

## **XÁC ĐỊNH OCHRATOXIN TRONG THỰC PHẨM BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG KHỐI PHỔ (LC-MS/MS)**

*Đến tòa soạn 25 – 1 – 2014*

**Lê Thị Hồng Hảo**

*Viện Kiểm nghiệm An toàn vệ sinh thực phẩm Quốc gia*

### **SUMMARY**

#### **DETERMINATION OF OCHRATOXINS IN FOOD BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY – TANDEM MASS SPECTROMETRY (LC-MS/MS)**

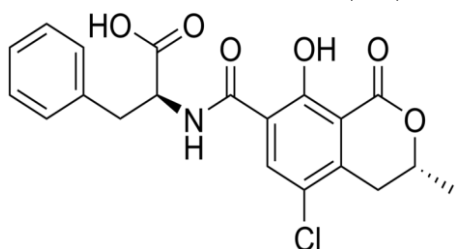
*Cereal are products essential in the our daily life However, cereals are prone to contamination by ochratoxins, which is toxic, carcinogenic and thermostable. A sensitive, reliable method was proposed for the determination of ochratoxins in food by high-performance liquid chromatography- tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The samples were firstly extracted and then cleaned up with an SPE C18 cartridge for LC-MS/MS analysis. Under the optimized conditions, the limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) for ochratoxins were 0,1 and 0,3 ng /mL, respectively. The recoveries of ochratoxins from cereal spiked at 2,5; 5 and 10 mg/kg ranged from 70 to 110%. The developed method was applied to the detection of 15 samples peanut, corn and 5 samples wine and 2 samples were contaminated by ochratoxins with levels below the newest legal limits.*

#### **1. MỞ ĐẦU**

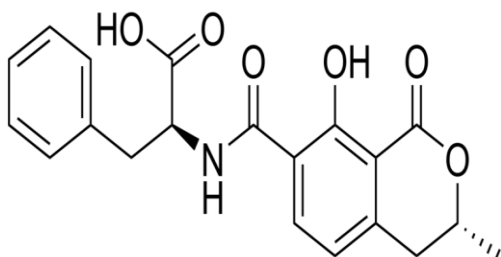
Ochratoxins là một loại độc tố được sinh ra bởi các chủng nấm mốc thuộc các giống *Aspergillus ochraceus* và *Penicillium verrucosum*. Theo tổ chức nghiên cứu ung thư quốc tế (IRAC) thì

ochratoxins được xếp vào loại chất có khả năng gây ung thư nhóm IIB. Độc tố này đã được phát hiện trên nhiều nông sản khác nhau bao gồm ngũ cốc và các sản phẩm của chúng. Tại Việt nam, mức dư lượng tối đa cho phép Ochratoxin A

trong ngũ cốc chưa qua chế biến là 5µg/g, rượu vang là 2µg/g, ngũ cốc và bột ngũ cốc là 3µg/g, thực phẩm dành cho trẻ dưới 36 tháng tuổi là 0,52µg/g. Hiện chưa có quy định cụ thể nào về mức MRL cho ochratoxin B kể cả trong nước và tiêu chuẩn Châu Âu (EN).



Ochratoxin A



Ochratoxin B

Hình 1: Cấu trúc các Ochratoxins

Trước đây, phương pháp thường được áp dụng là ELISA, dựa trên sự kết hợp đặc hiệu giữa kháng nguyên và kháng thể. Kháng thể đặc hiệu với ochratoxin được gắn lên bề mặt giếng nhựa polystyren. Tuy nhiên, phương pháp này lại dễ bị dương tính giả hoặc âm tính giả gây nhầm lẫn cho kết quả phân tích. Gần đây, có khá nhiều phương pháp được áp dụng xác định ochratoxins như: sắc ký khí (Gas chromatography-GC), sắc ký lỏng hiệu năng cao (RF-HPLC) dùng cột ái lực miễn dịch (IAC)

nhưng mỗi phương pháp đều có những ưu điểm và những hạn chế riêng.

Hiện nay, phương pháp phân tích sắc ký lỏng khối phổ với những đặc điểm ưu việt và độ chính xác cao đang được coi là phương pháp phân tích có giá trị pháp lý để phát hiện và định lượng nồng độ ochratoxin ở lượng vết hay siêu vết [1,2,3,4,5].

## 2. HÓA CHẤT VÀ THIẾT BỊ

**2.1 Hóa chất:** Tất cả các loại hóa chất đều thuộc loại hóa chất tinh khiết phân tích dùng cho sắc ký của hãng Merck (Đức): Acetonitril, methanol, n-hexan, acid acetic...

