



XÁC ĐỊNH ĐỒNG THỜI MỘT SỐ PYRROLIZIDINE ALKALOIDS TRONG THỰC PHẨM BẢO VỆ SỨC KHỎE CÓ NGUỒN GỐC THẢO DƯỢC

Trần Cao Sơn^{1*}, Bùi Cao Tiến¹, Đặng Phương Thảo², Nguyễn Xuân Trường³,
Cung Thị Tố Quỳnh⁴, Lê Thị Hồng Hảo¹

¹ Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm Quốc gia

² Trường Đại học Dược Hà Nội

³ Cục An toàn thực phẩm

⁴ Viện Công nghệ Sinh học và Công nghệ Thực phẩm - Đại học Bách Khoa Hà Nội

(Ngày đến tòa soạn: 4/1/2019; Ngày sửa bài sau phản biện: 11/2/2019; Ngày chấp nhận đăng: 18/2/2019)

Tóm tắt

Kỹ thuật sắc ký lỏng khối phổ hai lần (LC-MS/MS) đã được nghiên cứu nhằm xây dựng và thẩm định phương pháp xác định 4 pyrrolizidine alkaloids (PAs) độc trong các sản phẩm thực phẩm bảo vệ sức khỏe (TPBVSK) có nguồn gốc thảo dược, bao gồm intermidine, senecionine, echimidine và jacobine. Hệ thống sắc ký lỏng với cột TSK Gel, kết hợp với detector khối phổ ba tứ cực nguồn ESI (+), chế độ theo dõi ion MRM đã được sử dụng trong nghiên cứu. Phương pháp đã được xác nhận giá trị sử dụng cho thấy có tính đặc hiệu tốt, khoảng tuyến tính từ 1,0 – 40 ng/g, giới hạn phát hiện 0,3 ng/g; độ lặp lại và độ đúng đáp ứng yêu cầu của AOAC với hệ số biến thiên và độ thu hồi lần lượt dao động từ 3,6 - 7,5 % và 88,7 - 117 %. Kết quả phân tích 90 mẫu TPBVSK có nguồn gốc thảo dược trên thị trường cho thấy, có 26 mẫu (28,8 %) phát hiện chứa ít nhất 1 chất PAs trong nghiên cứu.

Từ khóa: Pyrrolizidine Alkaloids, Intermidine, Senecionine, Echimidine, Jacobine, LC-MS/MS

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Pyrrolizidine alkaloids (PAs) là nhóm hợp chất chuyển hóa thứ cấp có mặt trong khoảng 3% thực vật trên toàn thế giới, chủ yếu từ các họ thực vật thuộc họ Vòi voi (Boraginaceae), họ Cúc (Asteraceae), và họ Đậu (Fabaceae). Trong đó, khoảng 600 loại PAs đã được xác định và mô tả có khả năng gây nhiễm độc cấp tính và mạn tính trên gan, độc tính trên gen và nhiễm sắc thể, đôi khi có liên quan đến sự hình thành một số khối u phát triển trên da, bàng quang, não, tủy sống, tụy và đường tiêu hóa. Hàm lượng PAs trong thực vật thường thay đổi, dao động từ 100 mg/kg đến 40.000 mg/kg (tính theo chất khô), tùy thuộc vào loài thực vật, điều kiện khí hậu và môi trường, độ tuổi và các bộ phận khác nhau. [1][2].

Hiện nay, các sản phẩm TPBVSK có nguồn gốc thảo dược được người tiêu dùng ngày càng ưa chuộng. Tuy nhiên, các sản phẩm này lại tiềm ẩn nguy cơ chứa một số độc tố thực vật, trong đó có các hợp chất nhóm PAs. Cơ quan an toàn thực phẩm châu Âu (EFSA) đã khuyến nghị sử dụng tối đa 0,35 µg PAs /ngày đối với người có trọng lượng 50 kg. Ở Áo, mức giới hạn tối đa của PAs trong các chế phẩm từ thảo dược là 1 µg/kg [3]. Tại Việt Nam, TCVN 12053:2017 quy định về quy phạm thực hành kiểm soát cỏ dại để ngăn ngừa và giảm thiểu nhiễm pyrrolizidine alkaloid trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi, chưa có quy định cụ thể về giới hạn nồng độ pyrrolizidine trong thực phẩm [4].

Trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu xác định hàm lượng PAs trong thực vật, mật ong, thảo dược và các sản phẩm TPBVSK. Các PAs có thể được chiết khỏi nền mẫu ở dạng base sử dụng dung môi hữu cơ hoặc dạng muối sử dụng dung dịch acid. Sau đó, dung dịch chiết thường được làm sạch bằng chiết pha rắn và xác định bằng sắc ký khí khối phổ (GC-MS) hoặc sắc ký lỏng khối phổ hai lần (LC-MS/MS) [5-7]. Phương pháp LC-MS/MS kết hợp làm sạch và làm giàu bằng chiết pha rắn (SPE) đã

*Điện thoại: 0988683282

Email: caoson32@gmail.com

được nhiều tác giả nghiên cứu để xác định PAs trong các nền mẫu. Theo nghiên cứu của Griffin và Zhou, cột SPE SCX đã được sử dụng đối với nền mẫu trà, sau khi chiết bằng H_2SO_4 0,5 M có thể đạt được giới hạn phát hiện từ 1,3-3,9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ [8][9]. Gần đây, một số nước châu Âu đã đưa ra quy định các phương pháp phân tích cần phải đạt ngưỡng giới hạn định lượng được tối thiểu là 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Trong nghiên cứu này, kỹ thuật LC-MS/MS đã được sử dụng để xây dựng phương pháp xác định đồng thời 4 PAs trong mẫu TPBVSK có nguồn gốc thảo dược, nhằm góp phần giám sát, đánh giá các sản phẩm TPBVSK trên thị trường.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Các PAs được lựa chọn trong nghiên cứu gồm intermidine, echimidine, senecionine, jacobine (Bảng 1). Các mẫu TPBVSK có nguồn gốc thảo dược gồm 30 mẫu dạng trà túi lọc, 30 mẫu dạng viên, 30 mẫu dạng lỏng được mua tại các chợ, cửa hàng ở Hà Nội.

2.2. Hóa chất

Các chất chuẩn đơn gồm intermidine, senecionine, echimidine và jacobine có độ tinh khiết 99,5% (PhytoLab). Các dung môi, hóa chất được mua từ Merck gồm H_2SO_4 98%, HCl 37%, acetonitril (ACN), methanol (MeOH), acid formic (HCOOH), dichloromethan (CH_2Cl_2), chloroform ($CHCl_3$) và amoni hydroxide (NH_4OH). Cột chiết pha rắn (SPE) được sử dụng là cột SCX (500 mg, 3 mL), cột C18 (500 mg, 3 mL) của Supelco và cột Oasis HLB (60 mg, 3 mL) của Waters.

2.3. Thiết bị và dụng cụ

Hệ thống sắc ký lỏng khối phổ hai lần gồm thiết bị sắc ký lỏng LC20AD-XR (Shimadzu) và thiết bị khối phổ ba tứ cực 5500QQQ (AB Sciex). Các thiết bị khác gồm 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, dụng cụ thông thường khác trong phòng thí nghiệm.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Khảo sát điều kiện LC-MS/MS để phân tích các PAs

Các PAs được tối ưu sử dụng nguồn ion hóa phun điện tử (ESI), chế độ quét lựa chọn đa phản ứng (MRM). Mỗi chất được khảo sát để chọn ion mẹ và thực hiện tối ưu các điều kiện phân mảnh để chọn ra 2 ion con, trong đó 1 ion được sử dụng để định lượng và 1 ion được sử dụng để xác nhận. Điều kiện LC được khảo sát trên 2 loại cột sắc ký C18 và TSK-Gel.

2.4.2. Khảo sát điều kiện xử lý mẫu

Sử dụng mẫu TPBVSK có chứa các PAs và thực hiện xử lý mẫu theo hai quy trình chiết cơ bản để tách chiết các PAs:

Quy trình 1: (chiết alkaloid dạng base bằng dung môi hữu cơ) Khảo sát loại dung môi chiết gồm CH_2Cl_2 , $CHCl_3$, MeOH và ACN [6]. Cân 2,5 g mẫu vào ống ly tâm 50 mL, thêm 1 mL dung dịch kiềm hóa (sử dụng NH_4OH 5% do NH_3 phù hợp với phân tích khối phổ). Mẫu được chiết với 15 mL dung môi mỗi loại và siêu âm trong 30 phút. Chiết lặp 2 lần, sau đó lọc dịch chiết vào bình cô quay, cô quay chân không ở 50°C đến cạn. Hòa cạn bằng 5 mL MeOH, lọc dịch qua màng lọc 0,22 μm và phân tích trên LC-MS/MS.

