

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

**VIỆN HÀN LÂM
KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VN**



Bùi Minh Thúy

BÙI MINH THÚY

HÓA PHÂN TÍCH

**NGHIÊN CỨU PHÂN TÍCH BIS(1,3-DICHLORO-2-PROPYL)
PHOSPHATE TRONG NƯỚC TIỂU BẰNG PHƯƠNG PHÁP
SẮC KÝ LỎNG GHÉP NỐI KHỐI PHỔ HAI LẦN (LC-
MS/MS)**

LUẬN VĂN THẠC SĨ HÓA PHÂN TÍCH

Hà Nội, 09/2023

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM
KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VN**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Bùi Minh Thúy

**NGHIÊN CỨU PHÂN TÍCH BIS(1,3-DICHLORO-2-PROPYL)
PHOSPHATE TRONG NƯỚC TIỂU BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ
LỎNG GHÉP NỐI KHỐI PHỔ HAI LẦN (LC-MS/MS)**

Chuyên ngành : Hóa phân tích

Mã số: 8440118

LUẬN VĂN THẠC SĨ NGÀNH HÓA HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC : TS. Trịnh Thu Hà

Hà Nội - 2023

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan những kết quả nghiên cứu được thể hiện trong luận văn này là nghiên cứu của tôi dưới sự hướng dẫn của TS. Trịnh Thu Hà. Toàn bộ nội dung của luận văn đều được trình bày dựa trên quan điểm, kiến thức cá nhân hoặc tích lũy, chọn lọc từ nhiều nguồn tài liệu có đính kèm chi tiết và hợp lệ. Các kết quả nghiên cứu trong luận văn này là trung thực và chưa được ai công bố trong bất cứ công trình nào. Tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm và hình thức kỷ luật theo quy định nếu phát hiện bất kỳ gian lận nào.

Tác giả

Bùi Minh Thúy

LỜI CẢM ƠN

Khi em ngồi viết những dòng này thì có lẽ quãng thời gian còn lại ở Học viện đối với em cũng không còn nhiều nữa. Hai năm qua là khoảng thời gian không phải quá dài, nhưng đối với em đó là một phần thanh xuân đầy màu sắc, tích lũy được nhiều kiến thức. Trong suốt 2 năm học tập và rèn luyện tại Học viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, bên cạnh nỗ lực của bản thân em luôn nhận được những lời động viên, sự giúp đỡ tận tình của gia đình, thầy cô và bạn bè.

Em xin tỏ lòng biết ơn sâu sắc nhất đến TS. Trịnh Thu Hà – Viện Hóa Học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam – Người cô đã luôn tận tâm và hết mình tạo mọi điều kiện thuận lợi giúp đỡ em trong suốt quá trình học tập và thực hiện Luận văn tốt nghiệp. Em xin cảm ơn sự hỗ trợ kinh phí của đề tài “*Xây dựng bộ quy trình tiêu chuẩn xác định chất chống cháy trong môi trường, vật liệu chống cháy và đánh giá mức độ nguy hại đến sức khỏe con người*”, mã số: TĐPCCC.05/21-23”.

Em xin gửi lời cảm ơn sâu sắc tới Ban lãnh đạo, các phòng ban đào tạo cùng các thầy cô bộ môn Hóa Phân tích, khoa Hóa học, Học viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã luôn giảng dạy và truyền đạt đầy nhiệt huyết cho chúng em trong 2 năm qua, trang bị cho chúng em không chỉ những kiến thức chuyên môn và còn những kiến thức đời sống bổ ích. Các thầy cô luôn tạo điều kiện thuận lợi nhất để em hoàn thành luận văn một cách tốt nhất.

Em xin gửi lời cảm ơn tới Ban Lãnh đạo Trung tâm Chứng nhận Phù hợp (QUACERT) cùng toàn thể các anh chị đồng nghiệp đã động viên và giúp đỡ em trong quá trình em tham gia học tập nâng cao kiến thức chuyên môn.

Em xin gửi lời cảm ơn sâu sắc tới gia đình, các anh chị, các bạn bè cùng khóa trong suốt thời gian học tập đã luôn động viên, hỗ trợ mọi mặt về tinh thần cũng như kinh tế để em có thể thực hiện luận văn và hoàn thành khóa học tốt nhất.

Do thời gian và kiến thức còn nhiều hạn chế, do vậy không tránh khỏi những thiếu sót, em rất mong nhận được những đóng góp quý báu của thầy cô.

Hà Nội, ngày tháng năm 2023

Học viên thực hiện

Bùi Minh Thúy

MỤC LỤC

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT	i
DANH MỤC HÌNH	iii
DANH MỤC BẢNG	iv
MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU	2
1.1. Tris (1,3-dichloro-2-propyl) phosphate trong môi trường không khí trong nhà, sản phẩm tiêu dùng và mẫu sinh học của người trên thế giới và tại Việt Nam.	2
1.2. Chất chuyển hóa Bis (1,3-dichloro-2-propyl) photphat của chất chống cháy TDCPP trong quá trình chuyển hóa hoạt động sinh học ở người	3
1.3. Nguy cơ tác động đến sức khỏe con người của TDCPP và BDCPP.....	5
1.4. Các phương pháp chiết tách và phân tích BDCPP trong mẫu sinh học và nước tiểu	7
1.5. Các phương pháp chiết tách BDCPP trong mẫu sinh học và nước tiểu.....	7
1.6. Các phương pháp phân tích Bis (1,3-dichloro-2-propyl) photphat trong mẫu sinh học và nước tiểu.	12
1.7. Các phương pháp đánh giá mức độ phơi nhiễm ảnh hưởng đến sức khỏe con người của TDCPP.....	15
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG, NỘI DUNG, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	16
2.1. Đối tượng và nội dung nghiên cứu	17
2.1.1. Đối tượng nghiên cứu	17
2.1.2. Mục tiêu nghiên cứu	17
2.1.3. Mẫu nghiên cứu	17
2.1.4. Nội dung nghiên cứu.....	17
2.2. Hóa chất, dụng cụ và thiết bị.....	18
2.2.1. Hóa chất	18
2.2.2. Dụng cụ và thiết bị.....	18
2.3. Công thức tính toán	19
2.4. Phương pháp nghiên cứu	20
2.4.1. Nghiên cứu thu thập mẫu nước tiểu	20
2.4.2. Nghiên cứu phân tích BDCPP bằng LC-MS/MS.....	20
2.4.3. Nghiên cứu chiết tách BDCPP trong nước tiểu bằng chiết pha rắn.....	20
2.4.4. Nghiên cứu xác định giá trị sử dụng của phương pháp chiết tách và phân tích BDCPP trong mẫu nước tiểu	21
2.4.5. Phân tích mẫu thực tế.....	23
2.4.6. Nghiên cứu đánh giá nguy cơ phơi nhiễm.....	23

2.4.7. Phương pháp xử lý số liệu.....	24
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	25
3.1. Phương pháp phân tích BDCPP bằng LC-MS/MS	25
3.1.1. Điều kiện phân tích BDCPP bằng LC-MS/MS.....	25
3.1.2. Xây dựng đường chuẩn.....	27
3.2. Phương pháp chiết tách BDCPP trong mẫu nước tiểu bằng SPE.....	28
3.2.1. Điều kiện chiết tách BDCPP trong mẫu nước tiểu bằng SPE.....	28
3.2.2. Điều kiện dung môi rửa giải của quá trình chiết tách BDCPP trong mẫu nước tiểu bằng chiết pha rắn.....	29
3.3. Xác định giá trị sử dụng của phương pháp chiết tách và phân tích BDCPP trong mẫu nước tiểu bằng LC-MS/MS.....	30
3.3.1. Giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn phát hiện của phương pháp (MDL)	30
3.3.2. Độ lặp lại, độ đúng, độ thu hồi của phương pháp	32
3.5. Kết quả BDCPP trong các mẫu nước tiểu thu thập.....	35
3.6. Xác định nguy cơ phơi nhiễm TDCPP trong các mẫu nước tiểu thu thập được và đánh giá nguy cơ ảnh hưởng đến sức khỏe con người.....	39
3.6.1. So sánh theo độ tuổi.....	39
3.6.2. So sánh theo giới tính	42
3.6.3. Tính liều phơi nhiễm hàng ngày của chất chống cháy TDCPP	43
KẾT LUẬN.....	46
KIẾN NGHỊ.....	46
TÀI LIỆU THAM KHẢO	48
Phụ lục 01. Kết quả đặc điểm cơ bản của mẫu nước tiểu.....	52
từ các tình nguyện viên.....	52
Phụ lục 02. Thông tin điều tra từ các tình nguyện viên tham gia	54
Phổ sắc ký các mẫu phân tích	56

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Tên tiếng Việt	Tên tiếng Anh hoặc tên khoa học
ACN	Acetonitrile	Acetonitrile
APCI	Ion hóa hóa học áp suất khí quyển	Atmospheric pressure chemical ionization
AOAC	Hiệp hội các nhà hóa phân tích	Association of Official Analytical Chemists
BDCPP	Bis (1,3-dichloro-2-propyl) phosphate	Bis (1,3-dichloro-2-propyl) phosphate
CV	Hệ số biến thiên	Coefficient of Variation
DCM	Dichloromethane	Dichloromethane
DF	Tần suất phát hiện	Detect frequency
ESI	Ion hóa phun điện tử	Electron Spray Ionization
GC/MS	Sắc ký khí ghép nối khối phổ	Gas chromatography – Mass spectrometry
IDL	Giới hạn phát hiện của thiết bị	Instrument Detection Limit
LC/MS	Sắc ký lỏng ghép nối khối phổ	Liquid chromatography – Mass spectrometry
LC-MS/MS	Sắc ký lỏng ghép nối khối phổ hai lần khối phổ	Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry
LOD	Giới hạn phát hiện	Limit Of Detection
LOQ	Giới hạn định lượng	Limit Of Quantitation
MDL	Giới hạn phát hiện phương pháp	Method Dectection Limit
MQL	Giới hạn định lượng phương pháp	Method Quantitation limit
MeOH	Methanol	Methanol
OPE	Este cơ photphat	Organophosphate este
OPFRs	Chất chống cháy photpho hữu cơ	Organophosphate flame retardants

POD	Điểm khởi đầu	Point Of Departure
RSD	Độ lệch chuẩn tương đối	Relative Standard Deviation
SD	Độ lệch chuẩn	Standard Deviation
S/N	Tỷ lệ tín hiệu chia cho nhiễu nền	Signal to noise ratio
SPE	Chiết pha rắn	Solid Phase Extraction
TDCPP	Tris (1,3-dichloro-2-propyl) phosphate	Tris (1,3-dichloro-2-propyl) phosphate
TFA	Trifluoroacetic acid	Trifluoroacetic acid

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Công thức cấu tạo của TDCPP và BDCPP **Error! Bookmark not defined.**

Hình 3.1. Đường chuẩn của BDCPP khoảng nồng độ 50 – 1000 ng/ml **Error! Bookmark not defined.**

Hình 3.2. Quy trình chiết tách BDCPP trong nước tiêu **Error! Bookmark not defined.**

Hình 3.3. Phân bố nồng độ chất chuyển hóa BDCPP theo độ tuổi **Error! Bookmark not defined.**

Hình 3.4. Phân bố nồng độ chất chuyển hóa BDCPP theo giới tính **Error! Bookmark not defined.**

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Điều kiện chiết tách của một số nghiên cứu	10
Bảng 1.2. Điều kiện phân tích trên thiết bị LC-MS/MS của một số nghiên cứu	13
Bảng 2.1. Khảo sát các cột chiết BDCPP trong nước tiểu	21
Bảng 3.1. Các thông số cài đặt trên LC-MS	25
Bảng 3.2. Các điều kiện phân tích trên LC-MS/MS	26
Bảng 3.3. Chế độ bơm mẫu gradient	26
Bảng 3.4. Điều kiện được sử dụng để phát hiện BDCPP và chất chuẩn đồng hành gắn nhãn đồng vị d_{10} -BDCPP	27
Bảng 3.5. Hiệu suất thu hồi chất phân tích với các loại cột chiết pha rắn	29
Bảng 3.6. Hiệu suất chiết của các dung môi rửa giải khảo sát	30
Bảng 3.7. Kết quả xác định giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng	31
Bảng 3.8. Giá trị MDL của một số nghiên cứu tham khảo	31
Bảng 3.9. Độ lặp lại, độ đúng và độ thu hồi của phương pháp xác định BDCPP	32
Bảng 3.10. Nồng độ BDCPP thu được từ một số mẫu nước tiểu (chưa hiệu chỉnh)	36
Bảng 3.11. Tóm tắt nồng độ chất chuyển hóa BDCPP ban đầu, nồng độ hiệu chỉnh theo trọng lượng riêng và nồng độ hiệu chỉnh theo creatinin trong nước tiểu thu thập tại Hà Nội	38
Bảng 3.12. Phân bố nồng độ BDCPP theo các độ tuổi	41
Bảng 3.13. Kết quả nồng độ BDCPP theo giới tính	43
Bảng 3.14. Liều lượng phơi nhiễm ước tính hằng ngày (ng/kg bw/day) với TDCPP được tính toán từ nồng độ của chất chuyển hóa BDCPP trong nước tiểu thu thập ở Hà Nội	44

MỞ ĐẦU

Chất chống cháy photphat hữu cơ (OPFRs) là một nhóm các chất chống cháy được sử dụng để thay thế các chất chống cháy diphenyl ether polybrom hóa kể từ khi chất này bị loại bỏ năm 2004. Tris (1,3-dichloro-2-propyl) phosphate (TDCPP) là một trong những chất chống cháy este phosphate hữu cơ được sử dụng rộng rãi nhất Châu Á, thường được sử dụng trong bột polyurethane dẻo và cứng [1]. Chất chống cháy này có thể dễ dàng xâm nhập vào môi trường từ các sản phẩm tiêu dùng như vải bọc xe hơi, sản phẩm tiêu dùng, các hóa chất chế biến và các sản phẩm xốp dành cho trẻ em [2,3].

Đã có những nghiên cứu chứng minh rằng TDCPP đã được phát hiện trong bụi từ nhà riêng, tòa nhà văn phòng và ô tô cho thấy rằng phần lớn dân số bị phơi nhiễm mãn tính với TDCPP theo nhiều con đường khác nhau. Trong đó con đường gây phơi nhiễm TDCPP đã được kiểm tra vào năm 1981, nghiên cứu cho thấy con đường hấp thu của nó qua đường tiêu hóa được chuyển hóa nhanh chóng và rộng rãi. Trong 24 giờ đầu tiên, hơn 80 % hoạt tính được bài tiết qua nước tiểu, phân hoặc dưới dạng thở CO₂. Các enzyme microsome đã chuyển hóa TDCPP thành ba chất chuyển hóa, trong đó chất chuyển hóa chính được thải trừ qua nước tiểu là Bis (1,3-dichloro-2-propyl) phosphate (BDCPP) [4]. BDCPP là chất chuyển hóa đã được phát hiện trong nước tiểu của con người khi TDCPP có trong bụi xung quanh, điều này cho thấy TDCPP được chuyển hóa bởi gan người và gây ảnh hưởng xấu cho sức khỏe con người [5].

Theo thống kê tới thời điểm hiện tại, ở Việt Nam chưa có nghiên cứu nào liên quan đến việc đánh giá mức độ phơi nhiễm của TDCPP ở người và sự ảnh hưởng của các hợp chất TDCPP, BDCPP tới sức khỏe con người. Do đó việc nghiên cứu xây dựng quy trình định lượng BDCPP trong nước tiểu người để đánh giá mức độ phơi nhiễm và rủi ro sức khỏe của TDCPP và BDCPP ảnh hưởng tới con người là rất quan trọng và cần thiết triển khai.

Vì vậy, đề tài “**Nghiên cứu phân tích Bis (1,3-dichloro-2-propyl) phosphate trong nước tiểu bằng phương pháp sắc ký lỏng ghép nối khối phổ hai lần (LC-MS/MS)**” được lựa chọn thực hiện với mục tiêu là: Nghiên cứu xây dựng một quy trình chiết tách Bis (1,3-dichloro-2-propyl) phosphate trong mẫu nước tiểu của con người và thực hiện xác định hàm lượng bằng phương pháp sắc ký lỏng ghép nối hai lần khối phổ (LC-MS/MS). Trên cơ sở đó thực hiện phân tích trên một số lượng mẫu nước tiểu thu thập ngẫu nhiên trên địa bàn Hà Nội, từ đó đánh giá mức độ phơi nhiễm của người dân đối với chất chống cháy TDCPP.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. Tris (1,3-dichloro-2-propyl) phosphate trong môi trường không khí trong nhà, sản phẩm tiêu dùng và mẫu sinh học của người.

Tris (1,3-dichloro-2-propyl) phosphate (TDCPP) có công thức phân tử là $C_9H_{15}Cl_6O_4P$. Đây là một hóa chất hữu cơ halogen lỏng, nhớt không màu, có chứa phot pho. Nó được sử dụng rộng rãi trong các sản phẩm tiêu dùng khác nhau với lượng sản xuất lớn như bột polyurethane, vật liệu xây dựng, đồ nội thất, sơn phủ, sản phẩm chăn ga gối đệm, sản phẩm trẻ em và nó là chất thay thế quan trọng cho Ete diphenyl poly brom hóa (PBDE). TDCPP có xu hướng được thải ra môi trường thông qua nhiều con đường như quá trình lọc, bay hơi và mài mòn[6].

Dựa vào các đặc điểm của TDCPP như áp suất hơi, điểm sôi, điểm nóng chảy, hệ số phân chia nước-octanol, có một số nghiên cứu đã dự đoán sự phân bố khác nhau của TDCPP bằng phần mềm mô hình[7], mặc dù TDCPP được chuyển hóa nhanh chóng với thời gian bán hủy ngắn và độ bền thấp, nhưng trong môi trường thực tế, TDCPP phân bố khá phổ biến trong bụi (trong nhà và ngoài trời), nước, đất, trầm tích, các mẫu sinh học. Năm 2017 đã có thống kê mức TDCPP bụi trong nhà tối đa lên tới 2,14 mg/g tính trên trọng lượng khô ở California. Tương tự, phát hiện ra rằng mức TDCPP trung bình trong không khí trong nhà ở các trường mẫu giáo Trung Quốc và tiểu học Hong Kong là 15,00 ng/m³, TDCPP phổ biến trong các môi trường như phòng ngủ, khu vực sinh hoạt chính, văn phòng và xe cộ và nguồn chính gây ra chính là từ đồ nội thất bọc và các sản phẩm khác chứa Polyurethan. Ngoài việc được giải phóng vào khí quyển, TDCPP có được vận chuyển và tích lũy thêm trong đất, trầm tích. Cho đến nay một số nghiên cứu đã báo cáo sự hiện diện phong phú của TDCPP trong các loại đất khác nhau, nhìn chung nồng độ TDCPP cao được tìm thấy ở các khu vực đô thị hóa, công nghiệp hóa hoặc chất thải điện tử [6].

Năm 1981, TDCPP đã được phát hiện một lượng đáng kể trong các mẫu huyết tương, tinh dịch nam giới, do đó nó đã chỉ ra rằng con người đã tiếp xúc rộng rãi với TDCPP những năm 1980. TDCPP được phát hiện trong sữa mẹ, nhau thai, huyết tương và mẫu nước tiểu của người, ví dụ, Kim và cộng sự năm 2014 đã tìm thấy mức TDCPP trong sữa mẹ ở Nhật bản có thể đạt tới 162 ng/g, TDCPP cũng được phát hiện trong 36,7 % huyết tương người ở Hà Bắc, Trung Quốc. TDCPP được phát hiện trong nhau thai ở miền đông Trung Quốc, nó cho thấy nguy cơ tiềm ẩn lây truyền sang trẻ sơ sinh và gây lo ngại về độc tính tiềm ẩn và ảnh hưởng sức khỏe đối với nhiều thế hệ con người [6].

Chất chuyển hóa BDCPP và chất chống cháy TDCPP đã được phát hiện một lượng đáng kể ở chất dịch cơ thể người, bao gồm huyết tương, tinh dịch, sữa mẹ, nhau thai và nước tiểu. Do đó gây lo ngại về các tác động tiềm ẩn đối với sức khỏe con người do phơi nhiễm. TDCPP đã được chứng minh gây ra độc tính cấp tính, thần kinh, sinh sản, gan và rối loạn nội tiết và nó đã được đề xuất chất gây ung thư trong đề xuất 65. TDCPP đã được phân loại là một hợp chất có mức ưu tiên cao, rất cần có các nghiên cứu độc tính sâu hơn hoặc các biện pháp quản lý được đưa ra [6].

Vào năm 2011, TDCPP đã được Văn phòng Đánh giá Nguy cơ Sức khỏe Môi trường, Cơ quan Bảo vệ Môi trường Tiêu bang California thêm vào danh sách các hóa chất đề xuất như một chất gây ung thư, phát hiện thường xuyên chất này trong đồ nội thất Hoa kỳ và có đủ bằng chứng về khả năng gây ung thư. TDCPP đã được Ủy ban An toàn Sản phẩm tiêu dùng liệt kê là chất gây ung thư[8]. Thêm đó các nghiên cứu về độc tính của TDCPP trên hệ sinh vật thủy sinh, chẳng hạn như cá, ngựa vằn[9]. Năm 2017, Ủy ban An toàn Sản phẩm tiêu dùng Hoa kỳ (CPSC) đã chấp nhận đơn yêu cầu cấm bất kỳ thành phần nào thuộc nhóm halogen hữu cơ trong các sản phẩm dành cho trẻ em, vỏ bọc điện tử, đồ nội thất và ga trải giường. Tuy nhiên, nhiều quốc gia bao gồm trung Quốc, Nhật Bản và Hàn Quốc vẫn có rất ít hạn chế đối với việc sản xuất và áp dụng TDCPP[6].

Tính tới thời điểm hiện tại, thì tại Việt Nam chưa có nghiên cứu thống kê nào về mức độ phân bố của TDCPP trong môi trường.

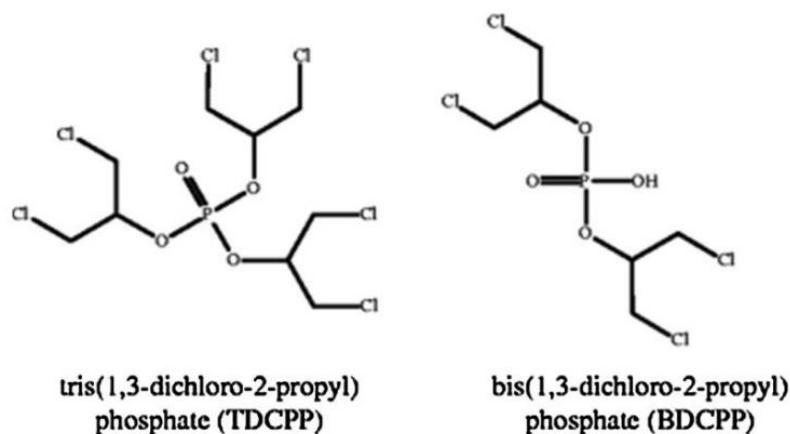
1.2. Chất chuyển hóa Bis (1,3-dichloro-2-propyl) photphat của chất chống cháy TDCPP trong quá trình chuyển hóa hoạt động sinh học ở người.

Bis (1,3-dichloro-2-propyl) phosphite (BDCPP) có công thức phân tử là $C_6H_{11}Cl_2O_4P$. Các thông số hóa lý cơ bản như khối lượng mol phân tử 319,935 Da; Trọng lượng riêng $1,5 \pm g/cm^3$; Nhiệt độ sôi $396,8 \pm 52 \text{ }^\circ C$ ở 760 mmHg; Áp suất hơi $0,0 \pm 2,0 \text{ mmHg}$. Đây là một hợp chất có độ phân cực cao, hằng số phân ly $pK_a \sim 1,18$ [10].

