

**ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI**  
**TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC TỰ NHIÊN**

-----

**Nguyễn Thị Hà Bình**

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

**LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC**

**Hà Nội - 2013**

**ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI**  
**TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC TỰ NHIÊN**

-----  
**Nguyễn Thị Hà Bình**

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

Chuyên ngành: Hóa phân tích

Mã số: 60440118

**LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC**

**NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:**

**HDC: TS. LÊ THỊ HỒNG HẢO**

**HDP: PGS.TS NGUYỄN XUÂN TRUNG**

**Hà Nội - 2013**

## **LỜI CẢM ƠN**

Lời đầu tiên cho em gửi lời cảm ơn sâu sắc tới thầy PGS.TS. Nguyễn Xuân Trung, Trường Đại học Khoa học tự nhiên – ĐHQGHN và cô Lê Thị Hồng Hảo, Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm Quốc gia – Bộ Y tế đã tận tình hướng dẫn, đóng góp những ý kiến quý báu, tạo mọi điều kiện giúp đỡ em trong suốt quá trình thực hiện đề tài và viết luận văn.

Em xin bày tỏ lòng biết ơn tới các thầy cô giáo giảng dạy tại khoa Hoá học, đặc biệt là các thầy cô trong bộ môn Hoá Phân Tích, đã cho em những kiến thức quý giá, tạo điều kiện cho em được học tập và nghiên cứu trong môi trường hiện đại.

Tôi xin được gửi lời cảm ơn chân thành tới ban lãnh đạo Viện kiểm nghiệm An toàn vệ sinh thực phẩm Quốc gia đã tạo mọi điều kiện thuận lợi để tôi được học tập và hoàn thành đề tài này.

Tôi cũng xin gửi lời cảm ơn tới các đồng nghiệp tại labo Hóa – Viện kiểm nghiệm An toàn vệ sinh thực phẩm Quốc gia đã giúp đỡ tôi rất nhiều trong quá trình làm thực nghiệm.

Cuối cùng tôi xin gửi lời cảm ơn tới gia đình và bạn bè đã luôn động viên, chia sẻ mọi khó khăn cùng tôi.

*Hà Nội, năm 2013*

Học viên

**Nguyễn Thị Hà Bình**

## MỤC LỤC

<b>MỞ ĐẦU</b> .....	1
<b>Chương 1: TỔNG QUAN</b> .....	4
<b>1.1 Giới thiệu chung [14-15]</b> .....	4
1.1.1 Định nghĩa.....	4
1.1.2 Tính chất hóa lý của Ochratoxins.....	5
<b>1.1.3 Giới hạn tồn dư tối đa cho phép (MRL)</b> .....	7
<b>1.2 Các phương pháp xác định</b> .....	8
<b>1.2.1 Phương pháp ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)</b> .....	8
1.2.2 Phương pháp sắc ký khí (Gas chromatography-GC) .....	9
<b>1.2.3 Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) và cột ái lực miễn dịch (IAC)</b> .....	9
<b>1.2.4 Phương pháp sắc ký lỏng khối phổ</b> .....	10
<b>Chương 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU</b> .....	12
<b>2.1 Đối tượng và nội dung nghiên cứu</b> .....	12
2.1.1 Đối tượng nghiên cứu.....	12
2.1.2 Nội dung nghiên cứu.....	12
<b>2.2 Phương pháp nghiên cứu</b> .....	12
2.2.1 Phương pháp tách chiết mẫu.....	12
2.2.2 Phương pháp sắc ký lỏng khối phổ.....	13
2.2.2.1 Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao.....	13
2.2.2.2 Khối phổ (Mass Spectrometry) .....	15
<b>2.3 Phương tiện nghiên cứu</b> .....	20
2.3.1 Thiết bị, dụng cụ.....	20
2.3.1.1 Thiết bị.....	20
2.3.1.2 Dụng cụ.....	21
2.3.2 Dung môi, hóa chất.....	21
2.3.3 Lấy mẫu.....	22
<b>Chương 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN</b> .....	23

