

Research Article**Determination of deoxynivalenol and metabolites in maize samples by LC-MS/MS****Bui Cao Tien^{1*}, Nguyen Thi Hong Ngoc¹, Nguyen Quang Huy²,****Le Thi Lan Huong³, Vu Ngan Binh³**¹*National Institute for Food Control, Hanoi, Vietnam*²*University of Medicine and Pharmacy, Thai Nguyen University, Thai Nguyen, Vietnam*³*Hanoi University of Pharmacy, Hanoi, Vietnam**(Received: 05 Dec 2023; Revised: 18 Jun 2024; Accepted: 25 Jun 2024)***Abstract**

In Vietnam, the regulation QCVN 8-1:2011/BYT has been issued to control mycotoxin content in food products. However, there are currently no regulations or studies on their derivatives and metabolites. Deoxynivalenol-3-glucoside (D3G) and two acetylated derivatives of deoxynivalenol (DON), namely 15-acetyldeoxynivalenol (15-AcDON) and 3-acetyldeoxynivalenol (3-AcDON), have been frequently detected in naturally contaminated grains such as wheat, barley, and corn. This study developed and applied a liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method to determine deoxynivalenol (DON) and its metabolites, including deoxynivalenol-3-glucoside (D3G), 3-acetyldeoxynivalenol (3-AcDON), and 15-acetyldeoxynivalenol (15-AcDON) in maize. The instrumental conditions comprised a C18 HSS SB (150 mm × 2.1 mm × 1.7 µm) column for separation and an MS/MS detector in positive and negative electrospray ionization (ESI) source, employing multi-reactive ion monitoring mode, with an injection volume of 2 µL. The method has been fully validated and meets the performance requirements of AOAC, demonstrating high specificity. The linearity range was established from 100 µg/kg to 1000 µg/kg, with a method detection limit (MDL) of 30 µg/kg. The repeatability and recovery rates were determined to be between 1.45% to 4.31% and 90% to 110%, respectively. The validated method was applied to analyze 50 maize samples. Deoxynivalenol (DON) was detected in 10 samples (20%), while deoxynivalenol-3-glucoside (D3G), 3-acetyldeoxynivalenol (3-AcDON), and 15-acetyldeoxynivalenol (15-AcDON) were not detected in any of the samples.

Keywords: *metabolites, DON, D3G, 3-AcDON, 15-AcDON.*

* Corresponding author: Bui Cao Tien (E-mail: buicaotientbk70@gmail.com)

Doi: <https://doi.org/10.47866/2615-9252/vjfc.4350>Copyright © 2024 The author(s). This article is licensed under [CC BY-NC 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

Xác định deoxynivalenol và các chất chuyển hóa trong ngô bằng LC-MS/MS

Bùi Cao Tiến¹, Nguyễn Thị Hồng Ngọc¹, Nguyễn Quang Huy²,

Lê Thị Lan Hương³, Vũ Ngân Bình³

¹*Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm quốc gia, Hà Nội, Việt Nam*

²*Trường Đại học Y Dược, Đại học Thái Nguyên, Thái Nguyên, Việt Nam*

³*Trường Đại học Dược Hà Nội, Hà Nội, Việt Nam*

Tóm tắt

Tại Việt Nam, QCVN 8-1:2011/BYT đã được ban hành để kiểm soát hàm lượng độc tố vi nấm trong thực phẩm, tuy nhiên hiện nay chưa có quy định và các nghiên cứu về các dẫn xuất cũng như chất chuyển hóa của chúng. Deoxynivalenol-3-glucoside (D3G) cùng với hai dẫn xuất acetyl hóa của deoxynivalenol (DON) là 15-acetyldeoxynivalenol (15-AcDON) và 3-acetyldeoxynivalenol (3-AcDON) thường được phát hiện trong các loại ngũ cốc bị nhiễm vi nấm tự nhiên như lúa mì, lúa mạch và ngô. Trong nghiên cứu này, phương pháp sắc ký lỏng khối phổ hai lần (LC-MS/MS) đã được phát triển và ứng dụng để xác định DON và 3 chất chuyển hóa bao gồm D3G, 3-AcDON và 15-AcDON trong ngô. Hệ thống sắc ký lỏng AB Sciex 5500 với cột C18 HSS SB (150 mm × 2,1 mm × 1,7 μm), kết hợp với detector khối phổ ba tứ cực nguồn ESI, chế độ theo dõi ion MRM, thể tích tiêm mẫu 2 μL đã được sử dụng trong nghiên cứu. Phương pháp đã được thẩm định cho thấy có tính đặc hiệu tốt, độ tuyến tính tốt trong khoảng đường chuẩn từ 100 – 1000 μg/kg, giới hạn phát hiện của phương pháp (MDL) là 30 μg/kg; độ lặp lại và độ đúng đáp ứng yêu cầu của AOAC với độ lệch chuẩn tương đối và độ thu hồi lần lượt tương ứng trong khoảng là 1,45 – 4,31% và 90 – 110%. Kết quả phân tích 50 mẫu ngô thu thập ngẫu nhiên trên thị trường cho thấy, 10 mẫu (20%) phát hiện DON, tuy nhiên không phát hiện các chất chuyển hóa của DON trong các mẫu này.

Từ khóa: *Chất chuyển hóa, DON, D3G, 3-AcDON, 15-AcDON.*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trichothecenes loại B (deoxynivalenol, nivalenol, 3-acetyldeoxynivalenol, 15-acetyldeoxynivalenol và deoxynivalenol-3-glucoside) là các chất chuyển hóa độc hại thứ cấp được sản xuất chủ yếu bởi nấm *Fusarium mycotoxigenic* và đã được công nhận là chất gây ô nhiễm tự nhiên trong ngũ cốc và các sản phẩm làm từ ngũ cốc [1].

Các nguồn sinh ra chất chuyển hóa của độc tố vi nấm chủ yếu từ bốn nguồn chính là: nấm, thực vật, quá trình chế biến thực phẩm và từ động vật có vú. Nguồn gốc của chúng và mức độ ô nhiễm tối đa đo được trong các loại thực phẩm khác nhau của DON và các chất chuyển hóa được đưa ra trong Bảng 1 [2].

Bảng 1. Một số chất chuyển hóa của DON

<i>Nguồn gốc</i>	<i>Chất chuyển hóa của DON</i>	<i>Nguyên nhân hình thành</i>
Nấm	3-AcDON	Ngũ cốc bị nhiễm nấm Fusarium
	15-AcDON	Ngô nhiễm nấm Fusarium
Thực vật	D3G	Từ lúa mì, ngô, lúa mạch, bia
Thực phẩm chế biến	Không có chất chuyển hóa	
Động vật có vú	D3G	Nước tiểu

3-AcDON và 15-AcDON được nấm bài tiết trực tiếp, có thể được tìm thấy trong ngũ cốc bị nhiễm Fusarium. Cả hai chất đều phát sinh từ một tiền chất chung là 3, 15-diacetyl deoxynivalenol và là tiền chất sinh tổng hợp của DON [3].

Các nghiên cứu đã chứng minh những tác động tiêu cực khác nhau của trichothecenes loại B đối với sức khỏe con người [1-3]. Do sự xuất hiện rộng rãi của các loài Fusarium, sự ô nhiễm bởi các độc tố nấm mốc này đã trở thành một khía cạnh quan trọng đối với sức khỏe cộng đồng và các hệ thống nông nghiệp - thực phẩm trên toàn thế giới. Do đó, việc nghiên cứu và giám sát các loại thực phẩm khác nhau đã nhận được rất nhiều sự quan tâm trong những năm gần đây.

Sự lây nhiễm độc tố vi nấm và các chất chuyển hóa của chúng là một vấn đề toàn cầu về an toàn thực phẩm, trong đó DON là chất phổ biến nhất. Một khảo sát với 17316 mẫu trên toàn thế giới (40% mẫu lấy từ châu Á, 38% mẫu lấy từ châu Âu, 15% mẫu lấy từ Mỹ, 4% mẫu lấy từ Úc và NewZealand, 2% mẫu lấy từ châu Phi, 1% mẫu lấy từ Trung Đông) thực hiện từ năm 2004 đến 2011 do trung tâm nghiên cứu BIOMIN đặt tại Áo tiến hành cho thấy, so với zearalenone (ZEA), aflatoxin (AF), fumonisin (FB) và ochratoxin (OTA) thì DON chiếm tỷ lệ cao nhất (55%) [2].

