

**NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG QUY TRÌNH PHÂN TÍCH DIOXIN/FURANS
TRONG MẪU SỮA BẰNG THIẾT BỊ SẮC KÍ KHÍ GHÉP NỐI KHỐI PHỔ
PHÂN GIẢI CAO (HRGC-HRMS)**

Đến tòa soạn 10-4-2019

**Nguyễn Thị Xuyên, Nguyễn Xuân Hưng, Lê Minh Thùy, Nguyễn Ngọc Tùng
Nguyễn Quang Trung, Vũ Đức Nam**

Trung tâm Nghiên cứu và Chuyển giao Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Phạm Thị Ngọc Mai, Đặng Minh Hương Giang

Khoa Hóa học, Trường Đại học Khoa học Tự Nhiên, Đại Học Quốc gia Hà Nội

Nguyễn Văn Thường

Viện Sức khỏe nghề nghiệp và Môi trường

SUMMARY

**DEVELOPMENT OF AN ANALYTICAL PROCEDURE FOR DETERMINATION
OF DIOXIN/FURANS IN MILK BY USING HIGH-RESOLUTION GAS
CHROMATOGRAPHY/ HIGH-RESOLUTION MASS SPECTROMETRY
(HRGC/HRMS)**

Eight samples of fresh cow milk were collected at supermarkets in Hanoi city. The freeze-dried samples were analyzed according to the US EPA Method 1613B. After extraction, the extracts were cleaned up by using multi-layer silicagel column and activated carbon column. The volume of eluted solvents was tested in order to optimize the clean-up procedure. Seventeen toxic congeners of polychlorodibenzo-p-dioxins (PCDDs) and polychlorodibenzofurans (PCDFs) were analyzed in eight samples in order to assess the tolerable daily intake (TDI). The concentration of PCDDs/PCDFs in 8 samples based on lipid weight were lower than method detection limit (MDL). The average daily intake for Vietnamese peoples leaving in Hanoi in case consuming 300 mL milk per day was 0.08 pg/kg/day/person. Through the level of daily intake was not regulated in Vietnam until now, however, comparison with the value of TDI regulated by the World Health Organization (4pg TEQ/kg body weight/day), the estimated mean value of PCDDs/PCDFs daily intake for Vietnamese peoples leaving in Hanoi is much lower than that value mentioned by WHO.

Keywords: *fresh cow milk, HRGC/HRMS, PCDDs, PCDFs,*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Dioxin/Furan là nhóm chất độc nhất trong 21 nhóm chất bị cấm hoặc hạn chế sử dụng theo Công ước Stockholm về các chất gây ô nhiễm hữu cơ khó phân hủy do chúng gây ô nhiễm môi trường và thực phẩm [10]. Mặt khác khi đi vào cơ thể người, nó có thể ảnh hưởng tới hệ miễn dịch, gây ra các bệnh ung thư và nhiều bệnh khác. Dioxin/Furans là những chất được

hình thành một cách không chủ định của quá trình đốt cháy và trong quá trình sản xuất công nghiệp [7]. Trong đó các hợp chất 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (2378-TCDD) và 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran (2378-TCDF) có hệ số độ độc tương đương (Toxic Equivalent Factor-TEF) lớn nhất [11]. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng con người tiếp xúc với dioxin/furans chủ yếu qua đường ăn uống

(90%) thông qua thịt, cá và các sản phẩm khác như sữa [3]. Giống như các hợp chất hữu cơ chứa clo khác, dioxin/furans thường được tích lũy trong các mô mỡ của động vật, do vậy chúng thường xuất hiện trong các sản phẩm như thịt, cá và sữa.

Sữa và các sản phẩm từ sữa là những thành phần đóng vai trò quan trọng trong cuộc sống hàng ngày của con người. Hàm lượng dioxin/furan trong sữa và các sản phẩm từ sữa rất nhỏ nhưng độc tính của chúng lại rất cao, do đó đòi hỏi một phương pháp phân tích có độ nhạy, độ chọn lọc và cũng như đảm bảo tính chính xác cao. Các phương pháp phân tích được ứng dụng hiện nay hầu hết là phương pháp sắc ký khí ghép nối khối phổ phân giải cao [3,8,9]. Trong bài báo này, chúng tôi nghiên cứu xây dựng quy trình phân tích 17 đồng phân độc của dioxin/furan trong các mẫu sữa tươi thu thập tại Hà Nội nhằm bước đầu đánh giá sơ bộ hàm lượng dioxin/furan trong các mẫu sữa thu thập, qua đó có thể ước lượng được liều lượng hấp thụ của dioxin/furan hàng ngày đối với người Việt Nam.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Hóa chất, thiết bị

Chất chuẩn. Bộ chất chuẩn theo phương pháp 1613B – US EPA do hãng Cerilliant Corporation, Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Mỹ sản xuất: các dung dịch đường chuẩn (1613_MCS1 ÷ 1613_MCS5); dung dịch chuẩn gồm 17 chất chuẩn (PAR); dung dịch chuẩn đồng hành (Labeled); dung dịch chuẩn làm sạch (Clean-up) và dung dịch nội chuẩn (IS).

