

# Xây dựng phương pháp phát hiện và định lượng một số độc tố vi nấm nhóm *Alternaria* trong thực phẩm bằng sắc ký lỏng khối phổ phân giải cao

Vũ Ngọc Tú<sup>1\*</sup>, Hoàng Lan Hương<sup>2</sup>, Bùi Cao Tiến<sup>1</sup>,

Trần Cao Sơn<sup>1</sup>, Thái Nguyễn Hùng Thu<sup>2†</sup>

<sup>1</sup>Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm Quốc gia, Hà Nội, Việt Nam

<sup>2</sup>Trường Đại học Dược Hà Nội, Việt Nam

(Ngày đến tòa soạn: 08/03/2022; Ngày chấp nhận đăng: 28/03/2022)

## Tóm tắt

Sắc ký lỏng khối phổ phân giải cao (LC-HRMS) đã được ứng dụng để xây dựng phương pháp phát hiện và định lượng đồng thời 03 độc tố vi nấm *Alternaria* (*Alternariol* (AOH), *Alternariol Monomethyl Ete* (AME), *acid Tenuazonic* (TeA)). Điều kiện sắc ký gồm: cột pha đảo C18, pha động ở chế độ gradient với hai kênh H<sub>2</sub>O và MeOH cùng chứa 0,1 % acid formic và 10 mM amoni format. Khối phổ phân giải cao HRMS với nguồn ion hóa điện tử âm (ESI-) đã được sử dụng. Mẫu được làm sạch và làm giàu bằng cột chiết pha rắn Oasis HLB. Phương pháp có giới hạn định lượng (LOQ) của AOH và AME là 1,0 µg/kg và TeA là 3,0 µg/kg với độ thu hồi từ 80,0 - 114,8 %, độ lặp lại từ 0,07 - 9,9 %, đạt yêu cầu theo quy định của AOAC và châu Âu. Phương pháp đã được ứng dụng để phát hiện và định lượng các độc tố vi nấm nhóm *Alternaria* có trong 80 mẫu thực phẩm được lấy trên địa bàn thành phố Hà Nội. Phát hiện AOH trong 04/20 mẫu rau (3,3 - 178 µg/kg), 03/20 mẫu trái cây (5,6 - 7,3 µg/kg), 06/20 mẫu ngũ cốc (13,4 - 17,4 µg/kg), 03/20 mẫu hạt chứa dầu (13,2 - 25,2 µg/kg); phát hiện AME trong 01/20 mẫu rau (7,5 µg/kg), 02/20 mẫu trái cây (< 3 µg/kg), 01/20 mẫu ngũ cốc (9,5 µg/kg), 02/20 mẫu hạt chứa dầu (< 3 µg/kg); phát hiện TeA trong 02/20 mẫu rau (9,0 µg/kg), 01/20 mẫu ngũ cốc (< 3 µg/kg), 02/20 mẫu hạt chứa dầu (< 3 µg/kg), không phát hiện ở mẫu trái cây.

**Từ khóa:** LC-HRMS, SPE, *Alternaria*, AOH, AME, TeA, thực phẩm.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong khẩu phần dinh dưỡng, các loại rau củ, trái cây, ngũ cốc, hạt có dầu và các sản phẩm chế biến của chúng là những thành phần quan trọng. Tuy nhiên, trong giai đoạn phát triển của nhiều loại cây trồng hoặc quá trình thu hoạch, các loại thực phẩm này dễ bị lây nhiễm các loài nấm, đặc biệt là nấm *Alternaria*. Hơn nữa, do có khả năng phát triển ngay cả ở điều kiện nhiệt độ thấp nên *Alternaria* có thể gây hỏng những sản phẩm này trong quá

\*Điện thoại: 0984459988

Email: [zungoctu1986@gmail.com](mailto:zungoctu1986@gmail.com)

†Điện thoại: 0911155091

Email: [thaihungthu@hup.edu.vn](mailto:thaihungthu@hup.edu.vn)

trình vận chuyển và bảo quản lạnh [2]. Sau khi xâm nhập vào thực phẩm, nấm *Alternaria* tạo ra sản phẩm chuyển hóa thứ cấp là các độc tố vi nấm nhóm *Alternaria* [3].

Trong các thử nghiệm *in vitro* và trên động vật, một số hợp chất trong nhóm như AOH, AME, TeA đã được báo cáo gây ra các tác động có hại trên gen và thai nhi. Theo Hội đồng các chất gây ô nhiễm trong chuỗi thực phẩm của Cơ quan an toàn thực phẩm châu Âu (EFSA), ngưỡng độc tố cần quan tâm (TTC) là cần thiết để đánh giá tương đối mức độ lo ngại do phơi nhiễm độc tố vi nấm nhóm *Alternaria* hàng ngày với giá trị TTC của AOH và AME là 2,5 ng/kg cân nặng/ngày; TeA là 1.500 ng/kg cân nặng/ngày [2]. Ngoài ra, một báo cáo tại Trung Quốc cho rằng độc tố nhóm *Alternaria* trong ngũ cốc có thể là nguyên nhân gây ra bệnh ung thư thực quản [5]. Do lo ngại có thể gây ra các ảnh hưởng có hại trên con người khi sử dụng sản phẩm có chứa độc tố vi nấm nhóm *Alternaria* hàng ngày trong thời gian dài nên việc tiến hành các nghiên cứu phân tích nhóm độc tố này trong thực phẩm đang được xem là mối quan tâm đối với sức khỏe cộng đồng.