Các chất chuẩn được cung cấp bởi hãng Supelco.

**2.2 Trang thiết bị:** Hệ thống sắc ký lỏng khối phổ khối phổ LC/MS/MS bao gồm: HPLC 20 AXL của Shimadzu và khối phổ ABI 5500 QQQ của Applied Biosystem. Cột sắc ký loại C18 (250mm x 4,6mm x 5µm) của Waters. Pha động gồm amoniacetate 10mM và methanol, tốc độ pha động 1,0 ml/phút.

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1 Tối ưu điều kiện máy LC/MS/MS

#### 3.1.1 Điều kiện khối phổ

Điều kiện phân mảnh, điều kiện của nguồn và khí được tự động tối ưu trên hệ thống MS thu được các ion con đặc trưng (bảng 1)

Mảnh ion con m/z có cường độ lớn nhất được chọn dùng để định lượng, mảnh ion con thứ 2 có cường độ thấp hơn dùng để xác nhận chất phân tích

*Bảng 1: Các thông số tối ưu cho ESI-MS/MS*

| Chất         | Ion mẹ | Ion con | DP (V) | CE (V) | CXP (V) |
|--------------|--------|---------|--------|--------|---------|
| Ochratoxin A | 402    | 358     | -100   | -24    | -25     |
|              |        | 166,9   |        | -35    | -25     |
| Ochratoxin B | 368    | 324     |        | -24    | -21     |
|              |        | 220     |        | -32    | -15     |

### 3.1.2 Điều kiện sắc ký:

Ochratoxin A và B tách khỏi nhau khi được rửa giải theo chế độ gradient. Chương trình gradient tối ưu được đưa ra

trong bảng 2 .Các thu pic được cân đối các chất được tách ra khỏi nhau, pic thu được không bị tù, không bị chẻ

*Bảng 2: Chương trình gradient tối ưu*

|                                              |      |     |     |      |    |
|----------------------------------------------|------|-----|-----|------|----|
| Thời gian (phút)                             | 0,01 | 4   | 6   | 6,01 | 10 |
| % CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub><br>10mM | 95   | 0   | 0   | 95   | 95 |
| % MeOH                                       | 5    | 100 | 100 | 5    | 5  |

Nồng độ amoni acetat ảnh hưởng đến khả năng tách và tín hiệu của các ochratoxin. Khảo sát nồng độ amoniacetat trong pha động trong khoảng 5mM – 0,1%.

Khi nồng độ amoniacetate cao, số lượng ion đi vào buồng ion của detector MS tăng, gây cạnh tranh với các ion của chất phân tích, làm giảm tín hiệu. Đồng thời nồng độ muối cao sẽ gây hại đến hiệu lực và tuổi thọ của cột. Tại nồng độ amoniacetate 10 mM các chất đều cho tín hiệu cao nhất, hình dạng pic đẹp, không bị chẻ, doãng chân.

### 3.2. Tối ưu hóa điều kiện xử lý mẫu

Tiến hành khảo sát quá trình chiết các ochratoxin: Cân chính xác khoảng 5g mẫu ngô đã đồng nhất vào ống ly tâm 50 ml. Thêm 100 µl chuẩn hỗn hợp 100 ng/ml, thêm 30 ml CHCl<sub>3</sub>, lắc xoáy. Lấy lớp hữu cơ sang ống ly tâm khác, thêm

10ml NaHCO<sub>3</sub> 1%, lắc xoáy, ly tâm 6000v/p trong 3 phút. Lấy lớp nước đem qua cột chiết pha rắn C18. Cột chiết pha rắn được hoạt hóa bằng 5ml MeOH, 5 ml H<sub>2</sub>O. Sau đó, cột chiết được rửa tạp bằng 2 ml H<sub>2</sub>O, 2 ml MeOH:H<sub>2</sub>O (6:4). Chất phân tích được rửa giải bằng 2 ml MeOH:CH<sub>3</sub>COOH (99,5:0,5, v/v). Dịch rửa giải được bơm vào hệ thống LC-MS/MS.

Khảo sát các thể tích chloroform 5, 10, 15ml dùng cho quá trình chiết cho thấy: khi sử dụng 15,0ml CHCl<sub>3</sub>, chiết một lần, hiệu suất chiết đạt 64%-70%, nếu tiến hành lặp lại lần hai hiệu suất đạt 82%-84% , nếu tiếp tục chiết lần ba hiệu suất chiết cũng chỉ đạt 82%.Do đó để tiết kiệm dung môi, chọn chiết lặp 2 lần mỗi lần 15 ml CHCl<sub>3</sub>.