Con người tiếp xúc với chất chống cháy TDCPP thông qua nhiều con đường bao gồm tiếp xúc qua da, hít phải không khí, cũng như thức ăn, bụi. TDCPP có thể được chuyển hóa nhanh chóng trong gan người và các hợp chất chuyển hóa được theo dõi phổ biến nhất.

Do tính ứng dụng rộng rãi của TDCPP sử dụng trong ô tô, đồ đạc trong nhà và các sản phẩm khác chứa polyurethane. Nhiều nghiên cứu chứng minh rằng TDCPP

được tìm thấy trong không khí và cho thấy rằng một phần lớn dân số bị phơi nhiễm mãn tính với TDCPP. Một trong những nhiệm vụ của nhóm làm việc phân tích Vật liệu sinh học từ Quỹ Nghiên cứu Đức (DFG), họ đã xây dựng một quy trình giám sát sinh học của con người đối với TDCPP. Quá trình chuyển hóa của TDCPP được mô tả trong các nghiên cứu invitro khác nhau và người ta đã chỉ ra rằng BDCPP là hợp chất chuyển hóa cụ thể chính của TDCPP thường được phát hiện trong nước tiểu. Nó là chất thích hợp nhất vì không có OPFR nào khác được biết đến bị chuyển đổi hoặc thủy phân thành BDCPP. Các con đường phơi nhiễm thì rất phức tạp, TDCPP bị phân hủy và chuyển hóa nhanh chóng. Trong 24 giờ đầu tiên, hơn 80% hoạt tính phóng xạ được bài tiết qua nước tiểu, các enzyme micromsome đã chuyển hóa TDCPP thành ba chất chuyển hóa và chất chuyển hóa chính là Bis (1,3-dichloro-2-propyl) phosphate (BDCPP)[11].



Hình 1.1. Công thức cấu tạo của TDCPP và BDCPP

Theo nghiên cứu của tác giả Tenlep và cộng sự[12], quá trình chuyển hóa của TDCCP được thực hiện trên chuột. Năm ngày sau khi tiêm tĩnh mạch, 92% chất phóng xạ được sử dụng bài tiết qua nước tiểu (54%), phân (16%) và khí thở ra (22%), 4% được phục hồi trong cơ thể. Chất chuyển hóa chính được tìm thấy trong nước tiểu, phân và mật là BDCPP, tương tự trên gan người cũng vậy[12]. Một nghiên cứu đối với người ở Hoa kỳ, 90% BDCPP được tìm thấy trong nước tiểu [13].

Một nghiên cứu sử dụng phương pháp giám sát sinh học để mô tả mức độ phơi nhiễm chất chống cháy của 36 lính cứu hỏa được giao nhiệm vụ ở bên trong, bên ngoài, trước và sau khi ứng phó với các tình huống hỏa hoạn. Lính cứu hỏa đã cung cấp 4 mẫu nước tiểu (trước đám cháy, 3 giờ, 6 giờ, 12 giờ sau đám cháy). Kết quả cho thấy nồng độ BDCPP, một chất chuyển hóa của chất chống cháy TDCPP của những người lính cứu hỏa đã được giao nhiệm vụ bên trong có nồng độ cao hơn với

những người giao nhiệm vụ bên ngoài, nó cho thấy BDCPP có thể tồn tại trong cơ thể trong vài ngày sau khi tiếp xúc [14].

Yu wanga và cộng sự (2019)[15] đã nghiên cứu định lượng chất chuyển hóa OPFR trong nước tiểu của 19 tình nguyện viên từ Albany, New York, Hoa Kỳ. Kết quả cho thấy 2 chất chuyển hóa chính được tìm thấy là Dipheny phosphate (DPPH) và BDCPP. Hai chất này được phát hiện trong tất cả các mẫu nước tiểu ở nồng độ được điều chỉnh theo trọng lượng riêng lần lượt là 1060 pg/ml và 414 pg/ml, đối với điều chỉnh theo creatinine nồng độ lần lượt là 404 ng/g và 156 ng/g [15].

Nghiên cứu này chúng tôi sẽ tập chung vào hợp chất chuyển hóa BDCPP trong nước tiểu người từ chất chống cháy TDCPP. Do đây là chất chuyển hóa chính trong 3 chất chuyển hóa có mặt trong mẫu sinh học và dễ thu thập mẫu nhất.

1.3. Nguy cơ tác động đến sức khỏe con người của TDCPP và BDCPP.

Hóa chất chống cháy có một lịch sử lâu đời về việc gây tác hại tới sức khỏe con người. Năm 1973, các gia đình vùng nông thôn ở Michigan đã tiếp xúc với chất chống cháy PBB ở mức độ cao khi đi vào thức ăn và gây nhiều ảnh hưởng nghiêm trọng tới sức khỏe. Tiếp theo là chất chống cháy PBDEs, sau khi thông tin về sự nguy hiểm của PBDE được biết đến rộng rãi, các cơ quan lập pháp đã hành động cấm chất chống cháy. Cuối cùng, các nhà sản xuất hóa chất đã được thỏa thuận với Cơ quan bảo vệ môi trường Hoa Kỳ để ngừng sản xuất PDBE. Thay vào đó họ đã tìm đến những chất thay thế dễ dàng hơn, nhưng mỗi chất chống cháy lại có những độc hại riêng của chúng. Đến những năm 2006, TDCPP hiện là một trong những hóa chất hàng đầu được sử dụng để xử lý bột polyurethane để chống cháy, đã có khoảng 10 đến 50 triệu tấn đã được sản xuất và nhập khẩu vào hoa kỳ[16].

TDCPP được tiểu bang California chỉ định là chất gây ung thư theo dự luật 65 vào tháng 10 năm 2011 dựa trên các nghiên cứu trong phòng thí nghiệm cho thấy sự gia tăng các khối u ở thận, gan và tinh hoàn cũng như bằng chứng về khả năng gây đột biến[17].

Một nghiên cứu được công bố vào năm 2010 cho thấy nam giới tiếp xúc nhiều với TDCPP có lượng hormone tuyến giáp thấp hơn, giảm số lượng tinh trùng và lượng prolactin cao hơn. Nghiên cứu đã đánh giá mức độ phơi nhiễm bằng cách xác định mức độ chất chống cháy trong bụi nhà và lượng hormone đo được trong huyết thanh[6, 18].

Trong nghiên cứu của nhóm tác giả người Trung Quốc[19], họ đã thực hiện nghiên cứu trên nhóm người đái tháo đường tuýp 2 và họ xây dựng mối liên quan giữa OPFR với các chất chuyển hóa của steroid. Kết quả cho thấy quá trình tổng hợp hormone steroid đối với người đái tháo đường tuýp 2 bị thay đổi nhiều nhất khi nồng độ OPFR tăng cao, do đó kết luận rằng những người có nguy cơ mắc bệnh đái tháo đường khi tiếp xúc với OPFR [19].

Blum và cộng sự đã có báo cáo chỉ ra rằng giá trị POD (nồng độ thấp nhất mà tác dụng gây ra về mặt hóa học) của TDCPP ở động vật gặm nhấm trong thí nghiệm In vitro nằm trong phạm vi phơi nhiễm của con người, do đó đã gợi ý rằng tác động sức khỏe của TDCPP ở con người đáng được chú ý và các nghiên cứu về độc tính TDCPP trong các mô hình trên tế bào có nguồn gốc từ con người hoặc dịch tế ở người. Nhiều nghiên cứu In vitro đã chứng minh sự hình thành các loại oxy phản ứng (ROS) tăng lên do tiếp xúc với TDCPP trong các dòng tế bào khác nhau của con người. Nhà nghiên cứu Killilea đã đánh giá độc tính tế bào gây ra do tiếp xúc với TDCPP bằng cách sử dụng dòng tế bào HK-2 (ống gần thần biến đội 16pa pillomavirus ở người). Tiếp xúc với TDCPP đã ức chế tốc độ tăng trưởng của tế bào và khả năng tồn tại của tế bào, đồng thời ức chế quá trình tổng hợp protein và khiến chu kỳ tế bào ngừng hoạt động [6].

Thêm vào đó các nhà nghiên cứu đã bắt đầu xem xét liệu TDCPP có giống như các hóa chất tương tự khác, có thể gây hại cho hệ thần kinh hay không. Một nghiên cứu năm 2011 đã thử nghiệm tác hại của hóa chất này đối với sự phát triển của não và so sánh tác dụng của nó với tác dụng của chlorpyrifos – một loại thuốc trừ sâu độc hại đối với hệ thần kinh, thì kết quả cho thấy TDCPP còn độc hại hơn [20].

Kathryn A. Crawford và các cộng sự đã thực hiện nghiên cứu phân tích BDCPP, BCEP, DPHP trong mẫu nước tiểu của các mẹ bầu ở những tuổi thai 12, 28, 35 tuần tuổi. Sau đó theo dõi giữa nồng độ các chất chuyển hóa chống cháy với cân nặng, chiều dài, chu vi vòng đầu và bụng của trẻ sơ sinh, độ dày nếp gấp da khi sinh và 6 tuần sau khi sinh. Kết quả cho thấy với khả năng phơi nhiễm xảy ra trong giai đoạn đầu mang thai có liên quan chặt chẽ với các ảnh hưởng xấu đến nội tiết và sự phát triển so với phơi nhiễm xảy ra giai đoạn sau. Các nhà nghiên cứu chỉ ra rằng BDCPP có liên quan đến cả sự tăng trưởng của trẻ sơ sinh và tăng khả năng phản ứng với đồ ăn trong 6 tuần đầu sau khi sinh; DPHP giúp tốc độ tích tụ mỡ dưới da, nhưng có mối quan hệ nghịch với các phép đo về kích thước; BCEP thì liên quan tích cực tới các thông số thành phần cơ thể trẻ sơ sinh [21].

Hơn nữa, việc tiếp xúc hỗn hợp với các OPFR bao gồm TDCPP đã làm thay đổi các thông số sinh học do stress oxy hóa trong nước tiểu của trẻ em. Ait bamai và cộng sự đã nghiên cứu mối quan hệ giữa hỗn hợp các chất chuyển hóa OPFR trong nước tiểu và các thông số sinh học gây stress oxy hóa trong nước tiểu bao gồm 8-hydroxy-2'-deoxy guanosine (8-OHdG), hexanoyl-lysine (HEL) và 4-hydroxynoneal (HNE) trong số 7 trẻ em ở Hokkaido, đã chứng minh rằng BDCPP có liên quan đến việc tăng mức độ HEL và HNE chứ không phải 8-OHdG [6].

1.4. Các phương pháp chiết tách và phân tích BDCPP trong mẫu sinh học và nước tiểu.

Chuẩn bị mẫu có tầm quan trọng quyết định đối với việc phân tích các mẫu sinh học. Máu, huyết tương và nước tiểu là nền mẫu phức tạp hơn nhiều so với nhiều nền mẫu khác do sự hiện diện của protein, muối và các hợp chất hữu cơ khác nhau có tính chất hóa học tương tự với các chất cần phân tích.

Trong phân tích định lượng, đặc biệt là ESI-MS, thường quan sát thấy hiện tượng triệt tiêu tín hiệu do nhiễu ma trận. Do vậy những thay đổi trong quy trình tiền xử lý mẫu có thể giải quyết được vấn đề này. Mục đích của việc chuẩn bị mẫu là để loại bỏ các chất cản trở và làm giàu chất phân tích.

Chất chuyển hóa, chất phân tích trong các chất nền phức tạp như huyết tương, máu, nước tiểu không thể được tiêm trực tiếp vào dụng cụ phân tích mà không làm sạch mẫu hoặc chuẩn bị mẫu. Nếu một phương pháp chuẩn bị mẫu không phù hợp được sử dụng thì việc phân tích đó coi như không có giá trị. Do đó cần chuyển đổi các chất phân tích thành dạng phù hợp hơn, cô đặc trước chất phân tích để cải thiện độ nhạy.

Ngày nay, các phương pháp chuẩn bị mẫu thường được sử dụng là chiết pha rắn (SPE), chiết lỏng – lỏng (LLE) và kết tủa protein (PPT). SPE và LLE là các phương pháp chuẩn bị mẫu quan trọng nhất cho LC-MS [22].

1.5. Các phương pháp chiết tách BDCPP trong mẫu sinh học và nước tiểu.

Để bắt đầu thử nghiệm và lựa chọn một quy trình và kỹ thuật chiết phù hợp chúng ta cần biết và hiểu một số vấn đề như: Đặc tính của chất phân tích, độ ổn định của chất phân tích, phạm vi nồng độ chất phân tích, bản chất của nền mẫu, số lượng mẫu cần phân tích, thời gian, nguồn lực sẵn có. Quy trình của phương pháp chuẩn bị mẫu phải có khả năng thu hồi cao các chất cần phân tích.

Độ ổn định của chất phân tích trong mẫu nên được kiểm tra ngay từ đầu. Việc lưu trữ cũng quan trọng nhưng việc lựa chọn kỹ thuật chiết tách do nó có thể bị nhiễm bẩn bởi thành phần vật chứa không phù hợp. Đối với các hợp chất dễ bay hơi như halothane hoặc các hợp chất ưa béo cao thì hộp và nút đậy bằng nhựa là không phù hợp.

Để tối ưu hóa quy trình chiết tách cần khảo sát, lựa chọn chính xác các thông số sau đây do nó ảnh hưởng trực tiếp tới hiệu quả chiết tách [23]:

- Loại dung môi sử dụng: Độ phân cực, mật độ là các yếu tố quyết định sự hòa tan của các chất phân tích đó trong dung môi. Vai trò chính của dung môi là hòa tan các chất cần phân tích cũng như loại bỏ các yếu tố ảnh hưởng trong nền mẫu (theo các dữ liệu được công bố thì dichlorimethane, hexan (1:1) hoặc hexan – acetone (1:1) thường được sử dụng cho chiết tách các chất chống cháy cơ photpho).

- Thời gian chiết tách, số vòng chiết tách (đối với thiết bị chiết áp lực cao).

- Nhiệt độ của quá trình chiết: Hiệu quả chiết tách thường tăng tỷ lệ thuận với sự gia tăng nhiệt độ. Điều này là do giảm độ nhớt của dung môi, cho phép dung môi thâm thấu vào bề mặt. Tuy nhiên, nếu nhiệt độ quá cao của quá trình chiết tách làm tăng sự rửa trôi các chất gây cản trở hoặc có thể phân hủy các chất phân tích làm giảm nồng độ của các chất phân tích.

Một số phương pháp chiết đang được sử dụng phổ biến hiện nay như:

- Chiết pha rắn (SPE): là một kỹ thuật chiết xuất trong đó các hợp chất bị hòa tan hoặc lơ lửng trong một hỗn hợp lỏng được tách ra khỏi các hợp chất khác trong hỗn hợp theo các tính chất vật lý và hóa học của chúng. Kỹ thuật này đang được ưa thích để chiết xuất thuốc, chất chuyển hóa từ các mẫu sinh học do tính chọn lọc của nó. Các thông số quan trọng nhất trong SPE bao gồm lựa chọn loại và lượng chất hấp thụ, xác định thể tích mẫu, thành phần và thể tích dung dịch rửa giải. SPE có 3 cơ chế rửa giải, đầu tiên là pha đảo ngược (RP-SPE); thứ hai là SPE pha thường và cuối cùng là SPE trao đổi ion.

- Chiết Lỏng – Lỏng (LLE): Được sử dụng để chiết các chất phân tích từ mẫu lỏng sang dung môi hữu cơ bằng cách trộn và lắc dung môi hữu cơ không thể trộn lẫn với nước (ví dụ như huyết tương, nước tiểu hoặc huyết thanh). Ở kỹ thuật này, độ pH của mẫu, pKa của chất phân tích và sự phân bố hệ số phân chia của chất phân tích giữa các pha hữu cơ và pha nước có vai trò quan trọng đối với quá trình chiết. Mặc

dù LLE có khả năng làm sạch mẫu vượt trội nhưng một loạt các hợp chất khác có thể được đồng chiết xuất.

- Kết tủa protein (PPT): Xảy ra bằng cách thêm dung môi hữu cơ, ion kim loại, muối hoặc axit vào huyết tương hoặc máu. Các dung dịch PPT phổ biến là các dung môi hữu cơ (methanol, axetonitril hoặc axeton), các ion kim loại (kẽm sunfat), dung dịch tạo ra muối (nhôm clorua) hoặc các dung dịch được tạo ra bằng cách thêm các axit như trichloroacetic, perchloric, metaphosphoric và Woltamic axit. Vì vậy, chất phân tích phải ổn định ở các giá trị pH thấp và cao.

Nhà nghiên cứu Dirtu và cộng sự đã phân loại nước tiểu của con người là một nền mẫu có lợi vì hàm lượng lipid và protein thấp và có thể tích mẫu lớn đáp ứng khi cần làm giàu mẫu đối với nồng độ chuyển hóa thấp [24]. Tuy nhiên, chất nền có thể chứa quá trình proton hóa trước chiết xuất làm cho việc chiết xuất trở nên khó khăn. Việc chiết tách các chất chuyển hóa PFR từ nước tiểu chủ yếu được thực hiện bằng phương pháp chiết pha rắn SPE. Các chất hấp thụ trao đổi ion chứa các nhóm tích điện mạnh có thể tương tác với các chất phân tích thông qua tương tác anion. Để loại bỏ sự tương tác này và thu hồi các chất phân tích cần thêm một dung môi hữu cơ có tỷ lệ nhỏ bazơ. Trong đó 2 chất hấp thụ trao đổi anion yếu phổ biến được sử dụng là Oasis WAX và StrataX-AW, cho hiệu suất tốt nhất trong việc chiết xuất các chất chuyển hóa PFR từ mẫu nước tiểu. Độ thu hồi của nó đạt từ 75-113 %.

Các nhà nghiên cứu như Thomas F. Webster và cộng sự [25]; Yu Wanga và cộng sự [19] đã thực hiện xử lý mẫu trước khi định lượng chất chuyển hóa của chất chống cháy trong nước tiểu với kỹ thuật chiết xuất pha rắn (SPE). Ở đây các nhà nghiên cứu đã sử dụng các cột và vật liệu hấp phụ là Strata-X-AW sau đó đem phân tích trên hệ thống LC-MS/MS. Kết quả đánh giá được mức độ phơi nhiễm của TDCPP và TPHP trong con người qua nhiều năm dựa trên nồng độ của BDCPP và DPHP trong nước tiểu. Minmin Hou và cộng sự [26] đã nghiên cứu phân tích OPE và di-OPE trong các mẫu máu (máu toàn phần và huyết thanh) và mẫu nước tiểu cũng được chiết xuất với kỹ thuật chiết pha rắn. Đối với nền mẫu là máu sử dụng ống chiết ENVI-18 được chiết tuần tự với axetonitril và nước deion, sau đó rửa giải bằng DCM : ACN (25 : 75). Đối với quy trình chiết Di-OPE, dịch chiết được thay thế bằng methanol và được nạp vào cột chiết HLB. Đối với các mẫu nước tiểu được thêm nội chuẩn và độ pH được điều chỉnh bằng dung dịch đệm amoni axetat (10 mM, pH = 5) sau đó được làm sạch qua cột có chất hấp phụ Strata-X-AW, dịch rửa giải bằng amoni hydroxit 5 % trong methanol.

Một nghiên cứu khác của tác giả Yongqing Ma và cộng sự [27] đã xây dựng phương pháp phân tích để xác định 14 chất chống cháy photpho hữu cơ trong mẫu sinh học đã được phát triển bằng phương pháp sắc ký khí khối phổ (GC/MS). Các mẫu sinh học được chiết xuất bằng phương pháp chiết xuất có hỗ trợ vi sóng (MAE) với hexan/axeton (1:1, v/v) làm dung môi, sau đó sử dụng kỹ thuật làm sạch hai bước, sắc ký thẩm thấu gel (GPC) kết hợp với chiết xuất pha rắn (SPE). Kết quả thí nghiệm cho thấy rằng phương pháp đã loại bỏ hiệu quả các hợp chất lipid và các chất cản trở trong mẫu.

Thêm nữa, phương pháp QuEChERS cũng được áp dụng cho các hợp chất OPFR có trong sữa mẹ. Tác giả Beser và cộng sự [28] kết quả cho độ thu hồi đạt 94 - 110 % đối với các hợp chất OPFR (trimethyl phosphate (TMP), triethyl phosphate (TEP), tris (chloroethyl) phosphate (TCEP), triisopropyl phosphate (TiPrP), tri-n-propyl phosphate (TPrP), triphenyl phosphate (TPP), tri-n-butyl phosphate (TNBP) trong sữa mẹ bằng phương pháp làm sạch QuEChERS, sử dụng NaCl và MgSO₄. Quá trình tiếp theo là làm sạch bằng SPE được báo cáo là phương pháp lựa chọn để theo dõi sinh học OPFR ở tóc và móng tay. Tương tự Alves và cộng sự đã xây dựng phương pháp để phân tích 4 chất chuyển hóa (DHP, DPB, BDCIPP và BBOEP) trong tóc và móng tay. Họ sử dụng phương pháp phân hủy axit, sau đó dịch chiết được làm sạch bằng phương pháp SPE với chất hấp phụ là Oasis Wax, độ thu hồi đạt 74 - 102 % trên tóc và 85 - 110 % trong nền móng tay. Dưới đây bảng tham khảo về điều kiện chiết tách của một số phương pháp xử lý mẫu được tìm hiểu.

Bảng 1.1. Điều kiện chiết tách của một số nghiên cứu

Chất phân tích	Điều kiện chiết tách	TLTK
Dipropyl phosphate (DPRP), DNBP, diisobutyl Phosphate (DIBP), BBOEP, bis(2-Ethylhexyl) phosphate (BEHP), BCEP, BCIPP, BDCPP, DPHP và BMPP trong nước	<ul style="list-style-type: none"> - Sử dụng 1 ml mẫu nước tiểu sau đó thêm 2 ng hỗn hợp chuẩn nội; - Tiếp theo điều chỉnh pH bằng cách bổ sung 1 mL dung dịch đệm amoni axetat (10 mM, pH = 5). Sau đó lắc xoáy trong vòng phút. - Mẫu được nạp vào hộp chiết Strata-X-AW (60 mg/cm³) hoạt hóa với 2 mL methanol và 2 mL nước. - Tiếp theo được rửa giải với 2 mL amoni hydroxit 5% trong methanol. Dung dịch rửa giải được cô đặc 	[15]

<p>tiêu và các chất nội chuẩn</p>	<p>đến gần khô dưới dòng khí nitơ nhẹ và được hoàn nguyên với 100 μL axetonitril.</p> <p>- Cuối cùng mẫu được ly tâm và lọc qua bộ lọc nylon 0,22 μm, Spin-X, Costar, Corning Inc., Corning, NY, U.S.</p>	
<p>Diphenyl phosphate (DPHP), diethyl phosphate (DEP), di-n-butyl phosphate (DNBP), bis(2-ethylhexyl) phosphate (BEHP), BDCPP trong nước tiêu.</p>	<p>Sử dụng 5 mL nước tiêu được chuyển vào một ống thủy tinh và thêm 10 ng mỗi chất chuẩn nội (d_{10}-diphenyl phosphate (d_{10}-DPHP), d_{10}- BDCPP, d_8-BBOEP.</p> <p>Sau đó mẫu được pha loãng theo tỷ lệ 1:1 (v/v) với nước Milli-Q và được axit hóa đến pH 6,5 bằng axit axetic 0,1 M.</p> <p>Tiếp theo nạp mẫu vào hộp chiết Strata-X-AW đã hoạt hóa với 3 mL methanol và 3 mL nước Milli-Q, nạp mẫu với tốc độ 0,5 mL/phút, các hộp được tráng bằng 3 mL nước Milli-Q và làm khô bằng khí nitơ trong 5 phút.</p> <p>Các hợp chất được rửa giải bằng 2 mL acetonitril chứa 5 % pyrrolidine hai lần. Dịch rửa giải kết hợp được cô dưới dòng khí nitơ thổi nhẹ đến gần khô, hoàn nguyên với 0,5 mL nước Milli-Q/MeOH (4 : 1, v/v) và lọc qua màng lọc Polytetrafluoroetylen ưa nước 0,22 μm.</p>	[29]
<p>Phân tích trong mẫu huyết thanh: 16 OPEs trong huyết thanh.</p>	<p>Lấy 3 mL huyết thanh, sau đó thêm vào một lượng chất nội chuẩn (50 ng TCEP-d_{12} và 50 ng TPhP-d_{15}), tiếp theo thêm 6 mL axeton.</p> <p>Mẫu được chiết 2 lần với 4 mL hỗn hợp hexan / metyl tert-butyl ete (1 : 1, v:v), sau đó dịch chiết được rửa bằng 4 mL dung dịch kali clorua (1 % w / w).</p> <p>Tiếp theo dịch chiết được làm sạch bằng cách sử dụng cột sắc ký thẩm thấu gel (GPC), sau đó là cột silica gel và alumin nhiều lớp.</p> <p>Cuối cùng, được cô đặc đến 100 μL để phân tích.</p>	[30]

1.6. Các phương pháp phân tích Bis (1,3-dichloro-2-propyl) photphat trong mẫu sinh học và nước tiểu.

Việc phân tích xác định hàm lượng các chất chống cháy và đánh giá mức độ phơi nhiễm của chúng trên cơ thể người là rất cần thiết. Hiện nay trên thế giới các nhà nghiên cứu đặc biệt chú tâm trong việc phân tích các chất chuyển hóa trong nước tiểu người của chất chống cháy photphat hữu cơ để theo dõi mức độ phơi nhiễm của OPFRs trên cơ thể người.