Nhiều phương pháp đã được xây dựng để xác định các độc tố vi nấm nhóm *Alternaria*. Một số kỹ thuật phân tích nhóm *Alternaria* được sử dụng phổ biến bao gồm: xét nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzym (ELISA), sắc ký lớp mỏng (TLC), sắc ký khí (GC), sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), sắc ký lỏng khối phổ (LC-MS). Các kỹ thuật phân tích này được sử dụng kết hợp với nhiều quy trình xử lý mẫu khác nhau như: chiết pha rắn SPE [8, 11], QuEChERS [6, 9], chiết lỏng - lỏng [7, 10]. Trong nghiên cứu này, kỹ thuật xử lý mẫu SPE kết hợp LC-HRMS đã được lựa chọn để phát hiện và định lượng đồng thời các độc tố vi nấm *Alternaria* do có độ nhạy, độ lặp và chính xác cao.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

Ba độc tố vi nấm nhóm *Alternaria* (AOH, AME, TeA) được lựa chọn làm đối tượng nghiên cứu. Hai đối tượng mẫu được lựa chọn để xác định giá trị sử dụng của phương pháp gồm cà chua và bột ngô. Đối tượng mẫu được lựa chọn để phân tích ứng dụng phương pháp là thực phẩm có nguy cơ chứa độc tố vi nấm nhóm *Alternaria* (đập, nát, thối, mốc, các sản phẩm trong chai không nhãn mác, sản xuất thủ công,...) gồm: rau củ và các sản phẩm từ rau củ; trái cây và các sản phẩm từ trái cây; ngũ cốc và các sản phẩm từ ngũ cốc; hạt chứa dầu và các sản phẩm từ hạt chứa dầu được lấy tại các chợ, siêu thị, cửa hàng tạp hóa trên địa bàn Hà Nội.

### 2.2. Hóa chất

Các chất chuẩn (AOH, AME, TeA) được sử dụng có độ tinh khiết > 93 %, cung cấp bởi hãng Toronto Research Chemicals, Canada. Các dung môi tinh khiết dùng cho phân tích sắc ký gồm methanol, acetonitril, acid formic, acid acetic và các hóa chất MgSO<sub>4</sub> khan, NaCl, CH<sub>3</sub>COONa, HCOONH<sub>4</sub> được cung cấp bởi hãng Merck; nước cất hai lần được lấy từ máy lọc nước siêu tinh khiết Milli-Q; bột PSA và C18 được cung cấp bởi Agilent.

### 2.3. Thiết bị, dụng cụ

Hệ thống sắc ký lỏng khối phổ phân giải cao gồm sắc ký lỏng siêu hiệu năng Ultimate 3000 kết nối với khối phổ Q-exactive Plus của Thermo Scientific. Các thiết bị khác bao gồm: máy đồng nhất mẫu (Phillips); cân phân tích chính xác đến 0,01 mg (MS105, Mettler Toledo); cân kỹ thuật, chính xác đến 0,01 g (ME2002T, Mettler Toledo); máy ly tâm (Mikro 200R, Hettich); máy lắc xoáy (Vortex 3, IKA); máy rung siêu âm (S300H, Elma); cột chiết pha rắn Oasis HLB 500mg, 3 mL (Waters).

Cột sắc ký pha đảo BEH C18 (2,1 × 100 mm; 1,7 μm) và tiền cột tương ứng, Waters. Các dụng cụ cơ bản trong phòng thí nghiệm: micropipet (Eppendorf), bình định mức các loại, ống ly tâm, ống đong.

### 2.4. Khảo sát và thẩm định phương pháp

#### 2.4.1. Điều kiện LC-HRMS

Khảo sát và lựa chọn điều kiện khối phổ: mảnh phổ lý thuyết được tra cứu dựa vào công thức phân tử của các hợp chất. Sau đó, các điều kiện MS được tối ưu để xác định ion mẹ; lựa chọn các ion con phù hợp. Tiến hành tiêm trực tiếp dung dịch các chất chuẩn AOH, AME và TeA có nồng độ 1 μg/mL vào hệ thống khối phổ. Xác định mảnh phổ thực nghiệm bằng chế độ quét toàn bộ mảnh khối (Fullscan) đối với mảnh mẹ và tất cả các phân mảnh ion (All ion fragmentation - AIF) để tìm kiếm mảnh con của chất phân tích.

Điều kiện sắc ký lỏng: cột sắc ký pha đảo UPLC BEH C18 (2,1 × 100 mm; 1,7 μm), pha động hai kênh H<sub>2</sub>O và MeOH cùng chứa 0,1 % acid formic và 10 mM amoni format.

#### 2.4.2. Phương pháp xử lý mẫu

Kỹ thuật xử lý mẫu bằng cột chiết pha rắn SPE được lựa chọn để khảo sát. Các bước thực hiện của quy trình làm sạch bằng SPE như sau: cân chính xác khoảng 2 - 20 g mẫu đã đồng nhất bằng cân phân tích vào ống ly tâm 50 mL. Thêm 20 mL dung môi chiết MeOH : H<sub>2</sub>O : CH<sub>3</sub>COOH (80 : 19 : 1, v/v/v), lắc xoáy trong 10 giây, lắc ngang trong 45 phút. Ly tâm ở tốc độ 6000 vòng/phút trong 10 phút. Chuyển toàn bộ dịch chiết sang ống ly tâm dung tích 50 mL mới. Thêm 5 mL hexan, lắc xoáy trong 1 phút. Ly tâm ở tốc độ 6.000 vòng/phút trong 3 phút, bỏ lớp hexan bên trên. Lọc dịch qua giấy lọc vào ống ly tâm 50 mL khác. Hút 10 mL dịch mẫu sau lọc vào ống ly tâm 50 mL. Thêm 10 mL dung dịch dung dịch acid acetic 1 % trong nước, lắc vortex 1 phút, làm sạch qua cột HLB. Hoạt hoá cột bằng 7 mL MeOH; 7 mL nước cất; 3 mL dung dịch acid acetic 1 %. Nạp mẫu qua cột với tốc độ chảy 1 giọt/giây; tráng ống ly tâm bằng 3 mL dung dịch acid acetic 1 %. Rửa tạp bằng 7 mL dung dịch acid acetic 1 %, hút khô 30 giây; tiếp tục rửa bằng 7 mL n-hexan, hút khô 1 phút. Ống hứng được thêm sẵn 100 μL DMSO. Rửa giải bằng 6 mL dung dịch MeOH; hút khô 10 giây. Dịch rửa giải được thổi khô bằng khí nitơ cho đến khi còn 100 μL. Thêm 100 μL nước, lắc xoáy 30 giây, lọc qua màng lọc PTFE 0,2 μm vào lọ đựng mẫu có ống thủy tinh đựng mẫu. Dịch lọc được phân tích bằng LC-HRMS.

