

DOI:10.22144/ctujos.2025.074

XÁC ĐỊNH NHÓM BENZALKONIUM CHLORIDE (BAC/BKC) TRÊN NỀN MẪU THỦY SẢN, SẢN PHẨM THỦY SẢN VÀ NƯỚC NUÔI TRỒNG THỦY SẢN BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG GHEP HAI LẦN KHỐI PHỔ (UPLC-MS/MS)

Trịnh Công Chức*

Trung tâm Chất lượng, Chế biến và Phát triển thị trường vùng 5, Việt Nam

*Tác giả liên hệ (Corresponding author): tcchuc20@gmail.com

Thông tin chung (Article Information)

Nhận bài (Received): 30/09/2024

Sửa bài (Revised): 21/10/2024

Duyệt đăng (Accepted): 26/01/2025

Title: Determination of benzalkonium chloride group (BAC/BKC) on aquatic samples, aquatic products and aquaculture water by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

Author(s): Trinh Cong Chuc*

Affiliation(s): National Authority for Agro Forestry Fishery Quality, Processing and Market Development Center 5, Viet Nam

TÓM TẮT

Phương pháp xác định hàm lượng nhóm benzalkonium chloride (BAC/BKC), một loại thuốc kháng khuẩn trên các nền mẫu thủy sản, sản phẩm thủy sản và nước nuôi trồng thủy sản được xây dựng trong nghiên cứu. Phương pháp này nhằm mục tiêu giúp các phòng thử nghiệm phân tích BAC trên các đối tượng nghiên cứu đã nêu. Trong nghiên cứu, nhóm BAC trong các nền mẫu tôm nguyên liệu, cá tra, tôm tẩm bột và nước nuôi trồng thủy sản được xử lý mẫu dựa theo kỹ thuật QueChERS (Quick-Easy-Cheap-Effective-Rugged-Safe), sử dụng kỹ thuật sắc ký lỏng siêu cao áp ghép nối đầu dò hai lần khối phổ (UPLC-MS/MS). Giá trị sử dụng phương pháp đã đánh giá các thông số cần quan tâm được xác nhận như độ tuyến tính (R^2), giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ), độ nhạy, độ chọn lọc đạt, độ lặp lại, độ tái lập và độ đúng đều đáp ứng theo tiêu chí quy định Sante/11312/2021v2 và EU808/2021 của Châu Âu.

Từ khóa: Benzalkonium chloride, phân tích, sắc ký lỏng ghép khối phổ, thủy sản

ABSTRACT

Research on developing a method to determine the content of benzalkonium chloride (BAC/BKC) group, an antibacterial drug, on aquatic samples, aquatic products and aquaculture water. The method aims to help laboratories analyze BAC in the above research subjects. In this study, BAC groups in raw shrimp samples, pangasius, breaded shrimp and aquaculture water were processed based on the QueChERS (Quick-Easy-Cheap-Effective-Rugged-Safe) technique, using ultra-high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). The method validation evaluated the parameters of interest, such as linearity (R^2), limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), sensitivity, selectivity, repeatability, reproducibility and accuracy, all of which met the European regulatory criteria Sante/11312/2021v2 and EU808/2021.

Keywords: Analysis, aquatic product, benzalkonium chloride, ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

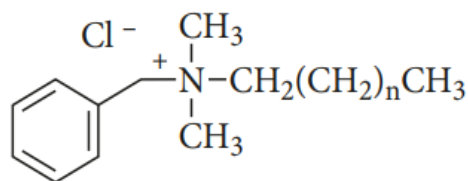
1. GIỚI THIỆU

Benzalkonium chloride là nhóm chất bao gồm: benzyl dimethyl octyl ammonium chloride (BAC-C8), benzyl dimethyl decyl ammonium chloride (BAC-C10), benzyl dimethyl dodecyl ammonium chloride (BAC-C12), benzyl dimethyl tetradecyl ammonium chloride (BAC-C14), benzyl dimethyl hexadecyl ammonium chloride (BAC-C16), benzyl dimethyl octadecyl ammonium chloride (BAC-C18), là chất hoạt động bề mặt cation, có tác dụng kháng khuẩn phổ rộng, chống lại vi khuẩn, nấm và vi rút. Các hợp chất benzalkonium chloride được sử dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực như y tế, trong công nghiệp sản xuất, chất làm sạch bề mặt, chất khử trùng nước, xử lý môi trường, ... (Beatriz & Ilias, 2019).

Cơ chế gây độc của BAC là sự xâm nhập của nhóm lipophilic alkyl vào trong màng tế bào, làm thay đổi tầng kép của phân tử phospholipid, dẫn đến sự suy yếu của màng tế bào và phá hủy màng tế bào. Cơ chế này đã làm cho sự điều khiển của các enzyme điều tiết hô hấp và trao đổi chất của tế bào bị gián đoạn (Nguyen, 2020).