Hiện tại, các tính chất hóa học và vật lý của OPFRs và các chất chuyển hóa của chúng là yếu tố quyết định trong việc lựa chọn thiết bị. Một số phương pháp đã được các tác giả xây dựng và phát triển thành công để định lượng chất chống cháy OPFRs hoặc các chất chuyển hóa của OPFRs trong nước tiểu người như phương pháp sắc ký khí (GC) hoặc sắc ký lỏng (LC) ghép nối với khối phổ.

Cooper E.M. và cộng sự [31] đã xây dựng phương pháp phân tích định lượng BDCPP và DPP (đây là hai chất chuyển hóa chính của chất chống cháy TDCPP và TPP) trong nước tiểu người trưởng thành bằng phương pháp sắc ký lỏng ion hóa hóa học áp suất khí quyển ghép nối khối phổ hai lần. Giới hạn phát hiện của phương pháp là 8 pg/mL đối với BDCPP và 204 pg/mL đối với DPP. Độ thu hồi của các chất phân tích được thêm vào nước tiểu nằm trong khoảng từ $82 \pm 10 \%$ đến $91 \pm 4 \%$ đối với BDCPP và từ $72 \pm 12 \%$ đến $76 \pm 8 \%$ đối với DPP [31].

Van den Eede và cộng sự [32] đã thực hiện phân tích so sánh trên hai phương pháp là sắc ký khí ghép nối khối phổ hai lần với hệ EI dương (GC-MS/MS-EI⁺) và sắc ký lỏng ghép nối khối phổ hai lần với hệ ESI âm (LC-MS/MS-ESI⁻) để phân tích các chất chuyển hóa OPFRs trong nước tiểu. Cả hai kỹ thuật đều cho kết quả tốt đối với một số hợp chất riêng lẻ, như LC-MS/MS có LOQ thấp hơn đối với DPHP và BBOEP (tương ứng là 0,3 và 0,15 ng/mL), trong khi đó GC-MS/MS có LOQ thấp hơn nhiều so với LC-MS/MS đối với BCEP, BCPP, BCDPP (tương ứng 0,1 ; 0,06; 0,02 ng/mL) [34]. Các tác giả đã đề xuất kỹ thuật LC-MS/MS như một phương pháp chung dựa vào thời gian phân tích, tuy nhiên GC-MS/MS được khuyến nghị cho các diakyl photphat clo hóa (DAP) vì tính kỵ nước và khả năng ion hóa của chúng là cho chúng phù hợp hơn với kỹ thuật này.

Do chất nền của mẫu rất phức tạp nên khi sử dụng kỹ thuật phân tích LC/MS có thể dễ bị hình thành các phức bền với các cation kim loại bao gồm Na⁺ để dẫn đến sự hình thành các ion [M⁺Na]⁺ và [2M⁺Na]⁺, gây cản trở làm giảm độ nhạy và phải

được theo dõi để giảm thiểu tác động của chúng đối với hiệu suất tổng thể của phương pháp.

Dưới đây bảng tham khảo một số phương pháp và điều kiện phân tích của một số chất chuyển hóa OPFRs trong nước tiểu :

Bảng 1.2. Điều kiện phân tích trên thiết bị LC-MS/MS của một số nghiên cứu

Chất phân tích	Điều kiện nghiên cứu	Kết quả	TLTK
BDCPP	<ul style="list-style-type: none"> - Thiết bị LC-MS/MS, quá trình ion hóa phun điện tử (ESI) và ion hóa học ở áp suất khí quyển (APCI) được sử dụng đồng thời - Cột Kinetex (kích thước : (100 x 2,1) mm ; 2,6 m ; Phenomenex, Torrance, USA) - Nhiệt độ tiêm 60 °C - Pha động : Nước tinh khiết(A), MeOH (B) - Tốc độ dòng 0,5 mL/phút 0 phút : 90 % A + 10 % B 10 phút : 10 % A + 90 % B 13 phút : 10 % A + 90 % B 13,10 phút : 90 % A + 10 % B 15 phút : 90 % A + 10 % B - Nhiệt độ hóa hơi 150°C, Nhiệt độ khí nitơ 350 °C - Lưu lượng khí 5 mL/phút, áp suất máy phun sương 60 psi - Điện áp mao quản -4000V - Mảnh mẹ : 319 ; 319 ; 318 ; 320 ; 329 	<ul style="list-style-type: none"> - Giới hạn phát hiện (LOD) 0,06 ng/mL - Giới hạn định lượng (LOQ) 0,2 ng/mL - Độ lặp lại 3,1-6,5 % - Độ tái lặp 5,5 -8,5 % - Độ thu hồi 80 -120 % - Độ không đảm bảo đo 15%. <p>Các mẫu có nồng độ Creatinine tăng dần dẫn đến nồng độ BDCPP tăng dần.</p>	[11]

	-Mảnh con : 35,1 ; 37 ; 35,1 ; 35,2 ; 35,1		
BDCPP ; BCPP ; DPHP	<p>Thiết bị LC-MS/MS</p> <p>Cột C18(2) (50 x 2,0 mm, kích thước hạt 2,5 μm, Phenomenex), hộp bảo vệ Security Guard Polar-RP (4 x 2,0mm)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pha động MeOH, nước (amoni axetat 0,8mM) - Tốc độ dòng chảy 300 μL/phút - Nhiệt độ lò cột 45°C - Chương trình gradient : 90 : 10 (nước : methanol) giữ trong 3 phút, tăng lên 5 : 95 trong 4 phút, giữ trong 2 phút, trở về điều kiện ban đầu trong 2 phút và giữ trong 6 phút. 	Giới hạn phát hiện(ng/mL) của các chất BCPP ; BDCPP ; DPHP ; ip-DPHP ; tb-DPHP lần lượt là : 0,12; 0,02 ; 0,18 ; 0,09 ; 0,09	[33]
BDCPP, DPP	<p>Thiết bị LC-MS/MS</p> <ul style="list-style-type: none"> - Cột nhồi Synergi Polar-RP (Phenomex) - Pha động amoni axetat 10 mM (A), Metanol (B) - Chương trình gradient : ban đầu 25 % B lên 95 % B trong 5 phút và giữ trong 5 phút, sau đó giữ 5 phút ở 25% B. - Tốc độ dòng 0,25 mL/phút - Nhiệt độ cột 35 °C, nhiệt độ khí 350 °C, lưu lượng khí 7 L/phút, áp suất máy phun sương 40 psi, bộ gia nhiệt khí vỏ bọc 400 °C 	Giới hạn phát hiện của BDCPP là 0,05 ng/mL ; DPP là 0,5 ng/mL	[34]

Sau khi tham khảo, tìm hiểu và phân tích có thể thấy phương pháp phân tích những năm gần đây phổ biến trong phân tích chất chuyển hóa chống cháy trong nước tiểu người là sử dụng kỹ thuật chiết pha rắn (SPE) làm sạch mẫu và dịch chiết được phân tích trên thiết bị sắc ký lỏng ghép nối khối phổ hai lần (LC-MS/MS). Đây là kỹ thuật cho độ chính xác và độ nhạy cao, hiệu quả, đáng tin cậy.

Với kỹ thuật MS một lần không nghiên cứu được cơ chế phân mảnh, sự khác biệt giữa các đồng phân, xác định thêm chi tiết cấu trúc hóa học và chịu ảnh hưởng của nền mẫu phân tích. Đối với MS/MS thì đã khắc phục được những nhược điểm này đồng thời tăng thêm độ nhạy, tăng độ chính xác kết quả loại bỏ ảnh hưởng của nền mẫu.

Máy khối phổ MS/MS gồm hai hệ máy khối phổ riêng biệt độc lập nhau được nối liền với nhau và cách nhau một buồng va chạm. MS đầu tiên được sử dụng để cô lập ion sơ cấp, ion này sau đó sẽ bị phân mảnh tại buồng va chạm để cho ra các ion thứ cấp, tiếp đến MS thứ hai sẽ phân tách các ion này và những ion mong muốn sẽ đi đến detector và chuyển thành tín hiệu.

1.7. Các phương pháp đánh giá mức độ phơi nhiễm ảnh hưởng đến sức khỏe con người của TDCPP.

Để đánh giá rủi ro sức khỏe, mức độ phơi nhiễm của các chất chống cháy cơ phot pho đối với con người đã được đánh giá trong rất nhiều nghiên cứu như dựa trên nồng độ OPFRs trong bụi, không khí trong nhà hàng ngày hay dựa trên diện tích da tiếp xúc. Tuy nhiên các phương pháp này thường không nhất quán giữa các nghiên cứu khác nhau, dẫn đến việc làm phức tạp thêm việc so sánh các kết quả đánh giá phơi nhiễm. Thêm nữa, việc lấy mẫu hoạt động ở những thời gian cụ thể khác nhau, quần thể khác nhau nhưng lại chỉ có duy nhất một môi trường vi mô dẫn đến sự không chắc chắn trong ước tính phơi nhiễm và so sánh giữa các nghiên cứu.

Trong khi đó dựa trên các nghiên cứu mô phỏng thực tế và nghiên cứu đã chỉ ra rằng các OPFRs dễ dàng được chuyển hóa thành các chất chuyển hóa diester của chúng và thường được phát hiện trong nước tiểu của con người. TDCPP được phát hiện ở mức độ cao trong nhiều phương tiện môi trường có liên quan chặt chẽ tới con người. BDCPP là chất chuyển hóa chính của TDCPP trong nước tiểu con người, ngoài ra còn có một số dẫn xuất dimetyl của BDCPP được dự đoán chuyển hóa trong gan người.

Theo nghiên cứu của Li và cộng sự [35], diester là chất chuyển hóa chính và là sản phẩm sinh học được phát hiện thường xuyên nhất, mức độ phơi nhiễm ước tính của TDCPP được đánh giá dựa trên việc phân tích hàm lượng BDCPP trong nước tiểu.

Do vậy, trong nghiên cứu này dựa vào hàm lượng BDCPP xác định được trong nước tiểu người sẽ tính toán liều lượng TDCPP phơi nhiễm trên cơ thể người và đánh giá nguy cơ phơi nhiễm TDCPP đối với con người.

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG, NỘI DUNG, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng và nội dung nghiên cứu

2.1.1. Đối tượng nghiên cứu

- Mẫu nước tiểu thu thập ngẫu nhiên tại Hà Nội
- Bis(1,3-Dichloro-2-propyl) Phosphate (BDCPP)

2.1.2. Mục tiêu nghiên cứu

Xây dựng quy trình xử lý mẫu và xác định hàm lượng chất chuyển hóa Bis(1,3-Dichloro-2-propyl) Phosphate (BDCPP) trong mẫu nước tiểu bằng phương pháp kết hợp kỹ thuật xử lý mẫu chiết pha rắn và phương pháp phân tích sắc ký lỏng ghép nối khối phổ hai lần (LC-MS/MS).

Ứng dụng để phân tích trong mẫu nước tiểu thu thập tại Hà Nội và đánh giá nguy cơ phơi nhiễm của chất chống cháy TDCPP đến con người.

2.1.3. Mẫu nghiên cứu

Các mẫu nước tiểu thu thập của 59 tình nguyện viên sinh sống tại khu vực ngoại thành và nội thành Hà Nội. Các tình nguyện viên cung cấp đầy đủ thông tin về tuổi tác, giới tính, nơi sinh sống và được trình bày chi tiết trong phụ lục luận văn.

2.1.4. Nội dung nghiên cứu

Để đạt được mục tiêu đề ra, những nội dung sau được nghiên cứu tiến hành thực hiện:

Nội dung 1: Nghiên cứu xây dựng quy trình chiết tách và phân tích BDCPP trong mẫu nước tiểu bằng phương pháp chiết pha rắn và sắc ký lỏng ghép nối khối phổ hai lần (LC-MS/MS).

- Xây dựng đường chuẩn định lượng của BDCPP trên thiết bị LC-MS/MS.
- Xây dựng quy trình chiết tách mẫu.
- Thẩm định phương pháp: Xác định giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ), giới hạn phát hiện của phương pháp (MDL), Hiệu suất thu hồi, độ chính xác, độ lặp lại.

Nội dung 2: Chiết tách và phân tích BDCPP trong mẫu nước tiểu của người dân thu thập tại Hà Nội.

- Xác định đặc điểm của mẫu nước tiểu thông qua kiểm tra các thông số cơ bản, bao gồm độ pH, trọng lượng riêng, tổng Creatinin, tổng protein, ure...

- Ứng dụng phân tích các mẫu nước tiểu thu thập tại Hà Nội.

Nội dung 3: Đánh giá nguy cơ phơi nhiễm tác động đến sức khỏe con người của TDCPP.

- Xử lý số liệu, phân tích và đánh giá kết quả.

2.2. Hóa chất, dụng cụ và thiết bị

2.2.1. Hóa chất

- BDCPP (98%) được mua từ phòng thí nghiệm Wellington (Guelph, Ontario, Canada);

- Các chất nội chuẩn d_{10} -BDCPP được mua từ Dr.Vladimir Belov (Viện Hóa sinh vật lý Max Planck, Goettingen, Đức);

- Dung môi Methanol (MeOH), Acetonitrile (ACN), nước (>98%) đạt chuẩn phân tích;

- Khí N_2 kỹ thuật 99% dùng để đuổi dung môi.

- Axit axetic 0,1 M (Merch)

Tất cả các dung dịch chuẩn làm việc đều được chuẩn bị trong ACN.

2.2.2. Dụng cụ và thiết bị

- Các dụng cụ và thiết bị để thu thập mẫu nước tiểu;

- Các thiết bị phân tích tại phòng thử nghiệm;

- Dụng cụ chiết SPE pha đảo (Varian Bond Elut Plexa; Agilent SampliQ);

- Hệ thống phân tích HPLC I-Class kết nối khối phổ MS/MS Xevo TQ-XS hãng Waters;

- Thiết bị cô cất quay chân không (Buchi Rotavapor® R-215);

- Bể siêu âm (SUPER RK510);

- Thiết bị ly tâm (Hettich Rotina 420R, Đức);

- Cân phân tích (± 0.0001 mg);

- Tủ sấy (50°C - 300°C) (Sellab, Mỹ)

- Tủ nung;

- Tủ lạnh sâu (Sanyo Biomedical MDF-U333);

- Thiết bị cất nước tinh khiết (Elix 3 UV Water Purification System; 120V/60Hz, Millipore).
- Ống nhựa ly tâm có nắp loại 10 ml.
- Bình định mức 10ml.
- Pipet, ống đong các loại, phễu chiết, cốc thủy tinh, đĩa thủy tinh bình định mức các loại.
- Máy lắc Unitwist 300, máy lắc Vortex.
- Hệ chiết áp suất cao (ASE 350, Dionex, Thermo Fisher Scientific)
- Đầu lọc nylon/PTFE, 13 mm, 0.2um.
- Hệ thống thiết bị sắc ký lỏng kết nối khối phổ hai lần hãng Waters: LC/MS-MS (Model : Xevo TQ-XS) bao gồm : bộ phận sắc ký lỏng siêu hiệu năng I-Class và bộ phận khối phổ ba tứ cực với nguồn ion hóa tia điện ESI và ion hóa hóa học áp suất khí quyển APCI.
- Cột sắc ký ACQUITY UPLC C18 (kích thước: (150 × 2,1) mm; 1.7μm; Phenomenex, Torrance, Hoa Kỳ).

2.3. Công thức tính toán

- Độ lệch chuẩn:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

- Độ lệch chuẩn tương đối:

$$\%RSD = \frac{SD}{C_{tb}} \times 100$$

- Độ thu hồi: $H (\%) = X_{tb}/X_{bd} \times 100$

Theo tiêu chuẩn EPA 1614, phương pháp phân tích phải đảm bảo giá trị % RSD ≤ 50% và hiệu suất thu hồi thuộc khoảng 70 – 120 %.

- Độ lặp lại của phép đo: Được xác định thông qua hệ số biến động của phép đo (CV) và được tính theo các đại lượng độ lệch chuẩn (SD).

$$S^2 = \frac{\sum (S_i - S_{tb})^2}{n - 1} \quad (2.13) \quad CV = \frac{S}{X_{tb}} \cdot 100 \quad (2.14)$$

Trong đó: X_{tb} : Nồng độ trung bình, n: số lần đo,

$$RSD (\%) = CV (\%)$$

Theo yêu cầu của EPA 1614: Độ lặp lại (CV) $\leq 15\%$; Độ tái lặp lại $\leq 25\%$

- Khoảng tin cậy: $\mu \pm Z \cdot \sigma$ hoặc $x \pm Z \cdot \sigma$

Với cơ số mẫu bé, σ chính là S hoặc SRD.

Trong nghiên cứu này với xác suất tin cậy là 96%, tương ứng với $Z = 2$ (quy tắc 2σ) được sử dụng để đánh giá độ tin cậy của phép đo.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Nghiên cứu thu thập mẫu nước tiểu

Quy trình lấy mẫu được chấp thuận (cho phép) của Hội Đồng đạo đức trong nghiên cứu y sinh học trường đại học Y tế công cộng (số 337/2023/YTCC-HD3).

Các mẫu nước tiểu được thu thập từ các tình nguyện viên ở các quận, huyện nội và ngoại thành Hà Nội với thể tích mỗi mẫu là 50 ml. Các mẫu được đựng trong các lọ thủy tinh nâu 100 ml đã làm sạch bằng MeOH, bảo quản ở -20°C cho đến khi phân tích (không quá 1 tuần). Các mẫu nước tiểu đã rã đông được đồng nhất bằng cách trộn qua máy lắc, các mẫu này được lấy ra 10 mL để xác định một số thông số chung trên nước tiểu. Hơn nữa, mỗi mẫu nước tiểu được chia thành năm mẫu phụ được lưu trữ trong các ống polypropylene 15 mL để sử dụng khi cần phân tích các thông số cơ bản khác.

2.4.2. Nghiên cứu phân tích BDCPP bằng LC-MS/MS

Phương pháp phân tích là phương pháp sắc ký lỏng ghép nối khối phổ 2 lần (LC-MS/MS), quá trình ion hoá phun điện tử (ESI) và ion hóa hóa học áp suất khí quyển (APCI) được sử dụng đồng thời.

Các thông số phân tích của hệ thống LC-MS/MS được tiến hành với mẫu chuẩn và chuẩn đồng hành được pha trong ACN.

2.4.3. Nghiên cứu chiết tách BDCPP trong nước tiểu bằng chiết pha rắn

Hàm lượng chất chuyển hóa chất chống cháy trong mẫu phẩm sinh học thường rất nhỏ, do đó việc nghiên cứu phương pháp để xử lý làm giàu mẫu rất cần thiết, hiện

nay có phương pháp phổ biến nhất là chiết pha rắn. Quá trình chuẩn bị mẫu đòi hỏi hết sức phải cẩn thận, vì nó là bước quan trọng quyết định đến hiệu quả của phương pháp phân tích. Quá trình chiết tách cần loại bỏ được các chất hữu cơ gây cản trở.

BDCPP cấu tạo có chứa nhóm OH⁻ mang điện tích âm nên là một anion trong khi đó pH thường được quan sát thấy trong nước tiểu nằm trong khoảng (pH 6 – 7). Do đó khảo sát các điều kiện chiết tách tập trung vào các cột chiết pha rắn trao đổi ion, sử dụng các cột dưới đây:

Bảng 2.1. Khảo sát các cột chiết BDCPP trong nước tiểu

STT	Tên cột	Vật liệu	pKa
1	Oasis WAX	Polyme	~6,5
2	StrataX-AW	Polyme	9
3	Bond Elut DEA	Silica	10,1
4	SampliQ	Silica	~6

Dựa trên cơ sở nghiên cứu của Petra Krystek và cộng sự (2019) về quy trình chiết BDCPP từ nước tiểu, chúng tôi đưa ra quy trình xử lý chiết tách mẫu dự kiến như sau:

*) *Quy trình chiết dự kiến:* Sau khi đồng nhất hóa các mẫu nước tiểu, 2 mL nước tiểu được thêm vào chất nội chuẩn d₁₀-BDCPP (20 µg/mL) sau đó điều chỉnh đến pH = 6 bằng dung dịch axit axetic 0,1M và lắc vortex trong vòng 1 phút. Cột chiết pha rắn được hoạt hóa bằng 2 mL MeOH, sau đó thêm 2 mL nước tinh khiết. Các mẫu được nạp lên cột chiết pha rắn ở tốc độ dòng chảy 1 mL/phút. Tiếp theo cột chiết được rửa bằng 2 mL nước tinh khiết và làm khô trong chân không. Cột chiết được rửa giải với 2 mL ACN (chứa 5 % pyrrolidin) và được làm bay hơi đến khô bằng khí N₂ ở nhiệt độ phòng. Cuối cùng, phần cặn được hoàn nguyên trong 500 µL nước siêu tinh khiết / MeOH với tỷ lệ 4:1 và được lọc qua màng nylon 0,2 µm. Sau đó dịch chiết đem đi phân tích.

*) Kiểm soát chất lượng/đảm bảo chất lượng: Mẫu trắng được tiến hành bằng cách sử dụng 2 mL nước muối sinh lý 0,9 % NaCl. Tất cả các dung dịch chuẩn đều được chuẩn bị trong dung dịch Acetonitril (ACN).

2.4.4. Nghiên cứu xác định giá trị sử dụng của phương pháp chiết tách và phân tích BDCPP trong mẫu nước tiểu

2.4.4.1. *Khảo sát giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ) của thiết bị giới hạn phát hiện định lượng của phương pháp (MDL, MQL)*

LOD là nồng độ thấp nhất của chất phân tích mà thiết bị phân tích có thể cho tín hiệu phân tích khác có nghĩa so với tín hiệu nền. LOD là nồng độ thấp nhất của chất phân tích mà phương pháp phân tích có thể phát hiện được so với mẫu trắng.