Các thông số của quy trình được khảo sát, tối ưu gồm: dung môi chiết, dung môi rửa giải, thể tích rửa giải, dung môi hòa cặn.

#### 2.4.3. Thẩm định phương pháp phân tích

Thẩm định phương pháp phân tích được thực hiện theo quy định bởi AOAC [1] và Hội đồng châu Âu (SANTE/2019/12682) [4]. Các thông số thẩm định gồm độ đặc hiệu, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng, đường chuẩn và khoảng tuyến tính, độ thu hồi và độ lặp lại.

### 2.5. Ứng dụng phương pháp

Phương pháp đã được ứng dụng để phát hiện và định lượng đồng thời một số độc tố vi nấm nhóm *Alternaria* (AOH, AME, TeA) trong mẫu thực phẩm được lấy ngẫu nhiên tại các chợ, siêu thị và cửa hàng ở Hà Nội.

## 3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

### 3.1. Điều kiện LC-HRMS

#### 3.1.1. Điều kiện khối phổ

Các dung dịch chuẩn AOH, AME và TeA có nồng độ 1 µg/mL được tiêm vào thiết bị khối phổ với thể tích 5 µL để xác định mảnh mẹ và mảnh con thực nghiệm. Điều kiện phân tích của các chất được trình bày ở Bảng 1.

*Bảng 1. Điều kiện phân tích của các độc tố vi nấm nhóm Alternaria*

<i>Chất phân tích</i>	<i>Mảnh mẹ (m/z)</i>	<i>Mảnh con (m/z)</i>	<i>Dạng ion phân tích</i>
<i>AOH</i>	257,0456	207,13872; 152,03448; 121,02842; 215,00960; 196,09744; 194,08180; 242,17628; 228,03020	[M-H] <sup>-</sup>
<i>AME</i>	271,0612	257,04577; 228,06630; 224,09270; 221,15454; 215,00957; 216,01294; 218,00421; 273,06741; 250,14481	[M-H] <sup>-</sup>
<i>TeA</i>	196,0979	138,01866; 112,98449; 126,09947; 121,02839; 108,02050; 102,98753; 96,95891 93,03336; 187,09703; 201,11232	[M-H] <sup>-</sup>

#### 3.1.2. Điều kiện sắc ký lỏng

Mẫu được phân tích với tốc độ dòng là 0,3 mL/phút và nhiệt độ buồng cột là nhiệt độ thường. Chương trình gradient pha động được khảo sát và lựa chọn dựa vào thời gian lưu và hình dạng, độ cân xứng của pic sắc ký. So sánh kết quả khảo sát thành phần pha động cho thấy khi sử dụng dung môi là MeOH sắc ký đồ của các chất phân tích có tín hiệu cao,

sắc nhọn và cân đối nhất. Khi sử dụng dung môi là ACN hoặc ACN : MeOH (50 : 50, v/v), tín hiệu của AOH và AME thấp, kém cân đối và đường nền dâng rất cao. Ngoài ra, TeA không lên tín hiệu. Do đó, hệ pha động tối ưu được lựa chọn là: kênh (A) amoni format 10 mM và acid formic 0,1 % trong nước, kênh (B) amoni format 10 mM và acid formic 0,1 % trong methanol. Chương trình gradient pha động được đưa ra tại Bảng 2.

**Bảng 2.** Chương trình gradient pha động

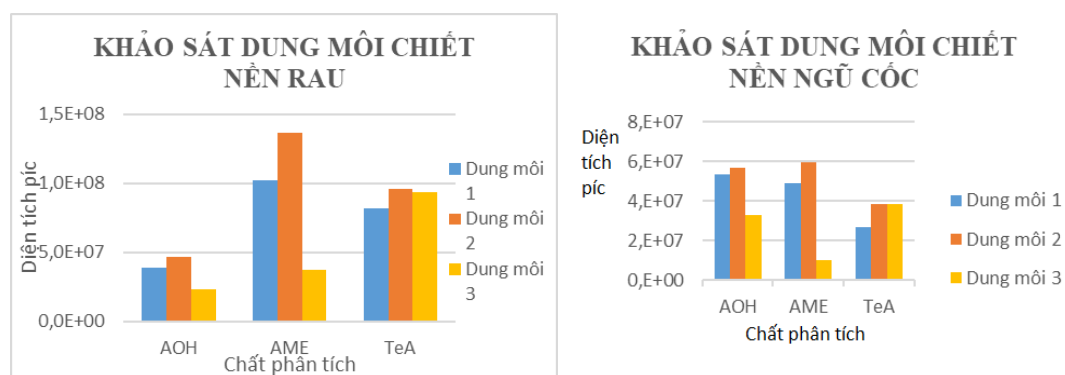
Thời gian (phút)	Kênh A	Kênh B
	(Amoni format 10 mM, acid formic 0,1 % trong nước)	(Amoni format 10 mM, acid formic 0,1 % trong methanol)
0 ÷ 1,0	100 %	0 %
1,0 ÷ 4,5	0 %	100 %
4,5 ÷ 7,0	100 %	0 %

### 3.2. Tối ưu quy trình xử lý mẫu

Các khảo sát được thực hiện với mẫu trắng (mẫu cà chua, bột ngô không chứa các chất phân tích) thêm chuẩn ở mức hàm lượng 100 µg/kg.