Trong nuôi trồng thủy sản, BAC là hóa chất quan trọng, được sử dụng rộng rãi trong khâu khử trùng ao nuôi, bể chứa và các vật dụng dùng trong canh tác. BAC là hợp chất được phép sử dụng trong nuôi trồng thủy sản tại Việt Nam (Thanh, 2020). Tuy nhiên, hiện nay các thị trường nhập khẩu thủy sản Việt Nam rất quan tâm về vấn đề tồn dư hoạt chất này trong thực phẩm. BAC không phải là hoạt chất được phê duyệt trong các sản phẩm bảo vệ thực vật theo qui định EC 1107/2009 của hội đồng Châu Âu (European Union, 2009). Tuy nhiên, BAC được sử dụng nhiều làm chất diệt khuẩn để khử trùng. Việc sử dụng đó có nguy cơ dẫn đến dư lượng có thể phát hiện được trong thực phẩm (European Union, 2023). Sau khi cơ quan An toàn Thực phẩm Châu Âu đánh giá dữ liệu về quan trắc BAC, theo báo cáo EFSA 2013: EN - 483 cho thấy rằng BAC tồn dư trong một số mẫu phân tích trên các loại rau, củ, quả, trong thịt và các sản phẩm từ động vật trên cạn ở mức khá cao (European Food Safety Authority, 2013). Hội đồng châu Âu đã yêu cầu cơ quan An toàn Thực phẩm Châu Âu tiến hành đánh giá rủi ro trong chế độ ăn uống đối với dư lượng BAC trong một số loại thực phẩm với mức dư lượng tạm thời là 0,1 mg/kg. Sau đánh giá, Hội đồng châu Âu đã thống nhất đưa ra mức dư lượng tối đa tạm thời trong các loại rau, củ, quả, động vật và sản phẩm động vật trên cạn là 0,1 mg/kg (European Food Safety Authority, 2014). Tuy nhiên, hiện nay vẫn chưa thấy có quy định về

sự tồn dư cho phép của BAC trên các loại thủy, hải sản cũng như phương pháp phân tích chúng. Trên thế giới cũng có một số nghiên cứu xoay quanh trên các nền thực vật, động vật trên cạn và sản phẩm của chúng. Một số phương pháp định lượng BAC bằng kỹ thuật HPLC đầu dò UV-Vis có giới hạn phát hiện khá lớn. Thời gian phân tích dài (từ 15 đến 25 phút) vì cần phải tách sắc ký đồ của tất cả các chất trong hỗn hợp phân tích. Đó là một trong những hạn chế thông thường của kỹ thuật phân tích sắc ký lỏng ghép nối đầu dò quang phổ so với khối phổ (Basharat et al., 2021). Trong nghiên cứu này, kỹ thuật sắc ký siêu cao áp đầu dò hai lần khối phổ được sử dụng có giới hạn phát hiện thấp (1 µg/kg) và thời gian phân tích ngắn. Thực tế tại nước ta, BAC đang được sử dụng khá phổ biến trong nuôi trồng thủy sản. Vì vậy, việc tồn dư chúng trong thủy sản, sản phẩm thủy sản và nguy cơ khi xuất khẩu các sản phẩm này ra thị trường ngoài nước sẽ bị kiểm soát chặt là khó tránh khỏi. Trong nghiên cứu này, Giá trị sử dụng phương pháp phân tích BAC được xây dựng và xác nhận trên các nền mẫu mới được quan tâm như tôm, cá tra, tôm tằm bột và nước nuôi trồng thủy sản nhằm giúp cho ngành thủy sản kiểm soát tồn dư BAC một cách hiệu quả hơn. Cấu trúc tổng quát các hợp chất benzalkonium chloride được biểu diễn thông qua Hình 1.



Hình 1. Benzalkonium chloride (BAC) – (n=8,10,12,14,16,18)

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thiết bị và hóa chất

Thiết bị phân tích sắc ký lỏng siêu cao áp được dùng trong nghiên cứu ghép hai lần khối phổ UPLC-MS/MS, Xevo TQ-S micro của hãng Waters, cột sử dụng là C18 1,7 µm; 2,1x50 mm và phần mềm ứng dụng Masslynx.

Các hóa chất được sử dụng trong nghiên cứu bao gồm formic acid (CH₂O₂, 99,6%), nước HPLC (H₂O), acetonitrile HPLC (C₂H₃N, 99,9%), sodium chloride (NaCl, 99,5%), magnesium sulfate (MgSO₄, 99,5%) của hãng Merck KGaA, Đức. Bột C18 có nguồn gốc từ hãng Agilent technologies, USA. Các chất chuẩn benzyl dimethyl

octyl ammonium chloride ($C_{17}H_{30}N.Cl$, 96,5%), benzyl dimethyl decyl ammonium chloride ($C_{19}H_{34}N.Cl$, 94,4%), benzyl dimethyl dodecyl ammonium chloride ($C_{21}H_{38}N.Cl$, 88,8%), benzyl dimethyl tetradecyl ammonium chloride ($C_{23}H_{42}N.Cl$, 90,1%), benzyl dimethyl hexadecyl ammonium chloride ($C_{25}H_{46}N.Cl$, 96,5%), benzyl dimethyl octadecyl ammonium chloride ($C_{27}H_{50}N.Cl$, 96,1%) của hãng LGC, Anh. Nội chuẩn benzyl dimethyl octadecyl ammonium chloride-D7 ($C_{27}H_{43}ClD_7N$) của HPC Standards GmbH, Đức.

2.2. Vật liệu nền

Nền mẫu tôm sú tươi, cá tra sống, tôm tằm bột, nước nuôi trồng thủy sản được thu tại các cơ sở chế biến thủy sản và ao nuôi trên địa bàn tỉnh Cà Mau.

2.3. Phương pháp tiến hành

2.3.1. Chuẩn bị mẫu

Mẫu cá, tôm, tôm tằm bột chỉ lấy phần thường dùng làm thức ăn cho người, xay mịn. Mẫu nước nuôi trồng thủy sản lọc sạch.

Các mẫu được sử dụng làm nền mẫu là các mẫu đã được xác định không chứa các chất cần phân tích hoặc có nhiều nền rất nhỏ, được xem là mẫu trắng. Nó được dùng làm nền thêm chuẩn ở các nồng độ quan tâm để khảo sát, đánh giá các thông số của phương pháp. Mẫu nền tôm, cá, tôm bột bảo quản ở nhiệt độ nhỏ hơn hoặc bằng $-18^{\circ}C$ nếu chưa phân tích ngay. Mẫu nước bảo quản lạnh ở $4-8^{\circ}C$.