Độc tố vi nấm có thể gây ra những ảnh hưởng nghiêm trọng cấp tính và mãn tính đến sức khỏe. Các ảnh hưởng này phụ thuộc vào nhiều yếu tố khác nhau, như: mức độ độc tính của độc tố vi nấm bị ô nhiễm, mức độ phơi nhiễm cũng như tình trạng dinh dưỡng của từng cá thể [1]. Người và động vật khi bị nhiễm độc DON sẽ có các biểu hiện như: thay đổi hình thái và mô học, tính toàn vẹn của hàng rào ruột và suy giảm khả năng hấp thụ chất dinh dưỡng, rối loạn hệ vi sinh vật; thay đổi cấu trúc gen, điều hòa lên các gen đơn bội và điều hòa giảm các gen chống lại, nhiễm độc ribosom, thiếu hụt tổng hợp protein, rối loạn hoạt động của ty thể, suy giảm sự tăng sinh tế bào và chết, giảm biệt hóa tế bào gốc, tác dụng ức chế miễn dịch, rối loạn chu kỳ nội tiết tố, giảm khả năng sống sót của tinh trùng, thay đổi hình thái và mô học. Các chất chuyển hóa của DON được cho là ít độc tính hơn [4], hoặc do chúng chưa được giải phóng và biến đổi từ chất nền trong quá trình chế biến và tiêu hóa [5].

Năm 2002, Ủy ban châu Âu đã thiết lập TDI của DON là 1 µg/kg cân nặng/ngày. Theo EC 1126/2007, DON là trichothecenes duy nhất có giới hạn quy định trong ngũ cốc và các sản phẩm liên quan. Tại châu Âu và Việt Nam đều quy định hàm lượng DON dao động từ

200 µg/kg (trong các sản phẩm cho trẻ nhỏ) đến 1750 µg/kg (trong các sản phẩm ngũ cốc chưa qua chế biến). Hiện nay, chưa có quy định cụ thể về giới hạn ô nhiễm các chất chuyển hóa của DON trong thực phẩm. Năm 2010, JECFA coi D3G, 3-AcDON và 15-AcDON là yếu tố góp phần bổ sung cho việc tiếp xúc với DON trong chế độ ăn uống [6]. Theo thống kê [2], DON và các chất chuyển hóa của nó được phát hiện nhiều nhất so với các độc tố vi nấm khác. Do đó, nguy cơ từ DON và các chất chuyển hóa của DON là đáng kể và cần có các nghiên cứu để xác định và đánh giá ảnh hưởng của chúng tới sức khỏe con người và vật nuôi tại Việt Nam.

Trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu xác định hàm lượng DON và các chất chuyển hóa trong các nền mẫu khác nhau, sử dụng các phương pháp sắc ký như: sắc ký lớp mỏng (TLC) [1], sắc ký khí (GC) [1], sắc ký lỏng (LC) [7-11] và phương pháp miễn dịch gắn enzyme (ELISA) [12]. Milena Zachariasova và cộng sự đã so sánh hai phương pháp ELISA và sắc ký lỏng khối phổ hai lần (LC-MS/MS) khi phân tích DON và các chất chuyển hóa trong bia [13]. Kết quả cho thấy, khi phân tích bằng ELISA có phản ứng chéo của 3-AcDON với tất cả các lần thử nghiệm, của D3G trong khoảng từ 32 – 78% trong mẫu nước và 51 – 104% trong mẫu bia.

Trong nghiên cứu này, phương pháp LC-MS/MS kết hợp với kỹ thuật QuEChERS có nhiều ưu điểm vượt trội như phân tích đồng thời, độ nhạy tốt, độ đặc hiệu cao, thời gian phân tích nhanh, quá trình xử lý mẫu đơn giản đã được sử dụng để xác định đồng thời DON và 3 chất chuyển hóa, nhằm mục đích phát triển một phương pháp kiểm nghiệm phù hợp cho việc giám sát, đánh giá mức ô nhiễm DON và các chất chuyển hóa trong ngô.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

DON và ba chất chuyển hóa được lựa chọn trong nghiên cứu gồm D3G, 3-AcDON và 15-AcDON (Bảng 1); 50 mẫu ngô được lấy ngẫu nhiên với định hướng có nguy cơ nhiễm độc tố tại các chợ ở khu vực Hà Nội.

2.2. Hóa chất, chất chuẩn

Các dung môi và hóa chất sử dụng trong nghiên cứu đều thuộc loại tinh khiết phân tích dùng cho LC-MS/MS.

Các chất chuẩn và nội chuẩn đồng vị: DON 100 µg/mL trong ACN, D3G 50 µg/mL trong ACN, ¹³C₁₅-DON 100 µg/mL trong ACN, 3-AcDON 99,9% - 1 mg, 15-AcDON 90% - 1 mg được cung cấp bởi hãng TRC (Canada).

Các dung môi, hóa chất: acetonitrile (ACN), methanol (MeOH), acid acetic (CH₃COOH), amoni acetat (CH₃COONH₄) được cung cấp bởi hãng Merck (Đức).

2.3. Thiết bị và dụng cụ

Nghiên cứu sử dụng các thiết bị sau: Hệ thống sắc ký lỏng khối phổ hai lần gồm máy LC20AD-XR (Shimadzu) và MS 5500 (AB Sciex) với nguồn ion hóa ESI, cột sắc ký C18 HSS SB (150 mm × 2,1 mm × 1,7 µm) (Water); Máy ly tâm Mikro 200R (Hettich); máy rung siêu âm S100H (Elma); máy lắc ngang HS260 (IKA); cân phân tích (có độ chính xác 0,1 mg) XS105 (Mettler Toledo) và các thiết bị thông thường khác trong phòng thí nghiệm.

Dụng cụ được sử dụng trong nghiên cứu bao gồm: micropipet có thể hút chính xác thể tích 10-100 μL , 100-1000 μL (Eppendorf), pipet pasteur, ống ly tâm 15 mL và 50 mL (Corning), bình định mức các loại (Isolab), giấy lọc, màng lọc PTFE RC15 0,2 μm (Sartorius), lọ đựng mẫu 1,8 mL (Agilent).

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Phương pháp phân tích

Phương pháp phân tích được sử dụng trong nghiên cứu này là sắc ký lỏng sử dụng detector khối phổ hai lần (LC-MS/MS). Trong đó, các điều kiện phân tích đồng thời DON và ba chất chuyển hóa được khảo sát, cụ thể như sau:

- Khảo sát điều kiện MS/MS: việc khảo sát điều kiện phân tích đồng thời DON và ba chất chuyển hóa trên thiết bị MS/MS được thực hiện với các dung dịch chuẩn đơn có nồng độ 1 $\mu\text{g/mL}$, tối ưu tự động bằng phần mềm của thiết bị, chế độ quét lựa chọn đa phản ứng (MRM). Mỗi chất chọn ion mẹ và thực hiện tối ưu các điều kiện phân mảnh để chọn ra 2 ion con, 1 ion được sử dụng để định lượng và 1 ion được sử dụng để xác nhận.

- Khảo sát điều kiện LC: các điều kiện phân tích đồng thời DON và ba chất chuyển hóa trên thiết bị LC được lựa chọn khảo sát nhằm tăng cường hiệu quả tách là thành phần pha động, cột tách và tốc độ dòng. Các khảo sát được thực hiện trên cột sắc ký C18 với các thông số cột khác nhau.

- Mẫu trắng: là mẫu đã được xác định không chứa các chất phân tích.

- Mẫu trắng thêm chuẩn: là mẫu trắng thêm chuẩn ở mức nồng độ 200 $\mu\text{g/kg}$.

