,41	2,27	0,325	0,14
Chlorpyrifos	50	47,99	1,44	1,154	0,20
	125	91,66	1,93	1,153	0,08
	500	2.178,66	1,17	0,360	0,52
Dimethoate	50	209,31	1,67	0,369	0,01
	125	506,28	1,23	0,363	0,01
	500	4.062,61	0,62	0,363	0,01
Fenobucarb	50	367,61	2,64	0,974	0,02
	125	827,88	1,64	0,974	0,01
	500	3.193,61	0,54	0,972	0,91

3.4. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính, LOD, LOQ của thiết bị

Khoảng tuyến tính được khảo sát trong khoảng nồng độ chất từ 10 ng/ml đến 1.000 ng/ml. Đường chuẩn nội được xây dựng dựa vào 06 mức nồng độ khác nhau của hỗn hợp chuẩn thể hiện mối tương quan tuyến tính giữa tỉ lệ lượng chất và tỉ lệ diện tích pic của chất tương ứng so với chất nội chuẩn warfarin-d5. Tại các mức nồng độ chất nội chuẩn đều là 50 ng/ml. Kết quả khảo sát được thể hiện trong bảng 4.

Phương trình hồi quy được xây dựng có hệ số tương quan tốt. Trong đó, Y là tỉ lệ diện tích pic của chất phân tích chia cho chất nội chuẩn; X là tỉ lệ lượng chất. Giới hạn phát hiện của quy trình đối với các chất phân tích trong mẫu máu được trình bày trong bảng 4.

Bảng 4. Số liệu khảo sát khoảng tuyến tính

TT	Hoạt chất	Phương trình hồi quy và hệ số tương quan	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)
1	2,3-D	$y = 22,009x + 2,5655; R^2 = 0,9986$	0,50	1,65
2	Nicosulfuron	$y = 184,81x + 37,473; R^2 = 0,9971$	0,10	0,33
3	Metsulfuron Methyl	$y = 282,28x + 72,235; R^2 = 0,9987$	0,10	0,33
4	Nereistoxin	$y = 151,59x + 33,022; R^2 = 0,9985$	0,10	0,33
5	Imidacloprid	$y = 1,4659x + 0,8840; R^2 = 0,9984$	0,10	0,33
6	Chlorpyrifos	$y = 29,151x + 16,296; R^2 = 0,9997$	0,50	1,65
7	Dimethoate	$y = 204,15x + 43,588; R^2 = 0,9975$	0,25	0,82
8	Fenobucarb	$y = 315,69x + 65,213; R^2 = 0,9992$	0,50	1,65

3.5. Kết quả khảo sát độ thu hồi và độ lặp lại quy trình phân tích mẫu

Bảng 5. Kết quả khảo sát độ thu hồi và độ lặp lại của quy trình

Hoạt chất	50 ng		250 ng		1000 ng	
	Độ thu hồi (%)	RSD (%)	Độ thu hồi (%)	RSD (%)	Độ thu hồi (%)	RSD (%)
2,4-D	85,88	0,8273	89,20	0,5708	98,81	0,5802
Nicosulfuron	86,92	6,9366	91,85	0,8807	97,72	1,0427
Metsulfuron Methyl	86,24	0,3400	88,26	0,5205	97,09	1,2688
Nereistoxin	90,63	0,9664	95,79	1,5315	99,75	2,1058
Imidacloprid	88,02	1,6792	91,66	1,7731	98,43	0,6201
Chlorpyrifos	85,76	4,4943	87,16	1,4453	100,46	1,4289
Dimethoate	87,08	5,8954	93,50	3,9918	99,63	0,5118
Fenobucarb	86,89	4,0189	90,86	1,1793	98,15	1,3527

Kết quả khảo sát cho thấy độ thu hồi của quy trình ở cả 03 hàm lượng chất nghiên cứu đều lớn 85%, độ lặp lại của quy trình khi thí nghiệm lặp 06 lần đều rất tốt, giá trị độ lệch chuẩn tương đối RSD < 10% ở cả 03 mức hàm lượng, đáp ứng được yêu cầu phân tích. Kết quả khảo sát độ thu hồi và độ lặp lại được chỉ ra trong bảng 5.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã đưa ra quy trình phân tích định tính, định lượng nhanh 8 HCBVTV là Imidacloprid, chlorpyrifos, dimethoate, fenobucarb, 2,4-D, nicosulfuron, metsulfuron methyl, nereistoxin trong mẫu máu bằng thiết bị LC-MS/MS có sử dụng chất nội chuẩn là warfarin-d5. Quy trình xử lý mẫu đơn giản, có độ thu hồi cao trên 85%, độ lặp lại có RSD <10%. Giới hạn phát hiện của quy trình đối với các chất phân từ 0,1ng/ml đến 0,5ng/ml. Khoảng tuyến tính khảo sát ở 6 mức nồng độ trong khoảng từ 10 đến 1.000ng/ml, lượng chất nội chuẩn trong các mức nồng độ là 50ng/ml, hệ số tương quan tuyến tính của 8 chất từ 0,9971 đến 0,9997.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Trần Cao Sơn, Phạm Xuân Đà và cs (2010), Thẩm định phương pháp trong phân tích hóa học và vi sinh vật, tr. 16-59.
2. Đặng Đức Khanh (2016), “Phân tích một số hóa chất bảo vệ thực vật trong mẫu máu bằng phương pháp sắc kí khí khối phổ”, *Tạp chí Y học Quân sự*.
3. Leo M.L Nollet, Hamir S Rathore (2010), “Handbook of pesticides: methods of pesticide residues analysis”, *Printed in the United States of America*.
4. Yongho Shin, Jonghwa Lee, Jiho Lee, Junghak Lee, Eunhye Kim, Kwang-Hyeon Liu, Hye Suk Lee, Jeong-Han Kim (2018), “Validation of a Multiresidue Analysis Method for 379 Pesticides in Human Serum Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. □