

NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG QUY TRÌNH XÁC ĐỊNH 3,5,6-TRICHLORO-2-PYRIDINOL TRONG NƯỚC TIỂU BẰNG SẮC KÍ KHÍ KHỐI PHỔ

ThS. NGUYỄN MAI DUNG, ThS. CHU THỊ NHƯ QUỲNH
TS. LÊ ANH HÀO - Viện Pháp y Quốc gia

TÓM TẮT: Nghiên cứu xây dựng quy trình xác định 3,5,6-trichloro-2-pyridinol trong nước tiểu bằng sắc kí khí khối phổ tại Viện Pháp y Quốc gia, làm cơ sở chẩn đoán ngộ độc chlorpyrifos.

Kết quả: Xây dựng thành công quy trình xác định 3,5,6-trichloro-2-pyridinol trong nước tiểu bằng phương pháp có độ đúng, độ chính xác với tỉ lệ thu hồi từ 84,29-91,8%; có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ 3,5,6-trichloro-2-pyridinol với tỉ lệ diện tích pic 3,5,6-trichloro-2-pyridinol/chuẩn nội trong khoảng nồng độ từ 10-500 ng/ml, hệ số tương quan xấp xỉ bằng 1 và phương trình hồi quy tuyến tính $y = 0,0041x + 0,0134$; giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của 3,5,6-trichloro-2-pyridinol trong nước tiểu lần lượt là 0,5 ng/ml và 1,5 ng/ml; hiệu suất chiết 3,5,6-trichloro-2-pyridinol từ mẫu nước tiểu đạt từ 84,29-91,87% (RSD < 5%). Kết quả phân tích 7 mẫu nước tiểu nghi ngờ ngộ độc chlorpyrifos cho kết quả 5 mẫu dương tính 3,5,6-trichloro-2-pyridinol và 2 mẫu âm tính.

Từ khóa: 3,5,6-trichloro-2-pyridinol, chlorpyrifos, sắc kí khí khối phổ, Urine.

ABSTRACT: Study and develop a process to determine 3,5,6-trichloro-2-pyridinol in urine by gas chromatography-mass spectrometry at the National Institute of Forensic medicine, as a basis for the diagnosis of chlorpyrifos poisoning.

Results: Successfully developed a process to determine 3,5,6-trichloro-2-pyridinol in urine by the method with accuracy and precision with the recovery rate from 84.29-91.8%; there was a close linear correlation between the concentration of 3,5,6-trichloro-2-pyridinol and the peak area ratio of 3,5,6-trichloro-2-pyridinol/internal standard in the concentration range from 10-500 ng/ml, the correlation coefficient was approximately equal to one and the linear regression equation $y = 0.0041x + 0.0134$; the detection limit and the quantitative limit of 3,5,6-trichloro-2-pyridinol in urine were 0.5 ng/ml and 1.5 ng/ml, respectively; extraction efficiency of 3,5,6-trichloro-2-pyridinol from urine samples was from 84.29-91.87% (RSD < 5%). The results of an analysis of seven urine samples suspected of chlorpyrifos poisoning showed five positive 3,5,6-trichloro-2-pyridinol samples and two negative samples.

Keywords: 3,5,6-trichloro-2-pyridinol, chlorpyrifos, gas chromatography-mass spectrometry, Urine

Chịu trách nhiệm nội dung: ThS. Nguyễn Mai Dung, Email: maidungibst@gmail.com

Ngày nhận bài: 17/8/2022; mời phản biện khoa học: 9/2022; chấp nhận đăng: 15/10/2022.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ.

Chlorpyrifos (CP) là một loại thuốc bảo vệ thực vật nhóm lân hữu cơ, được sử dụng cả trong nông nghiệp và công nghiệp [2]. Khi vào trong cơ thể, CP được chuyển hóa thành các chất khác nhau và thải trừ chủ yếu qua nước tiểu dưới dạng chuyển hóa với chất chuyển hóa chính là TCP (3,5,6-trichloro-2-pyridinol). Do độc tính cao đối với sức khỏe con người, nên CP đã bị loại khỏi danh mục thuốc bảo vệ thực vật được phép sử dụng tại Việt Nam từ năm 2019 [1]. Mặc dù vậy, Viện Pháp y Quốc gia vẫn nhận được nhiều vụ trưng cầu và yêu cầu giám định có liên quan đến ngộ độc CP trong thời gian gần đây.

Khả năng định sự có mặt của TCP trong nước tiểu là một tiêu chí quan trọng khi xác định ngộ độc CP. Sắc kí khí khối phổ với sự ion hóa điện tử là phương pháp phân tích hiện đại, có tính đặc hiệu

cao, được sử dụng phổ biến trong giám định pháp y nhằm khẳng định sự có mặt của TCP trong mẫu nước tiểu cần phân tích [4], [5].

Chúng tôi thực hiện nghiên cứu này nhằm xây dựng quy trình xác định TCP trong nước tiểu bằng sắc kí khí khối phổ, phục vụ công tác giám định pháp y và hỗ trợ điều trị lâm sàng các trường hợp có liên quan đến ngộ độc CP.