Trong nghiên cứu này, giới hạn phát hiện (LOD) được xác định dựa trên tỷ lệ tín hiệu chia cho nhiễu đường nền (S/N: Signal to noise ratio). Phân tích dung dịch chuẩn nồng độ 1 ng/mL, tính tỷ lệ S/N, nếu S/N < 3 cần tăng nồng độ khảo sát, nếu S/N > 3 giảm nồng độ khảo sát cho đến khi S/N xấp xỉ 3, chọn nồng độ đó là giới hạn phát hiện của thiết bị.

- Giới hạn phát hiện (LOD):

$$LOD = \frac{3.C_{\min}}{S/N} \quad (2.4)$$

C_{\min} : Nồng độ nhỏ nhất mà chiều cao tín hiệu pic của chất phân tích gấp 3 lần tín hiệu đường nền. S/N: Tín hiệu nền

- Giới hạn định lượng (LOQ)

$$LOQ = 3,33.LOD \quad (2.5)$$

Giới hạn phát hiện của phương pháp (MDL) được xác định bằng cách phân tích 8 mẫu thêm chuẩn từ nồng độ bằng nồng độ giới hạn phát hiện của thiết bị. Các mẫu được đo trong cùng điều kiện xác định.

MDL được tính theo độ lệch chuẩn (SD) từ các kết quả xác định từ các kết quả thí nghiệm, theo công thức:

$$MDL = t^{(n-1, 1-\alpha=0.99)} \times SD$$

(EPA 40 CFR Appendix B to Part 136, Definition and Procedure for the Determination of the Method Detection Limit, revision 1.11)

Trong đó: $t^{(n-1, 1-\alpha=0.99)}$ là chuẩn student với bậc tự do (n-1) với độ tin cậy 99%.

Giới hạn định lượng của phương pháp (MQL) được tính theo công thức:

$$MQL = 3 \times MDL$$

2.4.4.2. *Khảo sát đường chuẩn và khoảng tuyến tính*

Khoảng tuyến tính: Khảo sát khoảng nồng độ của chất phân tích trong đó có sự phụ thuộc tuyến tính giữa tỷ lệ diện tích pic chất phân tích / diện tích pic chất chuẩn với nồng độ của nó.

Để kiểm tra khoảng tuyến tính, thực hiện phân tích các dung dịch chuẩn có nồng độ từ 50; 100; 200; 400; 1000 ng/mL (nồng độ nội chuẩn thêm vào các mẫu 20 ng/L).

2.4.4.3. Khảo sát độ thu hồi và độ đúng của phương pháp

Độ thu hồi và độ đúng của phương pháp được xác định và tính toán tại 3 mức nồng độ (thấp, trung bình, cao) đối với mỗi chất phân tích. Dựa trên kết quả phân tích trung bình của các kết quả đo được với kết quả mẫu chuẩn và mẫu chuẩn nội với quá trình chiết tách mẫu lặp lại 8 lần.

Trong nghiên cứu này độ thu hồi được tính toán từ thí nghiệm lặp lại với mẫu thêm chuẩn BDCPP ở các mức nồng độ (0,5; 5; 100 ng/mL) lặp lại 8 lần. Chiết các mẫu thêm chuẩn theo quy trình chiết đã xác định. Sau đó phân tích bằng phương pháp trên LC-MS/MS.

Yêu cầu: Độ thu hồi phải nằm trong khoảng giá trị theo tiêu chuẩn từ 80% đến 120% (EPA 1614)

2.4.5. Phân tích mẫu thực tế

Sau khi khảo sát và tối ưu hóa được quy trình phân tích, tiến hành chiết tách và phân tích định lượng nồng độ BDCPP trong mẫu nước tiêu thụ thập được. Các mẫu được xử lý theo quy trình xử lý mẫu và được phân tích trên bằng phương pháp LC-MS/Ms đã xây dựng. Phương pháp định lượng là phương pháp đường chuẩn.

2.4.6. Nghiên cứu đánh giá nguy cơ phơi nhiễm

Đây là bước cuối cùng quan trọng trong quá trình nghiên cứu. Bước này liên quan đến việc xác định tần suất, mức độ, tính chất và thời gian phơi nhiễm của người dân với TDCPP.

Mức độ phơi nhiễm của người dân với TDCPP được đánh giá dựa trên số liệu phân tích BDCPP trong mẫu nước tiêu của các tỉnh nguyên viên, sự phụ thuộc của giới tính và độ tuổi khác nhau và tính liều phơi nhiễm hằng ngày dựa vào hàm lượng BDCPP.

Liều lượng phơi nhiễm hàng ngày của TDCPP được tính toán dự theo nồng độ chất chuyển hóa BDCPP trong nước tiêu. Tham khảo nghiên cứu [41] công thức sử dụng tính toán như sau:

$$D_P = \frac{C_m}{MW_m} * MW_P * UV_{excr}}{F_{UE}}$$

Trong đó:

D_P : Liều lượng phơi nhiễm hàng ngày của TDCPP (ng/kg bw/day)

C_m : Nồng độ chưa điều chỉnh của chất chuyển hóa BDCPP trong nước tiểu (ng/mL)

UV_{excr} : Lượng bài tiết nước tiểu hàng ngày ở mức 20 mL/kg bw/ngày đối với người lớn và 22,2, mL/kg bw/day đối với trẻ em [41].

F_{UE} : Phần mol của chất chuyển hóa trong nước tiểu được bài tiết (0,63 đối với BDCPP) [26]

MWP và $MWNS$ lần lượt là trọng lượng phân tử của các chất ban đầu và các chất chuyển hóa tương ứng.

2.4.7. Phương pháp xử lý số liệu

Các kết quả phân tích định lượng được xử lý theo phần mềm trên thiết bị LC-MS/MS và số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phương pháp phân tích BDCPP bằng LC-MS/MS

3.1.1. Điều kiện phân tích BDCPP bằng LC-MS/MS

Qua tham khảo một số tài liệu [1, 11, 31], chúng tôi tiến hành khảo sát xác định BDCPP bằng kỹ thuật ion hóa phun điện tử ESI kết hợp kỹ thuật ion hóa hóa học áp suất khí quyển APCI.

Định lượng được thực hiện trên hệ thống thiết bị sắc ký lỏng kết nối khối phổ hai lần hãng Waters: LC/MS-MS (Model : Xevo TQ-XS) bao gồm:

- Bộ phận sắc ký lỏng siêu hiệu năng I-Class. Cột sắc ký ACQUITY UPLC C18 (kích thước: (150 × 2,1) mm; 1.7µm; Phenomenex, Torrance, Hoa Kỳ).

- Bộ phận khối phổ ba tứ cực với nguồn ion hóa tia điện ESI và ion hóa hóa học áp suất khí quyển APCI.

Trong phương pháp sắc ký lỏng khối phổ, pha động rất quan trọng ảnh hưởng tới nhiều yếu tố như quá trình tách, quá trình ion hóa và tín hiệu của chất phân tích. Với kỹ thuật ion hóa phun điện tử bắn phá ở chế độ ion dương, quá trình ion hóa tăng khi pha động có thêm các chất như acid Acetic, acid Formic. Trong nghiên cứu, chúng tôi sử dụng hệ dung môi pha động như sau:

- Pha động A: 0,05% TFA
- Pha động B: ACN 0,01% acid Formic

Trong kỹ thuật ion hóa phun điện tử với chế độ bắn phá ion dương, các ion mẹ có dạng $[M+H]^+$. Detector được sử dụng trong nghiên cứu này là khối hai lần, do đó để phát hiện đúng chất phân tích thì việc chọn được ion con là rất quan trọng.

Dùng xi lanh bơm 5 µL dịch chuẩn 20 ng/mL vào cột chiết sắc ký và lựa chọn 2 ion con có cường độ tín hiệu cao nhất để định tính và định lượng. Cố định các thông số của nguồn và khí như bảng 3.1. Các điều kiện sắc ký chi tiết ở bảng 3.2.

Bảng 3.1. Các thông số cài đặt trên LC-MS

STT	Thông số	Điều kiện
1	Capillary (kV)	2,5
2	Cone (V)	22
3	Source Offset (V)	30

4	Source Temperature (°C)	150
5	Desolvation Temperature (°C)	400
6	Cone Gas Flow (L/Hr)	150
7	Desolvation Gas Flow (L/Hr)	800
8	Collision Gas Flow (mL/Min)	0,11
9	Nebuliser Gas Flow (Bar)	7

Bảng 3.2. Các điều kiện phân tích trên LC-MS/MS

Thông số kỹ thuật	Thông tin
Pha tĩnh	cột ACQUITY UPLC C18 (150 × 2,1) mm; 1,7µm)
Nhiệt độ cột	60 °C
Thể tích bơm mẫu	5 µL
Tốc độ pha động	0,2 mL/phút
Pha động	Chất rửa giải (A) 0,05% TFA và chất rửa giải (B) ACN 0,01% Formic acid
Dung dịch rửa	90 Nước 10 ACN

(Chi tiết tại bảng 3.3)

Bảng 3.3. Chế độ bơm mẫu gradient

Thời gian (phút)	Rửa giải A (%)	Rửa giải B (%)	Tốc độ dòng (mL/phút)
0	80	20	0,2
2	0	100	
5	0	100	
8	80	20	
14	80	20	

Các thông số tối ưu hóa điều kiện phân mảnh được thể hiện trong bảng 3.4.

Bảng 3.1. Điều kiện được sử dụng để phát hiện BDCPP và chất chuẩn đồng hành gắn nhãn đồng vị d₁₀-BDCPP

Hợp chất		BDCPP		d ₁₀ -BDCPP
		Quantitation ion	Confirmation ion	Quantitation ion
Transition	Parent ion (m/z)	318,87	318,87	328,7
	Daughter ion (m/z)	98,98	209,1	98,98
CE (eV)		15	10	10

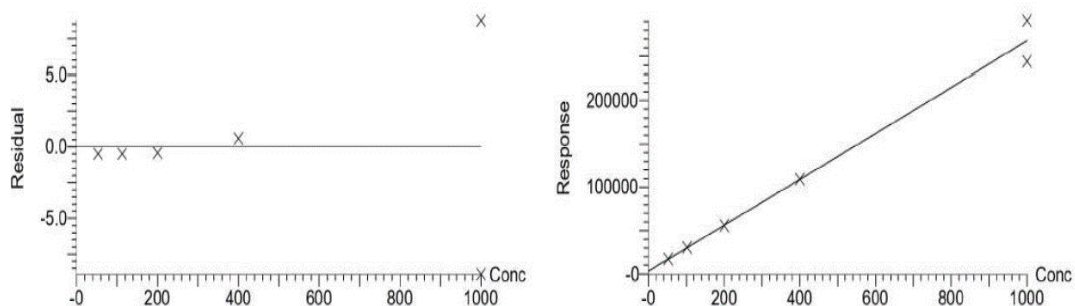
Nhận xét: Mạnh ion con m/z có cường độ lớn nhất dùng để định lượng, mạnh con thứ 2 có cường độ thấp hơn dùng để xác nhận chất phân tích.

Trên đây là toàn bộ là các điều kiện được thiết lập trên thiết bị LC-MS/MS để xác định hàm lượng BDCPP trong mẫu nước tiêu được áp dụng trong nghiên cứu này.

3.1.2. Xây dựng đường chuẩn

Trong khoảng nồng độ dung dịch chuẩn BDCPP từ 50 – 1000 ng/mL cho hệ số tương quan $R > 0,996$. Các điều kiện đo theo phần 3.1.1.

Compound name: BDCPP
 Correlation coefficient: $r = 0.998132$, $r^2 = 0.996267$
 Calibration curve: $264.603 * x + 3319.29$
 Response type: External Std, Area
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



Hình 3.1. Đường chuẩn của BDCPP khoảng nồng độ 50 – 1000 ng/mL

Phương trình hồi quy tuyến tính thu được là:

$$Y = 264,603x + 3319,29$$

Trong đó: y là diện tích pic; x là nồng độ BDCPP (ng/mL)

Hệ số tương quan $R^2 = 0,996$, do đó đường chuẩn BDCPP được xây dựng là đáng tin cậy và được sử dụng trong định lượng BDCPP trong nước tiểu.

3.2. Phương pháp chiết tách BDCPP trong mẫu nước tiểu bằng SPE

3.2.1. Điều kiện chiết tách BDCPP trong mẫu nước tiểu bằng SPE

Kỹ thuật xử lý mẫu bằng cột chiết pha rắn SPE được lựa chọn để khảo sát. Các bước thực của quy trình làm sạch SPE được thực hiện theo quy trình trong mục 2.4.3.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi lựa chọn khảo sát 4 cột chiết tách để chiết tách hợp chất BDCPP trong mẫu nước tiểu và phân tích trên LC-MS/MS bao gồm: Oasis WAX; StrataX-AW; Bond Elut DEA; SampliQ.

Chất nghiên cứu BDCPP có đặc tính độ phân cực cao, pKa thấp ($pK_a \sim 1,18$), nó gây khó khăn cho việc proton hóa hoàn toàn và tạo điều kiện cho quá trình phân vùng, do đó sử dụng cột chiết pha rắn SampliQ cho hiệu suất thu hồi chất phân tích thấp chỉ đạt $56,2 \pm 12 \%$.

Trong nước tiểu pH thường từ 6 - 7, BDCPP có thể trở thành 1 anion. Đối với cột chiết Oasis WAX do pKa nằm trong phạm vi pH của nước tiểu nên cần được điều chỉnh bằng dung dịch axit acetic 0,1M, còn lại đối với Bond Elut DEA, StrataX-AW chúng tôi sử dụng nước deion.

Kết quả khảo sát cho thấy độ thu hồi của trình chiết tách đạt $\geq 70 \%$, trong đó quá trình chiết tách bằng StrataX- AW đạt 96,5 %. Theo như quy trình chiết mẫu dự kiến ban đầu, chất rửa giải là ACN chứa 5% pyrrolidine có $pK_a \sim 11,3$, do đó đủ để trung hòa hầu hết điện tích dương của chất hấp phụ, làm giảm tương tác ion giữa chất hấp phụ và chất phân tích, tạo điều kiện loại bỏ chất phân tích khỏi chất hấp phụ SPE. Độ thu hồi chiết tách của các cột chiết này với các mẫu chất chuẩn được chỉ ra trong bảng 3.5.

Bảng 3.2. Hiệu suất thu hồi chất phân tích với các loại cột chiết pha rắn

Cột chiết	Vật liệu	Hằng số pKa	Nồng độ chất chuẩn (ng/mL)	Độ thu hồi (%)
Strata X-AW	Polyme	9,0	50	96,5 ± 5%
Oasis WAX	Polyme	6,5	50	77 ± 16%
Bond Elut -DEA	Silica	10,1	50	72 ± 9%

Từ các kết quả thực nghiệm và phân tích trên cho thấy độ thu hồi của chất phân tích đạt được cao nhất với cột chiết pha rắn Strata X-AW là 96,5 %. Do đó, sử dụng cột chiết này được sử dụng cho quy trình chiết tách mẫu nước tiểu trong nghiên cứu này.

Quy trình chiết tách mẫu nước tiểu: Thêm chất chuẩn đồng hành d₁₀-BDCPP (20 µg/mL) vào 2 mL nước tiểu, điều chỉnh đến pH=6 bằng dung dịch axit axetic 0,1M, lắc vortex trong vòng 1 phút. Cột chiết pha rắn được hoạt hóa bằng 2 mL MeOH, sau đó là 2 mL nước deion. Mẫu sẽ được tải lên cột chiết pha rắn Strata X-AW ở tốc độ dòng chảy 1 mL/phút. Sau đó cột chiết được rửa bằng 2 mL nước deion và làm khô bằng hút chân không. Cột chiết được rửa giải với 2 mL ACN (chứa 5% pyrrolidin) và được làm bay hơi đến khô bằng khí N₂ ở nhiệt độ phòng. Cuối cùng, phần cặn được hoàn nguyên trong 500 µL nước deion / MeOH với tỷ lệ 4:1 và được lọc qua màng nylon 0,2 µm. Sau đó dịch chiết đem đi phân tích trên thiết bị LC-MS/MS.

3.2.2. Điều kiện dung môi rửa giải của quá trình chiết tách BDCPP trong mẫu nước tiểu bằng chiết pha rắn

Trong nghiên cứu này chúng tôi đã so sánh giữa 2 dung môi rửa giải là ACN (chứa 5% pyrrolidin) và MeOH (chứa 5% amoni hydroxit) kết quả cho thấy hiệu quả chiết tách của hai chất đạt ≥ 90 %. Đối với dung môi rửa giải MeOH (chứa 5% amoni hydroxit) với pKa~9,25 [36] gần so với chất hấp phụ trên cột chiết SPE, với pKa chất hấp phụ StaraX-AW ~9, do đó khả năng trung hòa ion dương của chất hấp phụ yếu hơn so với ACN (chứa 5% pyrrolidin). Kết quả hiệu suất chiết tách được thể hiện chi tiết trong bảng 3.6.

Bảng 3.6. Hiệu suất chiết của các dung môi rửa giải khảo sát

Dung môi rửa giải	Điều kiện chiết	Hằng số pKa	Nồng độ chất chuẩn (ng/mL)	Độ thu hồi (%)
ACN (chứa 5% pyrrolidine)	Theo quy trình như mục 3.2.1	11,3	50	96 ± 4%
MeOH (chứa 5% amoni hydroxit)		9,25	50	92 ± 5%

Từ các kết quả trên chúng tôi lựa chọn dung môi rửa giải tối ưu nhất là ACN (chứa 5% pyrrolidine) làm dung môi chiết tách BDCPP trong nước tiểu.

3.3. Xác định giá trị sử dụng của phương pháp chiết tách và phân tích BDCPP trong mẫu nước tiểu bằng LC-MS/MS

3.3.1. Giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn phát hiện của phương pháp (MDL)

Trong nghiên cứu này kết quả giới hạn phát hiện (LOD) của thiết bị thu được giá trị LOD là 0,01 ng/mL. Kết quả này cho thấy thiết bị có thể đáp ứng được phân tích mẫu chuẩn BDCPP ở lượng vết khi không cần kết hợp với phương pháp xử lý và làm giàu mẫu.

Giới hạn phát hiện hiện của phương pháp (MDL) được xác định bằng cách thực hiện phân tích 8 mẫu thêm chuẩn nồng độ thấp 0,1 ng/ml sau khi đã tính hệ số làm giàu của quá trình và làm giàu mẫu. Kết quả được thể hiện ở bảng 3.7, giới hạn phát hiện thu được của BDCPP là 0,0085 ng/mL.

Kết quả cho thấy độ thu hồi của mẫu thêm chuẩn đạt 96,25 %, độ lệch chuẩn tương đối 4,66 % nằm trong giới hạn cho phép của EPA Method 1614. So sánh với MDL của các nghiên cứu khác từ các tác giả trên thế giới được thể hiện trong bảng 3.8. Kết quả cho thấy MDL của BDCPP ở nghiên cứu này tương đương với giá trị MDL của BDCPP ở các nghiên cứu [31, 15, 37].

Bảng 3.7. Kết quả xác định giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng

Kq nồng độ đo (ng/ml)	Nồng độ (ng/mL)	BDCPP
	Hàm lượng nền mẫu	0,051
	C1	0,164
	C2	0,159
	C3	0,161
	C4	0,160
	C5	0,156
	C6	0,158
	C7	0,162
	C8	0,165
Nồng độ trung bình C_{TB}		0,161
$t(n-1, 99 \%)$		2,998
Độ lệch chuẩn SD		0,0028
Độ lệch chuẩn tương đối (RSD) (%)		4,66
Độ thu hồi trung bình (%)		96,25
Giới hạn phát hiện MDL (ng/ml) ($MDL = t_{(n-1, 99\%)} \cdot SD$)		0,0085
Giới hạn định lượng MQL (ng/mL) $MQL = 3 \cdot MDL$		0,025

***C1-C8: Ký hiệu nồng độ theo thứ tự của mẫu phân tích**

Bảng 3.8 . Giá trị MDL của một số nghiên cứu tham khảo

STT	MDL(ng/mL)	TLTK
1	0,008	[31]
2	0,0127	[37]
3	0,01	[15]

Sau khi thực hiện các thực nghiệm và phân tích, kết quả thu được là: giới hạn phát hiện của thiết bị LOD là 0,01 ng/mL; Giới hạn phát hiện của phương pháp (MDL) là 0,0085 ng/mL; Giới hạn định lượng của phương pháp (MQL) 0,025 ng/mL.

3.3.2. Độ lặp lại, độ đúng, độ thu hồi của phương pháp

Phân tích 8 mẫu thêm chuẩn lặp lại ở 3 mức nồng độ (0,5 ; 5; 100 ng/mL) trong điều kiện lặp lại (cùng điều kiện phân tích, cùng khoảng thời gian thực hiện, cùng thiết bị phân tích và do một người làm). Đánh giá độ lặp lại thông qua hệ số biến thiên CV %, độ đúng thông qua hệ số thu hồi và so sánh với các giá trị yêu cầu theo phụ lục F của AOAC. Các kết quả được thể hiện trong bảng 3.9.

Bảng 3.9. Độ lặp lại, độ đúng và độ thu hồi của phương pháp xác định BDCPP

Nồng độ thêm chuẩn	(ng/mL)	0,5	5	100
Nồng độ đo được	C1	0,51	4,89	99,65
	C2	0,48	4,97	99,98
	C3	0,49	5,01	100,01
	C4	0,50	4,90	100,03
	C5	0,47	4,75	99,79
	C6	0,52	4,83	99,99
	C7	0,49	4,90	99,99
	C8	0,48	5,10	100,00
Nồng độ trung bình	C_{tb} (ng/mL)	0,49	4,92	99,93
Độ thu hồi	H (%)	96,57	98,97	99,93
Độ lệch chuẩn	SD (%)	1,56	10,10	12,70
Hệ số biến thiên	C_v (%)	3,17	2,05	0,13

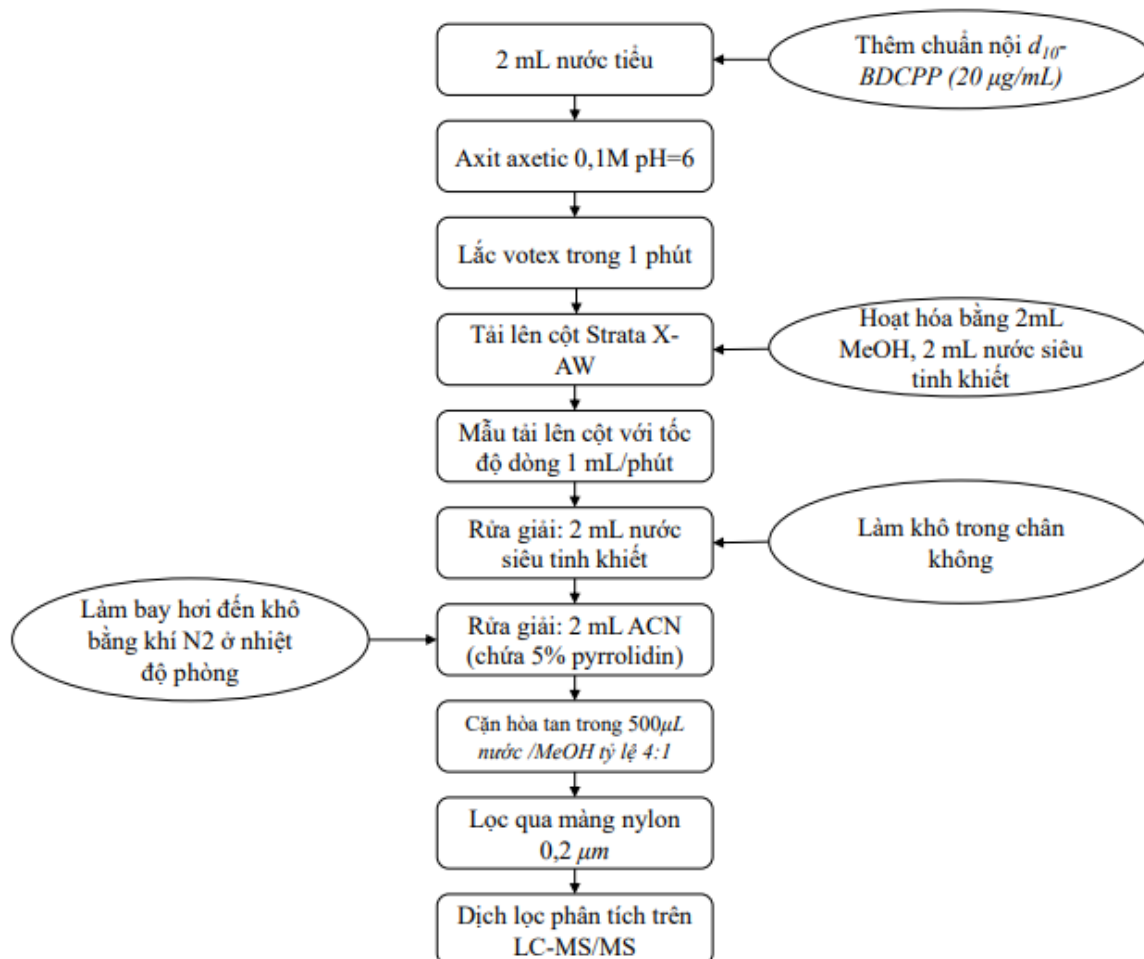
Độ thu hồi của phương pháp xác định BDCPP thu được nằm trong khoảng 96,57 - 99,93 %. Hệ số biến thiên (C_v) có giá trị từ 0,13 - 3,17 %, các kết quả này nằm trong khoảng cho phép khi so sánh với phụ lục F của AOAC 2016.