Quy trình 2: (chiết alkaloid dạng muối bằng acid loãng) Khảo sát 2 loại acid gồm H_2SO_4 0,05M và HCl 0,1M [7]: Cân 2,5 g mẫu vào ống ly tâm 50 mL. Chiết bằng 15 mL dung dịch acid mỗi loại và siêu âm trong 30 phút. Thu lấy dịch chiết, lặp lại quá trình chiết với 10 mL acid. Gộp dịch chiết và định mức đến 25 mL bằng dung dịch acid. Lấy 5 mL dịch chiết cho qua cột SPE SCX (500 mg, 3 mL), rửa giải bằng 5 mL NH_4OH 5% /MeOH. Thổi khô dịch rửa giải, hòa cạn thu được trong 1 mL MeOH, lọc dịch qua màng lọc 0,22 μm và phân tích trên LC-MS/MS.

2.4.3. Thẩm định phương pháp

Tiến hành thẩm định phương pháp đã tối ưu các thông số cơ bản gồm tính đặc hiệu, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng, khoảng tuyến tính, độ lặp lại và độ thu hồi. Các kết quả được đánh giá so sánh với các quy định theo AOAC.



3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

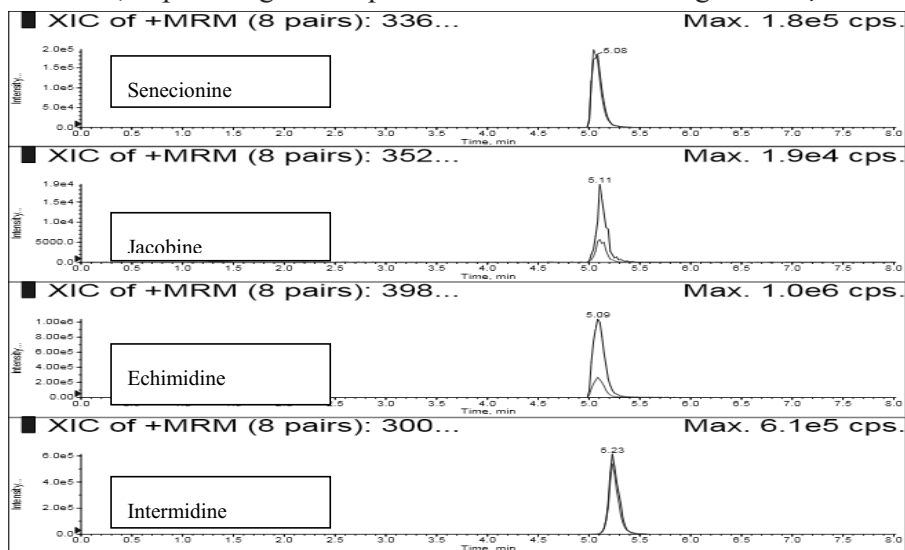
3.1. Khảo sát các điều kiện tối ưu phân tích PAs bằng LC-MS/MS

Để khảo sát điều kiện MS/MS, tiến hành tiêm dung dịch chuẩn có nồng độ 100 ng/mL vào khối phổ và thực hiện lựa chọn ion mẹ, ion con và năng lượng va chạm. Các kết quả xác định được tóm tắt trong Bảng 1.

Bảng 1. Các PAs được sử dụng trong nghiên cứu và điều kiện MS/MS

PAs	Công thức cấu tạo	Ion mẹ	Ion con (định lượng)	CE (eV)	Ion con (xác nhận)	CE(eV)	Số điểm IP
Echimidine		398,2	120,3	23	220,3	17	4
Intermidine		300,1	138,3	18	156,2	28	4
Jacobine		352,3	120,1	22	155,2	20	4
Senecionine		336,2	120,2	27	138,2	29	4

PAs là các chất tương đối phân cực, nên khi sử dụng pha tĩnh C18 không lưu giữ được chất phân tích. Khi sử dụng cột TSK Gel với bản chất hạt nhồi là Amide-80 có tính phân cực có thể lưu giữ và tách được các PAs với nền mẫu. Qua khảo sát đã chọn được chương trình gradient (kênh A: HCOOH 0,1% /H₂O, kênh B: ACN) như sau: ban đầu 90% B, giữ 2,5 phút; giảm 10% B tới 2,55 phút; giữ tới 5,5 phút; tăng 90% tới 5,55 phút và giữ tới 8 phút. Sắc đồ MRM của từng PAs được đưa ra ở Hình 1.