#### 3.2.1. Khảo sát dung môi chiết

Khảo sát 03 dung môi chiết: dung môi 1 (MeOH : nước : acid acetic (80 : 19 : 1, v/v/v)), dung môi 2 (MeOH:nước:acid acetic (50 : 49 : 1, v/v/v)), dung môi 3 (MeOH : nước : acid acetic (19 : 80 : 1, v/v/v)). Kết quả được trình bày ở Hình 1.

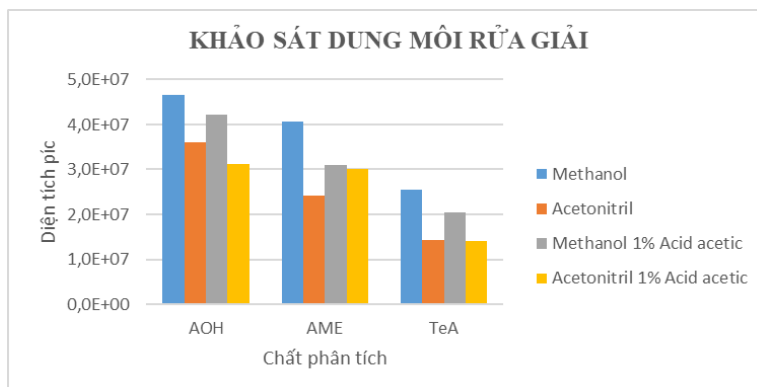


**Hình 1.** Biểu đồ khảo sát dung môi chiết trên nền mẫu rau, ngũ cốc

Kết quả đưa ra tại Hình 1 cho thấy tín hiệu của AOH, AME cao nhất khi sử dụng dung môi chiết MeOH : nước : acid acetic (50 : 49 : 1, v/v/v). Tín hiệu của TeA không có sự khác biệt nhiều so với dung môi MeOH : nước : acid acetic (19: 80 : 1, v/v/v). Điều này cho thấy tỷ lệ MeOH nhiều hơn sẽ không thể chiết hoàn toàn TeA ra khỏi nền mẫu do chất này có độ phân cực cao hơn AOH và AME. Do đó, MeOH : nước : acid acetic (50 : 49 : 1, v/v/v) được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

### 3.2.2. Khảo sát dung môi rửa giải

Khảo sát 04 dung môi rửa giải: methanol, acetonitril, methanol chứa 1 % acid acetic, acetonitril chứa 1 % acid acetic với cùng thể tích 6 mL. Kết quả được trình bày ở Hình 2.

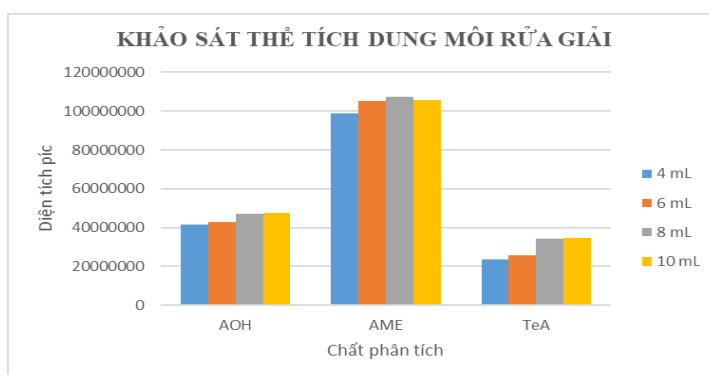


**Hình 2.** Kết quả khảo sát dung môi rửa giải

Kết quả đưa ra ở Hình 2 cho thấy tín hiệu của cả 3 chất phân tích cao nhất khi sử dụng dung môi rửa giải là MeOH. Khi thêm acid, tín hiệu của các chất giảm, chứng tỏ quá trình rửa giải các chất phụ thuộc vào pH. Khi rửa giải bằng dung môi ACN, tín hiệu các chất phân tích thấp hơn khi dùng MeOH do ACN có độ phân cực thấp hơn MeOH, trong khi các chất phân tích (AOH, AME và TeA) là các chất khá phân cực nên khả năng rửa giải các chất này ra khỏi cột bằng MeOH là cao hơn. Do đó, MeOH được lựa chọn là dung môi rửa giải tối ưu.

### 3.2.3. Khảo sát thể tích dung môi rửa giải

Khảo sát 4 mức thể tích dung môi rửa giải: 4, 6, 8, 10 mL. Kết quả khảo sát được trình bày ở Hình 3.