2.3.2. Pha chế hóa chất, chất chuẩn

Chuẩn gốc 1000 mg/L (1000 ppm): cân 10 mg các chuẩn BAC - C8, BAC - C10, BAC - C12, BAC - C14, BAC - C16, BAC - C18, BAC C18 - D7 vào từng bình định mức 10 mL, hòa tan chuẩn bằng acetonitrile, định mức đến vạch 10 mL. Dung dịch chuẩn được bảo quản $2-8^{\circ}C$.

Dung dịch chuẩn BAC - C8, BAC - C10, BAC - C12, BAC - C14, BAC - C16, BAC - C18, BAC C18 - D7 10 mg/L (10 ppm): 100 μL được hút ở mỗi dung dịch chuẩn gốc cho vào các bình định mức 10 mL riêng, định mức tới vạch bằng bằng ACN ở nhiệt độ phòng và lắc đều. Bảo quản các chuẩn vừa pha chế ở nhiệt độ từ 2 đến $8^{\circ}C$.

Hỗn hợp chuẩn làm việc BAC - C8, BAC - C10, BAC - C12, BAC - C14, BAC - C16, BAC - C18 100 $\mu g/L$ (100 ppb): 100 μL được hút tại mỗi dung dịch chuẩn 10 ppm cho vào cùng một bình định mức 10 mL, định mức tới vạch bằng bằng ACN ở nhiệt độ phòng và lắc đều. Dung dịch chuẩn được bảo quản $2-8^{\circ}C$.

Nội chuẩn làm việc BAC C18 - D7 100 $\mu g/L$ (100 ppb): 100 μL dung dịch chuẩn 10 ppm được hút cho vào bình định mức 10 mL, định mức tới vạch bằng bằng ACN ở nhiệt độ phòng và lắc đều. Dung dịch chuẩn được bảo quản $2-8^{\circ}C$.

Pha động A (formic acid 0,1%): 1 lít nước được dùng cho HPLC, hút bỏ 1 mL sau đó thêm vào 1 mL formic acid. Pha động B (acetonitrile 0,1 % acid formic): 1 lít acetonitrile, hút bỏ 1 mL sau đó thêm vào 1 mL formic acid.

2.3.3. Xử lý mẫu

Mẫu được cân 1 g rồi cho vào ống ly tâm nhựa có nắp 15 mL, thêm vào 50 μL nội chuẩn 100 $\mu g/L$, vortex và để yên khoảng 15 phút. Sau đó, 4 mL acetonitrile được thêm vào, đóng nắp, lắc tối mẫu. Ly tâm mẫu với tốc độ 3500 vòng/phút, 10 phút. Tiếp theo, phần dịch chiết bên trên được chuyển hết vào ống nhựa 15 mL có chứa sẵn khoảng 1 g $MgSO_4$ và 0,5 g NaCl, lắc xoáy 1 phút, ly tâm 3500 vòng/phút. Phần dịch trong (ACN) phía trên được hút cho vào ống nhựa 15 mL có chứa sẵn khoảng 200 mg bột C18, 0,5 g $MgSO_4$. Tiếp tục với công đoạn lắc xoáy 1 phút, ly tâm 3500 vòng/phút. Sau cùng, dung dịch phía trên được lọc qua màng lọc có kích thước lỗ từ 0,20 đến 0,22 μm vào lọ mẫu 2 mL, phân tích trên UPLC - MS/MS (Anastassiades & Lehotay, 2003).

2.3.4. Điều kiện UPLC-MS/MS

Điều kiện cho UPLC

Nhiệt độ cột được cài đặt ở $30^{\circ}C$. Pha động được sử dụng formic acid 0,1% (kênh A), acetonitrile 0,1 % acid formic (kênh B). Cài đặt tốc độ dòng 0,3 mL/phút, thể tích tiêm mẫu 10 μL và thời gian phân tích 4,5 phút. Chương trình gradient pha động trong quá trình nghiên cứu được trình bày trong Bảng 1.

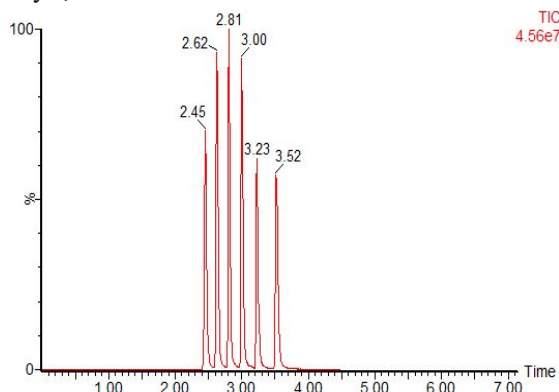
Bảng 1. Chương trình gradient dòng

Thời gian (phút)	A (%)	B (%)
0,2	95	5
0,8	55	45
1,5	10	90
3,0	10	90
3,1	95	5
4,5	95	5

Điều kiện cho đầu dò khối phổ

Kiểu ion hóa mẫu ESI (+). Năng lượng capillary 0,5 (kV). Nhiệt độ làm khô (desolvation temp) $500^{\circ}C$. Lưu lượng khí mang (desolvation) 1000 (L/H). Năng lượng cone 20 (V).

Sắc ký đồ dung dịch chuẩn nhóm benzalkonium chloride trong dung môi ACN, phân tích trên thiết bị ULPC-Xevo TQS micro, hãng Waters được trình bày tại Hình 2.



Hình 2. Sắc ký đồ nhóm benzalkonium chloride

Chương trình phân mảnh các chất nhóm benzalkonium chloride trong điều kiện ion hóa nêu trên được trình bày trong Bảng 2.