2. ĐỐI TƯỢNG, CHẤT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.

2.1. Đối tượng, chất liệu nghiên cứu:

- Đối tượng nghiên cứu: mẫu chuẩn (mẫu nước tiểu không chứa TCP, được thêm chuẩn tạo các mẫu nước tiểu có nồng độ TCP từ 0,5-500 ng/ml và chuẩn nội propofol 100 ng/ml) và 7 mẫu nước tiểu của người nghi ngờ ngộ độc CP, giám định tại Khoa Độc chất, Viện Pháp y Quốc gia.

- Chất liệu nghiên cứu:

+ Hóa chất và thuốc thử: chất chuẩn TCP 100 mg (Lot BNBZ8746, hãng Sigma Aldrich); chất chuẩn nội propofol 1 ml (Lot BCCC 9065, hãng Sigma Aldrich).

+ Hóa chất dung môi: methanol (HPLC), acid hydrochloric, diethylether, acetonitril, ethyl acetat, n-hexan, dichlormethan, natri hydroxyd, nước cất...

+ 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCP).

- Thiết bị nghiên cứu: máy sắc kí khí Agilent 7890B kết nối khối phổ MS 5977A; cân phân tích Mettler AB240 (Thụy Sĩ); cột chiết pha rắn C8 (500 mg, 3 ml), C18 (200 mg, 3 ml), Bond elute certify (200 mg, 3 ml); hệ thống chiết pha rắn; máy lắc siêu âm, máy li tâm, tủ sấy, hệ thống làm khô bằng nitơ; bình nón, ống nghiệm định mức các loại và các dụng cụ cần thiết khác.

2.2. Phương pháp nghiên cứu:

- Thiết kế nghiên cứu: thực nghiệm, xây dựng quy trình xác định TCP.

- Điều kiện sắc kí khí khối phổ:

+ Cột sắc kí HP5-MS (30m x 250 μ m x 0,25 μ m) của Agilent.

+ Thẻ tích tiêm mẫu 1 μ l với bộ tiêm mẫu tự động.

+ Chế độ tiêm mẫu không chia dòng (splitless).

+ Khí mang heli, tốc độ dòng 1 ml/phút.

+ Nguồn ion hóa EI 70eV; nhiệt độ nguồn ion 250°C.

+ Nhiệt độ lò cột: 80°C giữ trong 3 phút, tăng 40°C/phút, lên đến 200°C và giữ trong 1 phút, tiếp tục tăng 10°C/phút đến 290°C và giữ trong 6 phút.

- Chuẩn bị mẫu nghiên cứu:

+ Dung dịch chuẩn gốc: pha dung dịch chuẩn TCP 1 μ g/ml trong methanol và dung dịch chuẩn nội propofol nồng độ 1 μ g/ml trong methanol.

+ Mẫu chuẩn: mẫu nước tiểu trắng (không chứa TCP) được thêm chuẩn, tạo các mẫu có nồng độ TCP từ 0,5-500 ng/ml và chuẩn nội propofol 100 ng/ml.

+ Mẫu thử: sử dụng mẫu nước tiểu nghi ngờ ngộ độc CP, thêm dung dịch chuẩn nội propofol 100 ng/ml.

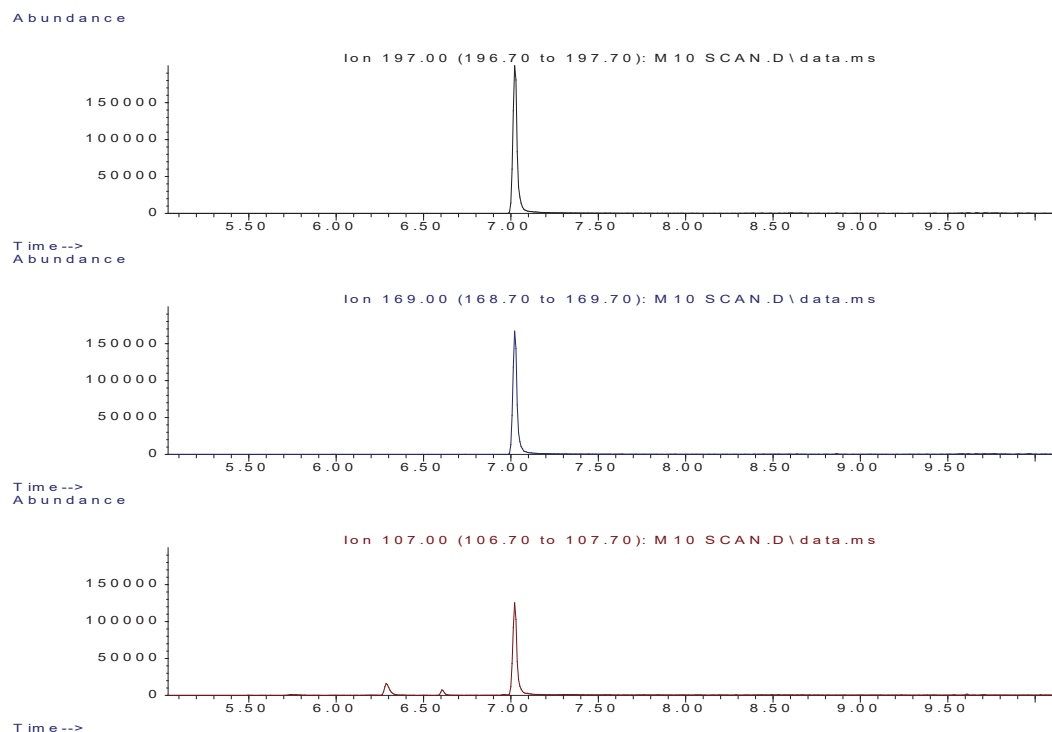
- Xử lý mẫu: hút chính xác 1,00 ml nước tiểu vào ống nghiệm, thêm 50 μ l dung dịch acid chlohydric đặc, thủy phân ở nhiệt độ 80°C trong 30 phút, để nguội mẫu ở nhiệt độ phòng. Thêm 3,00 ml EtOAc (x 2 lần), lắc bằng máy lắc 5 phút ở 2.000 vòng/phút. Dịch chiết trong dung môi hữu cơ được làm khô bằng khí nitơ tới cạn. Cặn được hòa tan trong 100 μ l MeOH rồi tiến hành sắc kí.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU.