Từ dung dịch chuẩn gốc, tiến hành pha loãng thành các dung dịch chuẩn làm việc tương ứng với loại chất chuẩn. Các dung dịch chuẩn làm việc được bảo quản lạnh

- Dung môi: n-hexan, acetone, toluen, diclometan, độ tinh khiết sắc ký (GC grade).
- Cột làm sạch silica gel đa lớp, cột than hoạt tính (Supelco)
- Khí He: độ tinh khiết từ 99,99% trở lên.

Thiết bị.

- Thiết bị sắc ký khí ghép nối khối phổ phân giải cao HRGC/HRMS (DFS Thermo scientific).

- Thiết bị chiết nhanh E916, Buchi, Thụy Sĩ.

- Thiết bị đông khô mẫu Eyela, Nhật bản.

2.2. Thu thập mẫu

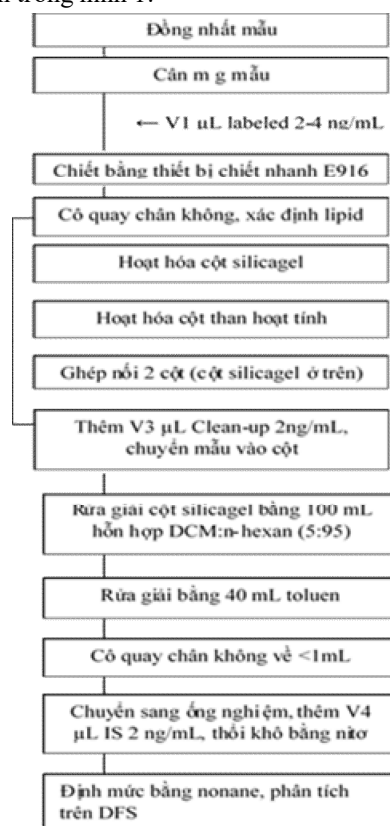
Tám mẫu sữa tươi đóng hộp đã được thu thập xung quanh địa bàn thành phố Hà Nội, kí hiệu từ M1-M8.

Các mẫu sữa sau khi thu thập phải được bảo quản lạnh (0-4°C) trước khi tiến hành xử lý và phân tích theo đúng yêu cầu của quy trình phân tích.

2.3. Xử lý mẫu

Xử lý sơ bộ: Đối với các mẫu sữa tươi, chúng tôi tiến hành quá trình đông khô mẫu 1L mẫu sữa tươi đóng hộp bằng thiết bị Eyela nhờ nhiệt độ và áp suất thấp giúp loại bỏ hết thành phần nước đến khi khối lượng không đổi sau đó xác định hàm ẩm của mẫu sữa. Mẫu khô được nghiền mịn và đồng nhất trước khi tiến hành các bước xử lý tiếp theo.

Quy trình phân tích mẫu dựa trên cơ sở tham khảo tài liệu EPA 1613B và tài liệu tham khảo khác [4,6]. Mẫu sữa khô được xử lý theo quy trình trong hình 1.



Hình 1. Quy trình phân tích dioxin/furan trong sữa

2.4. Tối ưu hóa các điều kiện làm sạch

Các mẫu sữa tiến hành khảo sát đều được thêm chuẩn 50 µL dung dịch chất chuẩn PAR nồng độ 0,2-2 ng/mL và 50 µL chuẩn Labeled 2-4 ng/mL. Khối lượng mẫu sữa là 3g. Quy trình chiết và xác định chất béo bằng thiết bị chiết nhanh E916 theo quy trình đề cập trong tài liệu [6].