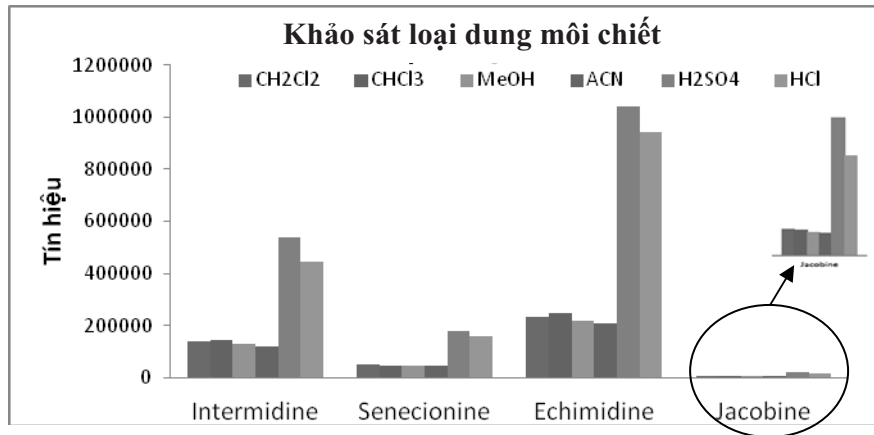


Hình 1. Sắc đồ MRM của từng PAs ở nồng độ 10 ng/mL

3.2. Khảo sát quy trình xử lý mẫu

3.2.1. Khảo sát quy trình chiết

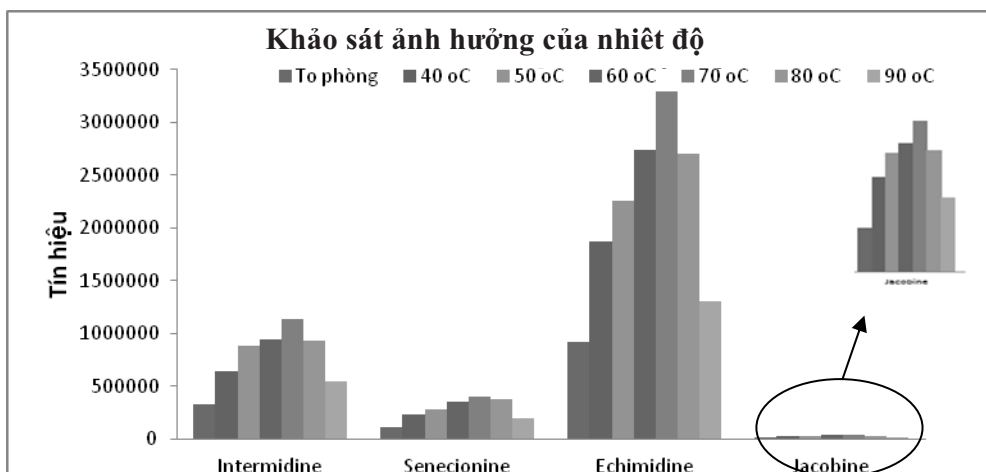
Sử dụng mẫu TPBVSK có chứa cả 4 PAs. So sánh hai quy trình xử lý mẫu: Chiết alkaloid dạng base bằng dung môi hữu cơ và chiết alkaloid dạng muối bằng acid loãng. Thực hiện 2 lần lấy kết quả trung bình, các kết quả được thể hiện trong Hình 2.



