

Bước đầu xây dựng và đánh giá phương pháp xác định đồng thời độc tố vi nấm trong ngũ cốc bằng kỹ thuật sắc ký lỏng ghép nối khối phổ

Nguyễn Hữu Vinh*, Nguyễn Hồng Thảo, Nguyễn Công Tuấn, Trần Vương Đức Nghĩa, Hồ Trần Ngọc Quyên, Nguyễn Hữu Tín, Nguyễn Thành Công, Ngô Quốc Việt
Trung tâm Kỹ thuật Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng 3, Hồ Chí Minh, Việt Nam

(Ngày đến tòa soạn: 16/08/2022; Ngày chấp nhận đăng: 12/09/2022)

Tóm tắt

Hiện nay, các phương pháp tiêu chuẩn xác định hàm lượng độc tố vi nấm sử dụng kỹ thuật chiết pha rắn (SPE) bằng cột ái lực để làm sạch dịch chiết và phân tích trên thiết bị HPLC-FLD hoặc LC-MS/MS cho từng độc tố hoặc nhóm độc tố. Do đó, việc xử lý mẫu và phân tích trên thiết bị tốn nhiều thời gian, dẫn đến chi phí vận hành cao. Phương pháp mới có thể xác định đồng thời 09 hoạt chất mycotoxin chỉ với một lần chuẩn bị mẫu và một lần phân tích trên thiết bị, cho kết quả chọn lọc, ổn định và chính xác. Phương pháp thử đã được đánh giá qua ba giai đoạn gồm: xác nhận giá trị sử dụng theo CEN/TR 16059:2010 (giai đoạn 1), so sánh với các phương pháp tiêu chuẩn (giai đoạn 2), đánh giá phương pháp bằng chương trình so sánh liên phòng (giai đoạn 3). Các mẫu ngũ cốc được chiết bằng kỹ thuật QuEChERS, làm sạch bằng d-SPE và được phân tích trên thiết bị LC-MS/MS. Giới hạn định lượng của phương pháp (LOQ) là 0,5 µg/kg cho từng độc tố nhóm aflatoxin và 40 µg/kg, 25 µg/kg, 1 µg/kg, 75 µg/kg lần lượt cho deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, từng độc tố fumonisin (B1&B2). Hiệu suất thu hồi của phương pháp trong khoảng 70-120%, độ lệch chuẩn tương đối RSD ≤ 20%, phương pháp cho kết quả tương đương các phương pháp xác định riêng lẻ có sử dụng cột ái lực trong giai đoạn chiết mẫu. Hiện phương pháp đã được đánh giá thông qua chương trình so sánh liên phòng lần 1 (vòng khảo sát) và đang thực hiện lần 2 (vòng chính thức) dự kiến thực hiện trong năm 2022.

Từ khóa: *mycotoxin, độc tố vi nấm, LC-MS/MS, simultaneous determination.*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Theo kết quả thống kê từ Bộ y tế, trong năm 2021, toàn quốc ghi nhận 81 vụ với 1942 người bị ngộ độc, trong đó có 18 trường hợp tử vong, so với năm 2020, giảm 58 vụ (41,7%), số mắc giảm 1152 người (37,2%), số tử vong giảm 12 người (40,0%). Đáng chú ý giai đoạn diễn ra từ tháng 4 đến tháng 8 ghi nhận 43 vụ ngộ độc thực phẩm, tương đương 53% số vụ ngộ độc thực phẩm trong cả năm. Các vụ ngộ độc thực phẩm chủ yếu do căn nguyên từ yếu tố tự nhiên, do vi sinh vật hoặc do nhiễm độc hóa chất [1].

* Điện thoại: 0394 948 356

Email: vinh.nh@quatest3.com.vn

Mycotoxin là một thuật ngữ chung chỉ các độc tố hóa học được tạo thành và chuyển hóa bởi các sinh vật trong nấm, thường được hay biết đến với tên gọi là độc tố vi nấm. Độc tố vi nấm là dạng độc tố nội sinh, thường được tìm thấy trong các sản phẩm ngũ cốc hoặc có nguồn gốc từ ngũ cốc. Một loài nấm có thể sinh ra một hoặc nhiều các mycotoxin khác nhau và ngược lại một mycotoxin cũng có thể được chuyển hóa bởi nhiều loài sinh vật khác nhau. Tùy vào thành phần cấu trúc mà các mycotoxin có độc tính khác nhau, các độc tố này có thể gây ra các chứng ngộ độc cấp tính và mãn tính. Bên cạnh đó, mycotoxin còn có khả năng gây ra các chứng rối loạn chức năng một số bộ phận, cơ quan trên cơ thể hoặc có khả năng giết chết người và động vật [2-3]. Theo công bố của Tổ chức nghiên cứu ung thư quốc tế, độc tố vi nấm là các hoạt chất có khả năng gây ung thư: các hoạt chất aflatoxin được xếp vào nhóm 1, ochratoxin A và fumonisin được xếp vào nhóm 2B, deoxynivalenol và zearalenone được xếp vào nhóm 3 [4].

Chính vì những tác động tiêu cực lên chất lượng sản phẩm, hàng hóa, cũng như sức khỏe con người và vật nuôi, hầu hết các quốc gia đều có thiết lập mức giới hạn tối đa cho phép đối với các hoạt chất này. Trước đây, việc kiểm soát hàm lượng độc tố vi nấm trong thực phẩm được quy định theo Quyết định số 46/2007/QĐ-BYT-Quyết định về việc ban hành “Quy định giới hạn tối đa ô nhiễm sinh học và hóa học trong thực phẩm”, tuy nhiên phần quy định có liên quan đến các hoạt chất mycotoxin sau đó được thay thế bởi Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia số QCVN 8-1:2011/BYT Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia đối với giới hạn ô nhiễm độc tố vi nấm trong thực phẩm [5-6].

