

XÁC ĐỊNH ĐỒNG THỜI MỘT SỐ ĐỘC TỐ VI NẤM NHÓM ERGOT ALKALOIDS TRONG THỰC PHẨM BẰNG LC-MS/MS

Trần Cao Sơn^{1*}, Trần Hoàng Giang^{1,4}, Nguyễn Thị Mến², Nguyễn Thị Hà Bình¹
Lê Đình Chi², Nguyễn Thị Phương Lan³, Nguyễn Thị Ánh Hương⁴

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

²Trường Đại học Dược Hà Nội

³Cục an toàn thực phẩm

⁴Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

(Ngày đến tòa soạn: 15/01/2020; Ngày sửa bài sau phản biện: 15/02/2020; Ngày chấp nhận đăng: 20/03/2020)

Tóm tắt

Phương pháp sắc ký lỏng khối phổ hai lần (LC-MS/MS) đã được áp dụng để nghiên cứu xác định đồng thời 04 độc tố vi nấm nhóm ergot alkaloids (EAs) bao gồm: ergosine, ergocryptine, ergocristine, ergocorsine trong thực phẩm. Các độc tố vi nấm EAs trong thực phẩm được chiết, làm sạch bằng kỹ thuật QuEChERS và được tách bằng sắc ký lỏng với cột C18 và định lượng bằng detector khối phổ ba tứ cực. Nguồn ion hóa ESI (+), chế độ theo dõi ion MRM đã được sử dụng trong nghiên cứu. Giá trị sử dụng của phương pháp được xác nhận theo hướng dẫn của AOAC. Kết quả cho thấy phương pháp có tính đặc hiệu tốt, đường chuẩn được xây dựng trong khoảng nồng độ từ 5,0 - 100 µg/kg, giới hạn phát hiện 0,3 µg/kg, giới hạn định lượng 1,0 µg/kg; độ chụm và độ đúng với hệ số biến thiên lặp lại RSD < 12,5% và độ thu hồi dao động từ 90,6 - 102,8%, đáp ứng yêu cầu theo AOAC. Phương pháp được áp dụng để đánh giá hàm lượng các độc tố vi nấm EAs trong một số sản phẩm thực phẩm như: ngô, lúa mì và bột ngũ cốc dinh dưỡng; chưa phát hiện thấy độc tố nhóm EAs trong các mẫu phân tích.

Từ khóa: ergot alkaloids, ergosine, ergocryptine, ergocristine, ergocorsine, LC-MS/MS, lúa mì, ngô, ngũ cốc.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ergot alkaloids (EAs) là độc tố vi nấm có nguồn gốc từ tryptophan được sinh ra bởi các loại nấm khác nhau, đặc biệt là các loài *Claviceps* spp. trong đó phổ biến nhất là *Claviceps purpureas* [1]. Nấm phát triển trong giai đoạn ra hoa, xâm chiếm nõn, sử dụng dinh dưỡng của cây chủ, hình thành hạch nấm có lớp tế bào cứng, sẫm màu, hình lưỡi liềm và thay thế nhân hạt sau 3 - 4 tuần xâm nhiễm. Hạch nấm của loài *Claviceps* spp. được gọi là sclerotia hay ergot [1], [2]. EAs tồn tại trong hạt và khó loại bỏ được bằng các cách sàng lọc thông thường. Các độc tố này thường xuất hiện trong các loại ngũ cốc như lúa mạch, lúa mì, lúa mạch đen, yến mạch và một số loại ngũ cốc khác.

Trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu xác định hàm lượng EAs trong lúa mì, lúa mạch và sản phẩm ngũ cốc,... [3 - 6]. Hiện nay, một số nước châu Âu đã đưa ra ngưỡng quy định về EAs trong các sản phẩm thực phẩm, theo đó các phương pháp phân tích cần phải đạt ngưỡng giới hạn định lượng được tối thiểu là 1,0 µg/kg. Phương pháp LC-MS/MS kết hợp xử lý mẫu bằng kỹ thuật QuEChERS có nhiều ưu điểm vượt trội như độ nhạy tốt, độ đặc hiệu cao, thời gian phân tích nhanh, có thể phân tích đồng thời, quá trình xử lý mẫu đơn giản, đã được nhiều tác giả nghiên cứu để xác định EAs trong các nền mẫu. Tuy nhiên, xử lý mẫu theo QuEChERS đòi hỏi cần phải khảo sát loại pha rắn phù hợp cho các nền mẫu khác nhau, để có thể loại trừ ảnh hưởng

* Điện thoại: 0988683282 Email: caoson32@gmail.com

của nền mẫu đến kết quả phân tích.