Bảng 2. Điều kiện phân mảnh

Chỉ tiêu	Ion mẹ(m/z)	Ion con(m/z)	Năng lượng va chạm (V)
BAC-C8	248,3	91,1	20
		156,3*	15
BAC-10	276,4	91,1	20
		184,3*	15
BAC-12	304,4	91,1	25
		212,3*	20
BAC-14	332,5	91,1	25
		240,4*	20
BAC-16	360,5	91,1	25
		268,4*	20
BAC-18	388,5	296,5	25
		388,5*	10
BAC-C18 D7	395,5	395,5*	30

Ghi chú: (*) ion định lượng

2.3.5. Xác nhận giá trị sử dụng phương pháp

Khoảng tuyến tính: thêm chuẩn trên từng nền mẫu 5 điểm chuẩn 0, 1, 3, 10, 30 $\mu\text{g/kg}$ để xem xét khoảng tuyến tính và khảo sát đường chuẩn áp dụng cho phương pháp. Hai thông số cần kiểm soát ở bước khảo sát này là độ lệch chuẩn tương đối của các điểm chuẩn $\leq 20\%$ và hệ số tuyến tính $R^2 \geq 0,99$. Các khảo sát được lặp lại ít nhất 3 lần, qua 3 thời điểm khác nhau.

Giới hạn phát hiện (LOD): LOD được đánh giá qua 3 ngày phân tích tái lập, mỗi ngày phân tích 7

mẫu thêm chuẩn ở nồng độ 0,5 $\mu\text{g/kg}$. Điều này được thực hiện như nhau trên 4 nền mẫu đã chọn. Tại giới hạn phát hiện, tỉ lệ signal/noise (S/N), tỉ lệ ion, độ lệch thời gian lưu (RT) đạt theo yêu cầu nhận diện của EU808/2021 và Sante/11312/2021v2.

Giới hạn định lượng (LOQ): tại giới hạn định lượng các thí nghiệm cũng được bố trí lặp lại 7 lần và tái lập 21 lần sau 3 ngày khác nhau, tại nồng độ 1 $\mu\text{g/kg}$. Kết quả đánh giá về độ chính xác bao gồm độ đúng và độ chụm. Các kết quả sẽ tham chiếu theo quy định về độ chính xác của Sante/11312/2021v2 và EU808/2021.

Độ nhạy: Mẫu được khảo sát thêm chuẩn tại giới hạn phát hiện với cỡ mẫu 21 mẫu/nền. Đánh giá xem tất cả có được phát hiện đúng. Tỉ lệ phát hiện đúng $\geq 95\%$ thì phương pháp mới có độ nhạy đạt yêu cầu.

Độ chọn lọc: Để đánh giá độ chọn lọc, 21 mẫu trắng được khảo sát trên các nền tôm, cá, tôm tằm bột và nước nuôi trồng thủy sản, xem xét tất cả các mẫu có được nhận diện đúng. Các mẫu cũng cần được nhận diện đúng với tỉ lệ từ 95% trở lên phương pháp được xem là có tính chọn lọc cao.

Độ lặp lại: Khảo sát được thực hiện trên 7 mẫu thêm chuẩn tại mỗi nồng độ, bao gồm giới hạn định lượng và 3 nồng độ 10, 15, 25 $\mu\text{g/kg}$, trong điều kiện lặp lại, tính toán độ lệch chuẩn Sr và RSDr.

Độ tái lập: Các mẫu được bố trí khảo sát qua 3 ngày khác nhau, mỗi nồng độ khảo sát 21 mẫu/nền, trong điều kiện tái lập nội bộ phòng thí nghiệm, xác định độ lệch chuẩn SR, RSDR vào các thời điểm khác nhau.

Theo tài liệu Sante/11312/2021v2 của EURL về kiểm soát chất lượng phân tích và quy trình xác nhận phương pháp, một phương pháp có độ chụm tốt phải thỏa mãn độ tái lập nội bộ phòng thí nghiệm RSDR (%) $\leq 20\%$.

Độ đúng: Giá trị này được đánh giá thông qua độ thu hồi của tất cả các mẫu thêm chuẩn từ giá trị định lượng trở lên. Các giá trị độ đúng, độ chụm sau khi tính toán thống kê được tham chiếu với các tài liệu hướng dẫn và tiêu chí chấp nhận của quy định Sante/11312/2021v2 và EU808/2021. Nhằm, đánh giá độ chính xác của phương pháp có đáp ứng theo yêu cầu quy định.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khoảng tuyến tính

Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính gồm các điểm chuẩn 0, 1, 3, 10, 30 $\mu\text{g/kg}$ qua ba ngày, trên bốn nền mẫu, hệ số hồi quy tuyến tính lần lượt thu

được rất tốt, trên tất cả các nền mẫu khảo sát. Quy mô khảo sát trên mỗi nền mẫu là 6 ngày tái lập, kể từ khi hoàn thiện những yếu tố cấu thành cho một đường chuẩn như số điểm, khoảng rộng cần thiết,

bước nhảy giữa các điểm. Các hệ số hồi quy tính toán được đều lớn hơn tiêu chí quy định ($\geq 0,99$) và được trình bày đại diện kết quả khảo sát 3 ngày trong Bảng 3.

Bảng 3. Hệ số hồi quy tuyến tính

		C8	C10	C12	C14	C16	C18
Ngày 1	Tôm	0,996	0,994	0,996	0,998	0,997	0,999
	Cá	0,999	0,999	0,997	0,999	0,998	0,998
	T.Bột	0,998	0,997	0,993	0,995	0,999	0,999
	Nước	0,997	0,998	0,996	0,998	0,999	0,998
Ngày 2	Tôm	0,998	0,992	0,996	0,998	0,999	0,998
	Cá	0,999	0,999	0,997	0,999	0,998	0,998
	T.Bột	0,998	0,998	0,996	0,997	0,996	0,999
	Nước	0,997	0,998	0,996	0,997	0,999	0,999
Ngày 3	Tôm	0,997	0,996	0,996	0,999	0,999	0,998
	Cá	0,999	0,999	0,998	0,999	0,999	0,998
	T.Bột	0,997	0,996	0,996	0,999	0,999	0,998
	Nước	0,998	0,998	0,996	0,996	0,998	0,998

Độ lệch các điểm chuẩn và hệ số hồi quy tuyến tính được tính toán sẵn trên phần mềm điều khiển thiết bị (MassLynx V4.2). Sau tất cả các lần khảo sát, giá trị độ lệch chuẩn các điểm chuẩn đều nhỏ hơn 15%. Hệ số R^2 đạt giá trị từ 0,992 đến 0,999.