Qua khảo sát độ lặp lại của phương pháp tại 3 nồng độ 0,5; 5; 100 ng/mL cho thấy kết quả lặp lại, độ thu hồi của phương pháp rất tốt. Phương pháp có độ chính xác phù hợp để phân tích định lượng BDCPP.

Từ các khảo sát trên, chúng tôi đưa ra phương pháp chiết tách và phân tích BDCPP trong nước tiểu bằng phương pháp sắc ký lỏng ghép nối khối phổ hai lần (LC-MS/MS) cụ thể như sau:

Quy trình xử lý mẫu: Thêm chất chuẩn đồng hành d_{10} -BDCPP (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) vào 2 mL nước tiêu, điều chỉnh pH = 6 bằng dung dịch axit axetic 0,1M, lắc vortex trong vòng 1 phút. Cột chiết pha rắn được hoạt hóa bằng 2 mL MeOH, sau đó là 2 mL nước deion. Mẫu sẽ được tải lên cột chiết pha rắn Strata X-AW ở tốc độ dòng chảy 1 mL/phút. Sau đó cột chiết được rửa bằng 2 mL nước deion và làm khô trong chân không. Cột chiết được rửa giải với 2 mL ACN (chứa 5% pyrrolidin) và được làm bay hơi đến khô bằng khí N_2 ở nhiệt độ phòng. Cuối cùng, phần cặn được hoàn nguyên trong 500 μL nước deion / MeOH với tỷ lệ 4:1 và được lọc qua màng nylon 0,2 μm . Sau đó dịch chiết đem đi phân tích. Trên thiết bị LC-MS/MS. Mô tả được thể hiện trong hình 3.2

Điều kiện trên thiết bị LC-MS/MS: Thiết bị sử dụng của hãng Waters (model: Xevo TQ-XS). Ion hóa điện tử (ESI) và ion hóa hóa học áp suất khí quyển (APCI) được sử dụng đồng thời. Cột sắc ký cột ACQUITY UPLC C18 (150 \times 2,1) mm; 1,7 μm). Để tách sắc ký, 5 μL dịch chiết được bơm vào cột chiết sắc ký. Pha động là gradient của dung dịch 0,05 % TFA (A), ACN 0,01 % Formic axit(B) (bảng 3.3), tốc độ dòng là 0,2 mL/phút. Chất phân tích BDCPP được phát hiện theo các điều kiện tối ưu hóa đưa ra ở trong bảng 3.1 và 3.4.



Hình 3.2. Quy trình chiết tách BDCPP trong nước tiểu

3.4. Thu thập mẫu nước tiểu của người dân tại khu vực Hà Nội

Để đánh giá độ phơi nhiễm của người dân tại khu vực Hà Nội, chúng tôi đã thực hiện thu thập 59 mẫu nước tiểu của các tình nguyện viên phân bố ở một số khu vực trong Hà Nội. Nhóm tình nguyện viên có độ tuổi từ 3 - 76 tuổi, bao gồm 34 nữ và 25 nam.

Các mẫu nước tiểu được thu thập lúc 6 giờ sáng, được đựng trong dụng cụ chuyên dụng có nắp đậy và để chỗ thoáng mát. Do nước tiểu để 24 giờ có thể bị biến đổi các thành phần sinh hóa do vi khuẩn, do đó mẫu nước tiểu được bảo quản trong môi trường tiệt trùng và bảo quản lạnh trong tủ đông -20°C cho đến khi phân tích.

Sau đó xác định các thông số đặc trưng cơ bản của nước tiểu bao gồm tỉ trọng, độ pH, glucose, tổng creatinin và tổng protein. Các thông số đặc trưng cơ bản được thực hiện bằng thiết bị đo nhanh.

Trọng lượng riêng nước tiểu (Specific gravity – SG) là tỷ số giữa trọng lượng của một thể tích nước tiểu và trọng lượng của cùng một thể tích nước cất. Tỷ trọng

nước tiểu phản ánh tổng trọng lượng các chất hòa tan có trong nước tiểu. Tỷ trọng nước tiểu ở người bình thường dao động từ 1,003 - 1,030 và trung bình 1,015 – 1,025.

Độ pH nước tiểu xác định để đánh giá tính chất của nước tiểu đang ở môi trường axit hay bazo. pH nước tiểu dao động từ 4,7 - 8 và trung bình 5,5 - 6,5.

Định lượng glucose được chỉ định đối với những trường hợp nghi ngờ có tổn thương liên quan đến thận hoặc nhiễm trùng đường tiết niệu. Đối với người bình thường khi chế độ ăn uống chứa 50% carbohydrate không kèm theo tăng glucose trong máu thì Glucose âm tính.

Định lượng tổng protein trong nước tiểu để phản ánh 1 phần dấu hiệu của tình trạng bệnh lý ở thận hoặc giúp phát hiện tiền sản giật trong thai kỳ.

Creatinin là một trong những loại chất thải có trong máu của cơ thể được thận lọc và thải ngoài cơ thể theo đường nước tiểu. Creatin đóng vai trò quan trọng trong việc sinh ra nguồn năng lượng cho các cơ hoạt động. Nếu chỉ số creatinine trong cơ thể cao có thể là một dấu hiệu của bệnh lý thận. Chỉ số bình thường ở nam giới 0,6 – 1,2 mg/dL; nữ giới từ 0,5 đến 1,1 mg/dL.

Các thông số cơ bản được thử bằng phương pháp đo nhanh. Kết quả phân tích từ 59 tình nguyện viên cho thấy giá trị pH nằm trong khoảng 5 - 8, không phát hiện glucose trong mẫu nước tiểu, hàm lượng creatinin trong khoảng 0,101 – 1,02 g/L, tỷ trọng nước tiểu (SG) trong khoảng từ 1,005 đến 1,030 và một số mẫu dương tính với protein.

3.5. Kết quả BDCPP trong các mẫu nước tiểu thu thập

Sau khi hoàn thành quá trình khảo sát, đánh giá phương pháp và xây dựng quy trình chiết mẫu tối ưu. Nghiên cứu đã ứng dụng để phân tích 59 mẫu nước tiểu từ các nhóm tình nguyện viên trong khu vực Hà Nội. Các mẫu được ký hiệu U1: mẫu nước tiểu. Kết quả thu được trong bảng 3.10 dưới đây.

**Bảng 3.10. Nồng độ BDCPP thu được từ một số mẫu nước tiểu
(chưa hiệu chỉnh)**

STT	Ký hiệu	Tuổi	Giới tính	BDCPP (ng/mL)	STT	Ký hiệu	Tuổi	Giới tính	BDCPP (ng/mL)
1	U1	9	nam	KPH	31	U31	10	nam	KPH
2	U2	36	nữ	KPH	32	U32	6	nam	1,072
3	U3	38	nam	KPH	33	U33	9	nam	KPH
4	U4	5	nữ	32,782	34	U34	5	nam	0,071
5	U5	40	nam	KPH	35	U35	37	nữ	7,189
6	U6	38	nữ	KPH	36	U36	14	nữ	KPH
7	U7	12	nam	0,487	37	U37	3	nữ	7,224
8	U8	76	nữ	0,072	38	U38	42	nam	KPH
9	U9	13	nữ	KPH	39	U39	6	nữ	0,657
10	U10	37	nữ	KPH	40	U40	42	nữ	KPH
11	U11	37	nam	KPH	41	U41	30	nam	42,999
12	U12	7	nữ	0,071	42	U42	51	nam	0,425
13	U13	18	nữ	KPH	43	U43	30	nữ	7,874
14	U14	11	nam	1,390	44	U44	28	nam	KPH
15	U15	43	nữ	0,086	45	U45	49	nữ	9,095
16	U16	45	nam	18,378	46	U46	25	nữ	KPH
17	U17	15	nam	KPH	47	U47	20	nữ	0,452
18	U18	38	nữ	KPH	48	U48	27	nam	KPH
19	U19	3	nữ	0,289	49	U49	26	nam	0,041
20	U20	7	nữ	KPH	50	U50	24	nữ	12,009
21	U21	38	nam	0,028	51	U51	24	nữ	KPH
22	U22	10	nam	13,758	52	U52	23	nữ	KPH
23	U23	68	nữ	KPH	53	U53	25	nữ	KPH
24	U24	30	nữ	49,585	54	U54	23	nữ	8,676
25	U25	30	nữ	KPH	55	U55	34	nữ	KPH
26	U26	33	nam	KPH	56	U56	38	nữ	22,599
27	U27	28	nữ	37,722	57	U57	35	nữ	32,277
28	U28	68	nam	1,616	58	U58	31	nữ	15,179
29	U29	42	nữ	KPH	59	U59	23	nam	7,875
30	U30	42	nam	KPH					

Qua kết quả phân tích nhận thấy các mẫu nước tiểu có sự xuất hiện của BDCPP, có 29 mẫu của nhóm tình nguyện viên không phát hiện và 30 mẫu có nồng độ từ 0,028 ng/mL đến 49,585 ng/mL. Tần suất phát hiện DF 51%.

Theo các nghiên cứu trên thế giới [1, 31, 37], với tần suất phát hiện DF > 50% mới được xem xét trong phân tích thống kê, do đó kết quả tần suất phát hiện trong nghiên cứu DF= 51% đủ điều kiện xác định nồng độ chất chuyển hóa OPFRs trong nước tiểu sau khi điều chỉnh bằng trọng lượng riêng (SG) và Creatinin (Cr). Tất cả các phân tích thống kê được thực hiện với phần mềm Excel.

Theo bảng trên nồng độ của BDCPP trong nước tiểu báo cáo không được hiệu chỉnh đối với độ thu hồi của các chất nội chuẩn và pha loãng. Để giải thích cho sự khác biệt về độ pha loãng trong nước tiểu, chúng tôi đã tham khảo phương pháp hiệu chỉnh nồng độ theo trọng lượng riêng (SG) [29] để điều chỉnh nồng độ của BDCPP.

$$C = C_o \cdot (1,024 - 1) / (SG - 1)$$

Trong đó:

C: Nồng độ chất chuyển hóa được điều chỉnh theo trọng lượng riêng (ng/mL)

C_o: Nồng độ chất chuyển hóa (ng/mL)

SG: Trọng lượng riêng mẫu nước tiểu (tham khảo phụ lục đối với từng mẫu)

Bên cạnh việc nồng độ chất chuyển hóa được điều chỉnh theo trọng lượng riêng (SG), chúng tôi thực hiện điều chỉnh theo creatinin để cho thấy sự khác biệt về việc pha loãng nước tiểu và kiểm soát khả năng gây nhiễu do chứng năng thận bị suy giảm khi bài tiết creatinin. Hàm lượng các chất chuyển hóa sau điều chỉnh được tính bằng đơn vị ng/mg. Tham khảo theo nghiên cứu [38].

$$C^* = C_o / Cr \cdot Cr_{24}$$

Trong đó:

C*: Nồng độ chất chuyển hóa được điều chỉnh theo nồng độ Creatinin (ng/g)

C_o: Nồng độ chất chuyển hóa (ng/mL)

Cr: Nồng độ creatinin (xem phụ lục đính kèm)

Cr₂₄: Giá trị phụ thuộc và độ tuổi và giới tính (xem phụ lục đính kèm)

Chúng tôi thực hiện tính toán hiệu chỉnh các mẫu nước tiểu bằng phần mềm excel và kết quả được thể hiện tóm tắt trong bảng 3.11.

Bảng 3.11. Tóm tắt nồng độ chất chuyển hóa BDCPP ban đầu, nồng độ hiệu chỉnh theo trọng lượng riêng và nồng độ hiệu chỉnh theo creatinin trong nước tiểu thu thập tại Hà Nội

	Nồng độ chưa hiệu chỉnh (ng/mL)	Nồng độ hiệu chỉnh theo trọng lượng riêng (ng/mL)	Nồng độ hiệu chỉnh theo creatinin (ng/g)
Tần suất phát hiện (DF) (%)	51		
Khoảng nồng độ	KPH - 49,585	KPH – 238,000	0,462 – 716,000
Giá trị trung bình	11,481	20,002	117,012
Giá trị trung vị	7,19	5,8	32,14
Độ lệch chuẩn	14,26	44,8	169,20

Trong nghiên cứu này, nồng độ BDCPP trong nước tiểu chưa hiệu chỉnh (11,481 ng/mL) gấp 2237 lần so với báo cáo ở Trung Quốc năm 2016 - 2017 với người lớn và trẻ em [29], gấp 41 lần so với báo cáo ở Mỹ với phụ nữ mang thai [39]. Có nghiên cứu chỉ ra rằng ở Trung Quốc tần suất phát hiện của BDCPP chỉ đạt 21 % nhưng ở cư dân California đạt 94 %, có thể thấy sự khác biệt khu vực về việc phơi nhiễm do việc quản lý nghiêm ngặt trong việc sử dụng chất chống cháy. Tại Bang California của Hoa kỳ có các tiêu chuẩn nghiêm ngặt về tính dễ cháy đối với đồ nội thất nhưng thay thế vào đó là sử dụng nhiều TDCPP nên dẫn đến tần suất phát hiện cao hơn.

Việc điều chỉnh độ pha loãng nước tiểu đã được khuyến nghị trong đánh giá xenobiotic và thường được đưa vào các nghiên cứu dịch tễ học. Trong nghiên cứu này chúng tôi, thực hiện theo điều chỉnh trọng lượng riêng của nước tiểu, yếu tố ít bị ảnh hưởng bởi những thay đổi tuổi tác, thành phần cơ thể hoạt động thể chất, lưu lượng nước tiểu, thời gian trong ngày và bệnh tật[37]. Giá trị trung bình của các tình nguyện viên tìm thấy ở 20,002 ng/ml gấp 1,74 lần so với nồng độ BDCPP chưa hiệu chỉnh.

Do các giá trị của chất chuyển hóa BDCPP trong nước tiểu có thể bị ảnh hưởng bởi chức năng thận nên việc điều chỉnh creatinine đã được thực hiện giảm sai lệch tiềm ẩn này, tuy nhiên cũng có thể dẫn đến sai lệch do phân lớp, để loại trừ khả năng này nghiên cứu đã kết hợp nồng độ creatinine trong nước tiểu phù hợp với các yếu tố điều chỉnh nước tiểu.

Từ kết quả trên, chất chuyển hóa BDCPP được phát hiện trên 50% mẫu của các tình nguyện viên trong khu vực Hà Nội. Từ đó, cho thấy khu vực Hà Nội đã có khả năng phơi nhiễm với chất chống cháy gốc của nó là TDCPP.

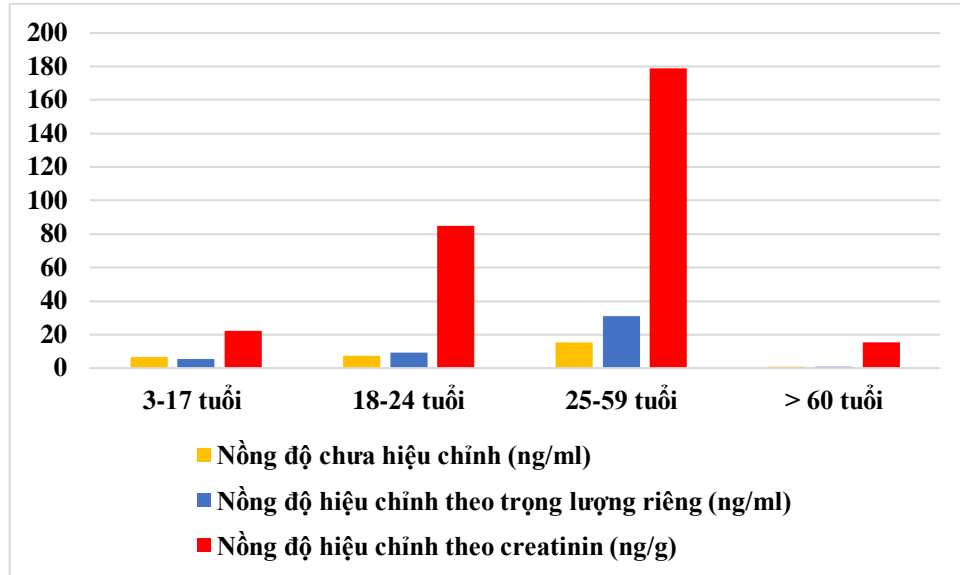
3.6. Xác định nguy cơ phơi nhiễm TDCPP trong các mẫu nước tiểu thu thập được và đánh giá nguy cơ ảnh hưởng đến sức khỏe con người.

Nồng độ trong nước tiểu của chất chuyển hóa BDCPP được điều chỉnh bằng trọng lượng riêng (SG) và Creatinin (Cr) và chúng được sử dụng so sánh giữa các nhóm tuổi và giới tính.

3.6.1. So sánh theo độ tuổi

Nhóm tình nguyện viên được chia thành 4 nhóm tuổi (nhóm 1 từ 3 - 17 tuổi; nhóm 2 từ 18 - 24 tuổi; nhóm 3 từ 25 - 59 tuổi; nhóm 4 với người > 60 tuổi), dựa vào kết quả của 4 nhóm tuổi chúng tôi xác định mối liên quan của độ tuổi và hàm lượng chất chuyển hóa BDCPP.

Nhóm 1 với độ tuổi từ 3 - 17, đây là nhóm tuổi đại diện cho trẻ em và người đang đi học. Nhóm 2 có độ tuổi từ 18 - 24 đại diện cho độ tuổi sinh viên. Nhóm 3 độ tuổi từ 25 - 59 đại diện cho độ tuổi lao động trong xã hội và cuối cùng nhóm 4 với độ tuổi > 60 đại diện cho người hết tuổi lao động. Kết quả bảng phân bố nồng độ theo độ tuổi thể hiện trong bảng 3.12. Để rõ hơn về kết quả phân bố, chúng tôi thể hiện trong hình 3.3.



Hình 3.3. Phân bố nồng độ chất chuyển hóa BDCPP theo độ tuổi

Bảng 3.12. Phân bố nồng độ BDCPP theo các độ tuổi

		Nồng độ chưa hiệu chỉnh (ng/mL)	Nồng độ hiệu chỉnh theo trọng lượng riêng (ng/mL)	Nồng độ hiệu chỉnh theo creatinin (ng/g)
3 - 17 tuổi	Giá trị nhỏ nhất	0,071	0,085	0,561
	Giá trị lớn nhất	32,781	26,202	108,001
	Giá trị trung bình	6,412	5,243	22,303
	Giá trị trung vị	1,072	1,113	8,411
	DF (%)	53	53	53
18 - 24 tuổi	Giá trị nhỏ nhất	0,452	0,432	4,391
	Giá trị lớn nhất	12,000	19,200	131,000
	Giá trị trung bình	7,251	9,092	84,903
	Giá trị trung vị	8,270	8,360	102,000
	DF (%)	57	57	57
25 - 59 tuổi	Giá trị nhỏ nhất	0,031	0,025	0,462
	Giá trị lớn nhất	49,612	238,000	716,000
	Giá trị trung bình	15,402	31,201	179,000
	Giá trị trung vị	8,481	6,790	83,202
	DF (%)	47	47	47
> 60 tuổi	Giá trị nhỏ nhất	0,070	0,062	0,711
	Giá trị lớn nhất	1,794	1,432	30,102
	Giá trị trung bình	0,931	0,742	15,440
	Giá trị trung vị	1,211	0,970	15,400
	DF (%)	67	67	67

Trung bình nồng độ cao nhất được phát hiện ở nhóm tuổi 25 - 59. Nồng độ chưa điều chỉnh của BDCPP là 15,40 ng/mL; nồng độ đã điều chỉnh theo trọng lượng riêng 31,20 ng/mL và nồng độ đã điều chỉnh theo creatinin 179 ng/g. Đây là nhóm

tuổi nằm trong khoảng thời gian lao động của con người, do đó thời gian ra ngoài làm việc tiếp xúc với nhiều nguồn phơi nhiễm đa dạng như khói bụi, hóa chất, quần áo, thiết bị điện tử, đồ nội thất ô tô... dẫn tới việc đa số thành viên có nồng độ phơi nhiễm cao. Theo một số nghiên cứu đã công bố [40, 41] nồng độ chất chuyển hóa BDCPP có mối tương quan chặt chẽ trong việc con người tiếp xúc nghề nghiệp với TDCPP. Tuy nhiên đây cũng là lứa tuổi có %DF thấp nhất với DF= 47%.

Theo những nghiên cứu trước đây, đối với nhóm tuổi trẻ em từ 1 - 3 tuổi, do khả năng nhận thức và thói quen hay cầm nắm và đưa lên miệng nên nồng độ phơi nhiễm cũng khá cao. Tuy nhiên, các tình nguyện trong nhóm tuổi 3 - 17 của chúng tôi có phân bố nồng độ mẫu xếp thứ 3 do một phần mẫu nước tiểu lấy của tình nguyện viên trong mùa hè, thời gian này trẻ em cũng được quan tâm chăm sóc hơn. Các bạn học sinh cũng ít tiếp xúc với môi trường bên ngoài hơn.

Tiếp theo, nhóm tuổi 18 - 24 tuổi là nhóm trong độ tuổi sinh viên, nồng độ phát hiện cũng khá cao, xếp thứ 2 trong 4 nhóm tuổi phân tích. Đây cũng là nhóm có đa số thành viên tiếp xúc với nhiều nguồn phơi nhiễm như thiết bị điện tử, thời trang đa dạng, khói bụi do đi lại nhiều. Cuối cùng là nhóm tuổi > 60, đây là nhóm thành viên có nồng độ trung bình thấp nhất.