2.4.2. Phương pháp xử lý mẫu

Trong nghiên cứu này, phương pháp xử lý và làm sạch mẫu sẽ được khảo sát. Qua tham khảo các tài liệu [7-11], quy trình xử lý mẫu dự kiến được lựa chọn như sau: Mẫu được cân chính xác khoảng 10 g vào bình nón, thêm 100 mL hỗn hợp dung môi chiết, chiết bằng phương pháp phù hợp trong 45 phút, lọc qua giấy lọc. Hút 15 mL mẫu vào ống ly tâm 50 mL, thêm 5 g MgSO_4 khan. Lắc vortex 30 giây, ly tâm 6000 vòng/phút trong 5 phút. Hút 8 mL dịch phía trên, chuyển vào ống ly tâm 15 mL có chứa sẵn 1,2 g MgSO_4 khan và 0,2 g C18 + 0,2 g PSA; lắc vortex 30 giây, ly tâm 6000 vòng/phút trong 5 phút. Hút 5 mL dịch chuyển vào ống ly tâm 15 mL, thổi khô N_2 ở nhiệt độ 40°C , hòa cạn trong 0,5 mL $\text{MeOH/H}_2\text{O}$ (20/80, v/v). Lọc qua màng lọc 0,2 μm trước khi phân tích trên thiết bị LC-MS/MS. Trong đó, hỗn hợp ACN và H_2O với các tỷ lệ khác nhau được lựa chọn làm dung môi chiết DON và ba chất chuyển hóa trong nền mẫu. Quá trình khảo sát điều kiện xử lý mẫu được thực hiện với mẫu trắng (là mẫu ngô đã được xác định bằng phương pháp LC-MS/MS không phát hiện tín hiệu các chất phân tích) thêm chuẩn ở mức nồng độ 200 $\mu\text{g/kg}$. Các thông số được khảo sát nhằm thu được hiệu suất chiết tốt nhất để xác định đồng thời DON và 3 chất chuyển hóa bao gồm:

- + Khảo sát phương pháp chiết: thời gian lắc ngang, siêu âm từ 30 – 60 phút.

- + Khảo sát dung môi chiết: tỷ lệ ACN/ H_2O từ 50 – 100%.

- + Khảo sát nồng độ acid: acid acetic 0 – 1%.

+ Khảo sát các phương pháp làm sạch với các cột: ái lực miễn dịch (IAC, DONstart), cột chiết pha rắn (SPE: HLB, C18) và QuEChERS.

2.4.3. Phương pháp thẩm định

Việc thẩm định phương pháp được thực hiện với các thông số thông số cơ bản gồm: độ đặc hiệu, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng, xây dựng đường chuẩn và đánh giá độ tuyến tính, độ chụm được đánh giá thông qua độ lặp lại và độ tái lặp nội bộ (thực hiện phân tích trong 2 ngày khác nhau bởi 2 người khác nhau) và độ đúng được đánh giá thông qua độ thu hồi (R%). Các kết quả được đánh giá so sánh với các quy định theo AOAC [14].

2.4.4. Phương pháp xử lý số liệu

Việc xử lý các số liệu được thực hiện bằng phần mềm Microsoft Excel 2020.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Khảo sát LC-MS/MS

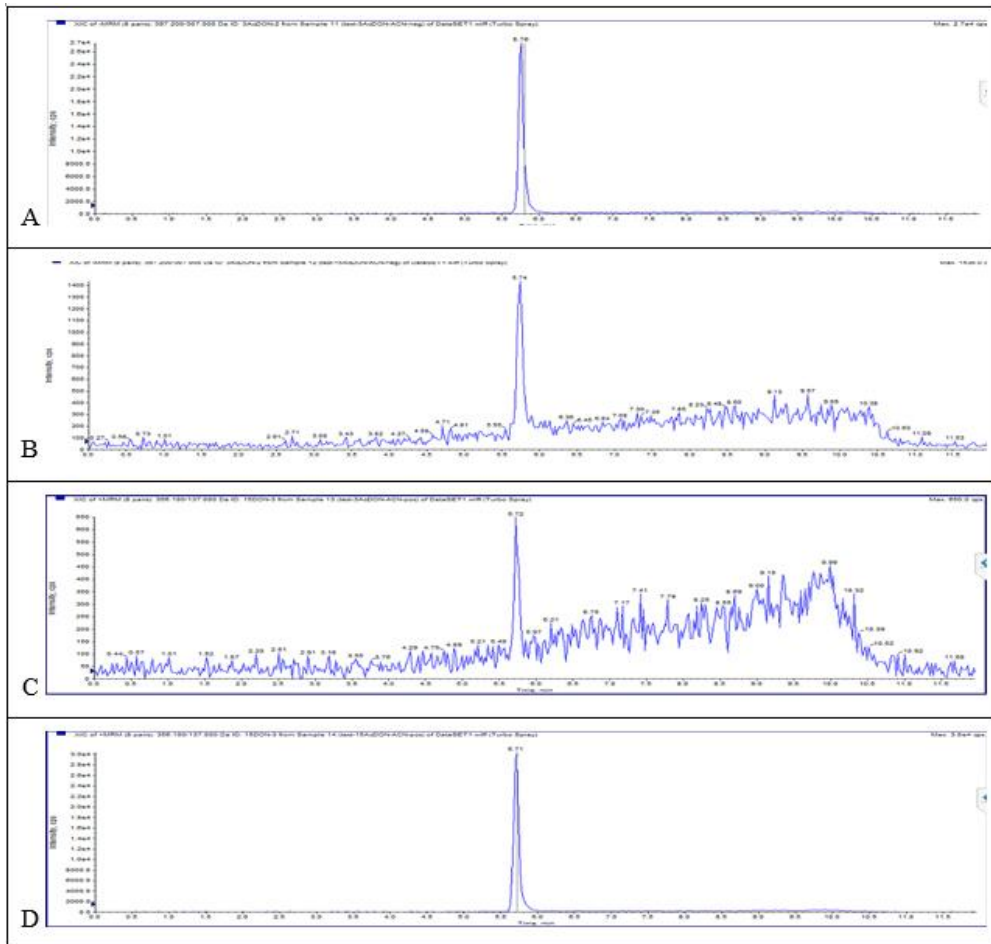
3.1.1. Kết quả khảo sát điều kiện phân tích trên khối phổ

Để khảo sát điều kiện phân tích trên khối phổ, dung dịch chuẩn có nồng độ 1 µg/mL được bơm trực tiếp vào thiết bị MS/MS nhằm lựa chọn ion mẹ, ion con và năng lượng va chạm. Kết quả được tóm tắt trong Bảng 2.

Bảng 2. Điều kiện phân tích DON và ba chất chuyển hóa trên thiết bị MS/MS

<i>Chất phân tích</i>	<i>Ion mẹ</i>	<i>Ion con</i>	<i>CE (eV)</i>	<i>Ion con</i>	<i>CE(eV)</i>	<i>Số điểm IP</i>
DON	355	265	-20	295	-15	5
D3G	517	457	-18	427	-28	5
3-AcDON	397	307	-20	247	-30	5
15-AcDON	356	231	25	261	29	5
¹³ C ₁₅ -DON	370	279	-20	310	-15	5

Kết quả ở Bảng 2 cho thấy, điều kiện khối phổ hoàn toàn phù hợp với công thức phân tử của các chất phân tích với ion mẹ có số khối là [M+CH₃COO]⁻ hoặc [M-H]⁻ ở chế độ ion âm và với ion mẹ có số khối là [M+NH₄]⁺ hoặc [M+H]⁺ ở chế độ ion dương. Mỗi chất đều lựa chọn được tối thiểu hai ion con, phù hợp với quy định của châu Âu về số điểm IP [15]. Do đó, nhằm tăng cường tín hiệu của các chất phân tích, các gốc CH₃COO⁻ và NH₄⁺ được bổ sung thêm vào pha động. Hình 1 thể hiện sắc ký đồ phân tích các chất chuẩn đơn 3-AcDON và 15-AcDON với chế độ ion âm và ion dương ở mức nồng độ 200 ng/mL.