3.1. Khảo sát phổ khối của TCP và chuẩn nội:

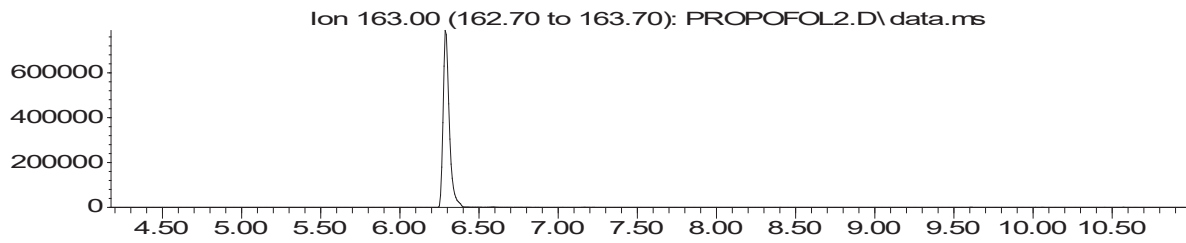
TCP và chuẩn nội được phân tích trên sắc kí khí khối phổ theo chương trình được lựa chọn, chế độ scan. Phổ khối của TCP và chuẩn nội rõ ràng và riêng biệt (hình 1A đến hình 1D).

Dựa vào tính đặc trưng và mức độ tín hiệu, chúng tôi lựa chọn mảnh m/z = 197; 169; 107 cho TCP và m/z = 163; 178; 117 cho chuẩn nội để phân tích sắc kí theo chế độ chọn lọc ion (SIM). Mảnh m/z = 197 và mảnh m/z = 163 sử dụng để phân tích định lượng.

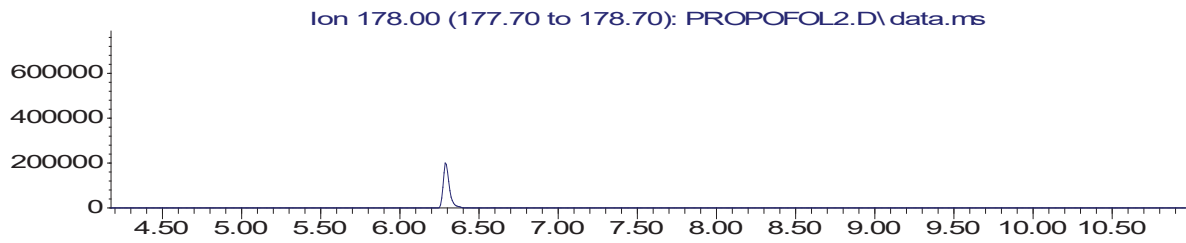


Hình 1A. Sắc đồ ion thành phần TCP.