Kết quả khảo sát cho thấy rằng các điều kiện đánh giá đều đáp ứng yêu cầu. Các yêu cầu bao gồm $R^2 \geq 0,99$, độ lệch của các điểm chuẩn $\leq 20\%$. Qua đó, nhận thấy đường chuẩn phù hợp với phương pháp, bước nhảy của các điểm chuẩn phù hợp nên đạt được hệ số tuyến tính cao (European commission, 2021).

3.2. Giới hạn phát hiện (LOD)

Các tiêu chí nhận diện một chất theo tài liệu của Phòng thí nghiệm tham chiếu Châu Âu về dư lượng thuốc trừ sâu (Sante/11312/2021v2) và quy định thực hiện của ủy ban Châu Âu về việc thực hiện các phương pháp phân tích dư lượng các hoạt chất được lý được sử dụng trong động vật sản xuất thực phẩm bao gồm:

- Tỷ lệ S/N ≥ 3 ,
- Tỷ lệ ion được phép dao động $\pm 30\%$ so với chuẩn,

- Độ lệch thời gian lưu tương đối cho phép $\pm 1\%$ so với chuẩn (European Union, 2021).

Các kết quả khảo sát thực hiện qua 3 ngày với 21 lần lặp lại và tái lập, được thực hiện trên 4 nền mẫu khảo sát và được thông kê trong Bảng 4.

Kết quả cho thấy tất cả các mẫu khảo sát tại giới hạn phát hiện đều được nhận diện đúng

Dấu hiệu nhận dạng một chất trong kỹ thuật sắc ký lỏng khối phổ bao gồm tỉ lệ S/N, tỉ lệ ion, độ lệch thời gian lưu đều đạt so với tiêu chí. Độ lệch thời gian lưu tương đối qua 21 lượt phân tích rất nhỏ, tỉ lệ ion ổn định chỉ dao động lớn nhất là 0,03 đơn vị, chiếm khoảng 13%, so với mức quy định 30% thì đây là con số khá thấp. Giá trị S/N tính toán thông qua phần mềm tính toán kết quả trên thiết bị và tất cả các mẫu đều cho giá trị lớn hơn 3 rất nhiều.

Thực nghiệm cho thấy, tại giá trị 0,5 $\mu\text{g/kg}$, kết quả phân tích 21/21 mẫu (100%) đã đáp ứng đầy đủ các tiêu chí về nhận diện một chất trong kỹ thuật sắc ký lỏng khối phổ. Giá trị LOD này cũng đáp ứng được mục đích sử dụng phương pháp trong phân tích hợp chất nhóm BAC trong các nền mẫu khảo sát nêu trên.

Bảng 4. Kết quả khảo sát các thông số đánh giá LOD trên các nền mẫu tôm, cá tra, tôm tằm bột, nước nuôi trồng thủy sản

Nền tôm thêm chuẩn 0,5 µg/kg, N=21	RT	Tỉ lệ ion	S/N
C8	0,70-0,72	0,21-0,24	>3
C10	0,75-0,77	0,24-0,28	>3
C12	0,80-0,82	0,22-0,25	>3
C14	0,85-0,87	0,24-0,26	>3
C16	0,92-0,93	0,22-0,24	>3
C18	1,00	0,13-0,16	>3
Nền cá tra thêm chuẩn 0,5 µg/kg, N=21			
C8	0,69-0,72	0,22-0,25	>3
C10	0,74-0,76	0,25-0,26	>3
C12	0,79-0,82	0,22-0,25	>3
C14	0,85-0,87	0,24-0,26	>3
C16	0,92-0,93	0,22-0,25	>3
C18	1,00	0,14-0,16	>3
Nền tôm tằm bột thêm chuẩn 0,5 µg/kg, N=21			
C8	0,70-0,72	0,22-0,24	>3
C10	0,75-0,76	0,25-0,27	>3
C12	0,80-0,82	0,23-0,24	>3
C14	0,86-0,87	0,24-0,27	>3
C16	0,92-0,93	0,22-0,24	>3
C18	1,00	0,13-0,16	>3
Nền nước NTTS thêm chuẩn 0,5 µg/kg, N=21			
C8	0,70-0,72	0,22-0,24	>3
C10	0,74-0,76	0,25-0,28	>3
C12	0,79-0,82	0,22-0,24	>3
C14	0,85-0,87	0,25-0,26	>3
C16	0,92-0,93	0,22-0,24	>3
C18	1,00	0,14-0,16	>3

3.3. Giới hạn định lượng (LOQ)

Kết quả khảo sát tại giới hạn định lượng qua 3 ngày tái lập, trên tất cả các nền khảo sát được thống kê trong Bảng 5.

Tại LOQ, độ chính xác là thông số mục tiêu được đánh giá. Độ chính xác được đánh giá thông qua độ thu hồi và độ lệch chuẩn tương đối các mẫu thêm chuẩn ở điều kiện tái lập nội bộ phòng thí nghiệm. Cả bốn nền mẫu đều thực hiện 21 mẫu phân tích, 7 mẫu/ngày, thực hiện trong 3 ngày. Kết quả tính toán thống kê cho thấy %RSDR và %R đều đạt yêu cầu so với qui định của Phòng thí nghiệm tham chiếu Châu Âu về dư lượng thuốc trừ sâu (EURL).