Theo kết quả khảo sát được công bố trên tập 3, số 3, năm 2020 của Tạp chí Kiểm nghiệm và an toàn thực phẩm, kết quả nghiên cứu cho thấy có 43 mẫu thực phẩm có chứa ít nhất một hoạt chất độc tố vi nấm trên tổng số 300 mẫu khảo sát, trong đó có 17 mẫu có hàm lượng độc tố vi nấm vượt ngưỡng giới hạn cho phép theo quy định tại quy chuẩn quốc gia của bộ Y tế QCVN 8-1:2011/BYT (chiếm tỷ lệ khoảng 5%) [7].

Hiện tại các hoạt chất mycotoxin được xác định riêng lẻ theo từng nhóm chất, gồm 5 lần xử lý mẫu và 5 lần phân tích trên các kỹ thuật khác nhau HPLC-FLD, HPLC-UV/VIS hoặc LC-MS/MS. Quá trình xác định riêng lẻ có nhiều bất cập như thời gian phân tích mẫu dài, chi phí cho hóa chất và nhân công cao. Phương pháp phân tích đồng thời dự kiến có một số ưu điểm vượt trội so với các phương pháp xác định riêng lẻ. Đầu tiên, tất cả các chất được xử lý dựa trên nguyên tắc chiết QuEChERS, đây là một phương pháp chiết phổ quát do đó có thể chiết tất cả các chất trong mẫu cùng một lần thực hiện, việc sử dụng phương pháp này mang lại lợi ích về mặt kinh tế, tiết kiệm chi phí, nhân lực và thời gian nhưng vẫn đảm bảo độ nhạy, độ chọn lọc phù hợp với mức giới hạn của các quy định. Thứ hai, tất cả các chất được phân tích trên cùng một lần chạy, sử dụng phương pháp có độ chọn lọc cao như sắc ký lỏng khối phổ, hạn chế sai sót do ảnh hưởng của nền mẫu, phương pháp mang tính ổn định cao do có sử dụng nội chuẩn đồng vị cho từng hoạt chất (trừ hoạt chất fumonisin B2), góp phần bù trừ các sai số, ảnh hưởng nền trong quá trình tách chiết cũng như các hiệu ứng ion hóa trong khối phổ.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Các hoạt chất độc tố vi nấm được khảo sát trong nghiên cứu này gồm: aflatoxin B1 (AFLA B1), aflatoxin B2 (AFLA B2), aflatoxin G1 (AFLA G1), aflatoxin G2 (AFLA G2), ochratoxin A (OTA), Zearalenone (ZEARA), deoxynivalenol (DON), Fumonisin B1 (FB1) và Fumonisin B2 (FB2). Nền mẫu khảo sát được chọn là nền ngũ cốc: ngũ cốc ăn liền, bột mì, bột bắp. Ngoại trừ các nền mẫu dạng lỏng và các nền mẫu thực phẩm dành cho trẻ nhỏ, ngũ cốc là nền mẫu có mức giới hạn cho phép thấp nhất trong các nền còn lại được quy định theo QCVN 8-1:2011/BYT. Bên cạnh đó, ngũ cốc cũng là nền mẫu phổ biến nhất tại các đơn vị thử nghiệm độc tố vi nấm được khảo sát trong nghiên cứu này, do đó nền mẫu này được chọn cho để tối ưu quy trình xử lý mẫu và xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp thử.

2.2. Hóa chất, chất chuẩn

Các chất chuẩn rắn mycotoxin: aflatoxin B1 (98,8%), aflatoxin B2 (98,4%), aflatoxin G1 (97,7%), aflatoxin G2 (97,8%), deoxynivalenol (98,3%), zearalenone (99,7%), ochratoxin A (99,0%), fumonisin B1 (98%), fumonisin B2 (98%), các dung dịch nội chuẩn đồng vị gồm $^{13}\text{C}_{17}$ aflatoxin B1 (0,500 mg/L), $^{13}\text{C}_{17}$ aflatoxin B2 (0,504 mg/L), $^{13}\text{C}_{17}$ aflatoxin G1 (0,504 mg/L), $^{13}\text{C}_{17}$ aflatoxin G2 (0,509 mg/L), $^{13}\text{C}_{15}$ deoxynivalenol (25,00 mg/L), $^{13}\text{C}_{20}$ ochratoxin A (10,10 mg/L), $^{13}\text{C}_{34}$ fumonisin B1 (25,10 mg/L) được cung cấp bởi Romer Lab (Technopark 1, Austria), d_6 zearalenone được cung cấp bởi TRC (Canada).

Các dung dịch chuẩn gốc có nồng độ chính xác khoảng 500 mg/L được chuẩn bị bằng cách cân từng dạng chuẩn rắn và hòa tan trong ACN. Riêng đối với fumonisin B1 và fumonisin B2 chuẩn gốc được chuẩn bị trong dung môi ACN: nước (tỷ lệ 1 : 1, v/v). Chuẩn gốc được bảo quản trong ống thủy tinh ở nhiệt độ -18°C và sử dụng trong 12 tháng.