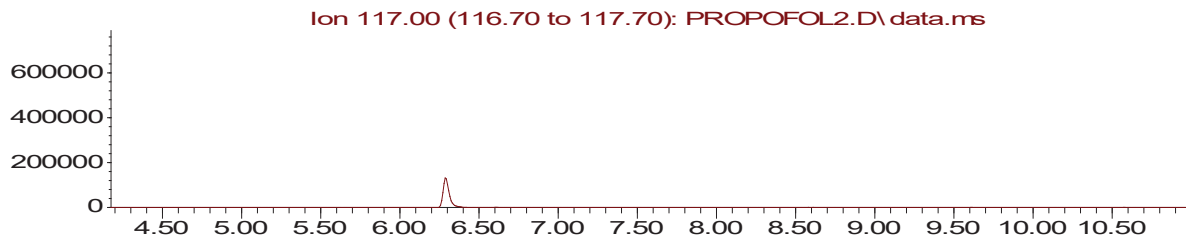
Abundance



Time→
Abundance



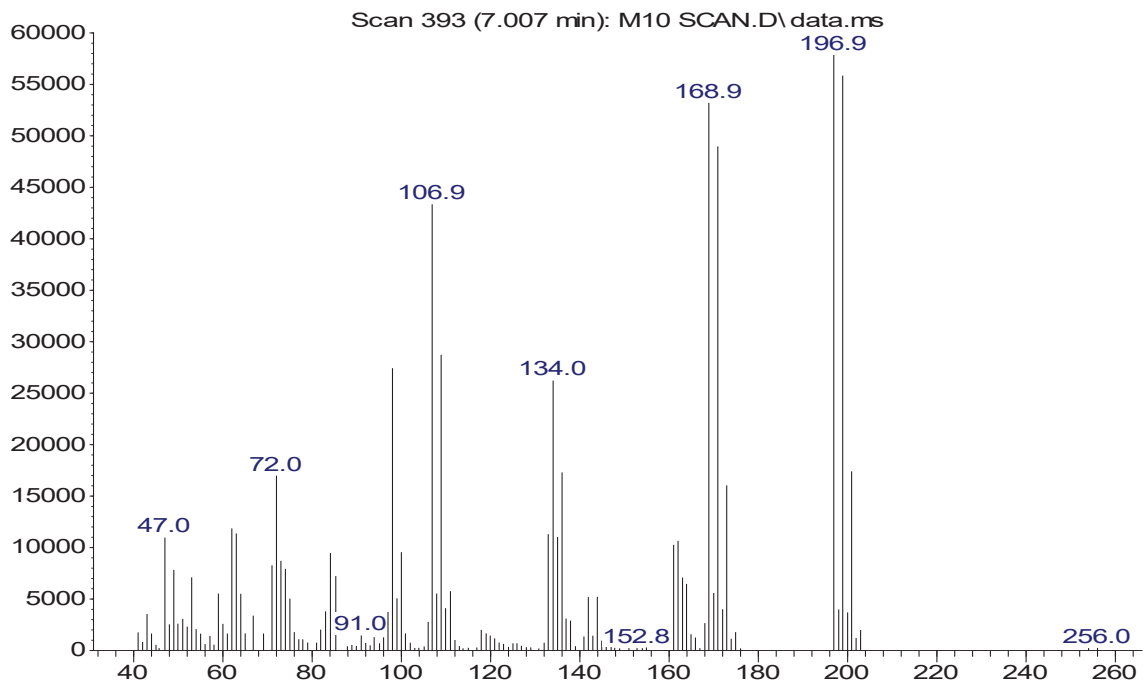
Time→
Abundance



Time→

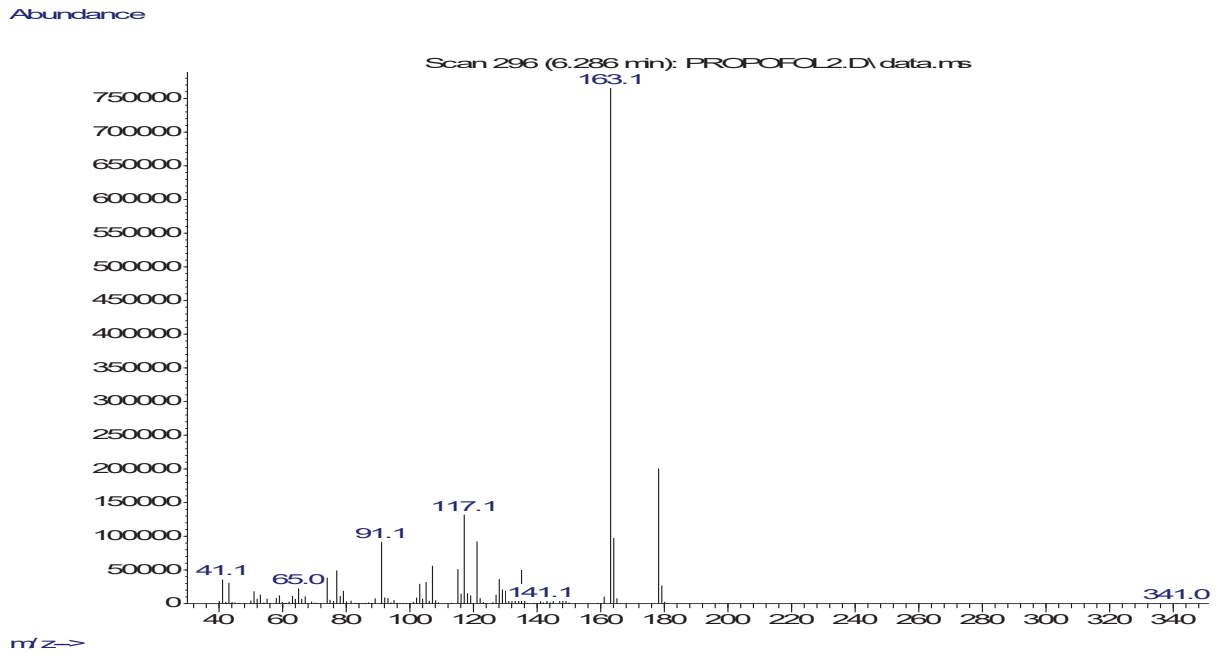
Hình 1B. Sắc đồ ion thành phần chuẩn nội.