Nguyên cứu này thực hiện xây dựng và hoạch định phương pháp phân tích sử dụng kỹ thuật LC-MS/MS để dung hòa 04 EAS. Kết quả nghiên cứu là cơ sở thực hiện giám sát, đánh giá các chất EAS trong các sản phẩm trên thị trường.

Nghiên cứu này thực hiện xây dựng và thẩm định phương pháp phân tích đồng thời 04 EAs. Kết quả nghiên cứu là cơ sở thực hiện giám sát, đánh giá các chất EAs trong các sản phẩm trên thị trường.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Các EAs được lựa chọn trong nghiên cứu gồm ergosine, ergocryptine, ergocristine, ergocorsine (Bảng 1). Các thực phẩm gồm ngô, lúa mỳ và bột ngũ cốc dinh dưỡng, được mua ngẫu nhiên tại các chợ, cửa hàng ở Hà Nội.

2.2. Hóa chất

Các chất chuẩn đơn, độ tinh khiết 99,5% (PhytoLab) gồm ergosine, ergocryptine, ergocristine, ergocorsine (Bảng 1). Các dung môi, hóa chất gồm H_3PO_4 85%; Acetonitril (ACN); methanol (MeOH); amoni cacbonat $(NH_4)_2CO_3$; amoni acetat (CH_3COONH_4) đều có nguồn gốc từ Merck (Đức).

2.3. Thiết bị và dụng cụ

Hệ thống sắc ký lỏng khối phổ hai lần gồm thiết bị khối phổ 5500 QQQ của SCIEX (Mỹ) kết nối với sắc ký lỏng LC 20-AD XR của Shimadzu (Nhật). Một số thiết bị phụ trợ khác bao gồm máy ly tâm lạnh 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 EAs

Điều kiện phân tích tối ưu các EAs được sử dụng nguồn ion hóa phun điện tử ESI (+), chế độ quét lựa chọn đa phản ứng (MRM). Mỗi chất chọn 01 ion mẹ và thực hiện tối ưu các điều kiện phân mảnh để chọn ra 2 ion con, 1 ion con được sử dụng để định lượng và 01 ion con được sử dụng để định tính. Đối với các điều kiện LC tham khảo cột phân tích C18, thành phần pha động (ACN và dung dịch đệm $(NH_4)_2CO_3$ 200 mg/L) [3] và tiến hành khảo sát điều kiện gồm: pH của dung dịch đệm (trong khoảng từ 8 đến 10) và chương trình gradient rửa giải chất phân tích.

2.4.2. Khảo sát điều kiện xử lý mẫu

Trên cơ sở tham khảo một số nghiên cứu [3-6], quy trình chiết với hỗn hợp dung môi hữu cơ trong đệm. Tiến hành khảo sát môi trường chiết, nồng độ dung môi, tỷ lệ dung môi, thể tích dung môi, pha rắn và hàm lượng. Sử dụng mẫu ngũ cốc đã được xác định là dương tính với các EAs để thực hiện các bước khảo sát, cụ thể như sau:

- Khảo sát môi trường chiết

+ Chiết EAs trong môi trường acid: methanol - H_3PO_4 0,25% (40 : 60)

+ Chiết EAs trong môi trường trung tính: acetonitril - amoni acetate 10 mM (1 : 2);

+ Chiết EAs trong môi trường kiềm: acetonitril - amoni carbonate 200 mg/L (84 : 16);

+ Khảo sát nồng độ $(NH_4)_2CO_3$ trong dung môi chiết: 100, 150, 200 và 250 mg/L.

+ Khảo sát tỷ lệ dung môi chiết (ACN: $(NH_4)_2CO_3$ 200 mg/L) theo các tỷ lệ: (75 : 25), (80 : 20), (85 : 15), (86 : 14), (90 : 10).

- Khảo sát thể tích dung môi chiết mẫu: 10, 20, 25, 30 và 35 mL.
- Khảo sát loại chất hấp phụ PSA, C₁₈, MgSO₄ và khối lượng 30 - 150 mg.