Theo tài liệu Sante/11312/2021v2 của EURL về kiểm soát chất lượng phân tích và quy trình xác nhận phương pháp, độ chính xác phải thỏa mãn hai tiêu chí độ tái lập nội bộ phòng thí nghiệm RSDR (%) ≤ 20% và độ thu hồi %R (70-120%). Số liệu cho thấy tại mức nồng độ 1 µg/kg phương pháp định lượng tốt, kết quả có độ chính xác đạt yêu cầu trên cả bốn nền mẫu thực hiện (EC, 2021).

Giới hạn định lượng của phương pháp 1 µg/kg là khá thấp so với mức kiểm soát trên các sản phẩm nông sản, thực phẩm mà liên minh Châu Âu đang kiểm soát (100 µg/kg). Điều này cho thấy hiệu năng của phương pháp đáp ứng rất tốt yêu cầu sử dụng.

Bảng 5. Kết quả khảo sát các thông số đánh giá LOQ trên nền tôm nguyên liệu, cá tra, tôm bột, nước nuôi trồng thủy sản

Thông số		Tôm	Cá tra	Tôm bột	Nước
C8	RSDR (%)	10,9	11,2	11,7	9,1
	R (%)	77-115	77-116	77-120	88-120
C10	RSDR (%)	11,6	10,3	10,8	8,8
	R (%)	78-115	83-117	79-117	85-118
C12	RSDR (%)	6,6	7,7	6,3	5,4
	R (%)	95-120	89-120	93-120	99-120
C14	RSDR (%)	6,8	7,5	9,2	10,4
	R (%)	97-119	90-119	85-119	81-120
C16	RSDR (%)	8,9	9,9	10,4	11,8
	R (%)	85-119	80-116	73-114	77-118
C18	RSDR (%)	10,4	10,7	8,8	14,4
	R (%)	85-120	83-117	82-114	73-117

3.3. Độ nhạy

Độ nhạy của phương pháp tại giới hạn phát hiện được khảo sát 21 mẫu lặp lại/nền 100% mẫu phát hiện đúng, kết quả khảo sát đã trình bày trong mục khảo sát LOD.

Từ kết quả này khẳng định phương pháp phân tích xây dựng có độ nhạy cao. Tất cả mẫu dương tính khảo sát đều phát hiện đúng. Độ nhạy tại giới hạn phát hiện là quan trọng trong việc khẳng định phương pháp có cho kết quả âm tính giả hay không, điều này còn có ý nghĩa quyết định hơn khi phương pháp phân tích chất cấm. Vì vậy, độ nhạy trong mọi trường hợp cần phải được khảo sát và đánh giá. Trong nghiên cứu này, độ nhạy sau khảo sát qua các loạt mẫu đạt 100%. Do đó, phương pháp có độ nhạy rất cao, đáp ứng hoàn toàn yêu cầu đặt ra về khả năng nhận diện được chất phân tích khi chúng có mặt trong mẫu thử với nồng độ từ lớn hơn hoặc bằng giới hạn phát hiện của phương pháp.

3.4. Độ chọn lọc

Nếu khảo sát độ nhạy nhằm khẳng định tỉ lệ âm tính giả thì độ chọn lọc nhằm khẳng định tỉ lệ dương tính giả của phương pháp. Bên cạnh đó, các yếu tố nội tại của nền mẫu có gây ra sự phát hiện sai lầm cho phương pháp hay không, đều được đánh giá thông qua độ chọn lọc của phương pháp.

Kết quả khảo sát 21 mẫu trắng/nền, 100% đều cho kết quả âm tính. Như vậy, phương pháp có tính chọn lọc cao. Độ chọn lọc cũng có ý nghĩa quan trọng như đối với độ nhạy. Cả hai hợp thành sự chắc chắn, tin cậy cho kết quả khi phát hiện chất phân tích. Khảo sát hai thông số này đã cho thấy khả năng

nhận diện sai hay bỏ lọt chất phân tích mục tiêu của phương pháp vừa xây dựng được là không xảy ra.

3.5. Độ chính xác của phương pháp (độ chụm và độ đúng)

Kết quả tiến hành khảo sát 3 nồng độ trên mức giới hạn định lượng. Phân tích được lặp lại và tái lập trong 3 ngày. Số liệu được thu thập và tính toán độ lệch chuẩn và độ thu hồi để chứng minh độ chính xác. Số liệu khảo sát và tính toán thống kê ở 3 nồng độ khác nhau, thực hiện tái lập qua 3 ngày trên các nền mẫu tôm, cá tra, tôm bột, nước nuôi trồng thủy sản được trình bày tại Bảng 6.

Độ tái lập tại các nồng độ 10, 15, 25 µg/kg trên các nền mẫu thực, đều cho độ chụm tốt. Cụ thể độ lệch chuẩn tái lập qua 3 ngày với 21 lượt phân tích đều cho kết quả nhỏ hơn 20% theo quy định của Sante/11312/2021v2. Độ lệch chuẩn tái lập nội bộ phòng thí nghiệm RSDR (%) càng nhỏ thì độ chụm càng tốt. Trên nền mẫu nước đa phần các chất có độ chụm tốt. BAC-C18 là chất có độ chụm tốt nhất trong nhóm trên tất cả các nền, nguyên nhân có thể là do phương pháp sử dụng nội chuẩn đồng vị của BAC-C18 là D7.