Abundance



m/z→

Hình 1C. Phổ khối lượng của TCP.



Hình 1D. Phổ khối lượng của chuẩn nội.

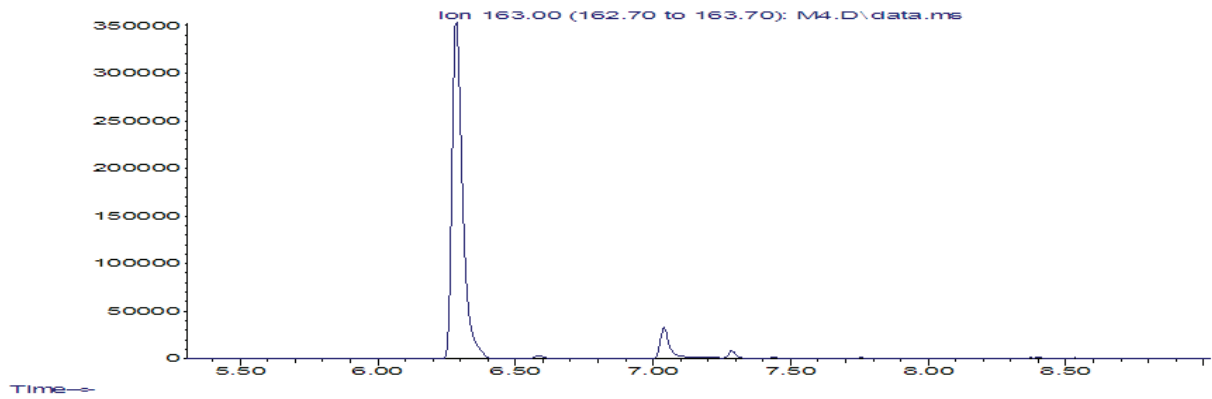
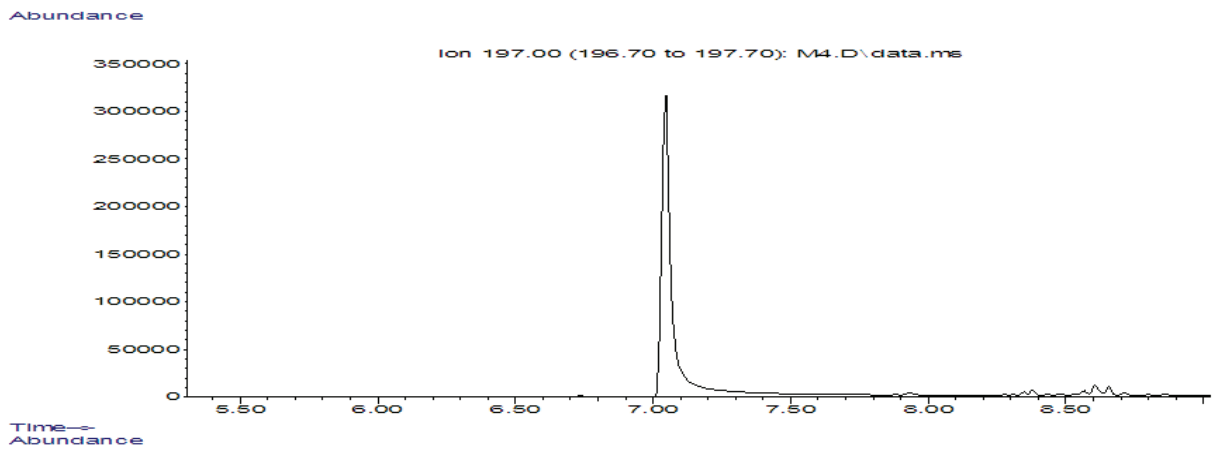
3.2. Đánh giá phương pháp:

- Sự phù hợp của hệ thống sắc kí: tiến hành tiêm lặp lại 6 lần mẫu chuẩn TCP 100 ng/ml. Kết quả thời gian lưu của TCP từ 7,06-7,09, trung bình là 7,08. RSD của thời gian lưu và diện tích pic lần lượt là 0,15% và 1,49%. Thời gian lưu và diện tích pic giữa các lần phân tích khác biệt không nhiều, đều có RSD < 2%. Vậy hệ thống sắc kí ổn định, bảo đảm chính xác để phân tích cho kết quả tin cậy.