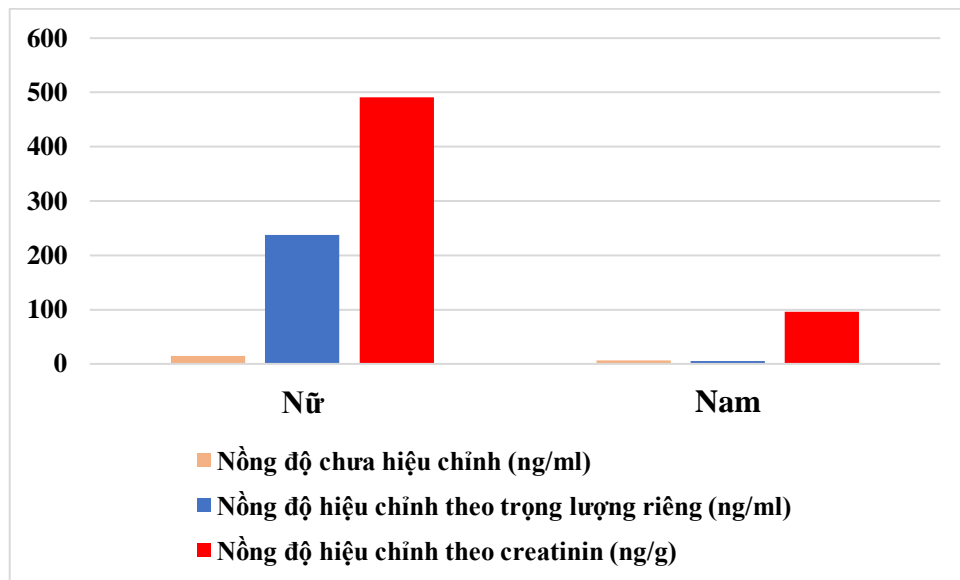
Sau khi đưa ra các kết quả phân tích trên, chúng tôi đã chỉ ra rằng nồng độ chất chuyển hóa chống cháy BDCPP phát hiện ở tất cả các nhóm tuổi. Trong đó nhóm tuổi 25 - 59 có nồng độ trung bình phơi nhiễm cao nhất và nhóm tuổi > 60 có nồng độ trung bình phơi nhiễm thấp nhất. Từ đó có thể lý giải được những nguyên nhân gây phơi nhiễm đến từ môi trường tiếp xúc hàng ngày như khói bụi trong nhà và ngoài đường, từ các vật dụng thiết bị điện tử, nội thất, hóa chất, quần áo thời trang.

3.6.2. So sánh theo giới tính

Trong nghiên cứu này, nhóm tình nguyện viên được lấy mẫu gồm nam và nữ. Kết quả nồng độ trong nước của chất chuyển hóa BDCPP sử dụng so sánh mức độ phơi nhiễm theo giới tính được thể hiện trong bảng 3.13. Để rõ hơn về kết quả phân bố, chúng tôi thể hiện trong hình 3.4.

Bảng 3.13. Kết quả nồng độ BDCPP theo giới tính

		Nồng độ chưa hiệu chỉnh (ng/mL)	Nồng độ hiệu chỉnh theo trọng lượng riêng (ng/mL)	Nồng độ hiệu chỉnh theo creatinin (ng/g)
Nam	Giá trị nhỏ nhất	0,0280	0,022	0,462
	Giá trị lớn nhất	43,000	34,401	717,000
	Giá trị trung bình	6,451	5,432	96,602
Nữ	Giá trị nhỏ nhất	0,072	0,061	0,712
	Giá trị lớn nhất	49,600	238,000	491,001
	Giá trị trung bình	14,400	29,901	122,000

**Hình 3.4. Phân bố nồng độ chất chuyển hóa BDCPP theo giới tính**

Kết quả cho thấy nồng độ chất chuyển hóa BDCPP được phát hiện ở nữ giới cao hơn nam giới. Điều đó chỉ ra, phụ nữ có khả năng gây phơi nhiễm cao hơn so với nam giới. Nguyên nhân dẫn tới điều này có thể lý giải là do phụ nữ có thời gian tiếp xúc thường xuyên với một số hóa chất làm đẹp nhưng sơn móng tay, móng chân; quần áo thời trang đa dạng; làm công việc nội trợ tiếp xúc với nhiều vật dụng nhựa.

3.6.3. Tính liều phơi nhiễm hàng ngày của chất chống cháy TDCPP

Kết quả được trình bày ở bảng 3.14.

Bảng 3.14. Liều lượng phơi nhiễm ước tính hàng ngày (ng/kg bw/day) với TDCPP được tính toán từ nồng độ của chất chuyển hóa BDCPP trong nước tiểu thu thập ở Hà Nội

		Giá trị	Liều phơi nhiễm ước tính hàng ngày TDCPP (ng/kg bw/day)
Giới tính	Nữ giới	Giá trị trung bình	627,0
		Giá trị trung vị	371,0
	Nam giới	Giá trị trung bình	281,0
		Giá trị trung vị	58,4
Độ tuổi	3-17 tuổi	Giá trị trung bình	304,0
		Giá trị trung vị	50,9
	18-24 tuổi	Giá trị trung bình	310,0
		Giá trị trung vị	353,0
	25-59 tuổi	Giá trị trung bình	658,0
		Giá trị trung vị	363,1
	>60 tuổi	Giá trị trung bình	39,7
		Giá trị trung vị	39,7

Kết quả liều phơi nhiễm ước tính hàng ngày của TDCPP giữa các độ tuổi cho thấy liều phơi nhiễm ở nhóm tuổi 25 - 59, các thành viên trong độ tuổi đi làm là cao nhất sau đó đến nhóm tuổi có độ tuổi sinh viên 18 - 24 tuổi và thấp nhất là nhóm hết tuổi lao động có độ tuổi > 60.

Kết quả tính toán theo giới tính chỉ ra giá trị trung bình liều lượng phơi nhiễm trên nữ giới cao gần gấp đôi nam giới. Kết quả này tương đồng với việc so sánh nồng độ của BDCPP ở mục 3.6.2.

Từ các kết quả về liều lượng phơi nhiễm của TDCPP theo phân bố giới tính và độ tuổi ở những tình nguyện viên trong khu vực Hà Nội tương đối cao so với 1 số nghiên cứu đã công bố trước đây trên thế giới [1, 15]. Từ đó cho thấy, người dân ở khu vực nội và ngoại thành Hà Nội có nguy cơ phơi nhiễm với chất chống cháy

TDCPP, nguồn gây ra nguy cơ phơi nhiễm do con người tiếp xúc với môi trường không khí bụi trong nhà và ngoài trời, sử dụng các thiết bị có chất chống cháy TDCPP như đồ nội thất gia đình, vật dụng nhựa.

KẾT LUẬN

Trên cơ sở các kết quả thực nghiệm đã nghiên cứu xác định được phương pháp xác định hàm lượng chất chuyển hóa BDCPP của chất chống cháy TDCPP bằng phương pháp sắc ký lỏng ghép nối khối phổ 2 lần (LC-MS/MS) đã thu được các kết quả sau:

Đã xác định được chiết tách BDCPP trong mẫu nước tiểu sử dụng cột chiết StrataX-AW với hiệu suất thu hồi ~ 96,5 %.

Đã xác định được các điều kiện chạy sắc ký lỏng khối phổ để đo BDCPP bao gồm: chương trình gradient; tốc độ dòng 0,2 mL/phút; cột ACQUITY UPLC C18 (150 × 2,1) mm; 1,7 μ m); mảnh m/z mẹ 318,87, mảnh m/z con 98,98 và 201,10. Đã xác định được khoảng tuyến tính (50-1000 ng/mL), đường chuẩn có hệ số tương quan tuyến tính là $R^2=0,996$; giới hạn phát hiện của thiết bị 0,01 ng/mL, giới hạn phát hiện của phương pháp 0,0085 ng/mL, giới hạn định lượng của phương pháp 0,025 ng/mL.

Đã phân tích BDCPP trong mẫu nước tiểu của nhóm tình nguyện viên trong khu vực Hà Nội. Xác định và đánh giá được liều phơi nhiễm TDCPP theo độ tuổi và giới tính của nhóm tình nguyện viên. Trung bình nồng độ cao nhất được phát hiện ở nhóm tuổi 25 - 59. Nồng độ chưa điều chỉnh của BDCPP là 15,402 ng/mL; nồng độ đã điều chỉnh theo trọng lượng riêng 31,201 ng/mL và nồng độ đã điều chỉnh theo creatinin 179,000 ng/g. Đối với giới tính, trung bình nồng độ cao nhất được phát hiện ở nữ giới. Nồng độ chưa điều chỉnh của BDCPP là 14,400 ng/mL; nồng độ đã điều chỉnh theo trọng lượng riêng 29,901 ng/mL và nồng độ đã điều chỉnh theo creatinin 122,000 ng/g. Liều phơi nhiễm hằng ngày của TDCPP trên cơ thể người đối với nhóm tuổi từ 25-59 tuổi trung bình là 658,0 ng/kg bw/day, trung bình đối với nữ giới là 627,0 ng/kg bw/day.

KIẾN NGHỊ

Cần phân tích BDCPP trên đa dạng mẫu nước tiểu trên những nhóm người

khác nhau như phụ nữ mang thai, nhóm người tiếp xúc nhiều vật liệu chống cháy như công an chữa cháy, trẻ sơ sinh.

Tiếp tục nghiên cứu mở rộng các chất thuộc nhóm chất chống cháy cơ photpho (OPFRs) và các chất chuyển hóa của chúng trong cơ thể người trên nền mẫu đa dạng hơn như máu, huyết tương.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Zhang, B., et al., 2018, Urinary metabolites of organophosphate flame retardants in 0–5-year-old children: Potential exposure risk for inpatients and home-stay infants. *Environmental Pollution*, 243: p. 318-325
2. Keller, A. S., Raju, N. P., Webster, T. F., & Stapleton, H. M., 2014, Flame retardant applications in camping tents and potential exposure. *Environmental science & technology letters*, 1(2), 152-155
3. Betts, K., 2012, Fire Retardants Abound in Baby Products: ES&T's Top Science Paper 2011.
4. Van der Veen, I., & de Boer, J., 2012, Phosphorus flame retardants: properties, production, environmental occurrence, toxicity and analysis. *Chemosphere*, 88(10), 1119-1153.
5. Dishaw, L. V., Powers, C. M., Ryde, I. T., Roberts, S. C., Seidler, F. J., Slotkin, T. A., & Stapleton, H. M., 2011, Is the PentaBDE replacement, tris (1, 3-dichloro-2-propyl) phosphate (TDCPP), a developmental neurotoxicant? Studies in PC12 cells. *Toxicology and applied pharmacology*, 256(3), 281-289.
6. Wang, C., Chen, H., Li, H., Yu, J., Wang, X., & Liu, Y. 2020. Review of emerging contaminant tris (1, 3-dichloro-2-propyl) phosphate: Environmental occurrence, exposure, and risks to organisms and human health. *Environment international*, 143, 105946.
7. Rodgers, T. F., Truong, J. W., Jantunen, L. M., Helm, P. A., & Diamond, M. L. 2018. Organophosphate ester transport, fate, and emissions in Toronto, Canada, estimated using an updated multimedia urban model. *Environmental science & technology*, 52(21), 12465-12474.
8. Babich, M. A, 2006, CPSC staff preliminary risk assessment of flame retardant (FR) chemicals in upholstered furniture foam. US Consumer Product Safety Commission, 21
9. Du, Z., Wang, G., Gao, S., & Wang, Z, 2015, Aryl organophosphate flame retardants induced cardiotoxicity during zebrafish embryogenesis: by disturbing expression of the transcriptional regulators. *Aquatic Toxicology*, 161, 25-32.
10. <https://www.chemspider.com/Chemical-Structure.163519.html>
11. Krystek, P., Beeltje, H., Noteboom, M., van den Hoeven, E. M., & Houtzager, M. M., 2019, Analytical human biomonitoring method for the identification and quantification of the metabolite BDCPP originated from the organophosphate flame retardant TDCPP in urine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 170, 169-175.

12. Romano, M. E., Hawley, N. L., Eliot, M., Calafat, A. M., Jayatilaka, N. K., Kelsey, K., ... & Braun, J. M. 2017. Variability and predictors of urinary concentrations of organophosphate flame retardant metabolites among pregnant women in Rhode Island. *Environmental Health*, 16(1), 1-11.
13. Tenlep, S. Y. N., Weaver, M., Chen, J., Vsevolozhskaya, O., Morris, A. J., & Rashid, C. S. 2023. Tris (1, 3-dichloro-2-propyl) phosphate is a metabolism-disrupting chemical in male mice. *Toxicology Letters*, 374, 31-39.
14. Mayer, A. C., Fent, K. W., Chen, I. C., Sammons, D., Toennis, C., Robertson, S., ... & Sjodin, A. 2021. Characterizing exposures to flame retardants, dioxins, and furans among firefighters responding to controlled residential fires. *International journal of hygiene and environmental health*, 236, 113782.
15. Wang, Y., Li, W., Martínez-Moral, M. P., Sun, H., & Kannan, K. 2019. Metabolites of organophosphate esters in urine from the United States: Concentrations, temporal variability, and exposure assessment. *Environment international*, 122, 213-221.
16. Greeson, K. W., Fowler, K. L., Estave, P. M., Kate Thompson, S., Wagner, C., Clayton Edenfield, R., ... & Easley IV, C. A. 2020. Detrimental effects of flame retardant, PBB153, exposure on sperm and future generations. *Scientific Reports*, 10(1), 8567.
17. Freudenthal, R. I., & Henrich, R. T. 2000. Chronic toxicity and carcinogenic potential of tris-(1, 3-dichloro-2-propyl) phosphate in Sprague-Dawley rat. *International Journal of Toxicology*, 19(2), 119-125.
18. Meeker, J. D., & Stapleton, H. M. 2010. House dust concentrations of organophosphate flame retardants in relation to hormone levels and semen quality parameters. *Environmental health perspectives*, 118(3), 318-323.
19. Ji, Y., Yao, Y., Duan, Y., Zhao, H., Hong, Y., Cai, Z., & Sun, H. 2021. Association between urinary organophosphate flame retardant diesters and steroid hormones: A metabolomic study on type 2 diabetes mellitus cases and controls. *Science of The Total Environment*, 756, 143836.
20. Dishaw, L. V., Powers, C. M., Ryde, I. T., Roberts, S. C., Seidler, F. J., Slotkin, T. A., & Stapleton, H. M. 2011. Is the PentaBDE replacement, tris (1, 3-dichloro-2-propyl) phosphate (TDCPP), a developmental neurotoxicant? Studies in PC12 cells. *Toxicology and applied pharmacology*, 256(3), 281-289.
21. Crawford, K. A., Hawley, N., Calafat, A. M., Jayatilaka, N. K., Froehlich, R. J., Has, P., ... & Romano, M. E. 2020. Maternal urinary concentrations of organophosphate ester metabolites: associations with gestational weight gain, early life anthropometry, and infant eating behaviors among mothers-infant pairs in Rhode Island. *Environmental health*, 19(1), 1-12.

22. Ashri, N. Y., & Abdel-Rehim, M. 2011. Sample treatment based on extraction techniques in biological matrices. *Bioanalysis*, 3(17), 2003-2018.
23. Tiếng việt, Nguyễn Thị Thanh Nga. 2022. Nghiên cứu xây dựng phương pháp phân tích Diphenyl Phosphate (DPP) trong nước tiểu bằng phương pháp sắc ký lỏng ghép nối khối phổ (LC/MS) để đánh giá rủi ro sức khỏe của hóa chất này đến con người. *Luận văn thạc sĩ hóa phân tích, Học viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam*.
24. Dirtu, A. C., Van den Eede, N., Malarvannan, G., Ionas, A. C., & Covaci, A. 2012. Analytical methods for selected emerging contaminants in human matrices—a review. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 404, 2555-2581.
25. Hoffman, K., Butt, C. M., Webster, T. F., Preston, E. V., Hammel, S. C., Makey, C., ... & Stapleton, H. M. 2017. Temporal trends in exposure to organophosphate flame retardants in the United States. *Environmental science & technology letters*, 4(3), 112-118.
26. Hou, M., Shi, Y., Jin, Q., & Cai, Y. 2020. Organophosphate esters and their metabolites in paired human whole blood, serum, and urine as biomarkers of exposure. *Environment international*, 139, 105698.
27. Ma, Y., Cui, K., Zeng, F., Wen, J., Liu, H., Zhu, F., ... & Zeng, Z. 2013. Microwave-assisted extraction combined with gel permeation chromatography and silica gel cleanup followed by gas chromatography–mass spectrometry for the determination of organophosphorus flame retardants and plasticizers in biological samples. *Analytica Chimica Acta*, 786, 47-53.
28. Beser. M. I, Pardo.O, Beltran. J, Yus.V, 2019, Determination of 21 per fluoroalkyl substances and organophosphorus compounds in breast milk by liquid chromatography coupled to orbitrap high-resolution mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta*, 1049, pp. 123-132
29. Sun, Y., Gong, X., Lin, W., Liu, Y., Wang, Y., Wu, M., ... & Ma, J. 2018. Metabolites of organophosphate ester flame retardants in urine from Shanghai, China. *Environmental research*, 164, 507-515.
30. Li. P, Jin, Wang. Y, Hu.J, Xu. M, Sun. Y, Ma. Y, 2017, Concentrations of organophosphorus, polybromobenzene, and polybrominated diphenyl ether flame retardants in human serum, and relationships between concentrations and donor ages, *Chemosphere*, 171, pp. 654-660.
31. Cooper, E. M., Covaci, A., Van Nuijs, A. L. N., Webster, T. F., & Stapleton, H. M. 2011. Analysis of the flame retardant metabolites bis (1, 3-dichloro-2-propyl) phosphate (BDCPP) and diphenyl phosphate (DPP) in urine using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 401, 2123-2132.
32. Van den Eede, N., Heffernan, A. L., Aylward, L. L., Hobson, P., Neels, H., Mueller, J. F., & Covaci, A. 2015. Age as a determinant of phosphate flame

- retardant exposure of the Australian population and identification of novel urinary PFR metabolites. *Environment international*, 74, 1-8.
33. Butt, C. M., Congleton, J., Hoffman, K., Fang, M., & Stapleton, H. M. 2014. Metabolites of organophosphate flame retardants and 2-ethylhexyl tetrabromobenzoate in urine from paired mothers and toddlers. *Environmental science & technology*, 48(17), 10432-10438.
 34. Thomas, M. B., Stapleton, H. M., Dills, R. L., Violette, H. D., Christakis, D. A., & Sathyanarayana, S. 2017. Demographic and dietary risk factors in relation to urinary metabolites of organophosphate flame retardants in toddlers. *Chemosphere*, 185, 918-925.
 35. Li, M., Yao, Y., Wang, Y., Bastiaansen, M., Covaci, A., & Sun, H. 2020. Organophosphate ester flame retardants and plasticizers in a Chinese population: significance of hydroxylated metabolites and implication for human exposure. *Environmental Pollution*, 257, 113633.
 36. Haynes, W. M. (Ed.). 2014. *CRC handbook of chemistry and physics*. CRC press.
 37. Hoffman, K., J.L. Daniels, and H.M. Stapleton, 2014, Urinary metabolites of organophosphate flame retardants and their variability in pregnant women. *Environment international*, 63: p. 169-172.
 38. Chen, Z., Qiu, S., Zhang, C., Zhan, Y., Liu, L., Bao, Y., ... & Wei, Q. 2022. Association of urinary organophosphate esters level with sex steroid hormones levels in adult males: A nationwide study, NHANES 2013–2014. *Andrology*, 10(3), 567-575.
 39. Castorina, R., Butt, C., Stapleton, H. M., Avery, D., Harley, K. G., Holland, N., ... & Bradman, A. 2017. Flame retardants and their metabolites in the homes and urine of pregnant women residing in California. *Chemosphere*, 179, 159-166.
 40. Assessment, R. (2008). European Union Risk Assessment Report. *Risk*.
 41. Krystek, P., & Ritsema, R. (2002). Determination of uranium in urine—measurement of isotope ratios and quantification by use of inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 374, 226-229.

**Phụ lục 01. Kết quả đặc điểm cơ bản của mẫu nước tiểu
từ các tình nguyện viên**

STT	Tên mẫu	Tuổi	Giới tính	Glucose mmol/L	pH	Specific Gravity	Protein (g/L)	Creatine (g/L)
1	U1	9	nam	neg.	5	1,030	neg.	1
2	U2	36	nữ	neg.	5	1,030	neg.	1
3	U3	38	nam	neg.	6	1,030	neg.	1
4	U4	5	nữ	neg.	6	1,030	neg.	0,5
5	U5	40	nam	neg.	6	1,030	neg.	1
6	U6	38	nữ	neg.	5	1,030	neg.	1
7	U7	12	nam	neg.	6	1,030	neg.	0,5
8	U8	76	nữ	neg.	7	1,030	neg.	0,1
9	U9	13	nữ	neg.	7	1,015	neg.	1
10	U10	37	nữ	neg.	7	1,015	neg.	0,1
11	U11	37	nam	neg.	7	1,015	neg.	0,1
12	U12	7	nữ	neg.	6	1,025	neg.	0,1
13	U13	18	nữ	neg.	6	1,030	neg.	1
14	U14	11	nam	neg.	6	1,030	neg.	0,1
15	U15	43	nữ	neg.	6	1,030	neg.	0,1
16	U16	45	nam	neg.	6	1,025	neg.	0,1
17	U17	15	nam	neg.	6	1,030	neg.	1
18	U18	38	nữ	neg.	8	1,000	trace	0,1
19	U19	3	nữ	neg.	6	1,020	neg.	0,1
20	U20	7	nữ	neg.	7,5	1,005	neg.	0,1
21	U21	38	nam	neg.	6,5	1,030	neg.	0,1
22	U22	10	nam	neg.	6	1,030	neg.	0,1
23	U23	68	nữ	neg.	6	1,030	neg.	0,1
24	U24	30	nữ	neg.	8	1,005	trace	0,1
25	U25	30	nữ	neg.	6	1,030	neg.	0,5
26	U26	33	nam	neg.	8	1,005	neg.	0,1
27	U27	28	nữ	neg.	7,5	1,010	3	0,1
28	U28	68	nam	neg.	6,5	1,030	trace	0,1

29	U29	42	nũ	neg.	6	1,025	neg.	0,1
30	U30	42	nam	28	6	1,030	neg.	0,1
31	U31	10	nam	neg.	7	1,025	neg.	0,1
32	U32	6	nam	neg.	7	1,015	neg.	0,1
33	U33	9	nam	neg.	8	1,010	3	0,1
34	U34	5	nam	neg.	7	1,020	3	0,1
35	U35	37	nũ	neg.	6	1,030	neg.	0,1
36	U36	14	nũ	neg.	6	1,030	neg.	0,1
37	U37	3	nũ	neg.	6	1,030	neg.	0,1
38	U38	42	nam	neg.	6	1,030	neg.	0,1
39	U39	6	nũ	neg.	6	1,030	neg.	0,1
40	U40	42	nũ	neg.	6	1,030	neg.	0,1
41	U41	30	nam	neg.	6	1,030	neg.	0,1
42	U42	51	nam	neg.	6,5	1,030	neg.	0,1
43	U43	30	nũ	neg.	6	1,030	neg.	0,1
44	U44	28	nam	neg.	6	1,030	neg.	0,1
45	U45	49	nũ	neg.	6	1,030	neg.	0,1
46	U46	25	nũ	neg.	6,5	1,025	neg.	0,1
47	U47	20	nũ	neg.	6,5	1,025	neg.	0,1
48	U48	27	nam	neg.	6	1,030	neg.	0,1
49	U49	26	nam	neg.	6	1,030	neg.	0,1
50	U50	24	nũ	neg.	7	1,000	neg.	0,1
51	U51	24	nũ	neg.	7	1,025	neg.	0,1
52	U52	23	nũ	neg.	6	1,030	neg.	0,1
53	U53	25	nũ	neg.	6	1,020	neg.	0,1
54	U54	23	nũ	neg.	6	1,020	neg.	0,1
55	U55	34	nũ	neg.	8	1,010	neg.	0,1
56	U56	38	nũ	neg.	6	1,025	neg.	0,1
57	U57	35	nũ	neg.	6	1,020	neg.	0,1
58	U58	31	nũ	neg.	7,5	1,010	neg.	0,1
59	U59	23	nam	neg.	6	1,030	neg.	0,1