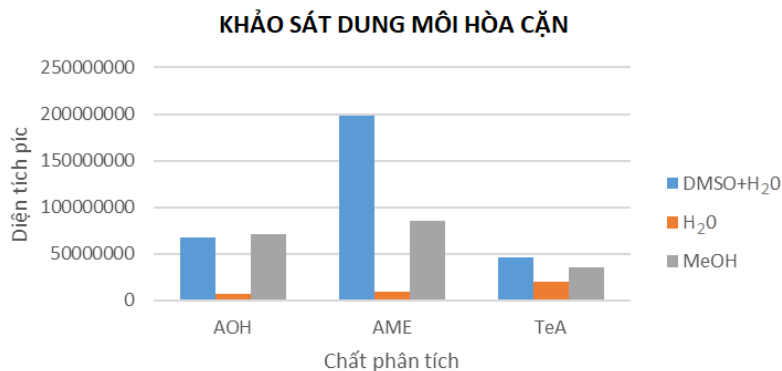


**Hình 3.** Kết quả khảo sát thể tích dung môi rửa giải

Kết quả đưa ra ở Hình 3 cho thấy tín hiệu của cả 3 chất phân tích không thay đổi nhiều khi thay đổi thể tích dung môi rửa giải. Tín hiệu các chất tăng khi tăng dần thể tích từ 4 mL lên 8 mL. Tuy nhiên, khi tăng thể tích lên 10 mL thì tín hiệu các chất phân tích không tăng. Điều này cho thấy 8 mL là thể tích dung môi rửa giải tối ưu.

### 3.2.4. Khảo sát dung môi hòa cặn

Với mục đích làm giàu mẫu, dung dịch mẫu được thổi khô, sau đó được hòa cặn với thể tích dung môi nhỏ hơn. Việc lựa chọn dung môi hòa cặn rất quan trọng vì nó ảnh hưởng tới khả năng hòa tan của chất phân tích vào dung môi đó. Khảo sát các dung môi hòa cặn: MeOH, H<sub>2</sub>O, DMSO : H<sub>2</sub>O (50 : 50, v/v). Kết quả được trình bày ở Hình 4.



**Hình 4.** Kết quả khảo sát dung môi hòa cặn

Kết quả đưa ra tại Hình 4 cho thấy tín hiệu của cả 3 chất có sự chênh lệch đáng kể khi sử dụng các dung môi rửa giải khác nhau. Tín hiệu các chất thấp nhất khi hòa cặn bằng nước và cao nhất khi hòa cặn bằng dung môi hỗn hợp DMSO : H<sub>2</sub>O (50 : 50, v/v). Điều này có thể được giải thích do DMSO là chất trợ tan nên việc thêm DMSO làm tăng khả năng tan của các độc tố vi nấm *Alternaria* vào dung môi hòa cặn. Vì vậy, dung môi hỗn hợp DMSO : H<sub>2</sub>O (50 : 50, v/v) được lựa chọn làm dung môi hòa cặn.

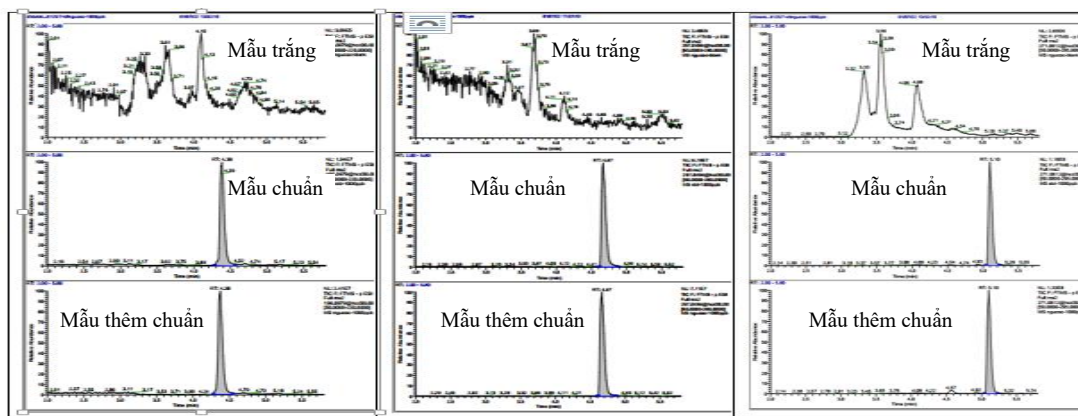
### 3.2.5. Quy trình xử lý mẫu tối ưu

Sau quá trình khảo sát, quy trình xử lý mẫu tối ưu được đưa ra như sau: cân khoảng 2 - 20 g mẫu đã được đồng nhất hóa vào ống ly tâm 50 mL có nút kín. Thêm 20 mL dung môi chiết MeOH : H<sub>2</sub>O : CH<sub>3</sub>COOH (50 : 49 : 1, v/v/v), lắc xoáy trong 1 phút, lắc ngang trong 45 phút, ly tâm ở tốc độ 6000 vòng/phút trong 10 phút. Chuyển toàn bộ dịch chiết sang ống ly tâm dung tích 50 mL mới. Thêm 5 mL hexan, lắc xoáy trong 1 phút, ly tâm ở tốc độ 6.000 vòng/phút trong 3 phút, bỏ lớp hexan bên trên. Lọc dịch qua giấy lọc vào ống ly tâm 50 mL khác. Hút 10 mL dịch mẫu sau lọc vào ống ly tâm 50 mL. Thêm 10 mL dung dịch dung dịch acid acetic 1 % trong nước, lắc vortex 1 phút, làm sạch qua cột HLB. Hoạt hoá cột bằng 7 mL MeOH; 7 mL nước cất; 3 mL dung dịch acid acetic 1 %. Rửa tạp bằng 7 mL dung dịch acid acetic 1 %. Ống hứng được thêm sẵn 100 µL DMSO. Rửa giải bằng 8 mL dung dịch MeOH. Dịch rửa giải được thổi khô bằng khí nitơ cho đến khi còn 100 µL. Thêm 100 µL nước cất để hòa cặn, ly tâm ở tốc độ 13.000 vòng/phút trong 3 phút. Hút dịch trong vào lọ đựng mẫu có ống thủy tinh đựng mẫu. Dịch lọc được phân tích trên thiết bị LC-HRMS.