2.4.3. Thẩm định phương pháp

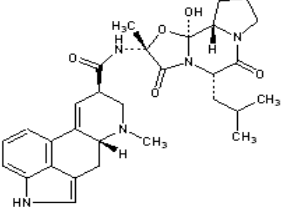
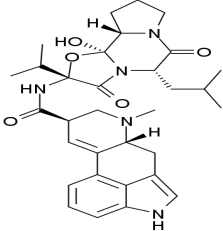
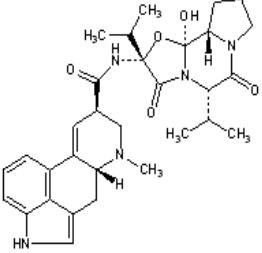
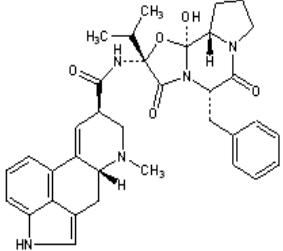
Tiến hành thẩm định phương pháp đã tối ưu các thông số cơ bản gồm: tính đặc hiệu, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng, đường chuẩn, độ lặp lại và độ thu hồi. Các kết quả được đánh giá so sánh với các quy định theo AOAC.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

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

Để khảo sát điều kiện MS/MS, tiến hành bơm dung dịch chuẩn có nồng độ 100 ng/mL vào khối phổ và tối ưu hóa tự động để lựa chọn ion mẹ, ion con và năng lượng va chạm. Các kết quả được tóm tắt trong Bảng 1.

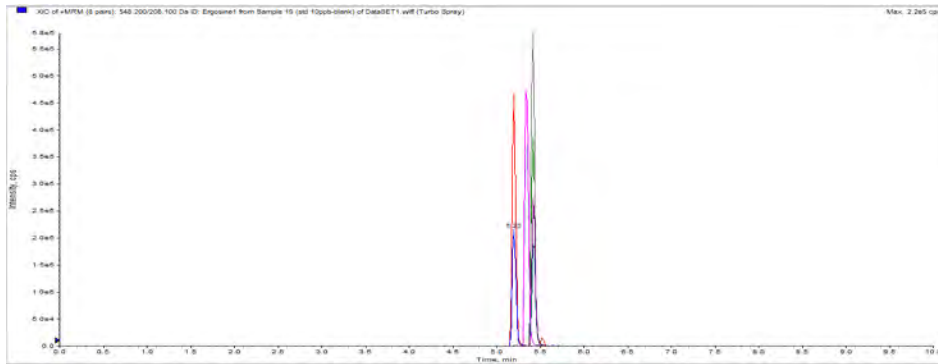
Bảng 1. Các EAs được sử dụng trong nghiên cứu và điều kiện MS/MS

EAs	Công thức cấu tạo	Ion mẹ	Ion con (định lượng)	CE (eV)	Ion con (xác nhận)	CE(eV)	Số điểm IP
Ergosine		548,2	208,1	37	223,2	35	4
Ergocryptine		576,2	208,1	51	268,2	33	4
Ergocorsine		562,1	223,1	41	268,2	31	4
Ergocristine		610,0	208,2	49	268,2	33	4

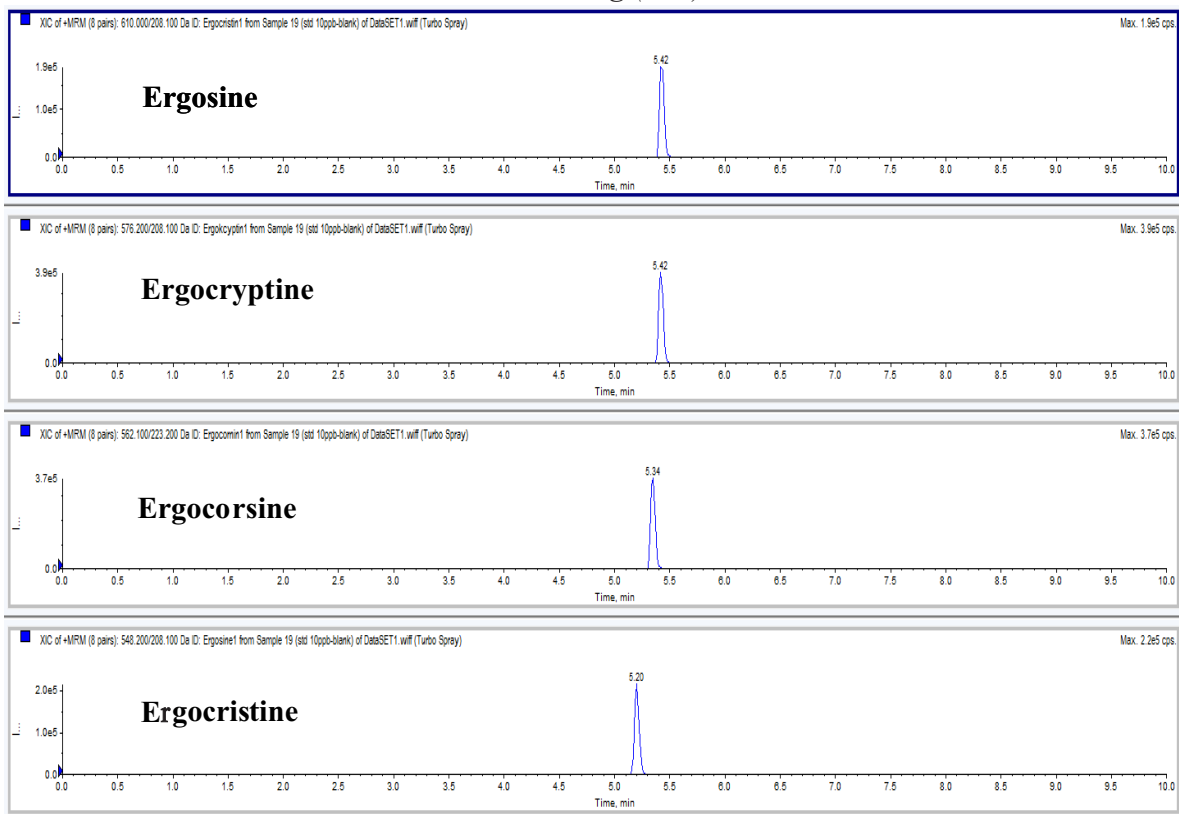
EAs là các chất không phân cực, dễ tương tác với pha tĩnh không phân cực của cột C18 nên lưu giữ được chất phân tích. Qua khảo sát chương trình gradient và pH của dung dịch đệm