Vì Ochratoxin có tính axit yếu nên chọn 2 loại cột để khảo sát: cột C18 và cột

Polydivinylbezen-N-vinylpyrrolidon HLB Oasis (hydrophile lyophile balance). Kết quả chỉ ra rằng để chiết Ochratonin A, B việc sử dụng cột chiết pha rắn C18 thì tốt hơn so với cột oasis HLB (74-86%). Cột HLB nhồi các phân tử có hai đầu một đầu ưa nước, một đầu kỵ nước nên có độ phân cực lớn hơn so với cột chiết C18. Trong khi Ochratoxin là chất ít phân cực nên nó bị lưu giữ trên cột C18 tốt hơn cột HLB trong suốt quá trình nạp mẫu lên cột và quá trình rửa giải. Do đó, chọn cột chiết C18 để làm sạch dịch chiết.

Khảo sát các thể tích rửa giải khác nhau là: 1, 2, 6 ml dung dịch MeOH-acid acetic (99,5:0,5, v/v). Dịch rửa giải 6 ml sẽ được đem thổi khô dưới dòng khí N<sub>2</sub>, rồi hòa cạn 1 ml pha động đem đo máy. Kết quả cho thấy khi rửa giải với thể tích 2 ml dung dịch MeOH-acid acetic (99,5:0,5) hiệu suất thu hồi các chất phân tích là cao nhất.

Ochratoxin có độ phân cực trung bình nên pH chiết ảnh hưởng lớn đến khả năng chiết. Acid hóa mẫu bằng HCl để tạo các pH khác nhau từ 1-10. Kết quả cho thấy ochratoxins chỉ được chiết tốt vào cloroform trong môi trường axit. Tại môi trường pH=1-2 ochratoxins ở trạng thái đẳng điện, dạng cation và anion ngang bằng, dẫn đến khả năng phân cực giảm. Do đó giúp nó dễ tan vào trong các loại dung môi không phân cực như cloroform. Mặt khác việc axit hóa còn giúp làm ẩm cơ chất, giúp chiết mẫu vào môi trường hữu cơ triệt để hơn.

### 3.3 Đánh giá phương pháp

*Khoảng tuyến tính và đường chuẩn:* Diện tích pic Ochratoxin tuyến tính với nồng độ trong khoảng 1-500 ng/ml với hệ số tương quan  $R^2 > 0,999$ .

*Giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ) của phương pháp:* Giới hạn phát hiện của các Ochratoxin là 0,1 ng/ml và giới hạn định lượng là 0,3 ng/ml

*Đánh giá độ chụm (độ lặp lại) và độ đúng (độ thu hồi):* Theo kết quả thực nghiệm hiệu suất thu hồi đạt 76% - 79%, hệ số biến thiên CV từ 7,2 - 11% tại 3 mức thêm chuẩn 2,5; 5; 10 ng/ml. Các kết thu được đáp ứng theo qui định của Châu Âu 2002/657/EC.

### 3.4 Phân tích mẫu thực

Sau khi nghiên cứu các điều kiện tách chiết, chúng tôi tiến hành phân tích trên các mẫu thực khác nhau. Các mẫu chúng tôi tiến hành khảo sát bao gồm: ngũ cốc và các sản phẩm chế biến từ ngũ cốc và các loại rượu lên men. Các mẫu được đồng nhất, sau đó được đem cân và tiến hành phân tích như qui trình đã tối ưu hóa ở trên. Mỗi mẫu tiến hành làm lặp lại 3 lần, lấy kết quả trung bình và tính độ lệch chuẩn.

Chúng tôi đã tiến hành phân tích trên 20 mẫu rượu nhập ngoại lên men từ hoa quả, xuất xứ Chi Lê, Pháp, Colombia và các mẫu ngô, lạc lấy ngẫu nhiên trên địa bàn các tỉnh Bắc Giang, Thanh Hóa, Nghệ An. Kết quả phát hiện một số mẫu có chứa ochratoxin A, B, tuy nhiên đều ở dưới ngưỡng cho phép. Hiệu suất thu hồi các mẫu thêm chuẩn đều nằm trong khoảng 70-110%.