2.4.1. Khảo sát làm sạch trên cột silica gel.

Dịch chiết được làm sạch trên cột silica gel đã hoạt hóa. Dung môi được chọn rửa giải là hỗn hợp hexan:diclometan (95:5,v/v). Quá trình rửa giải chia làm 5 phân đoạn, mỗi phân đoạn gồm 25 mL hỗn hợp và được chứa trong 5 ống nghiệm riêng biệt (S1-S5). Làm khô các ống nghiệm dưới dòng khí nitơ, thêm 50 µL dung dịch nội chuẩn IS nồng độ 2 ng/mL. Tiếp tục thổi khô, thêm 10 µL nonane và chuyển vào ống đựng mẫu thể tích nhỏ (micro-vial) trước khi phân tích.

2.4.2. Khảo sát làm sạch trên cột carbon hoạt tính

Chia quá trình rửa giải thành 8 phân đoạn, mỗi phân đoạn 5 mL toluene (F0-F8) (các bước thổi khô tương tự như cột silica gel). Các dịch chiết được cô về 10 µL nonane và bơm vào hệ HRGC-HRMS để định lượng.

2.4.3. Khảo sát quá trình làm sạch

Cột làm sạch silica gel và cột than hoạt tính được ghép nối với nhau. Thể tích của các dung dịch rửa giải cho từng loại cột đã được lựa chọn ở trên. Lặp lại thí nghiệm 5 lần.

2.5. Tách và xác định các hợp chất dioxin/furan trên thiết bị sắc khí khối phổ phân giải cao (DFS Thermo)

Các điều kiện tách để xác định 17 hợp chất dioxin/furan trên thiết bị DFS như sau:

Cột tách	TG-Dioxin (60m×0.25mm×0.25µm)
Chế độ bơm	Không chia dòng
Thể tích bơm	2 ± 0,2 µL
Nhiệt độ injector	250°C
Khí mang	Heli, độ tinh khiết 99,999%

Chương trình nhiệt độ của lò cột	140°C (giữ 2 phút), tăng đến 228°C (40°C/phút), sau đó tăng đến 290°C (1,6°C/phút) và tăng 5°C/phút cho đến 315°C (giữ 9 phút). Thời gian phân tích 56,95 phút.
Thời gian cắt dung môi	19 phút
Chế độ	Quan sát phản ứng chọn lọc -SRM (Selective Reaction Monitoring)

2.6. Ước tính liều lượng hấp thụ hàng ngày

Lượng hấp thụ dioxin/furan hàng ngày được ước tính với ước tính người Việt Nam tại Hà Nội tiêu thụ 300 ml sữa mỗi ngày (tương đương 309 g) và trọng lượng trung bình của người Việt Nam khoảng 51,5kg [2]. Giá trị tiêu thụ tối đa được tính theo phương trình dưới đây:

$$TDI \text{ (pg/kg/ngày)} = 309 \times L \times [TEQ] / 51,5$$

Trong đó:

309 (g) là lượng sữa tiêu thụ hằng ngày; 51,5

(kg) là trọng lượng trung bình

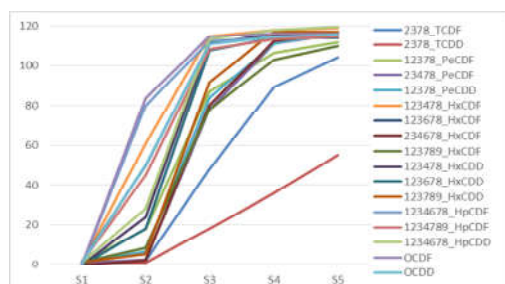
L là phần trăm chất béo trung bình trong mẫu sữa (%)

[TEQ] là nồng độ TEQ PCDD/F trong sữa (pg/g béo)

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

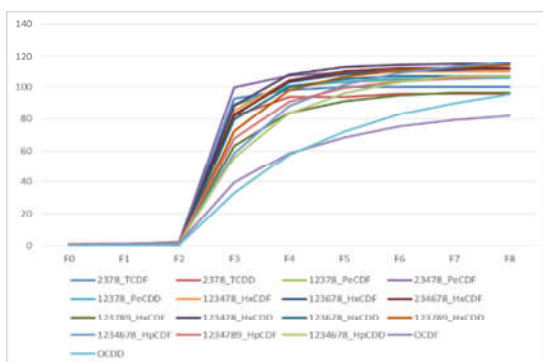
3.1. Khảo sát làm sạch trên cột silica gel