(tại 3 giá trị pH 8, 9, 10) lựa chọn được pha động gồm kênh A: $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 200 mg/L có pH = 8, kênh B: ACN) và chế độ gradient như sau: ban đầu 80% B, giữ 1 phút; giảm 10% B tới 3 phút; giữ tới 07 phút; tăng 80% tới 7,01 phút và giữ tới 10 phút.

Sắc ký đồ của các EAs sau khi đã xác định được các điều kiện LC-MS/MS được trình bày ở hình 1 và hình 2. Các pic được tách hoàn toàn khỏi nhau, tín hiệu cao, đỉnh pic tương đối nhọn và cân xứng, thời gian phân tích phù hợp.



Hình 1. Sắc đồ tổng (TIC) các EAs



Hình 2. Sắc ký đồ (MRM) của từng EAs

3.2. Khảo sát quy trình xử lý mẫu

3.2.1. Khảo sát môi trường chiết mẫu

Các EAs có tính base do trong phân tử có chứa nguyên tử N dễ tan trong một số dung môi hữu cơ như CH_2Cl_2 , CHCl_3 , ethyl acetate, acetonitril. Do đó, các dung môi này được lựa chọn

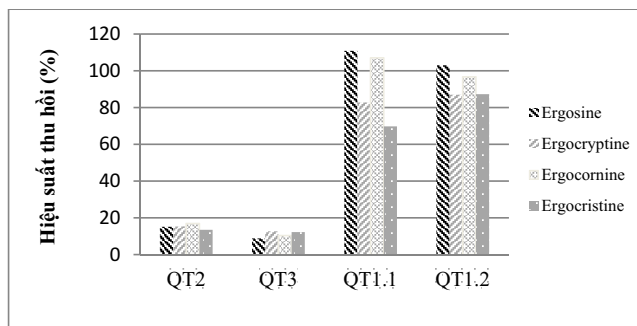
để khảo sát. Ba quy trình chiết được khảo sát trong nghiên cứu gồm:

+ Quy trình 1: Chiết và làm sạch bằng kỹ thuật QuEChERS [3]: 5 g mẫu được lắc với 25 mL ACN : $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 200 mg/L (84 : 16, v/v) trong ống ly tâm 50 mL. Sau khi lắc ngang trong 30 phút, mẫu được ly tâm và lọc dịch chiết qua màng lọc 0,22 μm và phân tích trên LC-MS/MS (Quy trình 1.1). Lấy 1 mL dịch chiết sau khi ly tâm cho vào ống 2 mL có chứa 50 mg PSA, lắc xoay 1 phút, ly tâm và lấy 0,5 mL dịch phân tích trên thiết bị LC-MS/MS (Quy trình 1.2).

+ Quy trình 2: Chiết và làm sạch mẫu bằng cột SPE HLB [5]: Sau khi thu được dịch chiết như ở quy trình 1, lấy 3 mL dịch chiết pha loãng với 10 mL nước và cho qua cột SPE HLB (60 mg, 3 mL) đã được hoạt hóa, các EAs được rửa giải bằng 6 mL ACN: H_2O (1 : 2). 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.