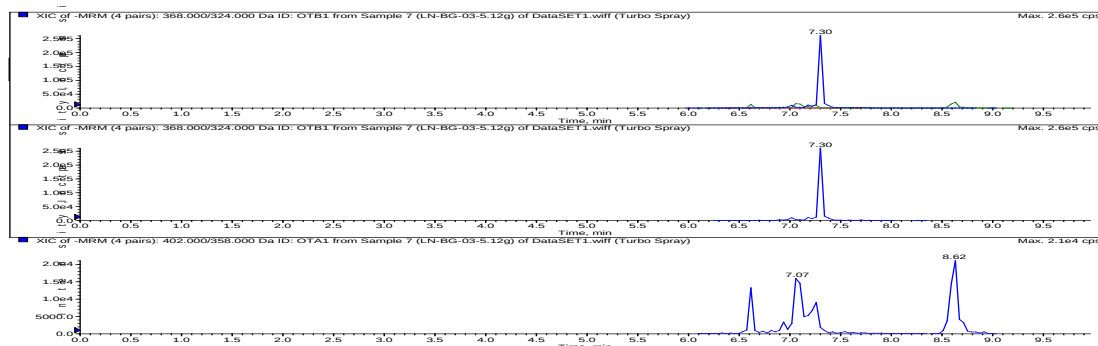
*Bảng 3: Kết quả phân tích mẫu thực tế*

| STT | Đối tượng                  | m (g)<br>/V(ml) | Diện<br>tích<br>OTA | Diện<br>tích<br>OTB | C-OTA<br>(ng/g.<br>ng/ml) | C-OTB<br>(ng/g.<br>ng/ml) |
|-----|----------------------------|-----------------|---------------------|---------------------|---------------------------|---------------------------|
| 1   | Rượu L'estaminet<br>- Pháp | 5               | KPH                 | KPH                 | KPH                       | KPH                       |
| 2   | Rượu Raiz - Chi Lê         | 5               | KPH                 | KPH                 | KPH                       | KPH                       |
| 3   | Rượu Mirabeau-<br>Pháp     | 5               | KPH                 | KPH                 | KPH                       | KPH                       |
| 4   | Rượu Piraat - Bỉ           | 5               | KPH                 | KPH                 | KPH                       | KPH                       |
| 5   | Rượu Bordeaux<br>-Pháp     | 5               | KPH                 | KPH                 | KPH                       | KPH                       |
| 6   | LN-BG-01                   | 5,12            | KPH                 | KPH                 | KPH                       | KPH                       |
| 7   | LN-BG-02                   | 5,24            | KPH                 | KPH                 | KPH                       | KPH                       |
| 8   | LN-BG-03                   | 5,23            | 3500                | KPH                 | <b>3,9</b>                | KPH                       |
| 9   | LC-BG-04                   | 6,12            | KPH                 | KPH                 | KPH                       | KPH                       |
| 10  | LN-BG-05                   | 5,02            | KPH                 | KPH                 | KPH                       | KPH                       |
| 11  | LN-BG-06                   | 5,95            | KPH                 | KPH                 | KPH                       | KPH                       |
| 12  | LN-TH-01                   | 5,78            | KPH                 | KPH                 | KPH                       | KPH                       |
| 13  | LC-TH-02                   | 5,21            | KPH                 | KPH                 | KPH                       | KPH                       |
| 14  | Ngo-TH-03                  | 5,06            | 3700                | 1560                | <b>4,1</b>                | <b>2,2</b>                |
| 15  | LN-TH-04                   | 5,23            | KPH                 | KPH                 | KPH                       | KPH                       |
| 16  | LN-TH-05                   | 5,62            | KPH                 | KPH                 | KPH                       | KPH                       |
| 17  | LN-NA-01                   | 5,14            | KPH                 | KPH                 | KPH                       | KPH                       |
| 18  | LC-NA-02                   | 5,42            | KPH                 | KPH                 | KPH                       | KPH                       |
| 19  | LN-NA-03                   | 5,33            | KPH                 | KPH                 | KPH                       | KPH                       |
| 20  | LN-NA-04                   | 5,27            | KPH                 | KPH                 | KPH                       | KPH                       |

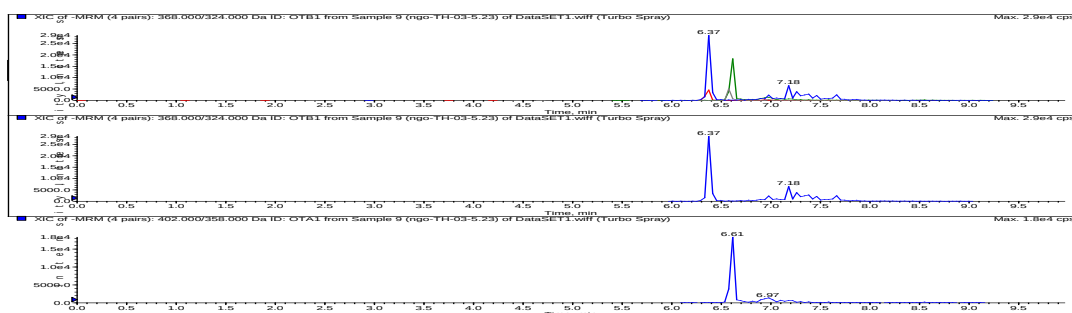
*Ghi chú: LN: lạc nhân, LC: lạc củ, BG: Bắc Giang, TH: Thanh Hóa, NA: Nghệ An*

Kết quả phát hiện 2 mẫu có chứa ochratoxin A, B, tuy nhiên đều ở dưới ngưỡng cho phép. Hiệu suất thu hồi các

mẫu thêm chuẩn đều nằm trong khoảng 70-110%.