Hỗn hợp chuẩn trung gian được chuẩn bị từ chuẩn gốc với nồng độ dựa trên mức giới hạn cho phép tối đa theo QCVN 8-1/2011/BYT. Dung dịch chuẩn trung gian và nội chuẩn trung gian được chuẩn bị trong dung môi ACN: nước (tỷ lệ 1 : 1, v/v), được bảo quản trong ống thủy tinh ở nhiệt độ -18°C và sử dụng trong 3 tháng.

Chuẩn làm việc được chuẩn bị trong dung môi MeOH: nước (tỷ lệ 1 : 9, v/v) với khoảng nồng độ như thông tin trong Bảng 2. Chuẩn làm việc được bảo quản ở nhiệt độ từ $4 - 8^\circ\text{C}$ trong ống thủy tinh và được sử dụng trong 1 tháng.

Các loại dung môi sử dụng trong quá trình khảo sát thuộc loại tinh khiết phân tích, bao gồm: Acetonitril (ACN), metanol (MeOH), acid formic (FA), thuộc loại tinh khiết phân tích dùng cho HPLC của Merck (USA). Nước cất khử ion của Merck Millipore dùng để chuẩn bị pha động và hỗn hợp dung môi pha chuẩn. Nước cho quá trình chuẩn bị mẫu được xử lý bằng hệ thống lọc nước Milli-Q ultrapure water system (Millipore, Billerica, MA, USA).

Các hóa chất dùng trong chuẩn bị mẫu của quá trình chiết QuEChERS gồm muối natri citrate ngậm 2 phân tử nước ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), muối natri citrat ngậm 1,5 phân tử nước ($\text{C}_6\text{H}_8\text{Na}_2\text{O}_8$), natri clorua (NaCl) tinh khiết phân tích (Merck). Magie sunfat (MgSO_4) khan, thuộc loại tinh khiết phân tích (Fisher), vật liệu hấp phụ amin bậc 1,2 (PSA) - 40 μm , chất

hấp phụ octadecyl-C18 từ hãng Agilent. Các muối dạng khan như MgSO₄ được sấy ở 550°C trong 4 giờ trước khi sử dụng. Các loại muối dùng trong quá trình chuẩn bị pha động: amoni formate (HCOONH₄), amoni acetate (CH₃COONH₄) thuộc loại tinh khiết phân tích (Merck, USA).

2.3. Điều kiện phân tích

Thiết bị LC-MS/MS gồm hệ thống sắc ký lỏng LC 1290 Agilent (USA) và detector khối phổ API 4000 (nguồn ion hóa ESI) AB Sciex Pte. Ltd. Các chất phân tích được phân tách trên cột pha đảo C18, 100 mm × 3,0 mm, 2,7 μm Phenomenex. Nhiệt độ buồng cột được cài đặt ở 35°C với thể tích tiêm mẫu là 20μL, tốc độ dòng pha động được cài đặt ở 0,4 mL/phút.

Thành phần pha động bao gồm: pha động A có thành phần gồm nước khử ion chứa 0,1 mM CH₃COONH₄, 0,1% HCOOH và pha động B có thành phần gồm MeOH chứa 0,1 mM CH₃COONH₄, 0,1% HCOOH. Ở giai đoạn đầu, pha động B được giữ ở mức 10% trong 0,5 phút, sau đó dung môi hữu cơ ở pha động B được tăng lên 90% trong vòng 5,5 phút và được giữ ổn định ở 90% trong 2,5 phút, sau đó pha động được đưa về điều kiện ban đầu trong 0,1 phút và được giữ ổn định trong 3 phút [8]. Tất cả các chất được phân tích ở chế độ ion hóa dương với nguồn ion hóa ESI, nhiệt độ source ion là 400°C với các mảnh ion và thế bắn phá như Bảng 1.

Bảng 1. Mảnh ion của các hoạt chất độc tố vi nấm được khảo sát

Q1	Q3	Hoạt chất	CE	Q1	Q3	Hoạt chất	CE
313,2	285,3	AFLA-B1-1	33	319,2	283,0	ZEARA-1	17
313,2	241,2	AFLA-B1-2	41	319,2	186,9	ZEARA-2	29
315,1	287,2	AFLA-B2-1	35	297,1	249,1	DON-1	17
315,1	259,3	AFLA-B2-2	35	297,1	203,2	DON-2	21
329,0	243,2	AFLA-G1-1	35	330,1	301,0	¹³ C ₁₇ -AFLA-B1	35
329,0	200,1	AFLA-G1-2	45	346,1	212,1	¹³ C ₁₇ -AFLA-G1	59
331,1	313,4	AFLA-G2-1	35	332,2	273,1	¹³ C ₁₇ -AFLA-B2	41
331,1	245,3	AFLA-G2-2	41	348,1	330,1	¹³ C ₁₇ -AFLA-G2	39
404,1	238,9	OTA-1	32	424,0	250,2	¹³ C ₂₀ -OTA	41
404,1	358,1	OTA-2	22	325,2	187,1	d ₆ -ZEARA	34
722,3	334,4	FUMO-FB1-1	57	312,2	263,2	¹³ C ₁₅ -DON	17
722,3	352,3	FUMO-FB1-2	51	706,3	336,4	FUMO-FB2-1	51
756,5	374,4	¹³ C ₃₄ -FUMO-FB1	53	706,3	354,4	FUMO-FB2-2	47

Ghi chú: Mảnh ion 1: mảnh định lượng; mảnh ion 2: dùng xác nhận tỉ lệ ion.