Hình 2. Biểu đồ kết quả khảo sát dung môi chiết

Khi chiết mẫu bằng quy trình 2 (chiết bằng acid) cho kết quả cao hơn đáng kể so với chiết bằng dung môi hữu cơ đối với cả 4 chất PAs. Trong đó, sử dụng acid H₂SO₄ 0,05M cho hiệu quả chiết cao nhất. Phương pháp chiết alkaloid dạng muối bằng acid loãng có nhiều thuận lợi khi kết hợp với giai đoạn làm sạch bằng cột SPE SCX. Như vậy, quy trình 2 với dung môi chiết là H₂SO₄ đã được lựa chọn cho các khảo sát tiếp theo. Qua khảo sát với nồng độ H₂SO₄ từ 0,01 M; 0,025 M; 0,05 M; 0,075 M; 0,1 M; 0,2 M cho thấy nồng độ H₂SO₄ tối ưu là 0,05 M. Kết quả này cũng phù hợp với nhiều nghiên cứu trước đây [8][9].

Nhiệt độ giai đoạn chiết mẫu được lựa chọn có ý nghĩa quan trọng để nâng cao hiệu suất chiết. Tiến hành khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến hiệu suất chiết từ nhiệt độ phòng, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C và 90°C. Thực hiện lặp lại 2 lần lấy giá trị trung bình. Kết quả khảo sát được thể hiện ở hình 3.



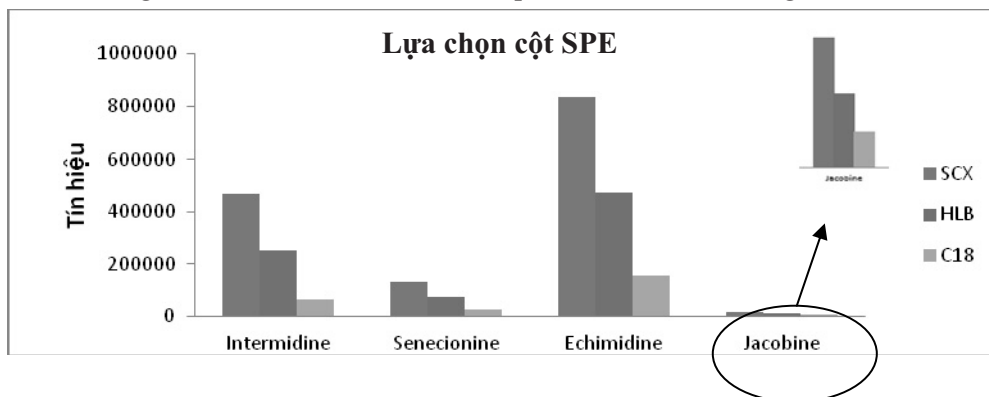
Hình 3. Biểu đồ kết quả khảo sát nhiệt độ

Hiệu suất chiết tăng dần khi tăng nhiệt độ, đạt cao nhất ở 70°C, sau đó giảm dần khi tiếp tục tăng nhiệt độ. Khi tăng nhiệt độ, có khả năng các PAs bị phân hủy nên hiệu suất chiết giảm. Do vậy, nhiệt độ chiết mẫu 70°C đã được lựa chọn để tiến hành các bước khảo sát tiếp theo.



3.2.2. Khảo sát giai đoạn làm sạch bằng SPE

Các PAs sau khi được chiết ra khỏi nền mẫu sẽ ở dạng muối trong môi trường acid. Theo lý thuyết, sử dụng cột SPE trao đổi cation sẽ cho hiệu quả làm sạch tốt nhất. Ngoài ra, các PAs có các vòng không phân cực nên cũng có thể làm sạch bằng các cột pha đảo như C18 hay HLB. So sánh hiệu suất chiết bằng cột SCX, C18 và HLB. Kết quả được thể hiện trong hình 4.



Hình 4. Biểu đồ kết quả khảo sát cột SPE

Cột SCX cho thấy ưu thế vượt trội so với các cột SPE khác do tính đặc hiệu tốt hơn. Bản chất của các PAs có chứa nguyên tố N dị vòng có thể tạo thành muối amoni bậc 4 do đó có thể tương tác với cột qua liên kết trao đổi cation. Do vậy, cột SCX đã được lựa chọn cho bước làm sạch. Thể tích dung môi rửa giải cũng được tối ưu là 5 mL.