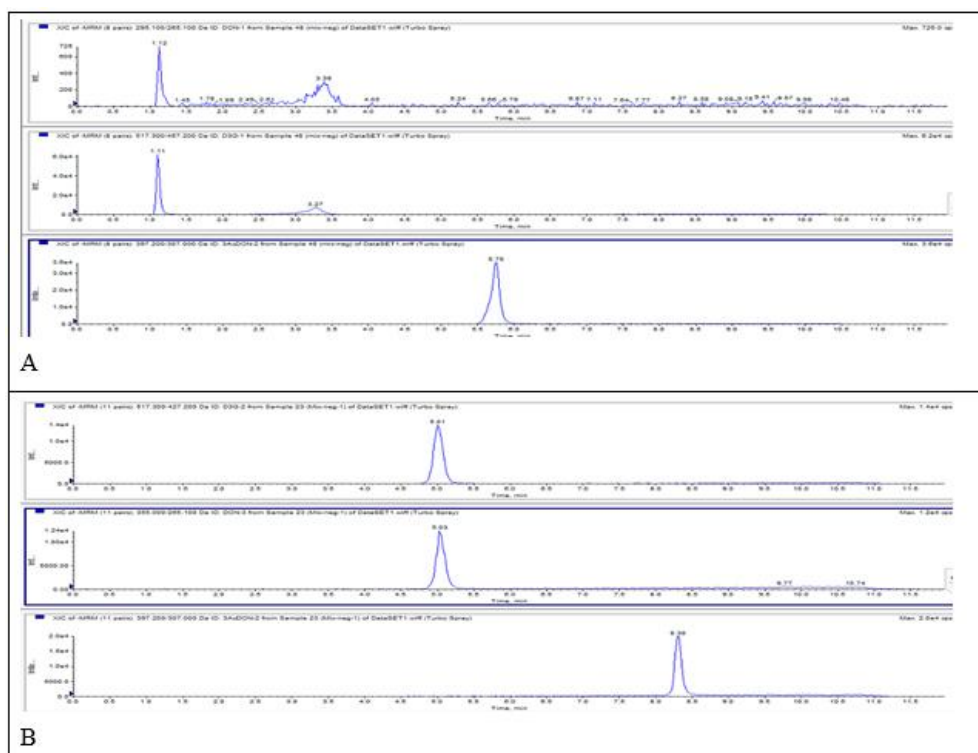


Hình 1. Sắc đồ khảo sát điều kiện phân tích khối phổ. A: 3-AcDON - chế độ ion âm, B: 15-AcDON - chế độ ion âm, C: 3-AcDON - chế độ ion dương, D: 15-AcDON - chế độ ion dương

Kết quả ở Hình 1 cho thấy, 3-AcDON phù hợp để phân tích ở chế độ ion âm, ngược lại, 15-AcDON phù hợp phân tích ở chế độ ion dương. Tuy nhiên, tín hiệu của 3-AcDON ở chế độ ion dương và 15-AcDON ở chế độ ion âm xuất hiện ở cùng thời gian lưu (5,7 phút). Do đó, cần thiết phải khảo sát điều kiện LC để có thể tách 3-AcDON và 15-AcDON, tăng cường hiệu quả phân tích.

3.1.2. Kết quả khảo sát điều kiện phân tích trên sắc ký lỏng

Qua tham khảo tài liệu [7-11], cột pha tĩnh C18 được lựa chọn để phân tách DON và ba chất chuyển hóa bằng phương pháp sắc ký lỏng. Do 3-AcDON và 15-AcDON có cùng công thức phân tử, tính chất hóa học tương tự nhau nên việc phân tách sắc ký là một thách thức lớn. Một số nghiên cứu trước đây [9, 12, 16] đều không phân tách được 3-AcDON với 15-AcDON và kết quả sẽ được tính theo hàm lượng DON tổng số. Qua khảo sát sơ bộ, kết quả cũng được thể hiện tương tự. Do đó trong nghiên cứu này việc khảo sát sự phân tách chỉ được thực hiện với ba chất D3G, DON, 3-AcDON trên thiết bị LC sử dụng cột C18 với pha động kênh A là $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 10 mM + CH_3COOH 1%/H₂O và khảo sát pha động kênh B là $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 10 mM + CH_3COOH 1%/MeOH hoặc ACN. Kết quả được trình bày ở Hình 2.

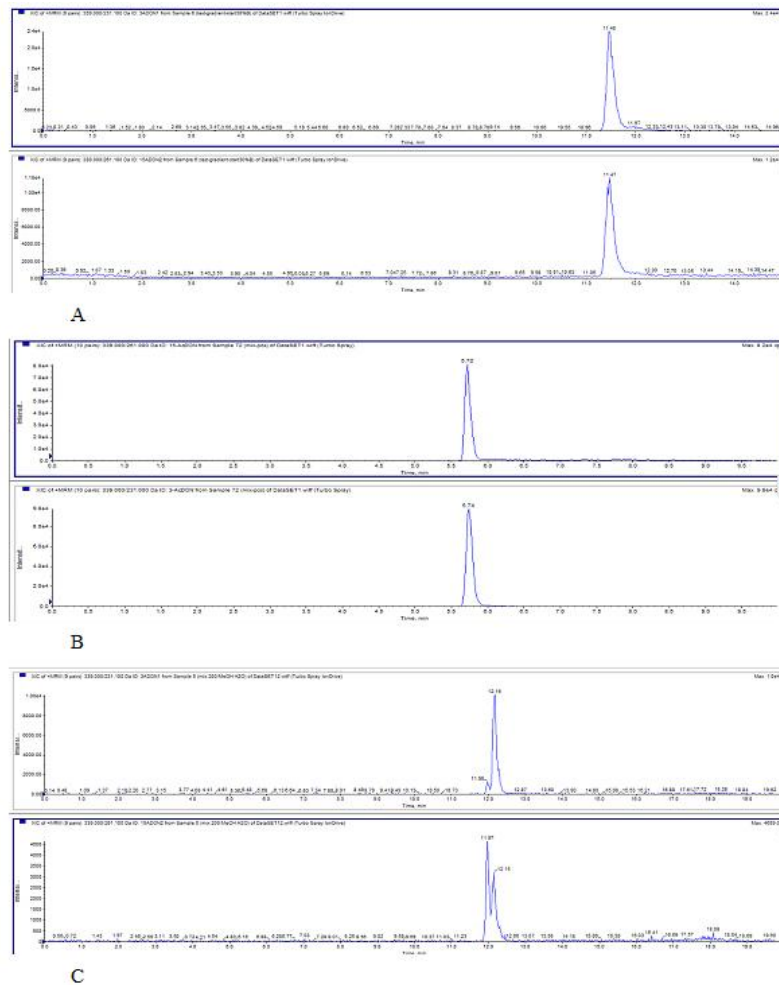


Hình 2. Khảo sát thành phần dung môi pha động. A- pha động kênh B: $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 10 mM + CH_3COOH 1%/ACN, B- pha động kênh B: $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 10 mM + CH_3COOH 1%/MeOH

Kết quả ở Hình 2 cho thấy, khi sử dụng pha động kênh B là ACN cho tín hiệu của DON rất thấp còn D3G pic kéo đuôi, thời gian lưu giữ kém. Trong khi đó, khi sử dụng pha động kênh B là MeOH cho tín hiệu tốt, pic nhọn và sắc nét của cả 3 chất phân tích. Do đó, hệ pha động kênh B là $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 10 mM + CH_3COOH 1%/MeOH được lựa chọn cho các khảo sát tiếp theo.

Với mục tiêu phân tách hai chất 3-AcDON và 15-AcDON bằng phương pháp LC-MS/MS, các yếu tố tốc độ dòng pha động, bản chất pha tĩnh, kích thước hạt nhồi đã được khảo sát. Đây là các yếu tố quan trọng nhất ảnh hưởng tới quá trình tách sắc ký. Hình 3 là kết quả khảo sát sự phân tách của 3-AcDON và 15-AcDON trên các cột C18 với kích thước và tốc độ dòng khác nhau ở cùng điều kiện gradient, chế độ ion dương.