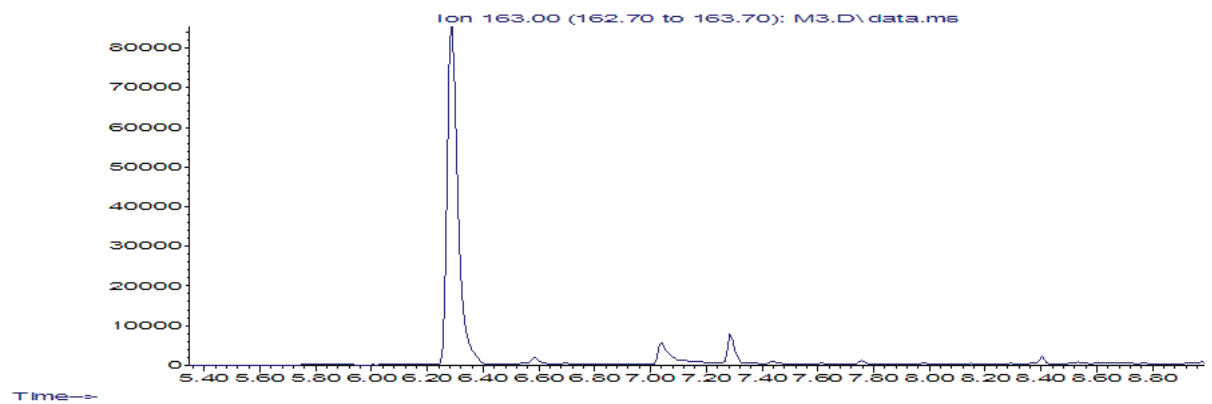
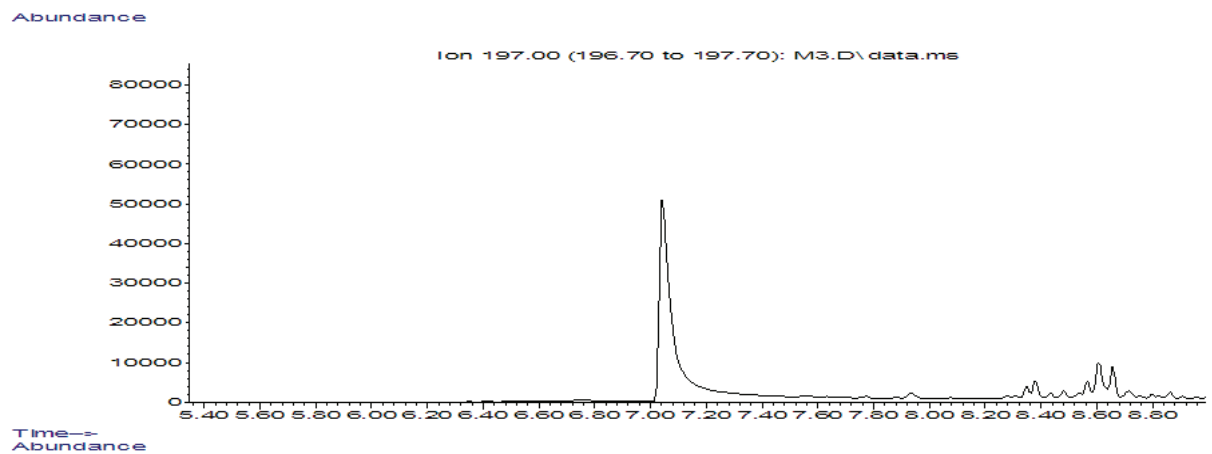
- Độ đặc hiệu: chuẩn bị 6 mẫu nước tiểu trắng, 6 mẫu nước tiểu trắng thêm chuẩn và chuẩn nội ở nồng độ 500 ng/ml mỗi chất. Xử lí mẫu và tiến hành sắc kí theo điều kiện như trên. Sắc kí đồ của mẫu trắng, mẫu trắng thêm chuẩn và mẫu chuẩn được như sau (hình 2A đến hình 2C):



Hình 2A. Sắc đồ mẫu nước tiểu trắng.



Hình 2B. Sắc đồ mẫu chuẩn.



Hình 2C. Sắc đồ mẫu nước tiểu trắng thêm chuẩn.

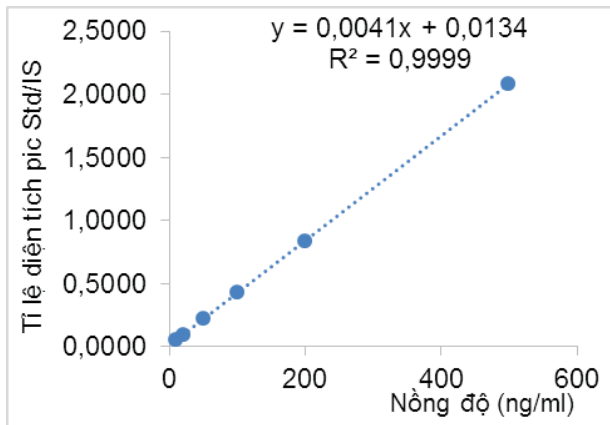
Trên sắc kí đồ mẫu trắng, không thấy pic tín hiệu tại thời gian lưu của TCP và nội chuẩn. Trên sắc kí đồ mẫu trắng thêm chuẩn, có pic xuất hiện tương ứng với thời gian lưu của TCP và nội chuẩn trong mẫu chuẩn. Như vậy, phương pháp có độ đặc hiệu, chọn lọc.

- Khoảng tuyến tính và đường chuẩn của TCP:

Bảng 1. Khoảng tuyến tính của TCP.