Qua khảo sát, đã xác định được các điều kiện tối ưu để chiết các PAs như sau:

- Dung môi chiết và nồng độ acid: H₂SO₄ 0,05M
- Nhiệt độ chiết mẫu: 70°C
- Làm sạch bằng cột SPE SCX
- Thể tích rửa giải: 5 mL NH₄OH 5%/MeOH

Sau khi đã tối ưu quy trình xử lý mẫu, tiến hành khảo sát ảnh hưởng của nền mẫu. Lập đường chuẩn trên nền dung môi và trên nền mẫu bằng cách thêm chuẩn vào mẫu TPBVSK đã được xác định là không có PAs, tiến hành xử lý mẫu theo quy trình đã tối ưu. Các kết quả cho thấy, nền mẫu làm giảm tín hiệu của PAs với các mức ảnh hưởng đối với mẫu TPBVSK dạng lỏng là 6,8%; đối với mẫu TPBVSK dạng viên là 4,4%; đối với mẫu TPBVSK dạng trà túi lọc là 8,4%. Các kết quả này nằm trong mức giới hạn theo FDA (15%). Do đó khi phân tích mẫu thực tế, có thể sử dụng đường chuẩn trên nền mẫu dung môi để tính kết quả.

3.3. Thẩm định phương pháp

3.3.1. Độ đặc hiệu

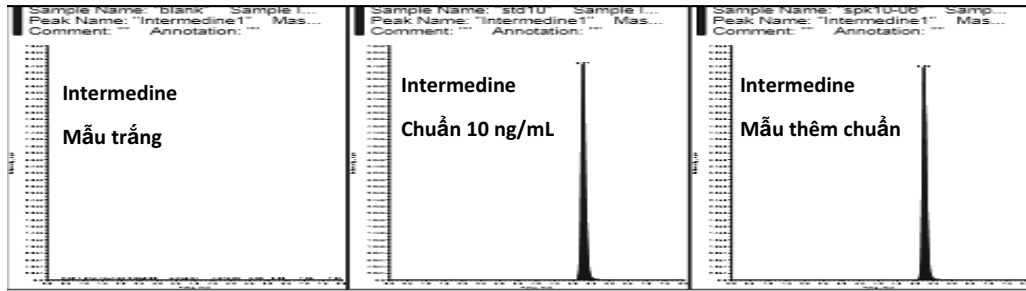
Số điểm IP: Các PAs đều có 1 ion mẹ và 2 ion con do đó số điểm IP = 4, thỏa mãn yêu cầu phân tích trên khối phổ.

Tỷ lệ ion: tiến hành phân tích mẫu chuẩn và mẫu trắng thêm chuẩn, so sánh tỷ lệ ion giữa ion định tính và ion định lượng. Kết quả ở bảng 2 cho thấy tỷ lệ ion thu được trên mẫu thêm chuẩn hoàn toàn phù hợp với chuẩn tương ứng.

Bảng 2. Tỷ lệ ion của các PAs

PAs	Echimidine	Senecionine	Intermidine	Jacobine
Mẫu chuẩn	25,4	98,5	88,2	34,1
Mẫu thêm chuẩn	24,8	96,1	83,5	31,8
% sai lệch	- 2,4 %	- 2,4 %	- 5,3 %	- 6,7 %
% sai lệch cho phép	± 20 %	± 10 %	± 10 %	± 20 %

Phân tích mẫu trắng, mẫu chuẩn và mẫu thêm chuẩn: Từ sắc đồ ở hình 5 cho thấy mẫu trắng không có tín hiệu của chất phân tích, mẫu trắng thêm chuẩn có pic của các PAs ở thời gian trùng khớp với thời gian lưu của chuẩn tương ứng (chênh lệch thời gian lưu không quá 2%). Như vậy, phương pháp đảm bảo tính đặc hiệu để phân tích các PAs.



Hình 5. Sắc đồ mẫu trắng thêm chuẩn, mẫu chuẩn và mẫu trắng của Intermedine

3.3.2. Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ)

Tiến hành phân tích mẫu trắng thêm chuẩn với nồng độ thấp còn có thể xuất hiện tín hiệu chất phân tích. Phân tích lặp lại 6 lần. Giới hạn phát hiện là nồng độ mà tại đó có S/N = 3. Giới hạn định lượng là giới hạn mà tại đó S/N = 10 hay LOQ = 3,3LOD. Phương pháp đã đạt được LOD = 0,3 µg/kg, LOQ = 1 µg/kg đối với cả 4 PAs nghiên cứu.