Kết quả khảo sát ở Hình 3A và B cho thấy, với hai cột sắc ký có cùng chiều dài, cột C18 (2) có kích thước hạt nhỏ hơn tương ứng với số đĩa lý thuyết lớn hơn, tuy nhiên chưa phân tách được 3-AcDON và 15-AcDON. Để có thể phân tách được hai chất này, hai cột C18 đã được ghép nối tiếp nhau nhằm tăng cường hiệu quả phân tách. Kết quả thu được ở Hình 3C cho thấy, pic của 3-AcDON (11,9 phút) và 15-AcDON (12,1 phút) không tách khỏi nhau hoàn toàn dù vẫn phù hợp để định lượng từng chất, tuy nhiên tổng thời gian phân tích rất dài (35 phút). Hơn nữa, khả năng ion hóa của 3-AcDON ở chế độ ion dương và 15-AcDON ở chế độ ion âm rất kém. Do đó, để tối ưu hóa thời gian phân tích, cột sắc ký C18 (150 mm × 2,1 mm × 1,7 μm) và tiền cột tương ứng được lựa chọn trong nghiên cứu này.



Hình 3. Khảo sát cột tách. A- Cột C18 (1) có kích thước: 150 mm × 3,0 mm × 3,5 μm, tốc độ dòng: 0,5 mL/phút; B- Cột C18 (2) có kích thước: 150 mm × 2,1 mm × 1,7 μm, tốc độ dòng: 0,3 mL/phút; C- Cột C18 x 2 (2) có kích thước: 150 mm × 2,1 mm × 1,7 μm, tốc độ dòng: 0,15 mL/phút

Từ các kết quả khảo sát thu được, điều kiện xác định đồng thời DON và ba chất chuyển hóa bằng LC-MS/MS được lựa chọn cho việc định lượng và phân tách các chất như sau: cột sắc ký C18 (150 mm × 2,1 mm × 1,7 μm) và tiền cột tương ứng; thể tích bơm mẫu: 2 μL; tốc độ dòng pha động: 0,3 mL/phút; pha động A (CH₃COONH₄ 10 mM + CH₃COOH 1%/H₂O); pha động B (CH₃COONH₄ 10 mM + CH₃COOH 1%/MeOH);

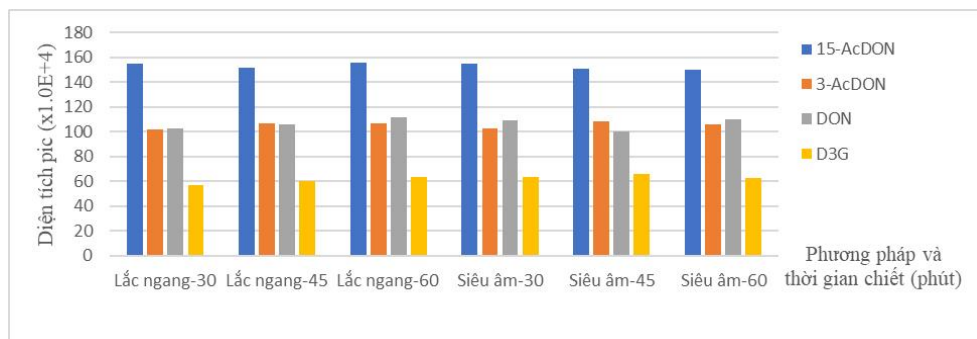
Gradient rửa giải (áp dụng khi tính hàm lượng DON tổng số): 0 – 1 phút, giữ nguyên 5% B; 1 – 6 phút, tăng dần tới 50% B; 6 – 6,5 phút, tăng dần tới 99% B; 6,5 – 7,5 phút, giữ nguyên 99% B; từ 7,5 – 8 phút, giảm dần về 5% B; từ 8 – 10 phút, giữ nguyên 5% B.

Gradient phân tách 3-AcDON và 15-AcDON (áp dụng khi tăng hiệu quả phân tách 3-AcDON và 15-AcDON): 0 – 1 phút, giữ nguyên 5% B; 1 – 30 phút, tăng dần tới 50% B; 30 – 31 phút, tăng dần tới 99% B; 31 – 32 phút, giữ nguyên 99% B; từ 32 – 33 phút, giảm dần về 5% B; từ 33 – 35 phút, giữ nguyên 5% B.

3.2. Khảo sát quy trình xử lý mẫu

3.2.1. Khảo sát phương pháp chiết

Hai phương pháp chiết phổ biến trong phòng thí nghiệm là lắc ngang và siêu âm được khảo sát, thay đổi thời gian chiết để lựa chọn điều kiện tối ưu. Kết quả khảo sát thể hiện ở Hình 4.

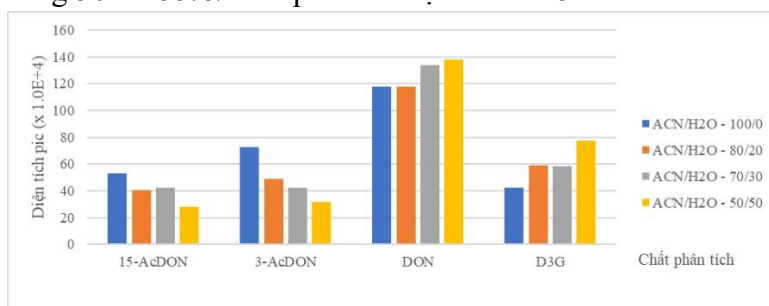


Hình 4. Khảo sát phương pháp chiết

Kết quả khảo sát ở Hình 4 cho thấy, cả phương pháp chiết và thời gian chiết đều ảnh hưởng không đáng kể tới hiệu suất. Do vậy, để tiết kiệm thời gian phân tích và đơn giản hóa khi thực hiện, chiết lắc ngang trong 30 phút đã được lựa chọn để tiến hành các bước khảo sát tiếp theo.

3.2.2. Khảo sát dung môi chiết

Việc khảo sát dung môi chiết được thực hiện kết hợp giữa H₂O với các tỷ lệ khác nhau của ACN trong khoảng 50 – 100%. Kết quả thu được ở Hình 5.

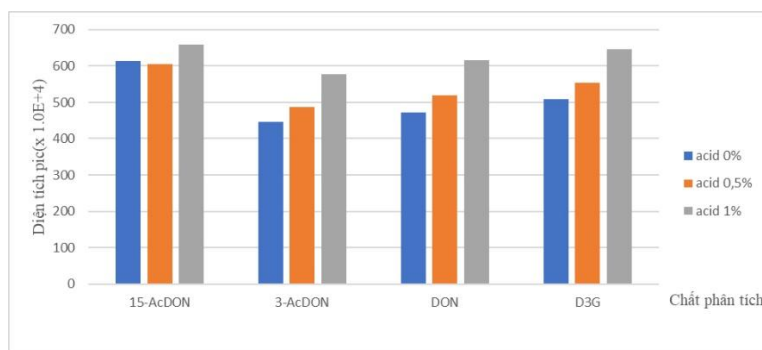


Hình 5. Kết quả khảo sát dung môi chiết

Kết quả khảo sát ở Hình 5 cho thấy, khi tăng lượng dung môi hữu cơ ACN thì hiệu suất của 3-AcDON và 15-AcDON tăng lên còn DON và D3G thì giảm xuống và ngược lại. Để tối ưu cho quá trình chiết đồng thời cả bốn chất phân tích, dung môi ACN/H₂O (70/30, v/v) được lựa chọn cho các bước khảo sát tiếp theo.

3.2.3. Khảo sát nồng độ acid

Các chất phân tích có tính base rất yếu và có tính phân cực, tan tốt trong nước và một số dung môi hữu cơ như MeOH, ACN, ... Việc sử dụng dung môi chiết có tính acid với nồng độ thấp thường tăng hiệu suất chiết do có thể phá vỡ các liên kết tiềm ẩn giữa các chất phân tích và nền mẫu, ví dụ như đường hoặc protein. Acid acetic 1% được lựa chọn để thêm vào dung môi chiết do có thành phần tương đồng với pha động. Kết quả khảo sát được thể hiện ở Hình 6.