+ Quy trình 3: Chiết và làm sạch mẫu bằng cột SPE C18 [4]: Sau khi thu được dịch chiết như ở quy trình 1, lấy 3 mL dịch chiết pha loãng với 10 mL nước và cho qua cột SPE C18 (500 mg, 3 mL), rửa giải bằng 6 mL ACN: MeOH (1 : 1, v/v). 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.

Tiến hành phân tích mẫu bột ngũ cốc thêm chuẩn 04 EAs, các kết quả thu được thể hiện trong Hình 3 cho thấy hiệu suất thu hồi qua các cột SPE C18 và HLB rất thấp (10 - 20%). Khi áp dụng phương pháp QuEChERS, hiệu suất thu hồi tăng lên đáng kể (80 - 110%). Việc không sử dụng bước làm sạch có thể cho hiệu suất cao với một số EAs nhưng dịch chiết có chứa nhiều tạp chất, có thể gây ảnh hưởng dẫn đến hiệu ứng nền cao. Phương pháp QuEChERS cho hiệu suất đồng đều giữa các chất phân tích, độ thu hồi tốt, ảnh hưởng của nền mẫu thấp được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 3. Kết quả khảo sát quy trình chiết EAs

3.2.2. Khảo sát tỷ lệ và thể tích dung môi chiết

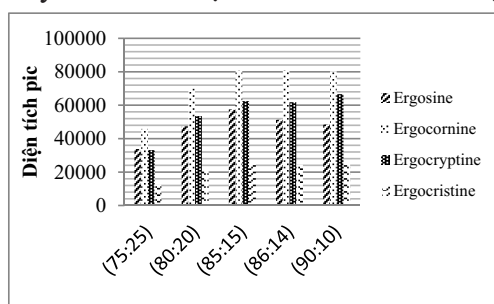
Tỷ lệ dung môi chiết cũng ảnh hưởng đến kết quả phân tích. Tiến hành cân 5 g mẫu vào ống ly tâm sau đó thêm 25 mL dung môi chiết (ACN : $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 200 mg/L) theo các tỷ lệ (75 : 25), (80 : 20), (85 : 15), (86 : 14), (90 : 10). Các kết quả được trình bày ở Hình 4a cho thấy, tín hiệu các chất phân tích tăng lên từ tỷ lệ (75 : 25) đến (85 : 15). Tuy nhiên, từ tỷ lệ (85 : 15) đến tỷ lệ (90 : 10) tín hiệu gần như không có sự thay đổi nhiều. Để đảm bảo tín hiệu ổn định trong quá trình phân tích, tỷ lệ ACN : $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 200 mg/L (85 : 15) được lựa chọn cho các khảo sát tiếp theo.

Thể tích dung môi chiết cũng được khảo sát với các giá trị 10, 20, 25, 30, 35 mL. Kết quả ở Hình 4b cho thấy, khi thay đổi thể tích chiết từ 10 đến 25 mL hiệu suất thu hồi các EAs tăng lên và tốt nhất ở 25 mL. Tuy nhiên khi tăng thể tích lên 30, 35 mL hiệu suất chiết giảm xuống, vì thông thường thể tích dung môi chiết tăng thì chiết hoạt chất được nhiều hơn. Nhưng có thể do khi thể tích tăng, chiết thêm được nhiều chất khác ở nền mẫu nên ảnh hưởng của nền tăng lên, làm giảm

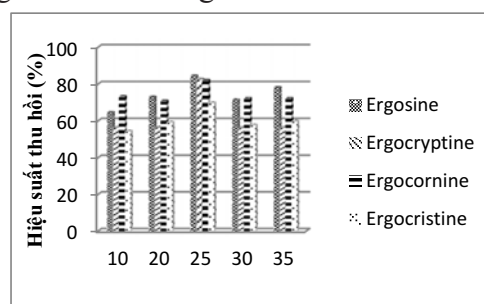
khả năng phân tích các EAs. Do đó, lựa chọn thể tích 25 mL cho các khảo sát tiếp theo.

3.2.3. Khảo sát bước làm sạch bằng d-SPE

Hai loại chất hấp phụ là PSA và C18 được sử dụng trong nhiều nghiên cứu. PSA có vai trò loại các hợp chất phân cực mạnh như các acid hữu cơ, trong khi C₁₈ được sử dụng để loại các chất béo, ngoài ra MgSO₄ là chất hấp phụ quan trọng trong bước này giúp loại nước còn dư. Tiến hành khảo sát các chất hấp phụ khác nhau PSA, C18, PSA+ C18, PSA + MgSO₄, C18 + MgSO₄. Khối lượng chất hấp phụ từ 30 đến 150 mg. Các kết quả được trình bày ở Hình 5a và 5b cho thấy PSA cho hiệu suất tốt nhất với lượng tối ưu là 50 mg.