Độ thu hồi của các chất chuẩn dioxin/furan được thể hiện ở hình 2. Có thể thấy rằng tại phân đoạn đầu tiên (25 mL), hầu hết các chất đều chưa được rửa giải, tại phân đoạn thứ 2 có một số chất được rửa giải với lượng khá lớn như OCDF, 1234678_HpCDF, 123478_HxCDF, các chất còn lại chưa xuất hiện hoặc được rửa giải ở mức thấp hơn. Hiệu suất thu hồi của các chất có xu hướng tăng dần và tăng mạnh nhất từ phân đoạn 2 lên phân đoạn 3, đến phân đoạn 4 tất cả các chất đều được rửa giải với độ thu hồi cao (66-118%). Từ phân đoạn 5 hiệu suất thu hồi các chất tăng không đáng kể so với phân đoạn 4, vì vậy để hạn chế việc sử dụng dung môi hữu cơ như hexan và DCM, chúng tôi sử dụng thể tích hỗn hợp rửa giải là 100 mL.



Hình 2. Độ thu hồi các chất chuẩn dioxin/furan sau khi làm sạch trên cột silica gel

3.2. Khảo sát làm sạch trên cột carbon hoạt tính

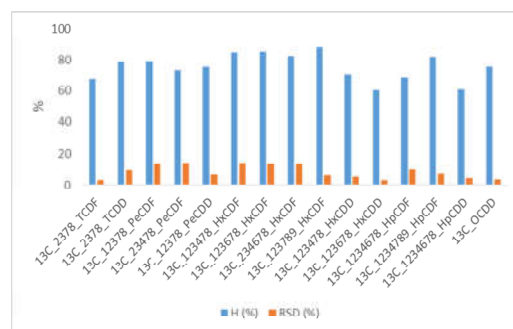


Hình 3. Độ thu hồi các chất chuẩn dioxin/furan sau khi làm sạch trên cột carbon hoạt tính

Các chất chuẩn dioxin/furan chưa được rửa giải sau 3 phân đoạn đầu tiên của quá trình rửa giải (15 mL toluen). Từ phân đoạn F2-F4 độ thu hồi của các chất có xu hướng tăng mạnh và đạt từ 58-108%. Từ các phân đoạn tiếp theo, độ thu hồi các chất có xu hướng tăng nhẹ và không đổi, riêng OCDD và OCCF vẫn tiếp tục tăng và đạt khoảng hiệu suất cao nhất tại phân đoạn F8 (82% và 96%). Vì vậy để đảm bảo khả năng rửa giải tất cả các chất đạt hiệu suất cao, chúng tôi sử dụng 40 mL toluen để tiến hành quá trình rửa giải cột carbon hoạt tính.

3.3. Khảo sát quá trình làm sạch

Hiệu suất thu hồi của các chất chuẩn đồng vị C13 (hình 4) nằm trong khoảng từ 61,0% đến 100% với các giá trị RSD đều nhỏ hơn 15%. Các giá trị hiệu suất thu hồi thu được hoàn toàn đáp ứng yêu cầu phân tích lượng vết dioxin/furan trong mẫu sữa (giá trị tham khảo theo US EPA 1613B là 20-180%).



Hình 4. Hiệu suất thu hồi (H) và độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của các chất chuẩn đồng vị

3.4. Đánh giá phương pháp

Phương trình đường chuẩn của 17 chất PCDD/Fs có độ tuyến tính cao với hệ số tương quan R^2 nằm trong khoảng từ 0,99978 đến 1,00000. Giá trị giới hạn phát hiện (MDL) và giới hạn định lượng (MQL) của phương pháp dao động tương ứng trong khoảng từ 0,15 đến 2,03 pg/g chất béo và 0,49 pg/g đến 6,78 pg/g chất béo phù hợp với phân tích lượng vết dioxin/furan trong mẫu sữa tại Việt Nam và trên thế giới [1,5].

3.5. Kết quả phân tích mẫu thực

Các giá trị hàm ẩm của mẫu sữa lỏng và hàm lượng chất béo có trong các mẫu sữa sau khi đông khô được xác định trước khi tiến hành phân tích hàm lượng các đồng phân dioxin/furan. Các giá trị này được trình bày trong bảng 1 dưới đây.