Phụ lục 02. Thông tin điều tra từ các tình nguyện viên tham gia

ST T	Ký hiệu	Tuổi	Giới tính	Quận phường	STT	Ký hiệu	Tuổi	Giới tính	Quận phường
1	U1	9	nam	Xuân Đỉnh	31	U31	10	nam	Mai Dịch
2	U2	36	nữ	Xuân Đỉnh	32	U32	6	nam	Mai Dịch
3	U3	38	nam	Xuân Đỉnh	33	U33	9	nam	Đông Ngạc
4	U4	5	nữ	Xuân Đỉnh	34	U34	5	nam	Đông Ngạc
5	U5	40	nam	Đông Anh	35	U35	37	nữ	Đông Ngạc
6	U6	38	nữ	Đông Anh	36	U36	14	nữ	Mẽ Trì/Nam Từ Liêm
7	U7	12	nam	Đông Anh	37	U37	3	nữ	Mẽ Trì/Nam Từ Liêm
8	U8	76	nữ	Đông Anh	38	U38	42	nam	Mẽ Trì/Nam Từ Liêm
9	U9	13	nữ	Tây Mỗ	39	U39	6	nữ	Mẽ Trì/Nam Từ Liêm
10	U10	37	nữ	Tây Mỗ	40	U40	42	nữ	Mẽ Trì/Nam Từ Liêm
11	U11	37	nam	Tây Mỗ	41	U41	30	nam	Xuân Mai
12	U12	7	nữ	Tây Mỗ	42	U42	51	nam	Xuân Mai
13	U13	18	nữ	An Khánh	43	U43	30	nữ	Xuân Mai
14	U14	11	nam	An Khánh	44	U44	28	nam	Xuân Mai
15	U15	43	nữ	An Khánh	45	U45	49	nữ	Xuân Mai
16	U16	45	nam	An Khánh	46	U46	25	nữ	Cổ Nhuế
17	U17	15	nam	An Khánh	47	U47	20	nữ	Cổ Nhuế

18	U18	38	nữ	Hoài Đức	48	U48	27	nam	Cổ Nhuế
19	U19	3	nữ	Hoài Đức	49	U49	26	nam	Cổ Nhuế
20	U20	7	nữ	Hoài Đức	50	U50	24	nữ	Cổ Nhuế
21	U21	38	nam	Hoài Đức	51	U51	24	nữ	Cầu Giấy
22	U22	10	nam	Hoài Đức	52	U52	23	nữ	VHH/Cầu Giấy
23	U23	68	nữ	Hoài Đức	53	U53	25	nữ	VHH/Thanh Xuân
24	U24	30	nữ	Thanh Xuân	54	U54	23	nữ	VHH/Thanh Xuân
25	U25	30	nữ	Thanh Xuân	55	U55	34	nữ	VHH/Thanh Xuân
26	U26	33	nam	Gia Lâm	56	U56	38	nữ	(Xuân)VH H/Cầu Giấy
27	U27	28	nữ	Nam Từ Liêm	57	U57	35	nữ	VHH/Cầu Giấy
28	U28	68	nam	Cầu Giấy	58	U58	31	nữ	VHH/Cầu Giấy
29	U29	42	nữ	Mai Dịch	59	U59	23	nam	VHH/Cầu Giấy
30	U30	42	nam	Mai Dịch					

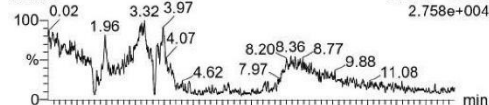
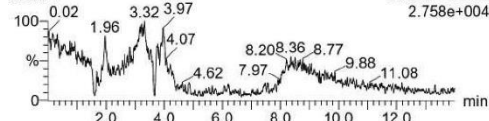
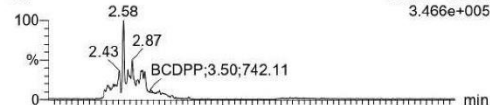
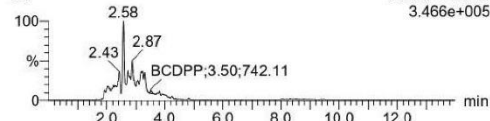
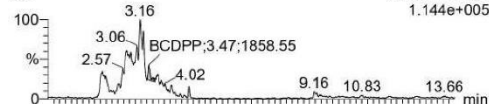
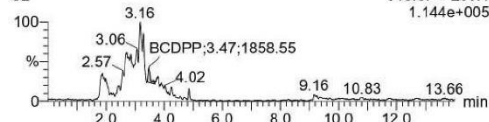
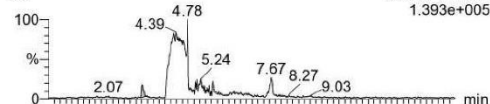
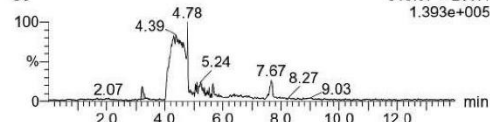
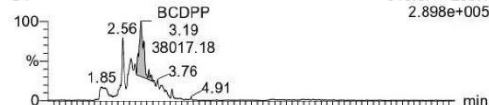
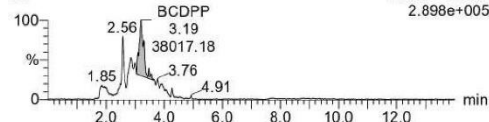
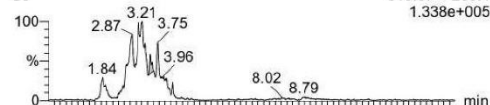
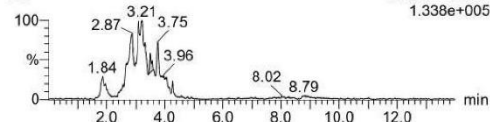
Quantify Compound Report MassLynx V4.2 SCN1007

Page 14 of 52

Dataset: Untitled

Last Altered: Thursday, March 30, 2023 17:02:43 SE Asia Standard Time

Printed: Thursday, March 30, 2023 17:03:27 SE Asia Standard Time

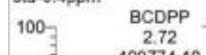
Sample Name: 032023-spl-1032023-spl-1 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
blank 1 318.87 > 209.1
2.758e+004032023-spl-1 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
blank 1 318.87 > 209.1
2.758e+004**Sample Name: 032023-spl-2**032023-spl-2 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U1 318.87 > 209.1
3.466e+005032023-spl-2 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U1 318.87 > 209.1
3.466e+005**Sample Name: 032023-spl-3**032023-spl-3 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U2 318.87 > 209.1
1.144e+005032023-spl-3 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U2 318.87 > 209.1
1.144e+005**Sample Name: 032023-spl-4**032023-spl-4 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U3 318.87 > 209.1
1.393e+005032023-spl-4 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U3 318.87 > 209.1
1.393e+005**Sample Name: 032023-spl-5**032023-spl-5 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U4 318.87 > 209.1
2.898e+005032023-spl-5 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U4 318.87 > 209.1
2.898e+005**Sample Name: 032023-spl-6**032023-spl-6 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U5 318.87 > 209.1
1.338e+005032023-spl-6 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U5 318.87 > 209.1
1.338e+005

Quantify Compound Report MassLynx V4.2 SCN1007

Dataset: Untitled

Last Altered: Thursday, March 23, 2023 17:02:43 SE Asia Standard Time

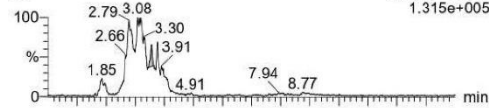
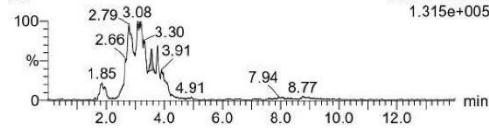
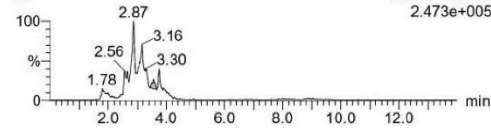
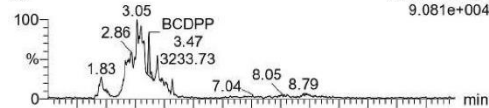
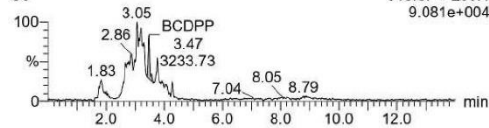
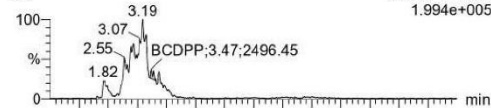
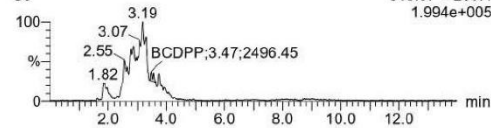
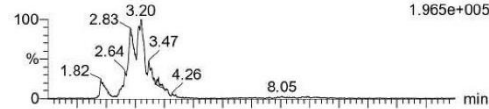
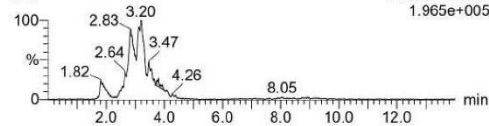
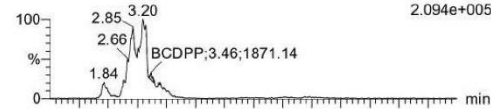
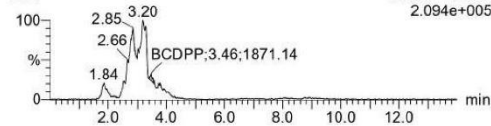
Printed: Thursday, March 23, 2023 17:03:27 SE Asia Standard Time

Sample Name: 23032023-spl-69-23032023-spl-69- Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
std-0.4ppm 318.87 > 209.1
1.947e+006**Sample Name: 23032023-spl-70-**23032023-spl-70- Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
std-0.2ppm 318.87 > 209.1
1.062e+006

Dataset: Untitled

Last Altered: Thursday, March 30, 2023 17:02:43 SE Asia Standard Time

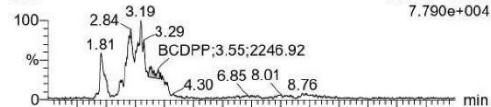
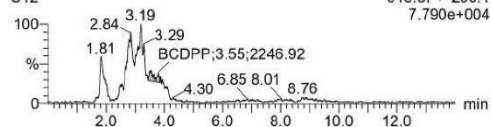
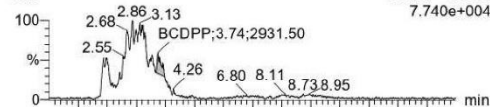
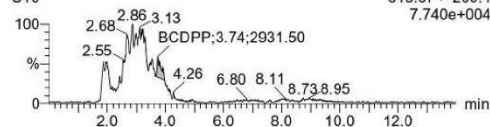
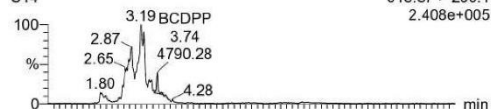
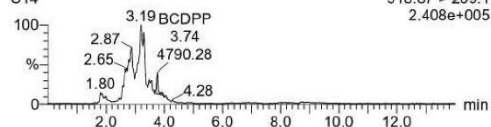
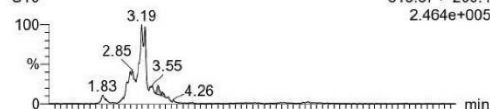
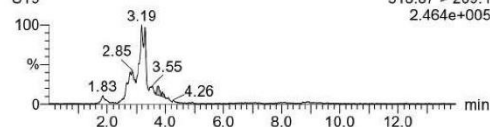
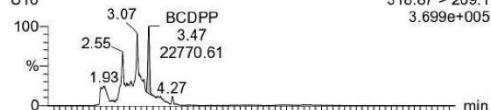
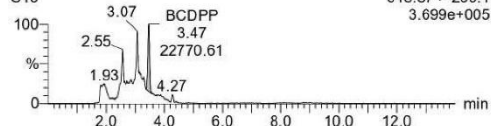
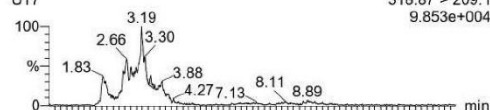
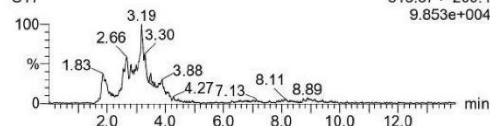
Printed: Thursday, March 30, 2023 17:03:27 SE Asia Standard Time

Sample Name: 032023-spl-7032023-spl-7 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U6 318.87 > 209.1
1.315e+005032023-spl-7 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U6 318.87 > 209.1
1.315e+005**Sample Name: 032023-spl-8**032023-spl-8 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U7 318.87 > 209.1
2.473e+005032023-spl-8 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U7 318.87 > 209.1
2.473e+005**Sample Name: 032023-spl-9**032023-spl-9 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U8 318.87 > 209.1
9.081e+004032023-spl-9 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U8 318.87 > 209.1
9.081e+004**Sample Name: 032023-spl-10**032023-spl-10 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U9 318.87 > 209.1
1.994e+005032023-spl-10 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U9 318.87 > 209.1
1.994e+005**Sample Name: 032023-spl-11**032023-spl-11 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U10 318.87 > 209.1
1.965e+005032023-spl-11 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U10 318.87 > 209.1
1.965e+005**Sample Name: 032023-spl-12**032023-spl-12 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U11 318.87 > 209.1
2.094e+005032023-spl-12 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U11 318.87 > 209.1
2.094e+005

Dataset: Untitled

Last Altered: Thursday, March 30, 2023 17:02:43 SE Asia Standard Time

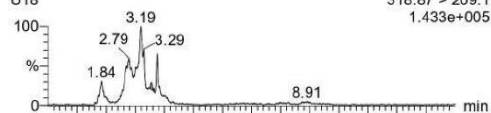
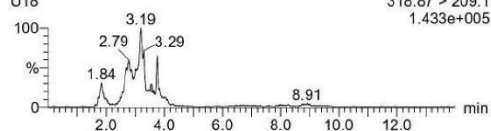
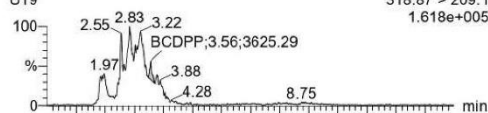
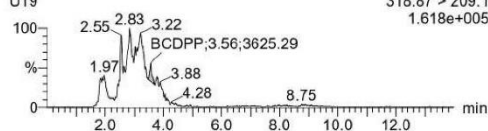
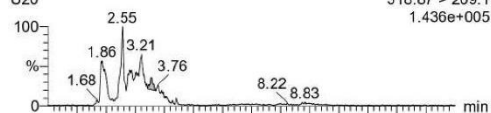
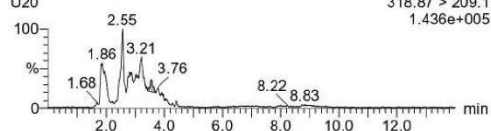
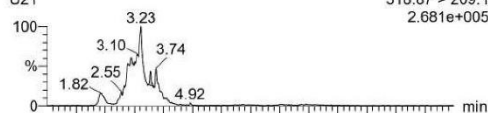
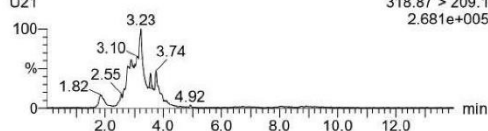
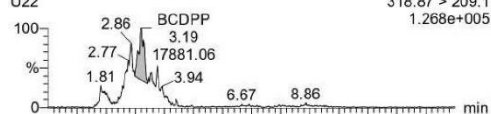
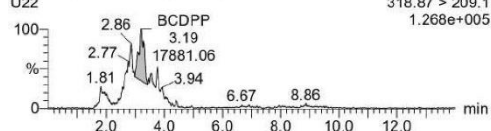
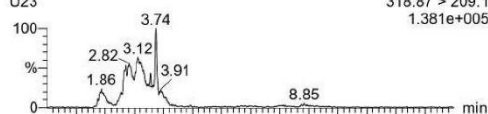
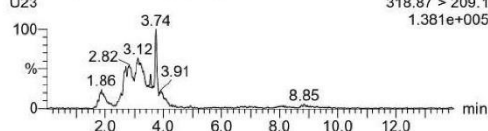
Printed: Thursday, March 30, 2023 17:03:27 SE Asia Standard Time

Sample Name: 032023-spl-13032023-spl-13 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U12 318.87 > 209.1
7.790e+004032023-spl-13 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U12 318.87 > 209.1
7.790e+004**Sample Name: 032023-spl-14**032023-spl-14 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U13 318.87 > 209.1
7.740e+004032023-spl-14 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U13 318.87 > 209.1
7.740e+004**Sample Name: 032023-spl-15**032023-spl-15 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U14 318.87 > 209.1
2.408e+005032023-spl-15 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U14 318.87 > 209.1
2.408e+005**Sample Name: 032023-spl-16**032023-spl-16 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U15 318.87 > 209.1
2.464e+005032023-spl-16 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U15 318.87 > 209.1
2.464e+005**Sample Name: 032023-spl-17**032023-spl-17 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U16 318.87 > 209.1
3.699e+005032023-spl-17 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U16 318.87 > 209.1
3.699e+005**Sample Name: 032023-spl-18**032023-spl-18 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U17 318.87 > 209.1
9.853e+004032023-spl-18 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U17 318.87 > 209.1
9.853e+004

Dataset: Untitled

Last Altered: Thursday, March 30, 2023 17:02:43 SE Asia Standard Time

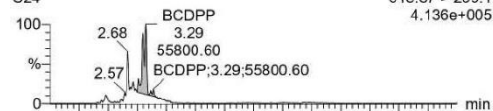
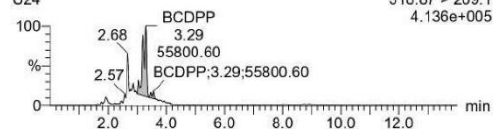
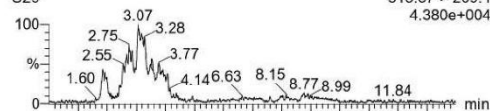
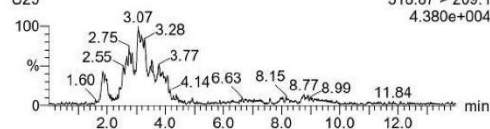
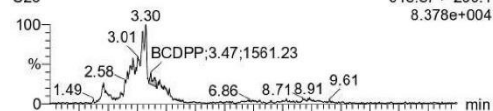
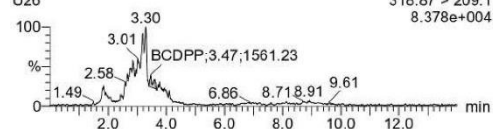
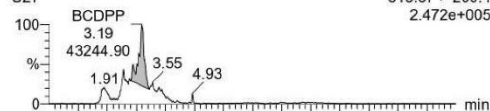
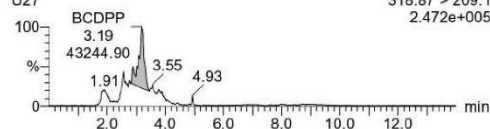
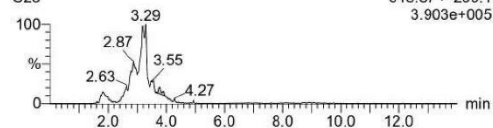
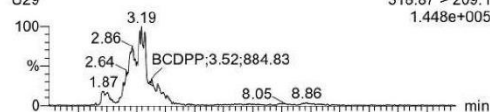
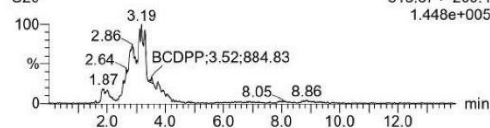
Printed: Thursday, March 30, 2023 17:03:27 SE Asia Standard Time

Sample Name: 032023-spl-19032023-spl-19 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U18 318.87 > 209.1
1.433e+005032023-spl-19 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U18 318.87 > 209.1
1.433e+005**Sample Name: 032023-spl-20**032023-spl-20 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U19 318.87 > 209.1
1.618e+005032023-spl-20 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U19 318.87 > 209.1
1.618e+005**Sample Name: 032023-spl-21**032023-spl-21 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U20 318.87 > 209.1
1.436e+005032023-spl-21 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U20 318.87 > 209.1
1.436e+005**Sample Name: 032023-spl-22**032023-spl-22 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U21 318.87 > 209.1
2.681e+005032023-spl-22 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U21 318.87 > 209.1
2.681e+005**Sample Name: 032023-spl-23**032023-spl-23 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U22 318.87 > 209.1
1.268e+005032023-spl-23 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U22 318.87 > 209.1
1.268e+005**Sample Name: 032023-spl-24**032023-spl-24 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U23 318.87 > 209.1
1.381e+005032023-spl-24 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U23 318.87 > 209.1
1.381e+005

Dataset: Untitled

Last Altered: Thursday, March 30, 2023 17:02:43 SE Asia Standard Time

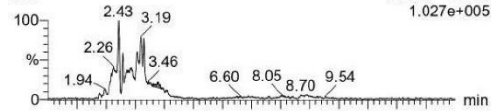
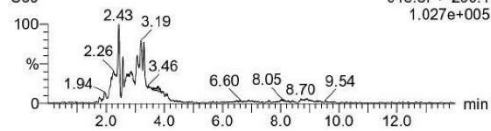
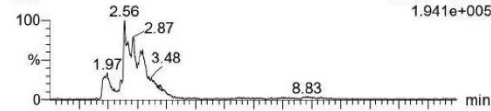
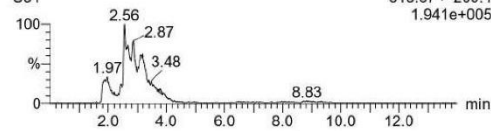
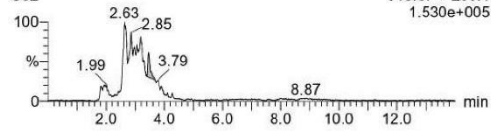
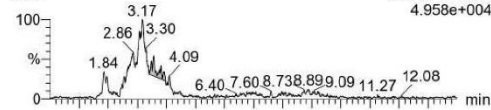
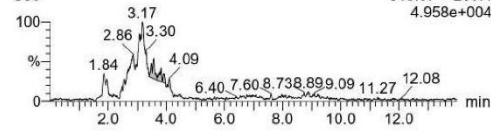
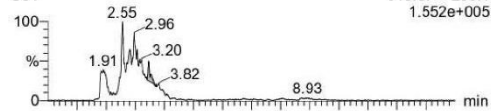
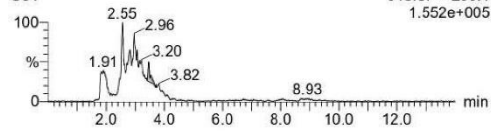
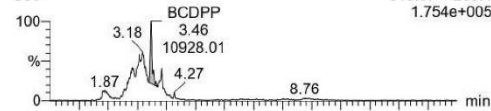
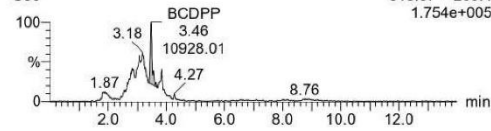
Printed: Thursday, March 30, 2023 17:03:27 SE Asia Standard Time