2.4. Đồng nhất mẫu

Đồng nhất mẫu là một trong những giai đoạn khá quan trọng, ảnh hưởng trực tiếp đến kết quả phân tích. Dựa trên nghiên cứu của nhóm Vincenzo Lippolis và cộng sự [9], quy trình đồng nhất mẫu được đề xuất với hai cách tiếp cận như sau:

2.4.1. Đồng nhất mẫu khô

Đối với các mẫu là dạng hạt, dạng viên, xay mẫu đến đồng nhất bằng thiết bị xay phù hợp trước khi cân mẫu, đối với các mẫu dạng bột mịn không cần thực hiện giai đoạn nghiền mẫu. Các mẫu là các sản phẩm bơ được thực hiện đồng nhất mẫu bằng cách khuấy trộn đều tất cả mẫu bằng thiết bị phù hợp (ví dụ: ultraturrax) trước khi cân mẫu.

2.4.2. Đồng nhất mẫu ướt

Mẫu được xay sơ bộ bằng thiết bị phù hợp, sau đó trộn mẫu đã xay với nước theo tỷ lệ 25 g mẫu/20 g nước, đồng nhất mẫu trên máy khuấy trộn trong ít nhất 1 giờ. Tỷ lệ mẫu/nước có thể thay đổi tùy thuộc vào hàm lượng nước có trong mẫu, tỷ lệ 1 : 1 thường được dùng cho các mẫu có hàm lượng nước nhỏ hơn 50%. Tỷ lệ 1 : 1,5 thường được dùng cho các mẫu bơ đậu phộng, tỷ lệ 1:2 thường được dùng cho các mẫu hạt, tỷ lệ 1 : 5 thường được dùng cho các mẫu dừa khô [10].

2.5 Xử lý mẫu

Quy trình xử lý mẫu được xây dựng dựa trên các nghiên cứu khoa học đã được công bố bởi nhóm tác giả Pratheeba Yogendrarajah [11] và nhóm Juan Sun [8]. Cân chính xác khoảng 25 g mẫu được đồng nhất khô, thêm 20 mL nước hoặc cân chính xác khoảng 45 g mẫu được đồng nhất ướt, thêm chính xác 80 mL dịch chiết (ACN chứa 1,25 % FA). Mẫu được trộn ở tốc độ cao bằng máy đồng nhất mẫu Ultraturrax trong 3 phút. Lấy 5 mL dịch chiết sau lọc sử dụng cho quy trình chiết QueChERS, 0,4 mL nội chuẩn trung gian (chứa 10 µg/L nội chuẩn nhóm $^{13}\text{C}_{17}$ AFLA, 50 µg/L nội chuẩn $^{13}\text{C}_{20}$ OTA, 500 µg/L nội chuẩn d_6 ZEARA, $^{13}\text{C}_{15}$ DON và $^{13}\text{C}_{34}$ FB1) được thêm vào mẫu. Thêm 3 mL nước, thêm hỗn hợp chứa 2 g muối MgSO_4 , 0,5 g NaCl, 0,5 g trisodium citrate, 0,25 g disodium citrate, hỗn hợp được lắc trong 3 phút, ly tâm 5.000 vòng/phút trong 2 phút. Dung dịch chiết lớp trên (5 mL) được hút sang ống ly tâm 15 mL và thực hiện giai đoạn làm sạch bằng phương pháp chiết pha rắn phân tán (d-SPE). Thêm hỗn hợp muối chứa 0,9 g MgSO_4 , 0,1 g chất hấp phụ C18 vào ống ly tâm chứa dịch chiết mẫu, lắc 1 phút, ly tâm. Hút 1 mL dung dịch thu được, thổi khí đến khô (nhiệt độ không quá 50°C). Hòa tan phần cặn thu được trong 1 mL dung dịch chứa MeOH : nước (tỷ lệ 1 : 9, v/v), siêu âm, lọc qua màng 0,22 µm và phân tích trên thiết bị LC-MS/MS.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Xác nhận giá trị sử dụng

Việc xác nhận giá trị sử dụng được thực hiện ngay sau khi kết thúc quá trình khảo sát phương pháp. Quá trình xác nhận có thể được thực hiện với các hình thức khác nhau như kiểm tra xác nhận (áp dụng đối với các phương pháp thử tuân thủ hoàn toàn các yêu cầu kỹ thuật và phạm vi áp dụng của phương pháp thử tiêu chuẩn) hoặc xác nhận đầy đủ các thông số (áp dụng cho các phương pháp thử phi tiêu chuẩn, được xây dựng bởi PTN). Trong nghiên cứu này, phương pháp thử xác định đồng thời các mycotoxin được xác nhận giá trị sử dụng theo các thông số được quy định chung trong EC 657/2002, AOAC phụ lục f (2019), SANTE/12089/2016 và CEN/TR 16059:2010 trên các nền mẫu ngũ cốc [12-13].

3.1.1. Khoảng làm việc

Trong thực tế, độc tố vi nấm là các hoạt chất có tác động xấu đến chất lượng sản phẩm, sức khỏe người tiêu dùng và vật nuôi, xác suất mẫu dương tính không cao, phần lớn hàm lượng các chất này trong mẫu cũng không quá lớn và chi phí chất chuẩn cao. Do đó, không nhất thiết phải kiểm tra đánh giá phương pháp với khoảng tuyến tính rộng, đặc biệt là khoảng giới hạn trên. Với thông số này, nhóm nghiên cứu chỉ đánh giá khoảng làm việc trong khoảng nồng độ phù hợp với độ nhạy của thiết bị và yêu cầu về mức giới hạn cho phép theo QCVN 8-1:2011/BYT. Kết quả trong Bảng 2 cho thấy tất cả các chất đều có hệ số $R^2 > 0,99$, đều thỏa mãn yêu cầu quy định cơ bản của đường chuẩn.