Nồng độ TCP (ng/ml)	Tỉ lệ diện tích pic Std/Is
10	0,0516
20	0,0916
50	0,2268
100	0,4347
200	0,8356
500	2,0853
Phương trình hồi quy	$y = 0,0041x + 0,0134$
Hệ số tương quan	$R^2 = 0,9999$

- Đường chuẩn TCP trong nước tiểu:



Hình 3. Đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc tuyến tính giữa nồng độ TCP và tỉ lệ diện tích pic TCP/chuẩn nội.

Có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ TCP với tỉ lệ diện tích pic TCP/chuẩn nội trong khoảng nồng độ khảo sát từ 10-500 ng/ml với hệ số tương quan xấp xỉ bằng 1, phương trình hồi quy tuyến tính:

$$y = 0,0041x + 0,0134.$$

- Độ đúng, độ chính xác: độ đúng của phương pháp được xác định tại 3 mức nồng độ (10 ng/ml, 100 ng/ml và 500 ng/ml), mỗi nồng độ thực hiện 3 lần. Xác định hàm lượng TCP trong mẫu bằng phương pháp đường chuẩn và tính độ thu hồi (là tỉ lệ % giữa lượng xác định được so với lí thuyết). Kết quả khảo sát độ đúng thu được tại bảng 2.

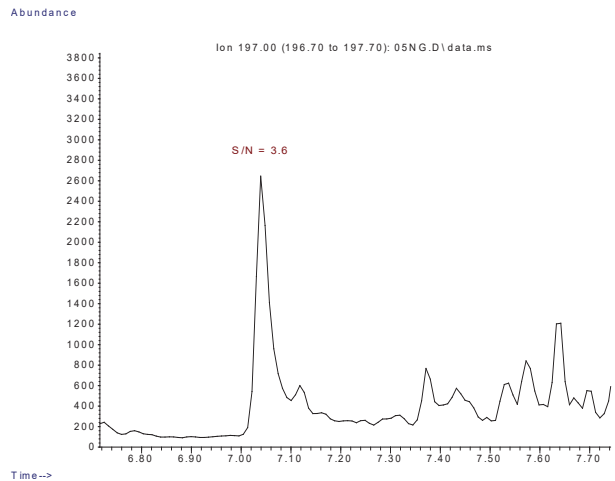
Theo đó, ở các khoảng nồng độ thấp, trung bình và cao của các chất phân tích, phương pháp đều có giá trị độ đúng (n = 3) nằm trong giới hạn cho phép từ 85-115%. Độ chính xác đáp ứng được quy định (RSD đều < 15%). Vậy phương pháp đáp ứng

các yêu cầu về độ đúng, độ lặp lại của phương pháp phân tích TCP trong nước tiểu.

Bảng 2. Kết quả khảo sát độ đúng.

STT	Nồng độ (ng/ml)	Lượng tích được	Độ đúng (%)	Trung bình	RSD (%)
1	10	9,13	91,32	97,83	6,37
2		10,37	103,74		
3		9,84	98,43		
1	100	87,60	87,60	94,52	7,35
2		101,49	101,49		
3		94,45	94,45		
1	500	478,82	95,76	95,05	2,15
2		463,71	92,74		
3		483,23	96,65		

- Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ):



Hình 4. Sắc đồ xác định LOD thông qua xác định S/N trong nước tiểu.

Xác định LOD của phương pháp bằng cách khảo sát các mẫu trắng thêm chuẩn có hàm lượng TCP giảm dần; so sánh tín hiệu chiều cao của TCP với nhiễu nền tại các hàm lượng đó. Xác định LOD tại nồng độ có S/N khoảng bằng 3. Xác định LOQ tại nồng độ có S/N khoảng bằng 10. Kết quả khảo sát cho giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) của TCP trong nước tiểu lần lượt là 0,5 ng/ml và 1,5 ng/ml. Kết quả này cho thấy độ nhạy phân tích cao, đáp ứng yêu cầu phân tích lượng vết.

- Hiệu suất chiết: khảo sát hiệu suất chiết của TCP trong mẫu nước tiểu ở 3 nồng độ (10 ng, 100 ng và 500 ng/ml); tiến hành phân tích sắc kí theo chương trình đã xây dựng. Hiệu suất chiết được tính bằng tỉ lệ % diện tích pic của dung dịch chuẩn cùng nồng độ giữa chiết và không chiết. Kết quả khảo sát hiệu suất chiết:

Bảng 3. Hiệu suất chiết TCP trong mẫu nước tiểu.

STT	Độ thu hồi (%)		
	10 ng	100 ng	500 ng
1	90,05	93,78	89,29
2	91,07	87,23	88,96
3	87,03	90,15	84,39
4	88,51	85,26	92,28
5	84,29	91,87	90,17
6	89,46	88,29	86,98
Trung bình	88,40	89,43	88,68
RSD	2,76	3,49	3,06

Tại cả 3 mức nồng độ TCP được khảo sát, độ thu hồi đều cao trên 80%. Hiệu suất chiết TCP từ mẫu nước tiểu đạt trong khoảng từ 84,29-91,87%. Kết quả giữa các lần phân tích có độ lặp lại tốt với RSD < 5%.