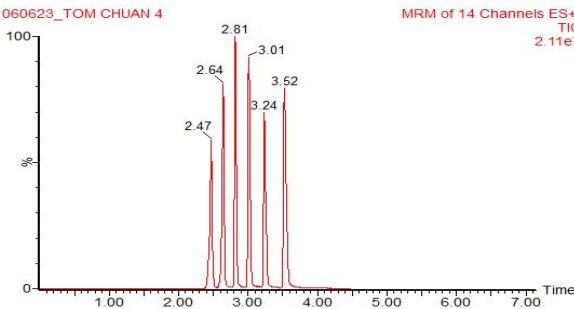
Các kết quả về độ chụm được tính toán thống kê chi tiết. Tuy nhiên, chỉ công bố độ tái lập nội bộ phòng thí nghiệm vì nó phản ánh khách quan hơn sự phân tán của kết quả dưới sự ảnh hưởng của các điều kiện tái lập. Kết quả khảo sát cho thấy các loạt phân tích có độ chụm cao trên hầu hết các nền mẫu và giá trị độ tái lập nội bộ phòng thí nghiệm thấp hơn nhiều so với qui định mà cộng đồng chung Châu Âu EU 808/2021 hay Sante/11312/2021v2 đưa ra.

Bảng 6. Kết quả khảo sát độ chính xác tại các nồng độ 10, 15, 25 µg/kg trên các nền mẫu tôm, cá tra, tôm bột, nước nuôi trồng thủy sản thêm chuẩn

Mẫu thêm chuẩn 10; 15; 25 µg/kg, N=21		Tôm	Cá tra	Tôm bột	Nước
C8	RSDR (%)	8,1-12,1	7,5-13,5	7,8-11,4	6,9-7,9
	R (%)	81-116	80-119	86-119	90-119
C10	RSDR (%)	8,7-9,8	6,5-12,2	6,9-11,4	7,3-10,9
	R (%)	84-117	81-119	87-119	84-119
C12	RSDR (%)	8,0-8,9	6,4-10,7	6,2-8,4	5,7-7,2
	R (%)	81-116	85-118	87-118	89-119
C14	RSDR (%)	5,6-8,7	4,6-7,0	5,7-7,4	4,8-19,2
	R (%)	86-116	86-120	84-119	93-119
C16	RSDR (%)	4,1-6,6	3,6-7,0	4,2-6,7	3,3-4,9
	R (%)	83-114	91-114	80-110	92-114
C18	RSDR (%)	3,1-5,0	3,0-5,2	2,5-5,3	2,4-4,2
	R (%)	83-106	8,6-106	85-105	84-106

Độ thu hồi trên cả 4 nền đều dao động trong khoảng 80 - 120% đều này thấy được độ đúng của phương pháp tốt. Độ đúng là thông số quan trọng trong định lượng một chất. Nó phản ánh mức độ gần nhau giữa giá trị thực và nồng độ phân tích được. Theo lý thuyết mẫu thêm chuẩn có nồng độ càng cao thì thu hồi càng tốt. Các kết quả thực nghiệm thu được phù hợp với lý thuyết nêu trên. Ở các điểm nồng độ cao các benzalkonium thành phần như C16 và C18 có độ chụm và độ đúng rất cao. Từ kết quả khảo sát và thống kê cho thấy, phương pháp có độ chính xác đáp ứng yêu cầu quy định tại các tài liệu tham chiếu về yêu cầu xác nhận phương pháp của hội đồng Châu Âu.

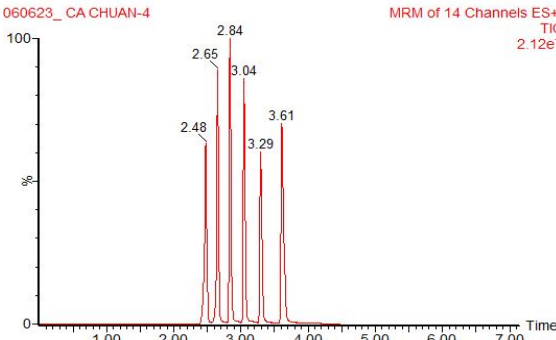
Sắc ký đồ thêm chuẩn các chất benzalkonium chloride trên các nền mẫu tôm, cá tra, tôm bột và nước nuôi trồng thủy sản được trình bày từ Hình 3 đến Hình 6



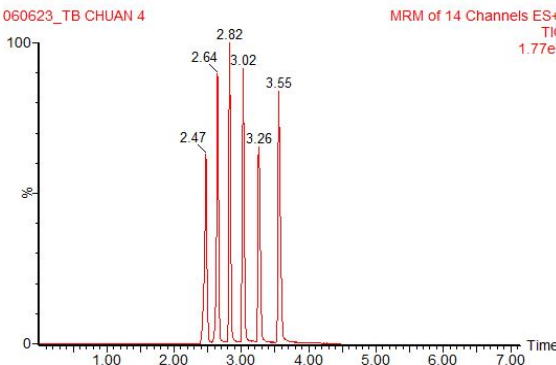
Hình 3. Sắc ký đồ thêm chuẩn nhóm benzalkonium chloride trên nền tôm

Nghiên cứu này có một số ưu điểm so với các nghiên cứu trước đây là giới hạn phát hiện thấp (0,05 µg/kg), thời gian phân tích ngắn (5 phút) và xác định được tất cả các hợp chất trong nhóm benzalkonium chloride. Một số nghiên cứu trên các nền mẫu nước

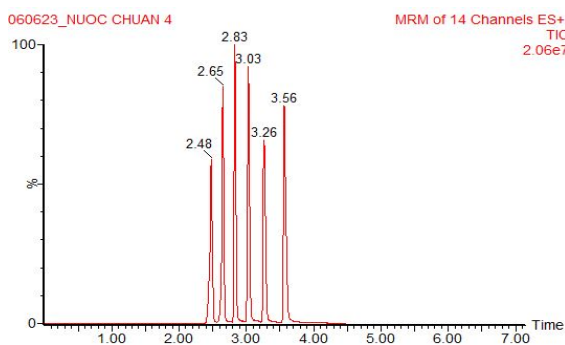
thải hoặc sản phẩm khử trùng bằng kỹ thuật HPLC đầu dò quang phổ đều cho giới hạn phát hiện cao từ vài chục ppb đến hàm lượng ppm, thời gian phân tích trên 20 phút và chỉ xác định vài dẫn xuất thuộc nhóm (Iuliana et al., 2023).