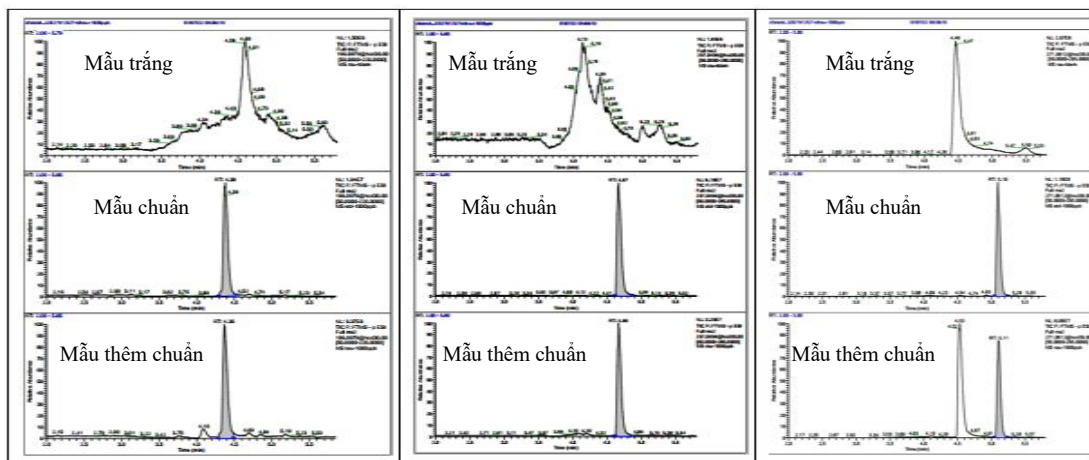
### 3.3. Thẩm định phương pháp

#### 3.3.1. Độ đặc hiệu

Sắc ký đồ của mẫu trắng, mẫu thêm chuẩn và mẫu chuẩn pha trong dung môi ở nồng độ 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  của 03 độc tố vi nấm nhóm Alternaria (AOH, AME, TeA) được trình bày trong Hình 5 và Hình 6.



**Hình 5.** Sắc ký đồ của mẫu trắng, mẫu chuẩn và mẫu thêm chuẩn tại nồng độ 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  của TeA, AOH, AME (theo thứ tự từ trái sang phải) trên nền mẫu cà chua



**Hình 6.** Sắc ký đồ của mẫu trắng, mẫu chuẩn và mẫu thêm chuẩn tại nồng độ 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  của TeA, AOH, AME (theo thứ tự từ trái sang phải) trên nền mẫu bột ngô

Theo kết quả từ sắc ký đồ, mẫu trắng không xuất hiện pic tại thời gian lưu tương ứng, thời gian lưu của mẫu chuẩn và mẫu thêm chuẩn không lệch quá 2,5 % đáp ứng yêu cầu theo tiêu chuẩn của Hội đồng châu Âu [4]. Ngoài ra, trong phương pháp phân tích HRMS, độ đặc hiệu được khẳng định thông qua độ chính xác khối. Độ chính xác khối là mức độ chênh lệch của mảnh khối thực tế xác định được so với mảnh khối lý thuyết. Kết quả thu được cho thấy độ lệch khối của các chất phân tích trong mẫu thử không lệch quá  $5 \times 10^{-6}$ , đáp ứng yêu cầu theo AOAC [1].



3.3.2. Giới hạn định lượng, giới hạn phát hiện

Tiến hành phân tích mẫu trắng thêm chuẩn với nồng độ thấp còn có thể xuất hiện tín hiệu chất phân tích, xử lý mẫu theo quy trình phân tích, phân tích lặp lại 6 lần. Xác định tỷ lệ tín hiệu trên nhiễu (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 = 3,3 x LOD. Kết quả xác định LOD và LOQ được trình bày ở Bảng 3.

**Bảng 3.** Giá trị LOD, LOQ của AOH, AME, TeA

Chất phân tích	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)
<i>AOH</i>	0,3	1,0
<i>AME</i>	0,3	1,0
<i>TeA</i>	1,0	3,0

Với giới hạn định lượng của AOH và AME là 1,0 µg/kg và TeA là 3,0 µg/kg, phương pháp có đủ hiệu năng để có thể phân tích các mẫu thực phẩm trên thị trường, đáp ứng được yêu cầu theo quy định của AOAC [1].

3.3.3. Đường chuẩn

Thực hiện tiêm các mẫu chuẩn pha trên nền mẫu trắng ở các mức nồng độ trong khoảng từ 300 - 3.000 ng/mL vào hệ thống LC-HRMS. Các phương trình đường chuẩn đều có hệ số tương quan R lớn hơn 0,995 và độ lệch tại các điểm không quá 15 %. Kết quả được trình bày ở Bảng 4.

**Bảng 4.** Phương trình đường chuẩn

Nền mẫu	Chất phân tích	Phương trình đường chuẩn	Hệ số tương quan R
<i>Rau</i>	<i>AOH</i>	$Y = 241493x + 8920230$	0,9985
	<i>AME</i>	$Y = 386059x + 52413200$	0,9977
	<i>TeA</i>	$Y = 96408x + 2000000$	0,9997
<i>Ngũ cốc</i>	<i>AOH</i>	$Y = 258122x + 23015200$	0,9979
	<i>AME</i>	$Y = 428870x + 52254500$	0,9976
	<i>TeA</i>	$Y = 99671,2x + 40461100$	0,9994

3.3.4. Độ đúng và độ lặp lại

Thực hiện phân tích các mẫu thêm chuẩn ở 03 mức nồng độ: 3; 15; 30 µg/kg. Mỗi mức nồng độ phân tích lặp lại 06 lần riêng biệt, tính từ bước cân mẫu. Kết quả phân tích độ đúng và độ lặp lại được thể hiện trong Bảng 5.