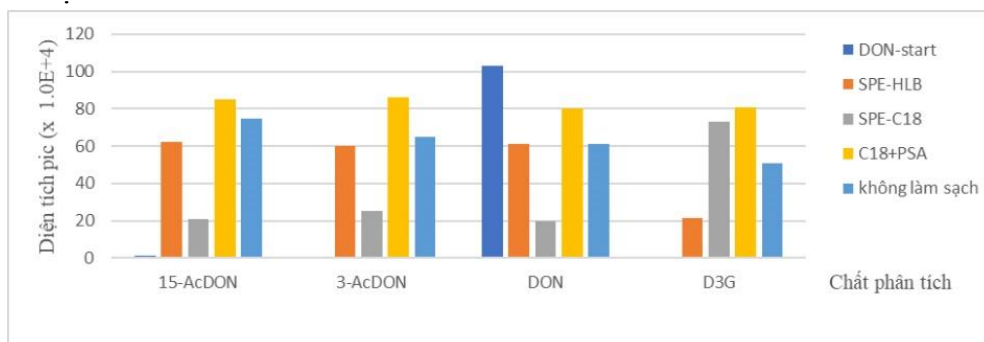


Hình 6. Kết quả khảo sát nồng độ acid acetic

Kết quả ở Hình 6 cho thấy, hiệu suất chiết tăng lên khi sử dụng dung môi chiết có chứa acid acetic 1%. Vì vậy, dung môi chiết ACN/H₂O/CH₃COOH (70/30/1, v/v/v) được lựa chọn cho các khảo sát tiếp theo.

3.2.4. Khảo sát phương pháp làm sạch

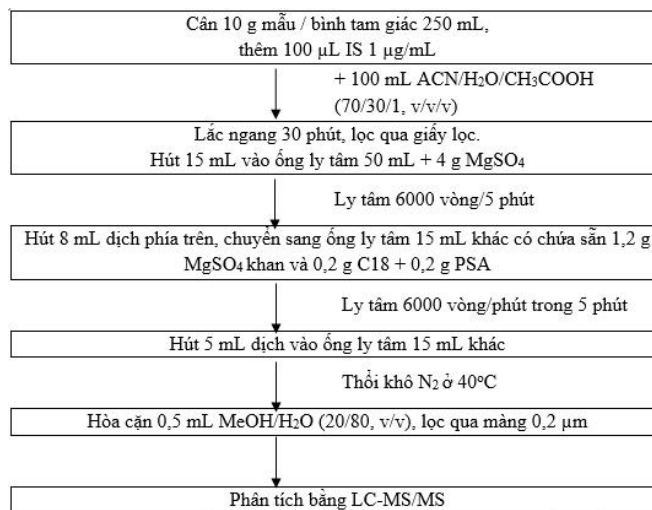
Cột ái lực miễn dịch (IAC) chứa chất hỗ trợ pha rắn được kích hoạt liên kết cộng hóa trị với các kháng thể có thể tương tác chọn lọc kiểu kháng nguyên – kháng thể với các độc tố vi nấm từ dịch chiết mẫu, trong khi các thành phần gây cản trở có thể được loại bỏ bằng một bước rửa tạp đơn giản. Sau đó, dung môi hữu cơ hoặc biến tính kháng thể được sử dụng để rửa giải độc tố nấm mốc khỏi cột IAC. Do đó, cột IAC rất đặc hiệu cho việc làm sạch hiệu quả và nâng cao tính chọn lọc đối với chất phân tích trong nền mẫu thực phẩm phức tạp. Tuy nhiên, cột IAC cũng có những nhược điểm như: khả năng phản ứng chéo của kháng thể với các độc tố khác có cấu trúc tương tự, chi phí cao và khả năng áp dụng chỉ cho một hoặc một số ít độc tố vi nấm có cấu trúc hóa học tương đồng. Các nghiên cứu trước đây [10, 16-18] cũng đã sử dụng và so sánh khả năng làm sạch của các cột IAC và các loại cột SPE khác nhau. Trong nghiên cứu này, cột ái lực miễn dịch DON-start, các cột SPE (bao gồm cột HLB, C18) và làm sạch bằng QuEChERS sử dụng bột C18 và PSA đã được lựa chọn để khảo sát hiệu quả làm sạch nhằm phân tích DON và ba chất chuyển hóa. Kết quả khảo sát được thể hiện ở Hình 7.



Hình 7. Khảo sát phương pháp làm sạch

Kết quả khảo sát ở Hình 7 cho thấy, khi sử dụng bột làm sạch C18 kết hợp PSA có hiệu suất tốt, ổn định cho cả bốn chất phân tích và kết quả này cũng phù hợp với các nghiên cứu trước đây [10, 16-18]. Do đó, phương pháp làm sạch bằng QuEChERS sử dụng C18 và PSA được lựa chọn trong nghiên cứu này.

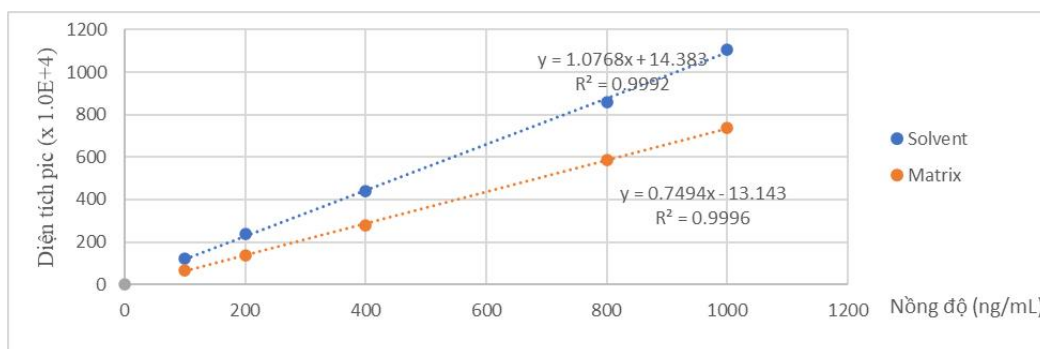
Trên cơ sở các kết quả khảo sát thu được, quy trình phân tích đồng thời DON và ba chất chuyển hóa bằng phương pháp LC-MS/MS kết hợp xử lý mẫu bằng QuEChERS được lựa chọn như trong Hình 8.



Hình 8. Quy trình xử lý mẫu lựa chọn nhằm phân tích DON và ba chất chuyển hóa bằng phương pháp LC-MS/MS

3.2.5. Khảo sát ảnh hưởng nền mẫu

Sau khi khảo sát lựa chọn được quy trình xử lý mẫu ảnh hưởng của nền mẫu cũng được khảo sát. Đường chuẩn trên nền dung môi và trên nền mẫu trắng đã được thiết lập trong khoảng 100 -1000 µg/kg sử dụng quy trình xử lý mẫu ở Hình 8. Đường chuẩn của bốn chất được xây dựng trên cơ sở tỷ lệ diện tích pic trên nền mẫu trắng (a_{matrix}) và trên nền dung môi (a_{solvent}) ($a_{\text{matrix}}/a_{\text{solvent}}$) phụ thuộc của vào hàm lượng các chất phân tích. Kết quả được thể hiện ở Hình 9.



Hình 9. Ảnh hưởng của nền mẫu

Từ kết quả ở Hình 9 cho thấy, ảnh hưởng của nền mẫu làm giảm tín hiệu khi phân tích trên thiết bị đối với nền mẫu ngô khoảng 30,4%. Ảnh hưởng này là đáng kể và cần phải sử dụng chất chuẩn nội hoặc đường chuẩn trên nền mẫu để loại trừ sai số. Do đó trong nghiên

cứu này, chất nội chuẩn $^{13}\text{C}_{15}\text{-DON}$ được sử dụng kết hợp với đường chuẩn xây dựng trên nền mẫu trắng nhằm tăng cường độ chính xác của phương pháp.