4a. Sự phụ thuộc tín hiệu vào tỷ lệ dung môi của các EAs



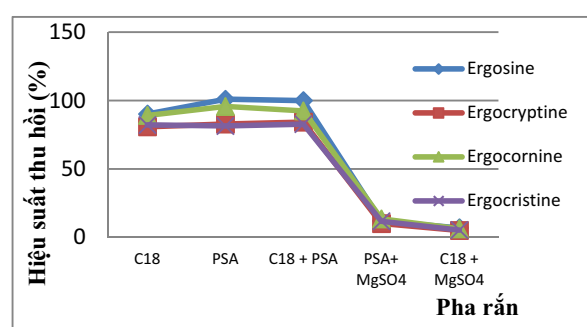
4b. Thể tích dung môi chiết

Hình 4. Khảo sát tỷ lệ và thể tích dung môi chiết

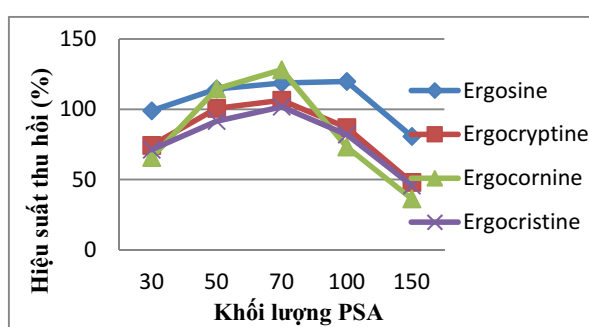
Dựa vào kết quả khảo sát, quy trình xử lý mẫu tối ưu như sau: Cân 5 g mẫu vào ống ly tâm 50 mL, thêm 25 mL ACN : (NH₄)₂CO₃ 200 mg/L (85 : 15), lắc đồng nhất bằng máy lắc ngang trong 15 phút và ly tâm với tốc độ 5000 vòng/phút, trong 5 phút. Lấy 1 mL dịch cho vào ống d-SPE (50 mg PSA) và lắc xoáy trong 1 phút, ly tâm 13000 vòng/phút trong 1 phút. Hút 0,5 mL dịch chiết vào vial 2 mL và phân tích bằng LC-MS/MS.

3.3. Thẩm định phương pháp

Thẩm định tiến hành trên mẫu trắng (mẫu ngũ cốc không chứa EAs), mẫu chuẩn (dung dịch chuẩn hỗn hợp EAs 10 ng/mL) và mẫu trắng thêm chuẩn (mẫu ngũ cốc không có EAs được thêm dung dịch chuẩn hỗn hợp EAs 10ng/mL).



5e. Khảo sát pha rắn



5f. Khảo sát lượng pha rắn

Hình 5. Khảo sát bước làm sạch bằng d-SPE

3.3.1. Độ đặc hiệu

Đánh giá độ đặc hiệu của phương pháp qua các tiêu chí sau:

- + *Tính số điểm IP*: Các PAs đều có số điểm IP = 4, thỏa mãn yêu cầu phân tích trên khối phổ.
- + *Tỷ lệ ion*: Đối với phương pháp khối phổ, tỷ lệ ion là tiêu chí để khẳng định sự có mặt của chất phân tích: tiến hành phân tích trên mẫu chuẩn và mẫu thêm chuẩn, so sánh tỷ lệ ion thu

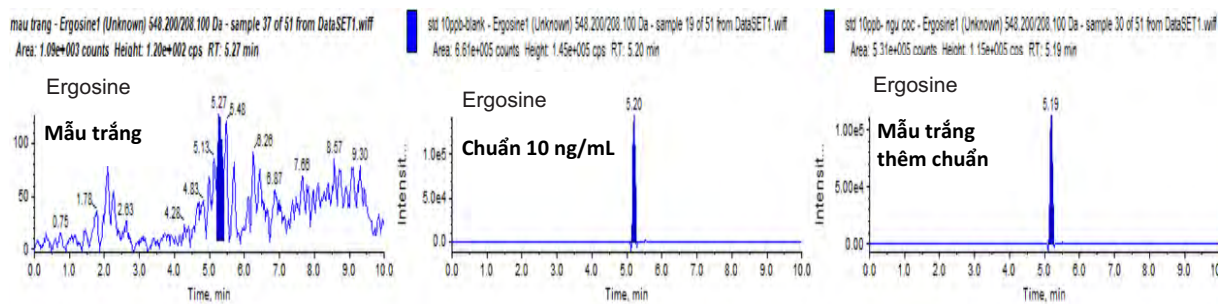
được. Các kết quả được trình bày ở Bảng 2. Theo tiêu chuẩn của EC/625/2002.