Bảng 3. Kết quả phân tích mẫu thực tế

Mã mẫu	Hàm lượng các PAs (µg/kg)				Mã mẫu	Hàm lượng các PAs (µg/kg)			
	Echimidine	Senecionine	Jacobine	Intermidine		Echimidine	Senecionine	Jacobine	Intermidine
T-01	-	3,1	-	4,0	L-12	-	65	-	-
T-04	-	14	-	2,8	L-13	-	31	41	1,0
T-06	-	22	-	4,5	L-20	-	0,98	-	-
T-07	-	11	1,4	4,8	L-21	-	2,9	9,3	-
T-14	-	2,6	8,2	8,7	L-29	-	13,4	56	-
T-15	-	16	-	3,0	V-01	-	6,8	-	39
T-21	-	20	1,0	1,8	V-02	5,4	7,3	-	59
T-25	-	4,5	6,5	2,4	V-06	-	1,1	-	40
T-30	-	2,7	10	14	V-09	-	10	1,0	-
L-03	-	1,79	13	-	V-16	-	3,5	9,8	3,4
L-04	-	-	3,7	-	V-17	-	1,7	42	35
L-07	-	1,0	4,9	-	V-18	-	8,8	-	-
L-08	-	13	25	-	V-23	-	4,3	9,5	3,1

3.3.3. Xây dựng đường chuẩn

Tiến hành thêm chuẩn vào dịch chiết mẫu trắng ở các mức nồng độ 1; 2; 5; 10; 20; 40 µg/kg và phân tích trên LC-MS/MS. Xây dựng đường phụ thuộc giữa diện tích pic và nồng độ tương ứng. Đường chuẩn được lập theo phần mềm của thiết bị.

Các kết quả cho thấy trong khoảng nồng độ đã khảo sát, tín hiệu các PAs có sự tương quan tuyến tính với nồng độ. Đường chuẩn có thể được lập trên nền dung môi hoặc nền mẫu.

3.3.4. Độ đúng, độ lặp lại, độ tái lập nội bộ

Độ đúng và độ lặp lại của phương pháp được đánh giá bằng cách thêm chuẩn vào mẫu TPBVSK đã được xác định không chứa PAs, tiến hành phân tích theo quy trình đã xây dựng. Các mẫu được



thêm chuẩn ở các mức nồng độ 1; 10; 40 ng/g. Kết quả phân tích có độ thu hồi từ 88,7 – 117%, độ lặp lại từ 3,6 – 7,5%, độ tái lặp 5,9 – 7,4%. Điều này cho thấy phương pháp có độ đúng, độ lặp lại đáp ứng yêu cầu của AOAC.

3.3.5. Ứng dụng phân tích PAs trong mẫu TPBVSK

Trên cơ sở phương pháp đã xây dựng, chúng tôi tiến hành xác định hàm lượng PAs trên một số mẫu TPBVSK dạng trà (T), lỏng (L) và viên (V). Kết quả các mẫu có phát hiện ít nhất 1 PAs được thể hiện trong bảng 3.

Kết quả cho thấy có 26/90 mẫu (chiếm 28,8%) có chứa ít nhất 1 chất PAs nghiên cứu. Trong đó, có nhiều mẫu chứa đồng thời 3 chất PAs gồm Senecionine, Jacobine, Intermidine; chỉ có 1 mẫu phát hiện Echimidine. Hàm lượng của các PAs dao động lần lượt từ 1,0-65 µg/kg (Senecionine), từ 1,0-56 µg/kg (Jacobine) và từ 1-59 µg/kg (Intermidine). Các mẫu này đều có hàm lượng PAs vượt quá mức quy định của Áo (1 µg/kg). Các đối tượng mẫu dương tính có thành phần chứa nhiều loại thảo dược khác nhau, các loại thảo dược có mặt có thể là nguồn PAs bao gồm: khoản đông hoa, vôi voi, liên mộc.