Hình 2: Sắc đồ mẫu lạc có Ochratoxin A



Hình 3: Sắc đồ mẫu ngô có Ochratoxin A, B

#### 4. KẾT LUẬN

Từ các kết quả nghiên cứu đã lựa chọn được điều kiện phân tích phù hợp để tách và định lượng đồng thời 2 loại ochratoxin trong các loại ngũ cốc và sản phẩm từ ngũ cốc: Tối ưu hoá điều kiện MS/MS, tối ưu hoá điều kiện chạy sắc ký lỏng hiệu năng cao, khảo sát quy trình xử lý mẫu và thẩm định phương pháp, áp dụng vào phân tích mẫu thực tế.

Thực trạng nhiễm ochratoxins vẫn còn hiện hữu mặc dù đã có những cảnh báo về khả năng nhiễm độc và độc tính cao của loại độc tố này. Kết quả phân tích cho thấy có 2 mẫu nhiễm ochratoxins

trong tổng số 20 mẫu (chiếm 10%). Các mẫu nhiễm ochratoxin A đều nằm trong giới hạn cho phép của Bộ Y tế. Đặc biệt là sự có mặt của ochratoxin B – loại độc chất chưa được nghiên cứu ở Việt Nam và cũng chưa có quy định nào về mức giới hạn cho phép của nó trong thực phẩm.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1.Joan M. Sáez , Ángel Medina, José V. Gimeno-Adelantado, Rufino Mateo, Misericordia Jiménez (2004), “Comparison of different sample treatments for the analysis of ochratoxin

A in must, wine and beer by liquid chromatography”, *Journal of Chromatography A*, 1029, pp. 125–133

2. Eduardo Beltrán, María Ibáñez, Juan Vicente Sancho, Miguel Ángel Cortés, Vicent Yusà , Félix Hernández (2011), “Simultaneous determination of aflatoxin M, ochratoxin A, zearalenoneanda-zearalenol in milk by UHPLC–MS/MS”, *Food Chemistry*, 126, pp.737–744

3.Mario Vega, Katherine Muñoz, Carolina Sepúlveda, Mario Aranda, Victor Campos, Ricardo Villegas Orialis Villarroel (2009), “Solid-phase extraction and HPLC determination of Ochratoxin A in cereals products on Chilean market”, *Food Control*, 20, pp. 631-634.

4.L.C. Huang, N. Zheng, B.Q. Zhen, F. Wen, J.B. Cheng, R.W. Han, X.M. Xu , S.L. Li J.Q. Wang (2013), “Simultaneous determination of aflatoxin M, ochratoxin A, zearalenoneanda-zearalenol in milk by UHPLC–MS/MS”, *Food Chemistry*, 146, pp. 242-249.

5.Lizhi Wang, Zhen Wang, Weiwei Gao, Juan Chen, Meihua Yang, Ying Kuang, Linfang Huang, Shilin Chen (2013), “Simultaneous determination of aflatoxin B and ochratoxin A in licorice roots and fritillary bulbs by solid-phase extraction coupled with high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry”, *Food Chemistry*, 138, pp. 1048-1054.

---

**NGHIÊN CỨU ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ XỬ LÝ 2,4-D.....(tiếp theo tr.114)**

7. Robert Zona, Sonja Solar, Knud Sehested (2012), *OH-radical induced degradation of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T) and 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid (MCPA): A pulse radiolysis and gamma-radiolysis study*, *Radiation Physics and Chemistry*, pp. 152–159, No 81.

8. Valerie J. Brown. *Environmental Health Perspectives. Fe-TAML (2006): Catalyst for Cleanup*, Vol.114, No.11.

9. Y.R. Wang, W. Chu (2012), *Photo-assisted degradation of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid by Fe(II)-catalyzed activation of Oxone process: The role of UV irradiation, reaction mechanism and mineralization*, *Applied Catalysis B: Environmental*, pp.151–161, No 123– 124.