Bảng 2. Tỷ lệ ion của các EAs

EAs	Ergosine	Ergocryptine	Ergocorsine	Ergocristine
Mẫu chuẩn	25,4	98,5	88,2	34,1
Mẫu trắng thêm chuẩn	24,8	96,1	83,5	31,8
% sai lệch cho phép	± 20 %	± 10 %	± 10 %	± 20 %
Khoảng cho phép	20,3 - 30,5%	88,7 - 108,4%	79,4 - 97,0%	27,3 - 40,9%

+ Phân tích mẫu trắng, mẫu chuẩn và mẫu trắng thêm chuẩn:

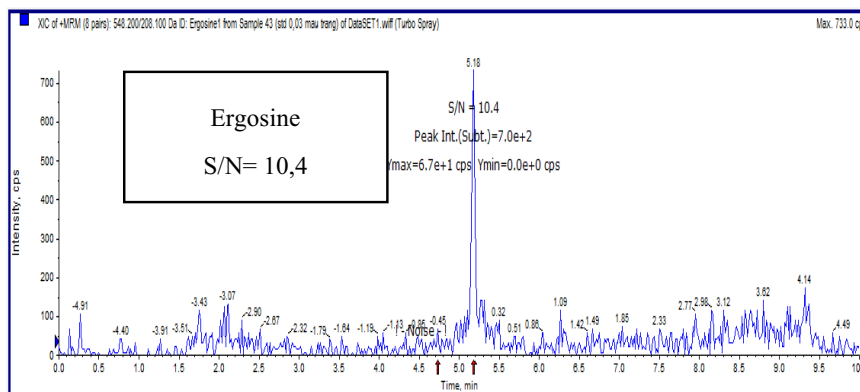
Quan sát sắc đồ Hình 6 của ergosine (đại diện cho 4 EAs phân tích) cho thấy mẫu trắng không có tín hiệu của chất phân tích, mẫu trắng thêm chuẩn có pic ở thời gian trùng khớp với thời gian lưu của chuẩn tương ứng (chênh lệch thời gian lưu không quá 2%). Như vậy, phương pháp đáp ứng yêu cầu về thông số thẩm định tính đặc hiệu để phân tích các EAs.



Hình 6. Minh họa sắc đồ mẫu trắng thêm chuẩn, mẫu chuẩn và mẫu trắng của Ergosine

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. Tiến hành xác định tỷ lệ S/N tự động theo phần mềm của thiết bị. 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 = 1,0 µg/kg cho cả 4 EAs phân tích, được thể hiện ở Hình 7 với Ergosine đại diện.



Hình 7. Sắc đồ mẫu thêm chuẩn ergosine tại 1,0 µg/kg

3.3.4. Đường chuẩn

Tiến hành thêm chuẩn vào dịch chiết mẫu trắng ở các mức nồng độ 5; 10; 20; 50, 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 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 EAs có sự tương quan tuyến tính với nồng độ, với hệ số tương quan tuyến tính $r > 0,99$. Đường chuẩn có thể được lập trên nền dung môi hoặc nền mẫu.

3.3.5. Độ lặp lại và độ thu hồi

Độ lặp lại và độ thu hồi của phương pháp được đánh giá bằng cách thêm chuẩn vào mẫu ngũ cốc đã được xác định không chứa EAs, tiến hành phân tích theo quy trình đã xây dựng. Các mẫu được thêm chuẩn ở các mức nồng độ 5; 10; 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Các kết quả phân tích cho thấy, giá trị độ thu hồi trung bình của các EAs nằm trong khoảng 90,6 - 102,8%, độ lệch chuẩn tương đối từ 3,7 - 12,5%. Các kết quả này cho thấy phương pháp có độ chính xác đáp ứng yêu cầu của AOAC (độ thu hồi 60 - 115% và độ lệch chuẩn tương đối $\leq 21\%$ tại nồng độ 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