**Bảng 5.** Kết quả độ thu hồi và độ lặp lại

<i>Mức thêm chuẩn</i> ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	<i>Cà chua</i>		<i>Bột ngô</i>	
	<i>Độ thu hồi</i> <i>R (%)</i>	<i>Độ lặp lại</i> <i>RSD (%)</i>	<i>Độ thu hồi</i> <i>R (%)</i>	<i>Độ lặp lại</i> <i>RSD (%)</i>
3	87,5 ÷ 114,8	0,07 ÷ 4,1	81,0 ÷ 114,5	1,2 ÷ 5,9
15	85,0 ÷ 108,9	3,5 ÷ 5,9	87,1 ÷ 103,2	6,1 ÷ 6,5
30	80,8 ÷ 102,0	1,9 ÷ 6,9	80,0 ÷ 105,1	2,3 ÷ 9,9

Kết quả đưa ra tại Bảng 5 cho thấy độ thu hồi của các chất nằm trong khoảng 80,0 - 114,8 % và độ lệch chuẩn tương đối không vượt quá 15 %. Điều này chứng minh phương pháp phân tích đáp ứng được yêu cầu theo tiêu chuẩn của AOAC [1].

### 3.4. Ứng dụng phương pháp phân tích độc tố vi nấm nhóm *Alternaria* trong mẫu thực tế

Phương pháp được ứng dụng để phân tích 80 mẫu thực được mua ngẫu nhiên từ các chợ (Đồng Xa, Phùng Khoang, Yên Phúc, Văn Quán) trên địa bàn thành phố Hà Nội. Kết quả phân tích sàng lọc được đưa ra tại Bảng 6.

**Bảng 6.** Kết quả phân tích sàng lọc độc tố vi nấm nhóm *Alternaria* thực tế

<i>Loại mẫu</i>	<i>Tổng số mẫu</i>	<i>Số mẫu phát hiện</i>		
		<i>AOH</i>	<i>AME</i>	<i>TeA</i>
Rau, củ và các sản phẩm từ rau, củ	20	4	1	2
Trái cây và các sản phẩm từ trái cây	20	3	2	-
Ngũ cốc và các sản phẩm từ ngũ cốc	20	6	1	1
Hạt chứa dầu và các sản phẩm từ hạt chứa dầu	20	3	2	2
<b>Tổng</b>	<b>80</b>	<b>16</b>	<b>6</b>	<b>5</b>

*Chú thích: “-”:* Không phát hiện

Kết quả phân tích đưa ra tại Bảng 6 cho thấy AOH được phát hiện trong 16/80 mẫu, AME trong 06/80 mẫu, TeA trong 04/80 mẫu.

Kết quả phân tích định lượng 03 độc tố vi nấm nhóm *Alternaria* (AOH, AME, TeA) được đưa ra tại Bảng 7.

**Bảng 7.** Kết quả phân tích định lượng AOH, AME, TeA trong mẫu thực

Loại mẫu	Số mẫu phát hiện (khoảng hàm lượng $\mu\text{g}/\text{kg}$ )		
	AOH	AME	TeA
<b>Rau, củ và các sản phẩm</b>	04/20	01/20	2/20
<i>từ rau, củ</i>	(3,3 - 178)	(7,5)	(< 3,0; 9,0)
<b>Trái cây và các sản phẩm</b>	03/20	02/20	0/20
<i>từ trái cây</i>	(5,6 - 7,3)	(< 3,0)	
<b>Ngũ cốc và các sản phẩm</b>	06/20	01/20	01
<i>từ ngũ cốc</i>	(13,4 - 17,4)	(9,5)	(< 3,0)
<b>Hạt chứa dầu và các sản phẩm</b>	03/20	02/20	02/20
<i>phẩm từ hạt chứa dầu</i>	(13,2 - 25,2)	(< 3,0)	(< 3,0)

Chú thích:  $LOQ = 3,0 \mu\text{g}/\text{kg}$

Từ kết quả đưa ra tại Bảng 7 cho thấy định lượng được AOH trong 04/20 mẫu rau (3,3 - 178  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), 03/20 mẫu trái cây (5,6 - 7,3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), 06/20 mẫu ngũ cốc (13,4 - 17,4  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), 03/20 mẫu hạt chứa dầu (13,2 - 25,2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ); phát hiện AME trong 01/20 mẫu rau (7,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), 02/20 mẫu trái cây (< 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), 01/20 mẫu ngũ cốc (9,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), 02/20 mẫu hạt chứa dầu (< 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ); phát hiện TeA trong 02/20 mẫu rau (9,0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), không phát hiện ở mẫu trái cây, 01/20 mẫu ngũ cốc (< 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), 02/20 mẫu hạt chứa dầu (< 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, số lượng mẫu được phân tích còn khá hạn chế để đưa ra một kết luận mang tính đại diện. Điều này đòi hỏi những nghiên cứu tiếp theo trên số lượng mẫu lớn hơn và trên nhiều nền mẫu khác để có đánh giá đầy đủ hơn về việc có mặt của các độc tố vi nấm nhóm *Alternaria* trong thực phẩm.