3.3. Áp dụng quy trình phân tích mẫu thực tế:

Dựa trên quy trình đã xây dựng, áp dụng để định lượng TCP trong mẫu nước tiểu của người nghi ngờ ngộ độc CP; lặp lại 3 lần trên mỗi mẫu và tính kết quả trung bình. Kết quả cụ thể:

Bảng 4. Kết quả định lượng TCP trong mẫu nước tiểu nghi ngờ.

STT	Họ và tên	Nồng độ (ng/ml)
1	Phạm Thị L.	249,27 ± 4,16
2	Ngô Công T.	81,24 ± 1,78
3	Đỗ Hải P.	(-)
4	Cao Văn C.	63,32 ± 2,24
5	Ngô Trung O.	19,56 ± 1,79
6	Thái Anh T.	(-)
7	Nguyễn Thị H.	32,99 ± 2,80

Kết quả phân tích 7 mẫu nước tiểu nghi ngờ ngộ độc CP, phát hiện 5 mẫu dương tính TCP và 2 mẫu không tìm thấy TCP.

4. BÀN LUẬN.

Việc xác định được TCP trong nước tiểu có ý nghĩa quan trọng trong giám định pháp y; đặc biệt với các trường hợp nghi ngờ ngộ độc chlorpyrifos mà không có mẫu phủ tạng gửi kèm. TCP trong nước tiểu tồn tại dưới cả dạng tự do và liên kết nên việc thủy phân mẫu giúp phân cắt liên kết của TCP với acid glucuronic, xác định được tổng lượng TCP trong mẫu. Mẫu nước tiểu sau khi thủy phân có thể được chiết lỏng bằng các dung môi khác nhau hoặc chiết bằng các loại cột chiết pha rắn. EtOAc được lựa chọn làm dung môi chiết trong quy trình phân tích do hiệu suất chiết cao, dịch chiết mẫu sạch, ít tạp, tiết kiệm thời gian và chi phí.

Sắc kí khí khối phổ là một phương pháp phân tích hiện đại, có độ nhạy và chính xác cao, thường dùng trong phân tích độc chất. Kết quả nghiên cứu đã cho thấy tính phù hợp của hệ thống sắc kí khí khối phổ tại thời gian lưu và diện tích pic, với thông số RSD < 2%, phương pháp có tính chọn lọc, độ đặc hiệu cao, chứng tỏ hệ thống có tính phù hợp cao, đáp ứng được yêu cầu phân tích TCP trong nước tiểu.

Qua nghiên cứu này, chúng tôi cho rằng cần tiếp tục nghiên cứu xây dựng phương pháp xác định CP và các chất chuyển hóa trong mẫu máu; xây dựng phương pháp xác định chất chuyển hóa của một số thuốc trừ sâu nhóm phospho hữu cơ.

5. KẾT LUẬN.

Đã xây dựng được phương pháp xác định 3,5,6-trichloro-2-pyridinol trong nước tiểu, làm cơ sở để áp dụng trong giám định pháp y. Phương pháp có độ đặc hiệu cao, bảo đảm độ đúng, độ chính xác với khoảng tuyến tính rộng. Phương pháp đã được áp dụng hiệu quả khi định lượng TCP trong 7 mẫu nước tiểu nghi ngờ ngộ độc CP.

TÀI LIỆU THAM KHẢO:

1. Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn (2019), *Về việc loại bỏ thuốc bảo vệ thực vật chứa hoạt chất Chlorpyrifos ethyl và Fipronil ra khỏi danh mục thuốc bảo vệ thực vật được phép sử dụng tại Việt Nam*, Quyết định số 501/QĐ-BNN-BVTV, ngày 12/02/2019.
2. Emanuela Testai, Franca M. Buratti and Emma Di Consiglio (2010), "Chlorpyrifos", *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology*, pp. 1505-1526.
3. Berna van Wendel de Joode, Douglas Barraza, Clemens Ruepert, Ana Mari'a Mora, Leonel Co' rdoaba, Mattias O' berg, Catharina Wesseling, Donna Mergler, Christian H. Lindh (2012), "Indigenous children living nearby plantations with chlorpyrifos-treated bags have elevated 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCP) urinary concentrations", *Environmental Research*, Vol. 117, pp. 17-26.
4. Darcy D. Shackelford, Debra L. Young, Charles A. Mihaliak, Brad A. Shurdut, and Jeanne A. Itak (1999), "Practical Immunochemical Method for Determination of 3,5,6-Trichloro-2-pyridinol in Human Urine: Applications and Considerations for Exposure Assessment", *J. Agric. Food Chem*, vol. 47, pp 177-182.
5. Dung Tri Phung, Connell, Des, Miller, Greg, Hodge, Mary, Patel, Renu, Cheng, Ron, Abeyewardene, Manel, Chu, Cordia (2012), "Biological monitoring of chlorpyrifos exposure to rice farmers in Vietnam", *Chemosphere*, Vol. 87, Issue 4, pp 294-300. □