Bảng 1: Hàm ẩm và hàm lượng chất béo trong mẫu sữa

Mẫu	Hàm ẩm (%)	Hàm lượng chất béo (%)
M1	88%	22,1
M2	88%	21,7
M3	88%	16,9
M4	88%	17,3
M5	85%	14,9
M6	87%	16,1
M7	88%	20,9
M8	88%	19,8

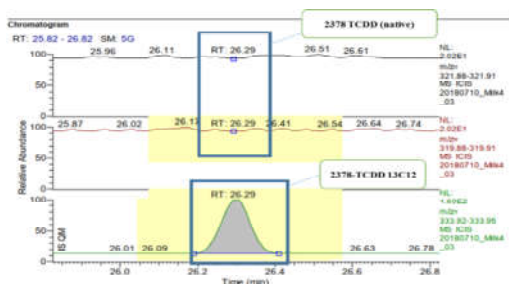
Hàm lượng các đồng phân dioxin/furan (Bảng 2) đều không phát hiện được trong 08 mẫu tiến hành phân tích (nhỏ hơn giới hạn phát hiện của các chất). Kết quả phân tích các mẫu sữa trong nghiên cứu này cho thấy tổng hàm lượng của

dioxin/furans trong mẫu sữa tính theo độ độc tương đương (TEQ=0,39 pg/g chất béo, tính theo giá trị ½ MDL) đều nhỏ hơn hàm lượng

tối đa cho phép theo quy định của WHO (TEQ = 2,5pg/g chất béo trong sữa).

*Bảng 2. Hàm lượng của các hợp chất dioxin/furan trong mẫu sữa (pg/g chất béo)
(các giá trị dưới giới hạn phát hiện được biểu thị <MDL)*

TT	Hợp chất	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8
1	2,3,7,8-Tetrachlorodibenzodioxin	<0,07	<0,07	<0,07	<0,07	<0,07	<0,07	<0,07	<0,07
2	1,2,3,7,8-Pentachlorodibenzo-p-dioxin	<0,31	<0,31	<0,31	<0,31	<0,31	<0,31	<0,31	<0,31
3	1,2,3,4,7,8-Hexachlorodibenzo-p-dioxin	<0,37	<0,37	<0,37	<0,37	<0,37	<0,37	<0,37	<0,37
4	1,2,3,6,7,8-Hexachlorodibenzo-p-dioxin	<0,40	<0,40	<0,40	<0,40	<0,40	<0,40	<0,40	<0,40
5	1,2,3,7,8,9-Hexachlorodibenzo-p-dioxin	<0,44	<0,44	<0,44	<0,44	<0,44	<0,44	<0,44	<0,44
6	1,2,3,4,6,7,8-Heptachlorodibenzo-p-dioxin	<0,14	<0,14	<0,14	<0,14	<0,14	<0,14	<0,14	<0,14
7	Octachlorodibenzo-p-dioxin	<0,85	<0,85	<0,85	<0,85	<0,85	<0,85	<0,85	<0,85
8	2,3,7,8-Tetrachlorodibenzofuran	<0,07	<0,07	<0,07	<0,07	<0,07	<0,07	<0,07	<0,07
9	1,2,3,7,8-Pentachlorodibenzofuran	<0,35	<0,35	<0,35	<0,35	<0,35	<0,35	<0,35	<0,35
10	2,3,4,7,8-Pentachlorodibenzofuran	<0,38	<0,38	<0,38	<0,38	<0,38	<0,38	<0,38	<0,38
11	1,2,3,4,7,8-Hexachlorodibenzofuran	<0,43	<0,43	<0,43	<0,43	<0,43	<0,43	<0,43	<0,43
12	1,2,3,6,7,8-Hexachlorodibenzofuran	<0,39	<0,39	<0,39	<0,39	<0,39	<0,39	<0,39	<0,39
13	2,3,4,6,7,8-Hexachlorodibenzofuran	<0,26	<0,26	<0,26	<0,26	<0,26	<0,26	<0,26	<0,26
14	1,2,3,7,8,9-Hexachlorodibenzofuran	<0,39	<0,39	<0,39	<0,39	<0,39	<0,39	<0,39	<0,39
15	1,2,3,4,6,7,8-Heptachlorodibenzofuran	<0,21	<0,21	<0,21	<0,21	<0,21	<0,21	<0,21	<0,21
16	1,2,3,4,7,8,9-Heptachlorodibenzofuran	<0,24	<0,24	<0,24	<0,24	<0,24	<0,24	<0,24	<0,24
17	Octachlorodibenzofuran	<0,85	<0,85	<0,85	<0,85	<0,85	<0,85	<0,85	<0,85
	TEQ (pg/g chất béo =1/2MDL)	0,39	0,39	0,39	0,39	0,39	0,39	0,39	0,39