#### 4. KẾT LUẬN

Phương pháp sàng lọc và định lượng đồng thời 03 độc tố vi nấm nhóm *Alternaria* (AOH, AME, TeA) trong thực phẩm đã được xây dựng dựa trên kỹ thuật chiết pha rắn bằng cột HLB kết hợp với kỹ thuật định lượng bằng LC-HRMS. Phương pháp đã được thẩm định đạt các tiêu chuẩn của Hội đồng Châu Âu (EC/657/2002) và AOAC, phù hợp và đủ tin cậy để phân tích các mẫu thực phẩm trên thị trường. Kết quả cho thấy có sự xuất hiện của độc tố vi nấm nhóm *Alternaria* trong một số mẫu thực phẩm.

#### LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm quốc gia với mã số đề tài NIFC.ĐTCS.21.03.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. AOAC Official Methods of Analysis, *Appendix F: Guidelines for standard method performance requirements*. 2012.
- [2]. Chain, EFSA Panel on Contaminants in the Food, "Scientific opinion on the risks for animal and public health related to the presence of *Alternaria* toxins in feed and food," *EFSA Journal.*, vol. 9, no. 10, pp. 2407, 2021.
- [3]. Chiara Dall'Asta, Martina Cirlini, and Claudia Falavigna, "Mycotoxins from *Alternaria*", *Advances in Molecular Toxicology*, vol. 8 pp. 107-121, 2014.
- [4]. European Commission, *Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed*, SANTE/12682/2019, 2019.
- [5]. Liu, GT, et al, "Relationships between *Alternaria alternata* and oesophageal cancer," *IARC scientific publications*, vol. 105, pp. 258-262, 1991.
- [6]. Rubert, J., et al, "Analysis of mycotoxins in barley using ultra high liquid chromatography high resolution mass spectrometry: comparison of efficiency and efficacy of different extraction procedures," *Talanta*. vol. 99, pp. 712-719, 2012.
- [7]. Siegel, David, et al-, "Quantification of the *Alternaria* mycotoxin tenuazonic acid in beer", *Food Chemistry*, vol.120, no. 3, pp. 902-906, 2010.
- [8]. Tölgyesi, Á., Stroka, J., Tamosiunas, V., & Zwickel, T, "Simultaneous analysis of *Alternariatoxins* and citrinin in tomato: an optimised method using liquid chromatography-tandem mass spectrometry," *Food Additives & Contaminants: Part A*, vol. 32, no. 9, pp.1512–1522, 2015.
- [9]. Walravens, J., et al, "Validated UPLC-MS/MS Methods To Quantitate Free and Conjugated *Alternaria* Toxins in Commercially Available Tomato Products and Fruit and Vegetable Juices in Belgium," *Journal Agriculture and Food Chemistry*, vol. 64, no. 24, pp. 5101-5109, 2016.
- [10]. Walravens, J., et al, "Development and validation of an ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometric method for the simultaneous determination of free and conjugated *Alternaria* toxins in cereal-based foodstuffs", *Journal of Chromatography A*, no. 1372C, pp. 91-101, 2014.
- [11]. Zwickel, T., et al., "Development of a high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry based analysis for the simultaneous quantification of various *Alternaria* toxins in wine, vegetable juices and fruit juices," *Journal of Chromatography A*, no. 1455, pp. 74-85, 2016.

## Development of method for determination and quantification of *Alternaria* mycotoxins in food by high resolution mass spectrometry

Vu Ngoc Tu<sup>1</sup>, Hoang Lan Huong<sup>2</sup>, Bui Cao Tien<sup>1</sup>,  
Tran Cao Son<sup>1</sup>, Thai Nguyen Hung Thu<sup>2</sup>

<sup>1</sup>National Institute for Food Control, Hanoi, Vietnam

<sup>2</sup>Hanoi University of Pharmacy, Hanoi, Vietnam

### Abstract

High-resolution liquid chromatography-mass spectrometry (LC-HRMS) is a highly sensitive, specific and accurate method for the simultaneous detection and quantification of three mycotoxins *Alternaria* (Alternariol (AOH), Alternariol Monomethyl Ete) (AME), Tenuazonic acid (TeA)). Chromatographic conditions include: column reversed phase C18, mobile phases in gradient mode with two channels of H<sub>2</sub>O and MeOH containing 0.1 % formic acid and 10 mM ammonium formate. HRMS high resolution mass spectrometer detector with negative electron ionization (ESI-) source is used. Samples were cleaned and enriched using an Oasis HLB solid phase extraction column. The method has a limit of quantitation (LOQ) for AOH and AME of 1.0 µg/kg and TeA of 1.0 µg/kg with recovery from 80.0 to 114.8 %, repeatability from 0.07 - 9.9 %, meeting the requirements of AOAC and European regulations. The method was applied to detect and quantify *Alternaria* mycotoxins in 80 food samples collected in Hanoi city. AOH was detected in 04/20 vegetable samples (3.3 - 178 µg/kg), 03/20 fruit samples (5.6 - 7.3 µg/kg), 06/20 cereal samples (13.4 - 17.4 µg/kg), 03/20 oil seed samples (13.2 - 25.2 µg/kg); detected AME in 01/20 vegetable samples (7.5 µg/kg), 02/20 fruit samples (< 3 µg/kg), 01/20 cereal samples (9.5 µg/kg), 02/20 oil seed samples (< 3 µg/kg); detected TeA in 02/20 vegetable samples (9.0 µg/kg), 01/20 cereal samples (< 3 µg/kg), 02/20 oil seed samples (< 3 µg/kg), not detected in fruit samples.

**Keywords:** LC-HRMS, SPE, *Alternaria* mycotoxins, AOH, AME, TeA, food.