Sample Name: 032023-spl-25032023-spl-25 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U24 318.87 > 209.1
4.136e+005032023-spl-25 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U24 318.87 > 209.1
4.136e+005**Sample Name: 032023-spl-26**032023-spl-26 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U25 318.87 > 209.1
4.380e+004032023-spl-26 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U25 318.87 > 209.1
4.380e+004**Sample Name: 032023-spl-27**032023-spl-27 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U26 318.87 > 209.1
8.378e+004032023-spl-27 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U26 318.87 > 209.1
8.378e+004**Sample Name: 032023-spl-28**032023-spl-28 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U27 318.87 > 209.1
2.472e+005032023-spl-28 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U27 318.87 > 209.1
2.472e+005**Sample Name: 032023-spl-29**032023-spl-29 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U28 318.87 > 209.1
3.903e+005032023-spl-29 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U28 318.87 > 209.1
3.903e+005**Sample Name: 032023-spl-30**032023-spl-30 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U29 318.87 > 209.1
1.448e+005032023-spl-30 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U29 318.87 > 209.1
1.448e+005

Dataset: Untitled

Last Altered: Thursday, March 30, 2023 17:02:43 SE Asia Standard Time

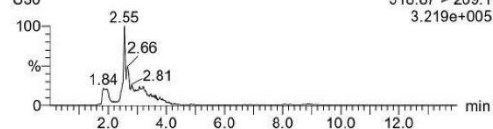
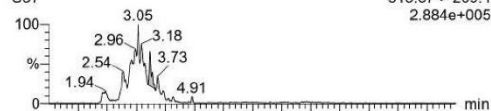
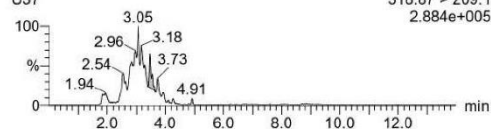
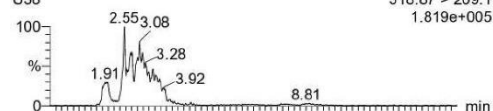
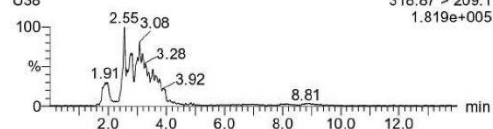
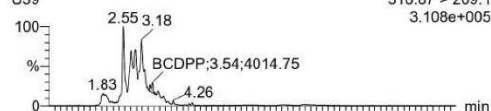
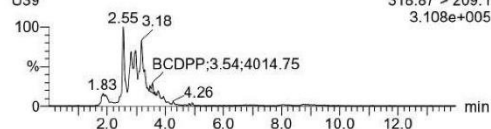
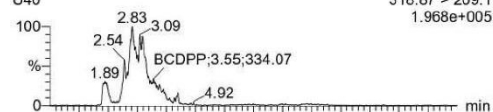
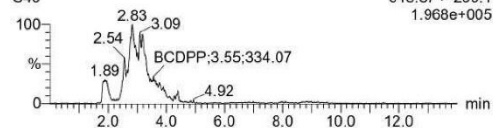
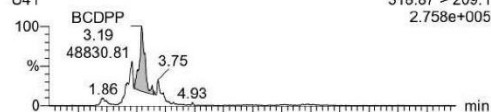
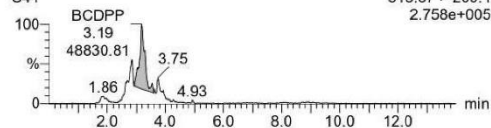
Printed: Thursday, March 30, 2023 17:03:27 SE Asia Standard Time

Sample Name: 032023-spl-31032023-spl-31 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U30 318.87 > 209.1
1.027e+005032023-spl-31 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U30 318.87 > 209.1
1.027e+005**Sample Name: 032023-spl-32**032023-spl-32 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U31 318.87 > 209.1
1.941e+005032023-spl-32 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U31 318.87 > 209.1
1.941e+005**Sample Name: 032023-spl-33**032023-spl-33 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U32 318.87 > 209.1
1.530e+005032023-spl-33 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U32 318.87 > 209.1
1.530e+005**Sample Name: 032023-spl-34**032023-spl-34 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U33 318.87 > 209.1
4.958e+004032023-spl-34 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U33 318.87 > 209.1
4.958e+004**Sample Name: 032023-spl-35**032023-spl-35 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U34 318.87 > 209.1
1.552e+005032023-spl-35 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U34 318.87 > 209.1
1.552e+005**Sample Name: 032023-spl-36**032023-spl-36 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U35 318.87 > 209.1
1.754e+005032023-spl-36 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U35 318.87 > 209.1
1.754e+005

Dataset: Untitled

Last Altered: Thursday, March 30, 2023 17:02:43 SE Asia Standard Time

Printed: Thursday, March 30, 2023 17:03:27 SE Asia Standard Time

Sample Name: 032023-spl-37032023-spl-37 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U36 318.87 > 209.1
3.219e+005032023-spl-37 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U36 318.87 > 209.1
3.219e+005**Sample Name: 032023-spl-38**032023-spl-38 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U37 318.87 > 209.1
2.884e+005032023-spl-38 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U37 318.87 > 209.1
2.884e+005**Sample Name: 032023-spl-39**032023-spl-39 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U38 318.87 > 209.1
1.819e+005032023-spl-39 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U38 318.87 > 209.1
1.819e+005**Sample Name: 032023-spl-40**032023-spl-40 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U39 318.87 > 209.1
3.108e+005032023-spl-40 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U39 318.87 > 209.1
3.108e+005**Sample Name: 032023-spl-41**032023-spl-41 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U40 318.87 > 209.1
1.968e+005032023-spl-41 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U40 318.87 > 209.1
1.968e+005**Sample Name: 032023-spl-42**032023-spl-42 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U41 318.87 > 209.1
2.758e+005032023-spl-42 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U41 318.87 > 209.1
2.758e+005

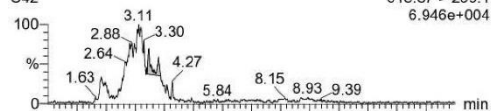
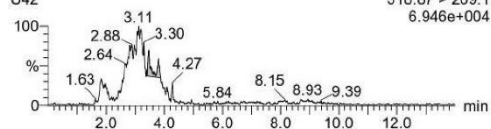
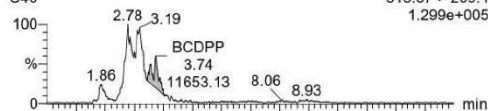
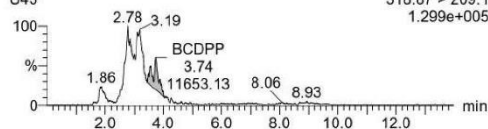
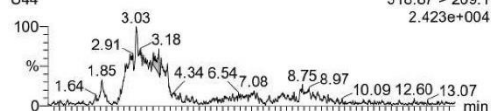
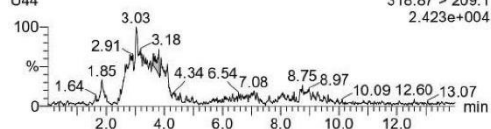
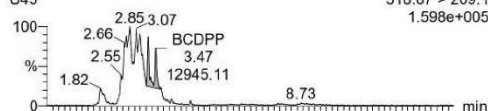
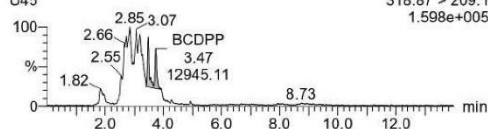
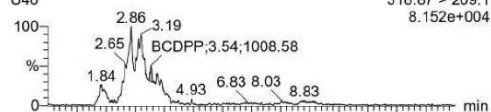
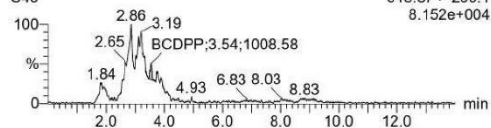
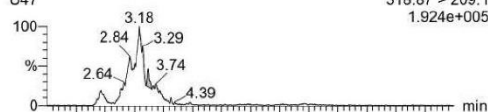
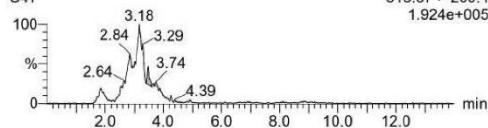
Quantify Compound Report MassLynx V4.2 SCN1007

Page 21 of 52

Dataset: Untitled

Last Altered: Thursday, March 30, 2023 17:02:43 SE Asia Standard Time

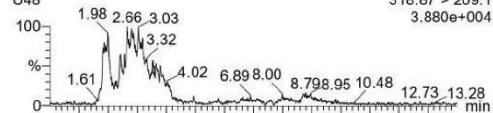
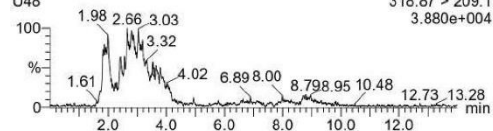
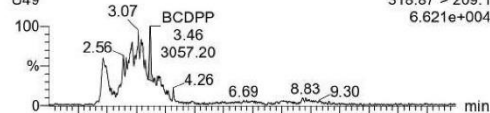
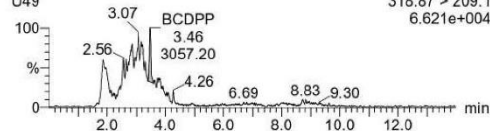
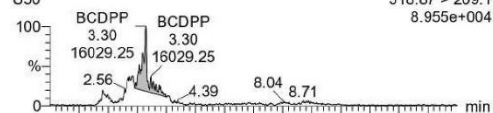
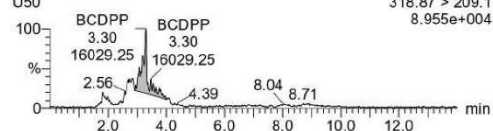
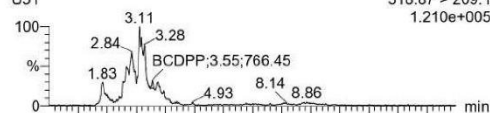
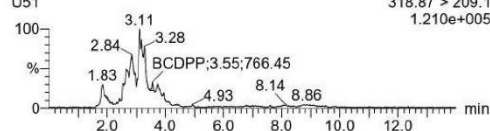
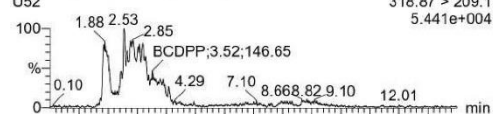
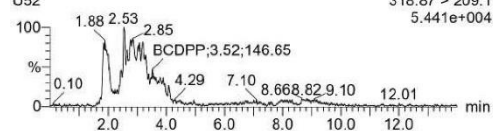
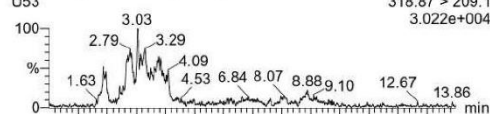
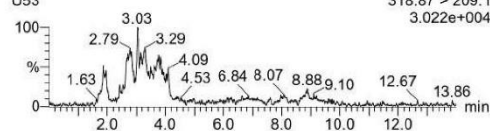
Printed: Thursday, March 30, 2023 17:03:27 SE Asia Standard Time

Sample Name: 032023-spl-43032023-spl-43 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U42 318.87 > 209.1
6.946e+004032023-spl-43 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U42 318.87 > 209.1
6.946e+004**Sample Name: 032023-spl-44**032023-spl-44 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U43 318.87 > 209.1
1.299e+005032023-spl-44 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U43 318.87 > 209.1
1.299e+005**Sample Name: 032023-spl-45**032023-spl-45 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U44 318.87 > 209.1
2.423e+004032023-spl-45 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U44 318.87 > 209.1
2.423e+004**Sample Name: 032023-spl-46**032023-spl-46 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U45 318.87 > 209.1
1.598e+005032023-spl-46 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U45 318.87 > 209.1
1.598e+005**Sample Name: 032023-spl-47**032023-spl-47 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U46 318.87 > 209.1
8.152e+004032023-spl-47 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U46 318.87 > 209.1
8.152e+004**Sample Name: 032023-spl-48**032023-spl-48 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U47 318.87 > 209.1
1.924e+005032023-spl-48 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U47 318.87 > 209.1
1.924e+005

Dataset: Untitled

Last Altered: Thursday, March 30, 2023 17:02:43 SE Asia Standard Time

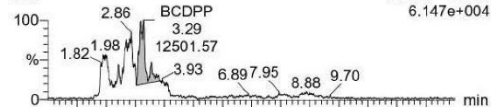
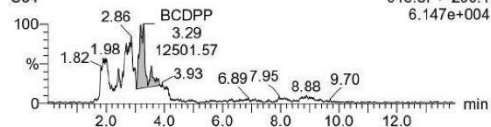
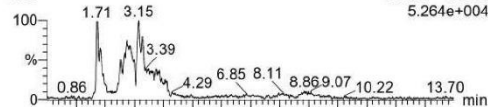
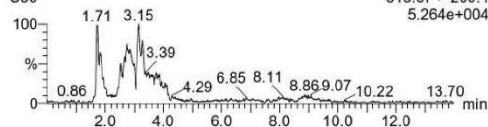
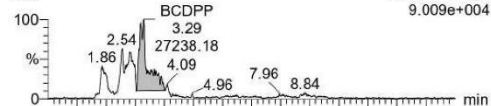
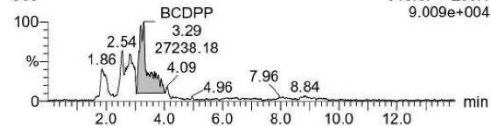
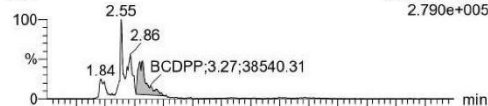
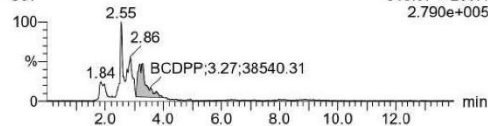
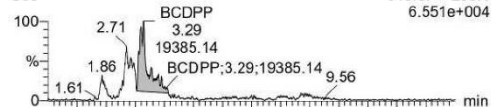
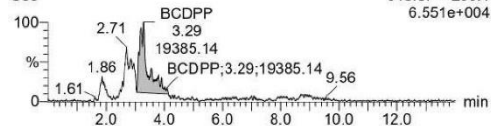
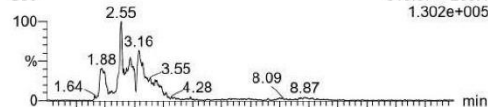
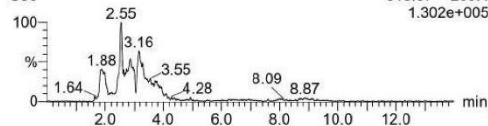
Printed: Thursday, March 30, 2023 17:03:27 SE Asia Standard Time

Sample Name: 032023-spl-49032023-spl-49 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U48 318.87 > 209.1
3.880e+004032023-spl-49 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U48 318.87 > 209.1
3.880e+004**Sample Name: 032023-spl-50**032023-spl-50 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U49 318.87 > 209.1
6.621e+004032023-spl-50 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U49 318.87 > 209.1
6.621e+004**Sample Name: 032023-spl-51**032023-spl-51 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U50 318.87 > 209.1
8.955e+004032023-spl-51 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U50 318.87 > 209.1
8.955e+004**Sample Name: 032023-spl-52**032023-spl-52 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U51 318.87 > 209.1
1.210e+005032023-spl-52 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U51 318.87 > 209.1
1.210e+005**Sample Name: 032023-spl-53**032023-spl-53 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U52 318.87 > 209.1
5.441e+004032023-spl-53 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U52 318.87 > 209.1
5.441e+004**Sample Name: 032023-spl-54**032023-spl-54 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U53 318.87 > 209.1
3.022e+004032023-spl-54 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U53 318.87 > 209.1
3.022e+004

Dataset: Untitled

Last Altered: Thursday, March 30, 2023 17:02:43 SE Asia Standard Time

Printed: Thursday, March 30, 2023 17:03:27 SE Asia Standard Time

Sample Name: 032023-spl-55032023-spl-55 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U54 318.87 > 209.1
6.147e+004032023-spl-55 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U54 318.87 > 209.1
6.147e+004**Sample Name: 032023-spl-56**032023-spl-56 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U55 318.87 > 209.1
5.264e+004032023-spl-56 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U55 318.87 > 209.1
5.264e+004**Sample Name: 032023-spl-57**032023-spl-57 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U56 318.87 > 209.1
9.009e+004032023-spl-57 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U56 318.87 > 209.1
9.009e+004**Sample Name: 032023-spl-58**032023-spl-58 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U57 318.87 > 209.1
2.790e+005032023-spl-58 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U57 318.87 > 209.1
2.790e+005**Sample Name: 032023-spl-59**032023-spl-59 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U58 318.87 > 209.1
6.551e+004032023-spl-59 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U58 318.87 > 209.1
6.551e+004**Sample Name: 032023-spl-60**032023-spl-60 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U59 318.87 > 209.1
1.302e+005032023-spl-60 Smooth(Mn,1x2) F2:MRM of 2 channels,ES+
U59 318.87 > 209.1
1.302e+005

Quantify Compound Report MassLynx V4.2 SCN1007

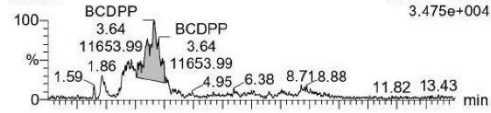
Page 24 of 52

Dataset: Untitled

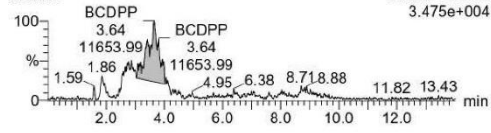
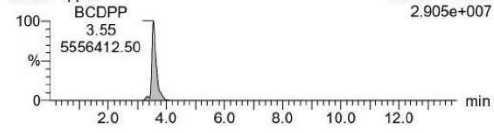
Last Altered: Thursday, March 30, 2023 17:02:43 SE Asia Standard Time

Printed: Thursday, March 30, 2023 17:03:27 SE Asia Standard Time

Sample Name: 032023-spl-61

032023-spl-61 Smooth(Mn,1x2)
blank 2F2:MRM of 2 channels,ES+
318.87 > 209.1
3.475e+004

Sample Name: 032023-spl-62

032023-spl-62 Smooth(Mn,1x2)
chuan 1ppmF2:MRM of 2 channels,ES+
318.87 > 209.1
2.905e+007032023-spl-61 Smooth(Mn,1x2)
blank 2F2:MRM of 2 channels,ES+
318.87 > 209.1
3.475e+004032023-spl-62 Smooth(Mn,1x2)
chuan 1ppmF2:MRM of 2 channels,ES+
318.87 > 209.1
2.905e+007

Quantify Compound Report MassLynx V4.2 SCN1007

Page 25 of 52

Dataset: Untitled

Last Altered: Thursday, March 30, 2023 17:02:43 SE Asia Standard Time

Printed: Thursday, March 30, 2023 17:03:27 SE Asia Standard Time

	# Name	Sample Text	Type	Std. Conc	RT	Area	Conc.	%Dev	1 ^o Ratio ...
1	1 032023-spl-1	blank 1							
2	2 032023-spl-2	U1			3.4998	742.106			1.000
3	3 032023-spl-3	U2			3.4723	1858.545			1.000
4	4 032023-spl-4	U3			3.2249	1787.490			1.000
5	5 032023-spl-5	U4			3.1919	38017.184			1.000
6	6 032023-spl-6	U5			3.4888	2675.064			1.000
7	7 032023-spl-7	U6			3.5603	2452.048			1.000
8	8 032023-spl-8	U7			3.5548	3834.961			1.000
9	9 032023-spl-9	U8			3.4723	3233.732			1.000
10	10 032023-spl-10	U9			3.4668	2496.448			1.000
11	11 032023-spl-11	U10			3.8022	2640.936			1.000
12	12 032023-spl-12	U11			3.4613	1871.140			1.000
13	13 032023-spl-13	U12			3.5493	2246.921			1.000
14	14 032023-spl-14	U13			3.7418	2931.498			1.000
15	15 032023-spl-15	U14			3.7418	4790.282			1.000
16	16 032023-spl-16	U15			3.7473	3410.391			1.000
17	17 032023-spl-17	U16			3.4668	22770.613			1.000
18	18 032023-spl-18	U17			3.4833	1099.577			1.000
19	19 032023-spl-19	U18			3.5548	832.082			1.000
20	20 032023-spl-20	U19			3.5603	3625.294			1.000
21	21 032023-spl-21	U20			3.5548	2516.788			1.000
22	22 032023-spl-22	U21			3.5493	3189.156			1.000
23	23 032023-spl-23	U22			3.1864	17881.061			1.000
24	24 032023-spl-24	U23			3.5493	1312.907			1.000
25	25 032023-spl-25	U24			3.2909	55800.602			1.000
26	26 032023-spl-26	U25			3.5163	328.310			1.000
27	27 032023-spl-27	U26			3.4668	1561.227			1.000
28	28 032023-spl-28	U27			3.1919	43244.902			1.000
29	29 032023-spl-29	U28			3.7582	5029.482			1.000
30	30 032023-spl-30	U29			3.5163	884.833			1.000
31	31 032023-spl-31	U30			3.7912	916.989			1.000
32	32 032023-spl-32	U31			3.7692	831.046			1.000
33	33 032023-spl-33	U32			3.4613	4453.691			1.000
34	34 032023-spl-34	U33			3.5658	2671.461			1.000
35	35 032023-spl-35	U34			3.4613	3394.518			1.000
36	36 032023-spl-36	U35			3.4613	10928.007			1.000
37	37 032023-spl-37	U36			3.6208	428.446			1.000
38	38 032023-spl-38	U37			3.4613	10965.052			1.000
39	39 032023-spl-39	U38							
40	40 032023-spl-40	U39			3.5438	4014.754			1.000
41	41 032023-spl-41	U40			3.5548	334.066			1.000
42	42 032023-spl-42	U41			3.1864	48830.813			1.000
43	43 032023-spl-43	U42			3.4669	3769.060			1.000
44	44 032023-spl-44	U43			3.7362	11653.125			1.000
45	45 032023-spl-45	U44			3.8077	892.893			1.000
46	46 032023-spl-46	U45			3.4668	12945.106			1.000
47	47 032023-spl-47	U46			3.5383	1008.581			1.000
48	48 032023-spl-48	U47			3.4668	3798.162			1.000
49	49 032023-spl-49	U48			3.5383	278.607			1.000
50	50 032023-spl-50	U49			3.4558	3057.195			1.000
51	51 032023-spl-51	U50			3.2964	16029.249			1.000
52	52 032023-spl-52	U51			3.5493	766.453			1.000

Quantify Compound Report MassLynx V4.2 SCN1007

Page 26 of 52

Dataset: Untitled

Last Altered: Thursday, March 30, 2023 17:02:43 SE Asia Standard Time

Printed: Thursday, March 30, 2023 17:03:27 SE Asia Standard Time

	# Name	Sample Text	Type	Std. Conc	RT	Area	Conc.	%Dev	1 ^o Ratio ...
53	53 032023-spl-53	U52			3.5218	146.652			1.000
54	54 032023-spl-54	U53							
55	55 032023-spl-55	U54			3.2854	12501.570			1.000
56	56 032023-spl-56	U55							
57	57 032023-spl-57	U56			3.2909	27238.182			1.000
58	58 032023-spl-58	U57			3.2744	38540.313			1.000
59	59 032023-spl-59	U58			3.2854	19385.143			1.000
60	60 032023-spl-60	U59							
61	61 032023-spl-61	blank 2			3.6428	11653.993			1.000
62	62 032023-spl-62	chuan 1ppm			3.5493	5556412.500			1.000