3.3. Thẩm định phương pháp

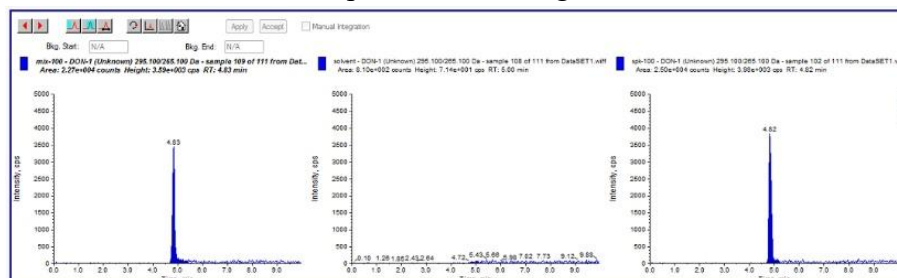
3.3.1. Độ đặc hiệu

Trên cơ sở kết quả ở Bảng 1, số điểm IP của tất cả các chất phân tích đều là 5, đáp ứng yêu cầu phân tích trên khối phổ [15]. Đồng thời, tỷ lệ ion cũng được đánh giá trên cơ sở phân tích mẫu chuẩn và mẫu trắng thêm chuẩn. Kết quả được thể hiện ở Bảng 2.

Bảng 2. Kết quả xác định tỷ lệ ion

Chất phân tích	DON	D3G	3-AcDON	15-AcDON
Chất chuẩn	62,0	81,2	22,9	37,2
Mẫu thêm chuẩn	64,0	79,4	23,3	38,0
% sai lệch cho phép	± 20	± 10	± 30	± 25
Khoảng cho phép	49,6 – 74,4	73,1 – 89,3	16,0 – 29,8	27,9 – 46,5

Kết quả thu được ở Bảng 2 cho thấy, các chất phân tích đều đạt yêu cầu về tỷ lệ ion theo EU 2021/808 [15]. Độ đặc hiệu cũng được khảo sát thông qua việc phân tích mẫu trắng, mẫu chuẩn và mẫu thêm chuẩn. Kết quả thể hiện trong Hình 10.

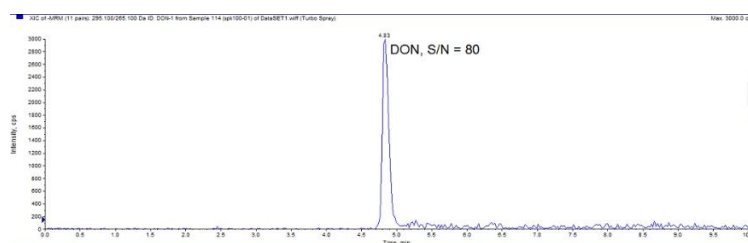


Hình 10. Sắc đồ đánh giá độ đặc hiệu khi phân tích mẫu trắng thêm chuẩn, dung dịch chuẩn và mẫu trắng của DON

Kết quả ở Hình 10 cho thấy, mẫu trắng không có tín hiệu của chất phân tích, mẫu trắng thêm chuẩn có pic của các chất phân tích ở thời gian trùng khớp với thời gian lưu của chất chuẩn tương ứng (chênh lệch không quá 2%). Như vậy, phương pháp có độ đặc hiệu tốt để phân tích DON và ba chất chuyển hóa.

3.3.2. Giới hạn phát hiện (MDL) và giới hạn định lượng (MQL) của phương pháp

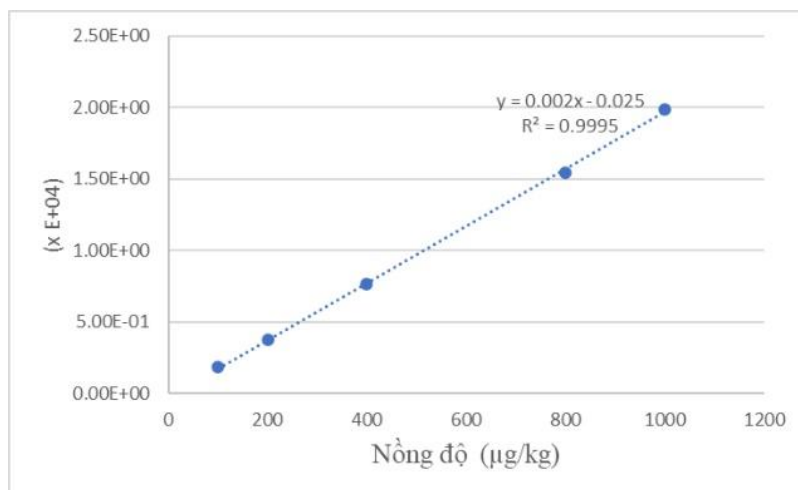
Việc xác định MDL được thực hiện bằng cách phân tích lặp lại 6 lần mẫu trắng thêm chuẩn ở mức nồng độ 100 $\mu\text{g/kg}$, xác định tỷ lệ tín hiệu so với nhiễu nền (S/N) sử dụng phần mềm của thiết bị. Giới hạn phát hiện là nồng độ mà tại đó có tỷ lệ S/N bằng 3. Giới hạn định lượng được xác định với tỷ lệ S/N bằng 10. Kết quả khảo sát tại Hình 11 cho thấy, phương pháp có giới hạn phát hiện (MDL) là 30 $\mu\text{g/kg}$ và giới hạn định lượng (MQL) là 100 $\mu\text{g/kg}$.



Hình 11. Sắc đồ xác định DON tại mức hàm lượng ứng với MQL là 100 µg/kg

3.3.3. Xây dựng đường chuẩn

Đường chuẩn xác định bốn chất phân tích bằng phương pháp LC-MS/MS được thiết lập với năm mức nồng độ 100; 200; 400; 800; 1000 µg/kg. Đường chuẩn được xây dựng trên cơ sở sự phụ thuộc giữa diện tích pic ngoại chuẩn/ diện tích pic nội chuẩn và nồng độ tương ứng. Kết quả đường chuẩn của 3-ACDON được thiết lập theo phần mềm của thiết bị được thể hiện ở Hình 12.



Hình 12. Đường chuẩn xác định 3-AcDON bằng phương pháp LC-MS/MS

Các kết quả thu được cho thấy, trong khoảng đường chuẩn, tín hiệu của DON và ba chất chuyển hóa có sự tương quan tuyến tính với nồng độ, các hệ số tương quan (R^2) đều lớn hơn 0,995.

3.3.4. Đánh giá độ đúng và độ chụm

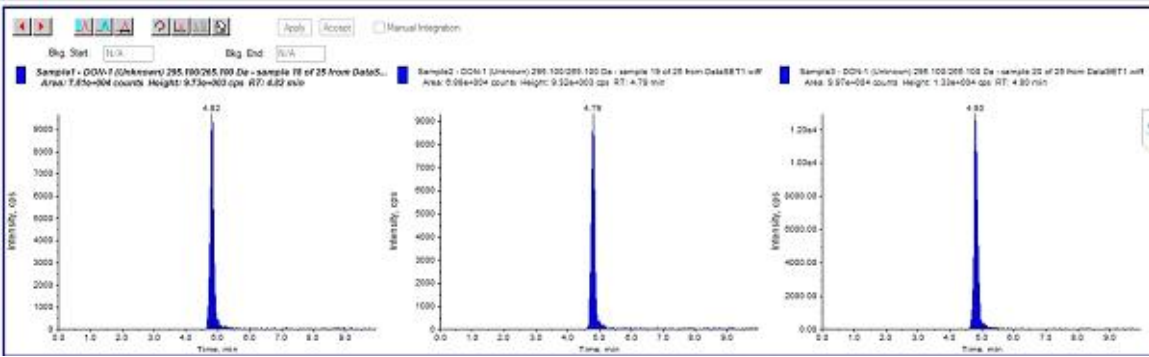
Độ đúng (đánh giá thông qua độ thu hồi) và độ chụm (đánh giá thông qua độ lặp và tái lặp nội bộ khi phân tích ở các ngày (cách nhau 2 tuần) và người thực hiện khác nhau) của phương pháp được đánh giá bằng cách thêm chuẩn vào mẫu trắng, ở ba mức nồng độ 100; 200; 400 µg/kg, phân tích lặp lại 6 lần. Kết quả cho độ thu hồi trung bình (R_{tb}) trong khoảng từ 90 – 110%, độ lặp lại (RSD%): 1,45 – 4,31%, độ tái lặp nội bộ: 2,7 – 10,3%. Các kết quả này cho thấy, phương pháp có độ đúng và độ chụm đáp ứng yêu cầu của AOAC [14].