3.3.6. Ứng dụng phân tích EAs trong mẫu thực phẩm

Trên cơ sở phương pháp đã xây dựng, chúng tôi tiến hành xác định hàm lượng EAs trong một số mẫu thực phẩm trên thị trường bao gồm ngô, lúa mì và bột ngũ cốc dinh dưỡng. Qua khảo sát 90 mẫu (30 mẫu mỗi loại sản phẩm) cho thấy chưa có mẫu dương tính với 4 chất EAs. Các mẫu thêm chuẩn được phân tích song song có độ thu hồi từ 89,3 - 99,7%, đáp ứng yêu cầu theo AOAC. Phương pháp có LOD tương tự với một số nghiên cứu khác [2, 3], tuy nhiên việc chưa xác định các độc tố EAs trong các mẫu thực phẩm ở Việt Nam có thể do điều kiện thời tiết ở Việt Nam có sự khác biệt so với các nước châu Âu và loại thực phẩm các độc tố EAs thường xuất hiện là lúa mì, lúa mạch vốn là các sản phẩm thực phẩm ít được sử dụng tại Việt Nam.

4. KẾT LUẬN

Sử dụng LC-MS/MS pha động ACN và $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 200 mg/L có pH = 8 kết hợp với xử lý mẫu bằng dung môi hữu cơ trong đệm, làm sạch bằng PSA, nhóm nghiên cứu đã xây dựng được quy trình phân tích EAs trong thực phẩm với LOQ là 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$; giá trị độ thu hồi trung bình của các EAs nằm trong khoảng 90,6 - 102,8%, độ lệch chuẩn tương đối từ 3,7 - 12,5%. Áp dụng quy trình để phân tích 90 mẫu thực phẩm cho thấy chưa phát hiện mẫu dương tính với chất phân tích, nhóm nghiên cứu tiếp tục mở rộng trên các đối tượng khác để phát hiện mối nguy.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] W. M. Haschek, C. G. Rousseaux, M. A. Wallig, "Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology", *Academic Press*, 3rd Edition, 2013.
- [2] EFSA, "Scientific Opinion on Ergot alkaloids in food and feed", *EFSA Journal*, pp. 158, 2012.
- [3] R. Krska, G. Stubbings, R. Macarthur and C. Crews, "Simultaneous determination of six major ergot alkaloids and their epimers in cereals and foodstuffs by LC-MS-MS", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 391, no. 2, pp. 563-576, 2008.
- [4] R. Mohamed, E. Gremaud, J. Richoz-Payot, J.-C. Tabet and P. A. Guy, "Quantitative determination of five ergot alkaloids in rye flour by liquid chromatography-electrospray ionisation tandem mass spectrometry", *Journal of Chromatography A*, vol. 1114, no. 1, pp. 62-72, 2006.
- [5] Q. Guo, B. Shao, Z. Du, and J. Zhang, "Simultaneous Determination of 25 Ergot Alkaloids in Cereal Samples by Ultraperformance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 64, no. 37, pp. 7033-7039, 2016.

- [6] G. M. Ware, G. Price, L. Carter, and R. R. Eitenmiller, "Liquid chromatographic preparative method for isolating ergot alkaloids, using a particle-loaded membrane extracting disk", *Journal of AOAC International*, vol. 83, no. 6, pp. 1395-1399, 2000.

Summary

SIMULTANEOUS DETERMINATION OF FOUR ERGOT ALKALOIDS IN FOOD USING LIQUID CHROMATOGRAPHY TANDEM MASS SPECTROMETRY (LC-MS/MS)

**Tran Cao Son¹, Tran Hoang Giang^{1,4}, Nguyen Thi Men², Nguyen Thi Ha Binh¹
Le Dinh Chi², Nguyen Thi Phuong Lan³, Nguyen Thi Anh Huong⁴**

¹*National Institute for Food Control*

²*Ha Noi University of Pharmacy*

³*Vietnam Food Administration*

⁴*VNU University of Science, Vietnam National University, Hanoi*

A simple and accurate LC-MS/MS method has been developed for the simultaneous determination of four ergot alkaloids (EAs) including ergosine, ergocryptine, ergocristine and ergocorsine in food. The studied EAs were extracted and cleaned up using QuEChERS technique then separated using C18 column and quantified by MS/MS detector. The positive ESI source was used in this study together with multi-reactive ion monitoring mode. The method, which has been validated according to AOAC International requirements, showed good specificity, with the linearity varying from 5.0 - 100 µg/kg, the LODs and LOQs were 0.3 µg/kg and 1.0 µg/kg; the repeatability and recovery were from 3.7 - 12.5% and 90.6 - 102.8% respectively. The method has been applied to determine the EAs concentration in 90 corn, wheat and cereal samples, of which no samples were detected with the studied EAs.

Keywords: LC-MS/MS, ergot alkaloids, ergosine, ergocryptine, ergocristine, ergocorsine, corn, wheat, cereal.