Hình 5. Sắc đồ của 2,3,7,8-TCDD và chất chuẩn đồng hành trong mẫu sữa

3.6. Ước tính liều lượng hấp thụ hàng ngày

Kết quả phân tích ở trên cho thấy rằng tổng hàm lượng của dioxin/furans trong mẫu sữa trung bình TEQ = 0,39 pg/g tính theo hàm lượng béo. Từ phương trình tính liều hấp thụ hàng ngày (mục 2.6) ta có thể tính toán được liều lượng hấp thụ trung bình hàng ngày của người dân là 0,08 pg/kg/ngày. Mặc dù Việt Nam chưa có quy định liều tối đa hàng ngày cho phép với sữa tươi đối với người dân. Tuy nhiên, liều lượng hấp thụ trung bình của dioxin/furan đối với người Việt Nam sinh sống tại Hà Nội vẫn nhỏ hơn giới hạn cho phép của Tổ chức y tế thế giới (4pg/người/ngày).

4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã đánh giá quy trình phân tích để xác định 17 đồng phân dioxin/furan trong mẫu sữa tươi đóng hộp bằng phương pháp sắc kí khí ghép nối khối phổ phân giải cao (HRGC/HRMS). Hiệu suất thu hồi của các chất chuẩn đồng vị C13 nằm trong khoảng từ 61,0% đến 100%. Hệ số hồi quy tuyến tính là $1,00000 \geq R \geq 0,99978$ đối với hầu hết các chất, giới hạn phát hiện của phương pháp nằm trong khoảng 0,15 đến 2,03 pg/g chất béo khẳng định rằng phương pháp phân tích có thể áp dụng cho việc xác định các hợp chất dioxin/furan trong mẫu sữa. Quy trình phân tích đã được áp dụng để xác định hàm lượng 17 đồng phân dioxin/furan trong một số mẫu sữa tươi đóng hộp được thu thập tại thành phố Hà Nội và kết quả đều nhỏ hơn giới hạn cho phép về hàm lượng tối đa trong sữa của WHO.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được thực hiện bởi sự hỗ trợ kinh phí từ Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (NAFOSTED), mã số 104.04-2017.12.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hue, N.T., et al., *Determination of PCDD/Fs in breast milk of women living in the vicinities of Da Nang Agent Orange hot spot*

(Vietnam) and estimation of the infant's daily intake. *Sci Total Environ*, 2014. **491-492**: p. 212-8.

2. <https://ins.dkn.tv/suc-khoe/can-nang-trung-binh-cua-nguoi-dan-cac-nuoc-tren-the-gioi-viet-nam-chi-hon-bangladesh.html>

3. Llobet, J.M., Domingo, J.L., Bocio, A., Casas, C., Teixidó, A. and Müller, L., *Human Exposure to Dioxins through the Diet in Catalonia, Spain: Carcinogenic and non-Carcinogenic Risk*. *Chemosphere*, 2003. **50**: p. 1193-2000.

4. Method 1613: Tetra- through Octa-Chlorinated Dioxins and Furans by Isotope Dilution HRGC/HRMS. 1994, U.S. Environmental Protection Agency.

5. Nakisa, A., et al., *Determination of the Most Toxic Polychlorodibenzofurans in Fresh Milk from Southwest Iran*. *Food and Nutrition Sciences*, 2015. **06**(11): p. 955-963.

6. Philippe Marchand, V.V., Loic Ehanno, Claudia Blum, *SpeedExtractor E-914: Pressurized Solvent Extraction using SpeedExtractor E-914 for the Determination of Dioxins in Dairy, Egg, Pork and Fish*. 2015: Buchi.

7. Schatowitz, B., Brandt, G., Gafner, F., Schlumpf, E., Bühler, R., Hasler, P. and Nussbaumer, T., *Dioxin Emissions from Wood Combustion*. *Chemosphere*, 1994. **29**: p. 2005-2013.

8. Schmid, P., et al., *Temporal and local trends of PCDD/F levels in cow's milk in Switzerland*. *Chemosphere*, 2003. **53**(2): p. 129-136.

9. Storelli, M.M., et al., *Levels and congener profiles of polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs), polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in sheep milk from an industrialised area of Sardinia, Italy*. *Food Chem Toxicol*, 2012. **50**(5): p. 1413-7.

10. UNIDO, UNITAR, Stockholm Convention, UNEP (2004) *Stockholm convention on persistent organic pollutants*.

11. van Zorge, J.A., van Wijnen, J.H., Theelen, R., Olie, K., van den Berg, M., *Assessment of the Toxicity of Mixtures of Halogenated Dibenzo-p-dioxins and Dibenzofurans by Use of toxicity Equivalency Factors (TEF)*. *Chemosphere*, 1989. **19**: p. 1881-1895.