Bảng 2. Kết quả đánh giá khoảng làm việc

Chất phân tích	Nội chuẩn	Khoảng làm việc ($\mu\text{g/L}$)	Phương trình hồi quy	R^2
AFLA B1	$^{13}\text{C}_{17}$ AFLA B1	0,1-5,0	$y = 1,19x + 0,0383$	1,0000
AFLA B2	$^{13}\text{C}_{17}$ AFLA B2	0,1-5,0	$y = 0,968x - 0,0176$	0,9998
AFLA G1	$^{13}\text{C}_{17}$ AFLA G1	0,1-5,0	$y = 1,09x - 0,0573$	0,9988
AFLA G2	$^{13}\text{C}_{17}$ AFLA G2	0,1-5,0	$y = 0,927x - 0,012$	0,9999
DON	$^{13}\text{C}_{15}$ -DON	10-500	$y = 0,00937x + 0,00991$	0,9996
ZEARA	d_6 -ZEARA	5,0-250	$y = 0,00434x - 0,00662$	0,9990
OTA	$^{13}\text{C}_{20}$ -OTA	0,5-25	$y = 0,204x$	0,9992
FB1	$^{13}\text{C}_{34}$ -FB1	10-500	$y = 0,00789x + 0,0719$	0,9992
FB2	$^{13}\text{C}_{34}$ -FB1	10-500	$y = 0,018x + 0,2845$	0,9915

3.1.2. Giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng của phương pháp

Giới hạn phát hiện (LOD) của phương pháp là nồng độ thấp nhất mà tại đó có thể phát hiện và khẳng định sự hiện diện của chất phân tích mà chưa cần phải định lượng. Giới hạn định lượng (LOQ) của phương pháp là nồng độ thấp nhất của chất phân tích có trong mẫu thử mà phương pháp có thể định lượng với các yêu cầu nhất định về độ đúng và độ chụm. Có nhiều phương pháp tiếp cận và xác nhận giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng. Tùy thuộc vào bản chất nền mẫu, hàm lượng chất phân tích có trong mẫu, phương pháp phân tích và quy định trong các quy chuẩn kỹ thuật mà người nghiên cứu có thể chọn cách tiếp cận cho phù hợp [14].

Theo tiêu chuẩn CEN/TR 16059:2010, LOQ của phương pháp phân tích hàm lượng độc tố vi nấm phải đáp ứng một số yêu cầu như Bảng 3.

Bảng 3. Yêu cầu giới hạn định lượng theo CEN/TR 16059:2010

Trường hợp một hoạt chất		Trường hợp nhóm hoạt chất	
Giới hạn cho phép ≥ 100 $\mu\text{g/kg}$	$\text{LOQ} \leq 1/5\text{MRL}$	Với	$\text{LOQ} \leq L/2n$
Giới hạn cho phép < 100 $\mu\text{g/kg}$	$\text{LOQ} \leq 2/5\text{MRL}$		L là mức giới hạn cho phép n số hoạt chất thành phần

Trong nghiên cứu này, LOD và LOQ được xác định thông qua việc đánh giá mẫu thêm chuẩn ($n = 7$) trên quy trình đã tối ưu, phân tích trên thiết bị và tiến hành xác định LOD, LOQ. Giá trị LOD được đánh giá lại thông qua hệ số $R = X_{tb}/SD$. Kết quả trong Bảng 3 cho thấy tất cả các giá trị R đều nằm trong khoảng chấp nhận $4 \leq R \leq 10$, điều này cho thấy các giá trị LOD, LOQ ước lượng từ công thức có độ tin cậy đạt yêu cầu quy định. Bên cạnh đó, giới hạn định lượng của phương pháp tính từ độ lệch của mẫu thêm chuẩn được so sánh, đánh giá với các giới hạn tính toán được theo tiêu chuẩn CEN/TR 16059 : 2010 (Bảng 4).

Bảng 4. LOD, LOQ của phương pháp (đơn vị: $\mu\text{g}/\text{kg}$)

Chất phân tích	LOD (LOD = 3SD)	LOQ (LOQ = 10SD)	LOQ tính (CEN 16059)	LOQ chọn	$R = X_{tb}/SD$
AFLA B1	0,12	0,38	0,5	0,50	5,2
AFLA B2	0,14	0,47	0,5	0,50	4,8
AFLA G1	0,11	0,36	0,5	0,50	4,1
AFLA G2	0,15	0,50	0,5	0,50	4,3
DON	5,65	18,8	37,5	40	6,4
ZEARA	2,76	9,19	37,5	25	8,5
OTA	0,29	0,95	1,0	1,0	5,2
FB1	18,6	61,9	250	75	9,8
FB2	22,0	73,5	250	75	8,6

3.1.3. Hiệu suất thu hồi, độ lặp lại

Hiệu suất thu hồi của phương pháp được đánh giá bằng các mẫu thêm chuẩn trên nền bột mì, nền ngũ cốc và nền bột bắp. Cân chính xác khoảng 25 g mẫu khô, tiến hành thêm chuẩn tại mức hàm lượng cao gấp 5 lần LOQ (2,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ cho nhóm aflatoxin, 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ đối với hoạt chất DON, 125 $\mu\text{g}/\text{kg}$ đối với ZEARA, 5,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ đối với OTA, 375 $\mu\text{g}/\text{kg}$ đối với từng hoạt chất FUMO), để yên trong 60 phút tại nhiệt độ phòng. Tiến hành chiết mẫu như các bước tại Mục 2.5.