Hình 4. Sắc ký đồ thêm chuẩn nhóm benzalkonium chloride trên nền cá tra



Hình 5. Sắc ký đồ thêm chuẩn nhóm benzalkonium chloride trên nền tôm tẩm bột



Hình 6. Sắc ký đồ thêm chuẩn nhóm benzalkonium chloride trên nền nước

4. KẾT LUẬN

Kết quả phân tích thực nghiệm cho thấy BAC là nhóm chất dễ chiết và có cường độ tín hiệu cao. Vì vậy, khối lượng mẫu lấy phân tích nhỏ (1 gam), không cần phải làm giàu thông qua quá trình cô đặc

mà chỉ cần công đoạn chiết, làm sạch mẫu là có thể tiến hành tiêm mẫu, do đó thời gian phân tích ngắn. Phương pháp này được sử dụng các hóa chất phổ biến, giá thành không cao. Sau khi xây dựng, phương pháp đã được thẩm định nhiều thông số và tiêu chí chấp nhận tham chiếu theo các quy định hiện hành của Châu Âu. Tất cả đều đáp ứng theo yêu cầu các tổ chức quốc tế về kiểm tra, xác nhận giá trị sử dụng phương pháp phân tích như Sante, EU808/2021, Eurachem, AOAC 2016. Qui mô cỡ mẫu thống kê lớn, các thông số đều được khảo sát chi tiết, kỹ lưỡng. Phạm vi của nghiên cứu này thực hiện tập trung trên lĩnh vực thủy sản bao gồm 4 nền mẫu tôm, cá, tôm tằm bột và nước nuôi trồng thủy sản. Tuy nhiên, BAC được sử dụng rộng rãi trên nhiều lĩnh vực. Do đó, rất có thể bằng nhiều nguyên nhân khác nhau chúng sẽ nhiễm bẩn vào thức ăn của con người. Vì vậy, cần nghiên cứu phân tích trên nhiều nền mẫu thực phẩm khác để kiểm soát chúng tốt hơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO (REFERENCES)

- Anastassiades, M., & Lehotay, S. J. (2003). *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe (QuEChERS) approach for the determination of pesticide residues*. https://www.researchgate.net/publication/283647077_Quick_Easy_Cheap_Effective_Rugged_and_Safe_QuEChERS_approach_for_the_determination_of_pesticide_residues
- Basharat, R., Kotra, V., Loong, Y. L., Mathews, A., Kanan, M. M., Devi, C. P., Nyamathulla, S., Varala, R., Ming, C. L., Rao, S. K., Babu, H. B., & Alam, M. M. (2021). Ultra Performance Liquid Chromatography. *Oriental Journal Of Chemistry*, 37(4), 847-857. <https://www.orientjchem.org/vol37no4/a-mini-review-on-ultra-performance-liquid-chromatography/>
- Beatriz, M. P. P., & Ilias, T. (2019). Benzalkonium Chlorides: Uses, Regulatory Status, and Microbial Resistance. *American Society For Microbiology*, 85(13), 1-10. <https://doi.org/10.1128/AEM.00377-19>
- Cong, T. (2020). *Limit the use of BKC in shrimp farming (in Vietnamese)*. <https://thuysanvietnam.com.vn/han-che-su-dung-bkc-trong-nuoi-tom/>
- European Union. (2009). *Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 concerning the placing of plant protection products on the market and repealing Council Directives 79/117/EEC and 91/414/EEC*. <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2009/1107/oj>
- European Food Safety Authority. (2013). *Evaluation of monitoring data on residues of didecyldimethylammonium chloride (DDAC) and benzalkonium chloride (BAC)*. <https://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/en-483>
- European Food Safety Authority. (2014). *Reasoned opinion on the dietary risk assessment for proposed temporary maximum residue levels (MRLs) of didecyldimethylammonium chloride (DDAC) and benzalkonium chloride (BAC)*. <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/3675>
- European Union. (2021). *Commission Implementing Regulation (EU) 2021/808 of 22 March 2021 on the performance of analytical methods for residues of pharmacologically active substances used in food-producing animals and on the interpretation of results as well as on the methods to be used for sampling and repealing Decisions 2002/657/EC and 98/179/EC*. http://data.europa.eu/eli/reg_impl/2021/808/oj
- European Union. (2023). *Commission Regulation (EU) 2023/377 of 15 February 2023 amending Annexes II, III, IV and V to Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards maximum residue levels for benzalkonium chloride (BAC), chlorpropham, didecyldimethylammonium chloride (DDAC), flutriafol, metazachlor, nicotine, profenofos, quizalofop-P, sodium aluminium silicate, thiabendazole and triadimenol in or on certain products (Text with EEA relevance)*. <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2023/377/oj>

European Commission. (2024). *Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed*.
https://www.eurl-pesticides.eu/docs/public/tmpl_article.asp?CntlD=727

Nguyen, T. Q. (2020). *Notes when using BKC in brackish water shrimp farming (in Vietnamese)*

<https://thuysanvietnam.com.vn/luu-y-khi-su-dung-bkc-trong-nuoi-tom-nuoc-lo/>

Iuliana, P., & Mierla, C., Cristina, I. (2023). Determination of benzalkonium chlorides from wastewater using HPLC-DAD method. *U.P.B. Sci. Bull., Series B, Vol. 85, Iss. 2*.