3.4. Phân tích mẫu thực tế

Phương pháp sau khi thẩm định đáp ứng yêu cầu đã được áp dụng để phân tích hàm lượng DON và ba chất chuyển hóa trong 50 mẫu ngô thu thập ngẫu nhiên trên thị trường Hà Nội. Song song, các mẫu thêm chuẩn cũng được phân tích nhằm kiểm tra độ thu hồi. Kết quả phân tích được thể hiện ở Bảng 3 và sắc đồ một số mẫu dương tính được thể hiện ở Hình 13.

Bảng 3. Kết quả phân tích mẫu thực tế

Nền mẫu	Số mẫu phân tích	Số mẫu dương tính và khoảng hàm lượng ($\mu\text{g/kg}$)			
		DON	D3G	3-AcDON	15-AcDON
Ngô	50	10 mẫu: 174 – 1350 $\mu\text{g/kg}$	< MDL	< MDL	< MDL



Hình 13. Sắc đồ của một số mẫu dương tính

Kết quả phân tích 50 mẫu ngô cho thấy, 10/50 mẫu (chiếm 20%) phát hiện DON trong khoảng hàm lượng từ 174 – 1350 $\mu\text{g/kg}$, tuy nhiên không có mẫu nào vượt theo quy định tại QCVN 8-1:2011/BYT (1750 $\mu\text{g/kg}$) [19]. Không phát hiện ba chất chuyển hóa của DON trong 50 mẫu đã phân tích.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã thành công trong việc xây dựng quy trình xác định đồng thời DON và ba chất chuyển hóa trong mẫu ngô bằng phương pháp LC-MS/MS kết hợp với xử lý mẫu bằng QuEChERS. Giới hạn phát hiện đạt được của phương pháp đối với DON và ba chất chuyển hóa là 100 $\mu\text{g/kg}$. Phương pháp được thẩm định đáp ứng yêu cầu của AOAC và áp dụng phân tích hàm lượng DON và ba chất chuyển hóa trong 50 mẫu ngô thu thập trên thị trường Hà Nội. Kết quả đã phát hiện DON trong 20% (10/50) số mẫu nhưng không phát hiện ba chất chuyển hóa của DON trong các mẫu này. Trong tương lai, nghiên cứu sẽ tiếp tục được thực hiện nhằm đánh giá tổng quát hơn về mức độ ô nhiễm bốn độc tố vi nấm trong thực phẩm tại Việt Nam.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện trong khuôn khổ đề tài cơ sở của Viện kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm quốc gia mã số NIFC.ĐTCS.22.05.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. M. A. Gab-Allah, K. Choi & B. Kim, “Type B Trichothecenes in Cereal Grains and Their Products: Recent Advances on Occurrence, Toxicology, Analysis and Post-Harvest Decontamination Strategies,” *Toxins*, vol. 15, no. 2, pp. 85, 2023.

- [2]. F. Berthiller, R. Schuhmacher, G. Adam & R. Krska, "Formation, determination and significance of masked and other conjugated mycotoxins," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 395, pp. 1243–1252, 2009.
- [3]. N. Broekaert, M. Devreese, S. De Baere, P. De Backer & Croubels, "Modified Fusarium mycotoxins unmasked: From occurrence in cereals to animal and human excretion," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 80, pp. 17–31, 2015.
- [4]. J. C. Young, T. Zhou, H. Yu, H. Zhu, J. Gong, "Degradation of trichothecene mycotoxins by chicken intestinal microbes," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 45, pp. 136–143, 2007.
- [5]. H. Guo, J. Ji, J. Wang, & X. Sun, "Deoxynivalenol: Masked forms, fate during food processing, and potential biological remedies," *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, vol. 19, no. 2, pp. 1-32, 2020.
- [6]. JECFA, in: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (Ed.), *WHO Technical Report Series*, 959, 2011.
- [7]. A. Veršilovskis, J. Geys¹, B. Huybrechts, E. Goossens, S. De Saeger and A. Callebaut, "Simultaneous determination of masked forms of deoxynivalenol and zearalenone after oral dosing in rats by LC-MS/MS," *World Mycotoxin Journal*, vol. 5, no. 3, pp. 303-318, 2012.
- [8]. F. Berthiller, C. Dall'asta, R. Corradini, R. Marchelli, M. Sulyok, R. Krska, G. Adam & R. Schuhmacher, "Occurrence of deoxynivalenol and its 3-β-D-glucoside in wheat and maize," *Food Additives & Contaminants: Part A*, vol. 26, no. 4, pp. 507-511, 2009.
- [9]. J. J. Sasanya, C. Hall and C. Wolf-Hall, "Analysis of Deoxynivalenol, Masked Deoxynivalenol, and *Fusarium graminearum* Pigment in Wheat Samples, Using Liquid Chromatography–UV–Mass Spectrometry," *Journal of Food Protection*, vol. 71, no. 6, pp. 1205–1213, 2008.
- [10]. M. De Boevre, J. D. Di Mavungu, P. Maene, K. Audenaert, D. Deforce, G. Haesaert, M. Eeckhout, A. Callebaut, F. Berthiller, C. Van Peteghem & S. De Saeger, "Development and validation of an LC-MS/MS method for the simultaneous determination of deoxynivalenol, zearalenone, T-2-toxin and some masked metabolites in different cereals and cereal-derived food," *Food Additives & Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, vol. 29, no. 5, pp. 819-835, 2012.
- [11]. O. Vendl & F. Berthiller & C. Crews & R. Krska, "Simultaneous determination of deoxynivalenol, zearalenone, and their major masked metabolites in cereal-based food by LC–MS–MS," *Anal Bioanal Chem*, vol. 395, pp. 1347–1354, 2009.
- [12]. J. Ruprich, V. Ostrý, "Immunochemical Methods in Health Risk Assessment: Cross Reactivity of Antibodies against Mycotoxin Deoxynivalenol with Deoxynivalenol-3-glucoside," *Central European Journal of Public Health*, vol. 16, no. 1, pp. 34–37, 2008.
- [13]. M. Zachariasova, M. Vaclavikova, O. Lacina, L. Vaclavik, and J. Hajslova, "Deoxynivalenol Oligoglycosides: New "Masked" Fusarium Toxins Occurring in

- Malt, Beer, and Breadstuff,” *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, vol. 60, pp. 9280-9291, 2012.
- [14]. AOAC International, “Appendix F: Guidelines for standard method performance requirements,” *AOAC Official Methods of Analysis*, 2016.
- [15]. Commission implementing regulation (EU) 2021/808, “on the performance of analytical methods for residues of pharmacologically active substances used in food-producing animals and on the interpretation of results as well as on the methods to be used for sampling and repealing Decisions 2002/657/EC and 98/179/EC,” *Official Journal of the European Union*, vol. 180, pp. 84-109, 2021.
- [16]. M. Behrens, S. Hüwel, H. J. Galla, H. U. Humpf, “Blood-Brain Barrier Effects of the Fusarium Mycotoxins Deoxynivalenol, 3 Acetyldeoxynivalenol, and Moniliformin and Their Transfer to the Brain,” *PLOS ONE*, vol. 10, no. 11, ID. e0143640, 2015.
- [17]. N. Broekaert, M. Devreese, T. De Mil, S. Fraeyman, G. Antonissen, S. De Baere, P. De Backer, A. Vermeulen and S. Croubels, “Oral Bioavailability, Hydrolysis, and Comparative Toxicokinetics of 3 Acetyldeoxynivalenol and 15-Acetyldeoxynivalenol in Broiler Chickens and Pigs,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 63, no. 69, pp. 8734-8742, 2015.
- [18]. P. J. Doyle, H. Saeed, A. Hermans, S. C. Gleddie, G. Hussack, M. Arbabi-Ghahroudi, C. Seguin, M. E. Savard, C. R. MacKenzie, and J. C. Hall, “Intracellular Expression of a Single Domain Antibody Reduces Cytotoxicity of 15-Acetyldeoxynivalenol in Yeast,” *Journal of Biological chemistry*, vol. 284, no. 50, pp. 35029–35039, 2009.
- [19]. Ministry of Health, *QCVN 8-1:2011/BYT National technical regulation on the limits of mycotoxins contamination in food*, 2011 (in Vietnamese).