3.2. So sánh phương pháp xác định đồng thời với các phương pháp thử tiêu chuẩn riêng lẻ cho từng chất/nhóm chất

Nhằm có cơ sở so sánh và đánh giá phương pháp đang khảo sát, mẫu ngũ cốc được tiến hành thêm chuẩn ở mức hàm lượng như Mục 3.1.3 và đánh giá đồng thời bằng hai phương pháp. Kết quả được tóm tắt như Bảng 6, kết quả khảo sát cho thấy các phương pháp tiêu chuẩn sử dụng cột ái lực miễn dịch trong quá trình làm sạch dịch chiết, giảm tác động của nền mẫu lên quá trình phân tích các hợp chất mycotoxin, nhằm hạn chế rủi ro dương tính giả. Tuy hiệu suất thu hồi của các phương pháp này không cao ở một số hoạt chất như ochratoxin A và deoxynivalenol nhưng vẫn nằm trong khoảng chấp nhận theo các quy định. Phương pháp đang nghiên cứu cho kết quả hiệu suất thu hồi rất tốt trong khoảng 89 - 111%, kết quả này phù hợp hơn so với các phương pháp đã tiêu chuẩn hóa và phù hợp với yêu cầu CEN/TR 16059 : 2010. Với kỹ thuật phân tích trên thiết bị LC-MS/MS, độ chọn lọc, độ đặc

hiệu của phương pháp cao hơn, cho kết quả tin cậy và hạn chế được các trường hợp nhận danh nhầm.

Bảng 5. Hiệu suất thu hồi trên các nền mẫu khảo sát

Chất phân tích	Nền bột mì (n = 7)		Nền ngũ cốc (n = 7)		Nền bột bắp (n = 7)	
	Hiệu suất thu hồi (%)	RSD (%)	Hiệu suất thu hồi (%)	RSD (%)	Hiệu suất thu hồi (%)	RSD (%)
AFLA B1	103,1	10,5	106,3	5,9	103,8	8,0
AFLA B2	88,7	5,9	91,0	6,9	95,4	8,5
AFLA G1	119,9	6,0	97,0	6,5	110,8	8,2
AFLA G2	110,5	7,8	95,4	7,2	106,2	9,9
DON	108,3	4,5	108,8	4,1	109,8	3,7
ZEARA	99,9	8,4	96,5	8,5	105,5	4,3
OTA	111,8	8,5	95,4	6,3	108,5	5,9
FB1	104,1	9,0	113,2	5,8	116,4	8,8
FB2	84,2	22,1	60,8	5,2	115,6	16,1

Bảng 6. So sánh phương pháp đang khảo sát và phương pháp tiêu chuẩn

Chất phân tích	Phương pháp tiêu chuẩn (n = 3)		Phương pháp nghiên cứu (n = 3)	
	Hiệu suất (%)	Kỹ thuật phân tích	Hiệu suất (%)	Kỹ thuật phân tích
AFLA B1	108		108	
AFLA B2	84	TCVN 7596:2007	92	
AFLA G1	92		100	
AFLA G2	96		100	
OTA	60	TCVN 9724:2013	110	LC-MS/MS
ZEARA	78	TCVN 9591:2013	95	
DON	64	Tham khảo TCVN 10929:2015	89	
FB1	-	Tham khảo	111	
FB2	70	TCVN 8162:2009	96	

Bên cạnh đó, phương pháp mới còn cho thấy tính hiệu quả cao hơn các phương pháp tiêu chuẩn hiện nay về thời gian phân tích và chi phí vận hành. PTN sẽ xử lý mẫu bằng 5 quy trình khác nhau, sử dụng các cột ái lực đặc hiệu cho từng nhóm độc tố vi nấm, sau đó phân tích trên các kỹ thuật sắc ký khác nhau trong trường hợp áp dụng các phương pháp tiêu chuẩn. Do đó thời gian phân tích mẫu kéo dài, chi phí vật tư hóa chất cao. Nếu không xét chi phí khấu hao thiết bị, giá thành các nội chuẩn đồng vị cho từng hoạt chất là thành phần cấu thành chính cho chi phí vận hành phương pháp thử mới. Tuy nhiên, chi phí ước tính cho phương pháp thử mới vẫn tiết kiệm và đem lại hiệu quả kinh tế cao, chi tiết xem Bảng 7.

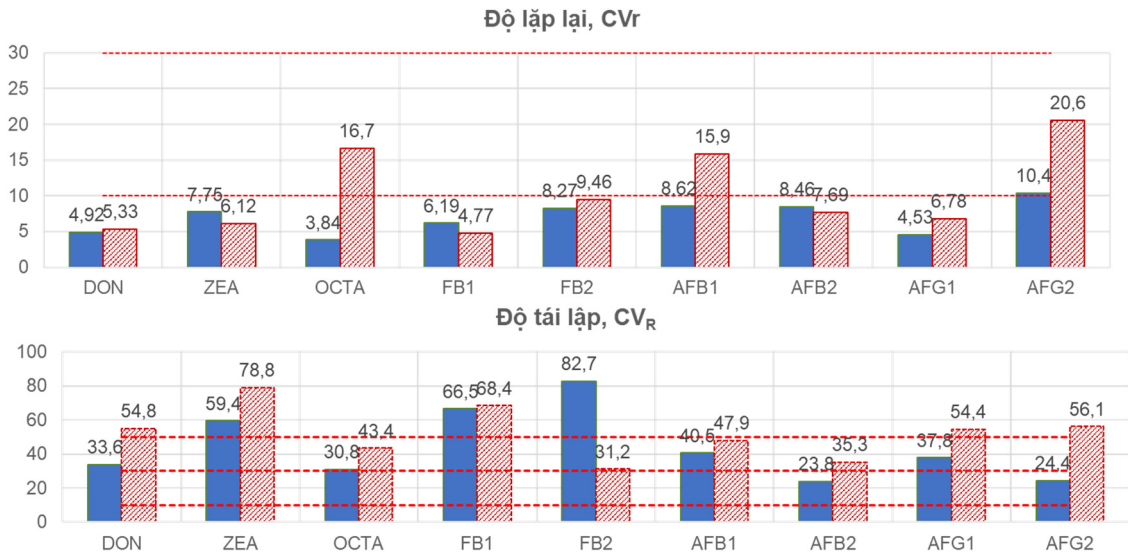
Bảng 7. So sánh hiệu quả phương pháp xác định đồng thời và phương pháp tiêu chuẩn