KẾT LUẬN

Sử dụng phương pháp LC-MS/MS trên cột TSK-Gel kết hợp với quá trình chiết mẫu bằng acid loãng, làm sạch bằng SPE SCX, nhóm nghiên cứu đã xây dựng được quy trình phân tích PAs trong TPBVSK có nguồn gốc thảo dược đáp ứng được các yêu cầu theo AOAC. Kết quả xác định ntermidine, echimidine, senecionine, jacobine trong một số mẫu TPBVSK dạng lỏng, viên và trà túi lọc cho thấy tần suất và mức độ xuất hiện là đáng kể, cần phải có quy định kiểm soát đối với các hợp chất này và các PAs nói chung.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Edgar J. A., Colegate S. M., Boppré M., Molyneux R. J. (2011), “Pyrrolizidine alkaloids in food: a spectrum of potential health consequences”, *Food Additives & Contaminants: Part A*, vol. 28, no. 3, pp. 308–324.
2. Poppenga R. H., Puschner B. (2009), “Poisonous Plant Threats to Cattle and Horses: Tansy Ragwort, Common Groundsel and Fiddleneck,” *California Animal Health and Food Safety Laboratory System (CAHFS)*.
3. EFSA (2007), “Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the European Commission related to pyrrolizidine alkaloids as undesirable substances in animal feed”, *EFSA Journal*, vol. 447, pp. 1–51.
4. TCVN 12053:2017 (CAC/RCP 74-2014), “Quy phạm thực hành kiểm soát cỏ dại để ngăn ngừa và giảm thiểu nhiễm alkaloid pyrrolizidine trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi”, Bộ Khoa học và Công nghệ.
5. Kempf M. et al. (2008), “Pyrrolizidine alkaloids in honey: Risk analysis by gas chromatography-mass spectrometry” *Molecular nutrition & food research*, vol. 52, no. 10, pp. 1193–1200.
6. Crews C., Startin J. R., Clarke P. A. (1997), “Determination of pyrrolizidine alkaloids in honey from selected sites by solid phase extraction and HPLC-MS”, *Food Additives & Contaminants*, vol. 14, no. 5, pp. 419–428.
7. Edgar J. A., Colegate S. M., Boppré M., Molyneux R. J. (2011), “Pyrrolizidine alkaloids in food: a spectrum of potential health consequences”, *Food Additives & Contaminants: Part A*, vol. 28, no. 3, pp. 308–324.
8. Griffin C. T., Gosetto F., Danaher M., Sabatini S., Furey A. (2014), “Investigation of targeted pyrrolizidine alkaloids in traditional Chinese medicines and selected herbal teas sourced in Ireland using LC-ESI-MS/MS”, *Food Additives & Contaminants: Part A*, vol. 31, no. 5, pp. 940–961.

9. Zhou Y. et al. (2010), “A new approach for simultaneous screening and quantification of toxic pyrrolizidine alkaloids in some potential pyrrolizidine alkaloid-containing plants by using ultra performance liquid chromatography–tandem quadrupole mass spectrometry” *Analytica chimica acta*, vol. 681, no. 1–2, pp. 33–40.

Summary

SIMULTANEOUS DETERMINATION OF PYRROLIZIDINE ALKALOIDS IN FOOD SUPPLEMENTS OF HERBAL ORIGIN USING LIQUID CHROMATOGRAPHY TANDEM MASS SPECTROMETRY

**Tran Cao Son^{1*}, Bui Cao Tien¹, Dang Phuong Thao², Nguyen Xuan Truong³,
Cung Thi To Quynh⁴, Le Thi Hong Hao¹**

¹ National Institute for Food Control

² Hanoi University of Pharmacy

³ Vietnam Food Administration

⁴ School of Biotechnology and Food Technology,
Hanoi University of Science and Technology

A simple and accurate method has been developed for the simultaneous determination of four pyrrolizidine alkaloids (PAs) including echimidine, senecionine, jacobine and intermidine in food supplements of plant origin. The instrumental conditions including the use of TSK-Gel column for the separation and an MS/MS detector in positive ESI source, multi-reactive monitoring (MRM) mode for quantitation were optimized. The method has fully validated and meets the performance requirement of AOAC with good specificity. The linearity varies from 1.0 µg/kg to 40 µg/kg, the LOD was of 0.3 µg/kg; the repeatability and recovery range from 3.6% to 7.5% and 88.7% to 117%, respectively. The method was applied to determine PAs in 90 food supplement samples, of which 26 samples (28.8%) contain PAs.

Keywords: LC-MS/MS, pyrrolizidine alkaloids, senecionine, jacobine, intermidine, echimidine