Hoạt chất	Phương pháp xác định riêng lẻ		Phương pháp xác định đồng thời	
	Thiết bị	Thời gian - Chi phí	Thiết bị	Thời gian - Chi phí
AFLA B1				
AFLA B2				
AFLA G1		707.000		267.000
AFLA G2	HPLC-FLD	Thời gian: 5h xử	LC-MS/MS	Thời gian: 1h xử lý
OTA	LC-MS/MS	lý mẫu, 5 lần		mẫu, 1 lần tiêm
ZEARA		tiêm trên thiết bị		trên thiết bị
DON				
FB1&FB2				

3.3. So sánh liên phòng

Chương trình nghiên cứu liên phòng được tổ chức nhằm khảo sát độ lặp lại và tái lập của phương pháp thử đang nghiên cứu. Chương trình so sánh liên phòng gồm 2 vòng: vòng khảo sát (đã diễn ra vào tháng 03/2021 với dự tham dự của 10 PTN) và vòng chính thức (dự kiến tổ chức trong 2022). Mục đích của vòng khảo sát nhằm giúp các phòng thí nghiệm (PTN) tham gia làm quen với phương pháp thử mới cũng như góp ý hoàn thiện phương pháp. Đây cũng là cơ hội để nhóm nghiên cứu khảo sát điều kiện các PTN, nhằm tối ưu phương pháp thử theo các điều kiện chung nhất. Phương pháp thử này sau khi được đánh giá sẽ được lấy ý kiến rộng rãi, hướng đến việc xây dựng phương pháp thử tiêu chuẩn xác định đồng thời các hoạt chất nhóm độc tố vi nấm. Tất cả các PTN tham dự chương trình so sánh liên phòng đều được công nhận phù hợp với yêu cầu của hệ thống quản lý chất lượng ISO/IEC 17025:2017. Các PTN này cũng từng tham dự ít nhất một chương trình so sánh liên phòng hoặc thử nghiệm thành thạo các chỉ tiêu mycotoxin.

Kết quả vòng khảo sát sơ bộ cho thấy, độ lặp lại của phương pháp ở tất cả các phòng thí nghiệm khá tốt, hầu hết các hoạt chất đều có RSD < 10%. Độ lệch chuẩn tái lập của phương pháp còn khá lớn ở một số hoạt chất như zearalenone và hai hoạt chất nhóm fumonisin, đặc biệt là fumonisin B2. Điều này có thể giải thích bởi hoạt chất fumonisin B2, do nhóm nghiên cứu chưa có đủ điều kiện trang bị, do đó tất cả các kết quả đều được tính toán dựa trên nội chuẩn fumonisin B1. Điều này có thể dẫn đến việc ảnh hưởng bởi nền mẫu chưa được loại bỏ hoàn toàn, dẫn đến kết quả định lượng fumonisin B2 chưa được tốt bằng các hoạt chất khác. Thêm vào đó, một số PTN tham dự chương trình chưa được trang bị máy khuấy trộn mẫu tốc độ cao như ultraturrax, do đó một số PTN tham dự chỉ tiến hành lắc chiết mẫu, do đó vẫn còn có sự khác biệt đáng kể đối với một số hoạt chất. Nhóm nghiên cứu sẽ tiếp tục phối hợp với các PTN tham dự để giải quyết các vấn đề còn tồn đọng và tổ chức vòng chính thức (dự kiến trong 2022).



Hình 1. Kết quả đánh giá vòng khảo sát trên nền mẫu bột bắp
(Màu xanh: mẫu blank thêm chuẩn; Màu đỏ: mẫu có hàm lượng xác định)

4. KẾT LUẬN

Kết quả thực nghiệm cho thấy phương pháp xác định đồng thời các mycotoxin gồm: 4 hoạt chất nhóm aflatoxin (B1, B2, G1 và G2), deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A và 2 hoạt chất nhóm fumonisin (B1 và B2) trong ngũ cốc bằng thiết bị sắc ký lỏng ghép nối khối phổ có tính ổn định, đặc hiệu, đáp ứng các yêu cầu của một phương pháp phân tích định lượng và thỏa mãn mức giới hạn quy định trên các nền mẫu thực phẩm: Phương pháp có tính chọn lọc, đặc hiệu: thể hiện qua việc phân tích mẫu trắng, mẫu thêm chuẩn, và có mảnh ion định lượng và mảnh ion định danh; Tính ổn định cao: hiệu suất thu hồi trong khoảng 70-120% và độ lệch chuẩn tương đối của các hợp chất khảo sát đều nhỏ hơn 20%; Mức giới hạn (phát hiện và định lượng) phù hợp yêu cầu các quy định hiện hành; Phương pháp phân tích đồng thời cho kết quả tương đương các phương pháp tiêu chuẩn đang được áp dụng hiện hành tại PTN. Phương pháp phân tích đồng thời đã và đang được đánh giá thông qua 2 vòng của chương trình so sánh liên phòng.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ và hỗ trợ kỹ thuật bởi Cơ quan Năng lượng Nguyên tử Quốc tế (IAEA), mã đề tài VIE5022, được thực hiện bởi nhóm nghiên cứu và các trang thiết bị tại Trung tâm Kỹ thuật Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng 3 (QUATEST 3).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. An Giang Department of Health, "Ensuring food safety, preventing food poisoning and food-borne diseases in 2022", Available:

- <https://soyte.angiang.gov.vn/wps/portal/Home/trang-chu/tin-chi-tiet/sa-khoitin/sa-vsattp/syt184>, [accessed 15/06/2022].
- [2]. M. A. A. Adam, Y. M. Tabana, K. B. Musa, and D. A. Sandai, "Effects of different mycotoxins on humans, cell genome and their involvement in cancer," *Oncology Reports*, vol. 37, pp. 1321-1336, 2017.
- [3]. S. A. Adeyeye, "Fungal mycotoxins in foods: A review," *Cogent Food & Agriculture*, vol. 2, no. 1, pp. 121-127, 2016.
- [4]. International Agency for Research on Cancer, "IARC monographs on the identification of carcinogenic hazards to humans," Địa chỉ: <https://monographs.iarc.who.int/agents-classified-by-the-iarc/> [Truy cập 30/3/2021].
- [5]. Ministry of Health, Decision No. 46/2007/QĐ-BYT on promulgation "Regulation of maximum level of biological and chemical pollution in food," 2007.
- [6]. Ministry of Health, QCVN 8-1:2011/BYT "National technical regulation on the limits of mycotoxins contaminant in food," 2011.
- [7]. N. T. H. Binh, N. N. Son, N. Thi Lan, and T. Cao Son, "The occurrence of mycotoxins in food collected from some northern provinces of Vietnam in 2019", *Vietnam Journal of Food Control*, vol. 3, no.3, pp. 183-190, 2020.
- [8]. J. Sun, W. Li, Y. Zhang, X. Hu, L. Wu, and B. Wang, "QuEChERS purification combined with ultrahigh-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for simultaneous quantification of 25 mycotoxins in cereals," *Toxins*, vol. 8, no. 12, pp. 375, 2016.
- [9]. V. Lippolis, M. Pascale, S. Valenzano, and A. Visconti, "Comparison of slurry mixing and dry milling in laboratory sample preparation for determination of ochratoxin A and deoxynivalenol in wheat," *Journal of AOAC International*, vol. 95, no. 2, pp. 452-458, 2012.
- [10]. J. Velasco and S. L. Morris, "Use of water slurries in Aflatoxin analysis," *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, vol. 24, no.1, 1976.
- [11]. P. Yogendrarajah, C. V. Poucke, B. De Meulenaer, and S. De Saeger, "Development and validation of a QuEChERS based liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the determination of multiple mycotoxins in spices," *Journal of Chromatography A*, vol. 1297, pp. 1-11, 2013.
- [12]. European Committee Standardization, "CEN/TR 16059:2010 - Food analysis - Performance criteria for single laboratory validated methods of analysis for the determination of mycotoxins," 2010.
- [13]. European Communities, "2002/657/EC Commission - COMMISSION DECISION of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results," *Official Journal of the European Communities*, 2002.
- [14]. Tran Cao Son, *Method validation in chemical and microbiological analysis*. Hanoi: Science and Technics Publishing House, 2010.

First step in development and evaluation simultaneous determination of mycotoxins in cereals by liquid chromatography - mass spectrometry

Nguyen Huu Vinh, Nguyen Hong Thao, Nguyen Cong Tuan, Tran Vuong Duc Nghia,
Ho Tran Ngoc Quyen, Nguyen Huu Tin, Nguyen Thanh Cong, Ngo Quoc Viet
Quality Assurance and Testing Center 3, Ho Chi Minh City, Viet Nam

Abstract

Currently, solid phase extraction (SPE) with immunoaffinity columns is applied in most standardized methods for mycotoxin determination to purify extracts and analysis by HPLC-FLD, HPLC-UV/VIS or LC-MS/MS. Therefore, sample preparation and analysis by instruments are time-consuming and high operating costs. The novel method allow simultaneously identify nine mycotoxin compounds with selective, stable and accurate results. The new method has been evaluated through three stages including validation as requirements of CEN/TR 16059:2010 (phase 1), comparison with current standard methods (phase 2), evaluate the method using an interlaboratory comparison program (phase 3).

Cereal samples were extracted by QuEChERS and analyzed by LC-MS/MS. The limit of quantitation (LOQ) was 0,5 µg/kg for each aflatoxin compound and 40 µg/kg, 25 µg/kg, 1 µg/kg, 75 µg/kg for deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, each toxin fumonisin (B1&B2), respectively. The recovery is in the range of 70-120%, relative standard deviation RSD < 20%. The novel method also gives the same results compared to the individual standardized methods, using the immunoaffinity column in the extraction stage. At the present, the method is being evaluated through an interlaboratory comparison program with two rounds: round 1 (for survey) and round 2 (official round), which is expected to be implemented in 2022.

Keywords: *mycotoxin, LC-MS/MS, simultaneous determination.*