<b>3.1 Tối ưu các điều kiện chạy máy LC-MS/MS.....</b>	<b>23</b>
3.1.1 Tối ưu các điều kiện chạy của máy khối phổ MS/MS.....	23
3.1.1.1 Khảo sát ion mẹ và ion con.....	23
3.1.1.2 Tối ưu các điều kiện MS.....	24
<b>3.1.2 Tối ưu các điều kiện chạy sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).....</b>	<b>26</b>
3.1.2.1 Pha tĩnh.....	26
3.1.2.2 Khảo sát thành phần pha động.....	27
3.1.2.3 Khảo sát tốc độ pha động.....	29
3.1.2.4 Chọn chương trình chạy gradient.....	30
<b>3.2 Tối ưu quy trình xử lý mẫu.....</b>	<b>33</b>
3.2.1 Chọn quy trình xử lý mẫu.....	33
3.2.2 Khảo sát thể tích (số lần chiết) dung môi chiết.....	36
3.2.3 Chọn cột chiết pha rắn.....	36
3.2.4 Khảo sát tốc độ qua cột chiết pha rắn.....	37
3.2.5 Khảo sát thể tích dung môi rửa giải.....	38
3.2.6 Khảo sát ảnh hưởng pH trong quá trình chiết mẫu.....	38
<b>3.3 Thẩm định phương pháp phân tích.....</b>	<b>42</b>
3.3.1 Tính đặc hiệu / chọn lọc.....	42
3.3.2 Giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ).....	44
3.3.3 Xác định khoảng tuyến tính.....	45
3.3.4 Xây dựng đường chuẩn.....	47
3.3.5 Độ chính xác (accuracy) của phương pháp phân tích (độ đúng và độ chụm) [9].....	48
<b>3.4 Phân tích mẫu thực tế.....</b>	<b>52</b>
<b>KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....</b>	<b>57</b>
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO.....</b>	<b>59</b>
<b>PHỤ LỤC.....</b>	<b>63</b>



### DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT

Ký hiệu	Tiếng Anh	Tiếng Việt
CE	Collision energy	Năng lượng va chạm
EI	Electron Ionization	Ion hóa bằng dòng electron
ESI	Eelectrospray ionization	Chế độ ion hóa phun điện tử
EU	European Union	Châu Âu
HPLC	High performance liquid chromatography	Sắc ký lỏng hiệu năng cao
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry	Liên minh quốc tế về hóa học cơ bản và ứng dụng
LOD	Limit of detection	Giới hạn phát hiện
LOQ	Limit of quantity	Giới hạn định lượng
MeOH	Methanol	metanol
MRL	Maximum Residue Limit	Giới hạn dư lượng tối đa
PSA	Primary and secondary amine	Các amin bậc 1, bậc 2
RSD	Relative standard deviation	Độ lệch chuẩn tương đối
SPE	solid phase extraction	Chiết pha rắn
IARC	International Agency for Research on cancer	Tổ chức nghiên cứu ung thư quốc tế
UPLC-MS/MS	Ultral performance liquid chromatography tandem mass spectrometry	Sắc ký lỏng siêu hiệu năng kết nối khối phổ
RF	Fluorescence detector	Huỳnh quang

## **DANH MỤC CÁC BẢNG**

	Trang
Bảng 1.1: Mức dư lượng tối đa cho phép của ochratoxin A ở Việt Nam	7
Bảng 2.1: Bảng pha dung dịch chuẩn chạy máy	22
Bảng 3.1: Ion mẹ của từng chất	23
Bảng 3.2: Các thông số tối ưu cho ESI-MS/MS	23
Bảng 3.3: Các thông số tối ưu MS/MS	26
Bảng 3.4: Chương trình chạy gradient	28
Bảng 3.5: Kết quả khảo sát thành phần pha động	28
Bảng 3.6: Khảo sát các chương trình gradient	31
Bảng 3.7: Chương trình gradient tối ưu	32
Bảng 3.8: Khảo sát quy trình xử lý mẫu	34
Bảng 3.9 : Khảo sát thể tích dung môi chiết	36
Bảng 3.10: Khảo sát cột chiết pha rắn	37
Bảng 3.11: Ảnh hưởng của tốc độ rửa giải tới hiệu suất của quá trình chiết mẫu	37
Bảng 3.12: Kết quả khảo sát thể tích dung dịch rửa giải	38
Bảng 3.13: Ion mẹ và hai ion con của các chất trong nhóm ochratoxins	42
Bảng 3.14: Kết quả xác định LOD, LOQ của ochratoxin A, B	45
Bảng 3.15: Sự phụ thuộc của diện tích pic vào nồng độ	46
Bảng 3.16: Kết quả đánh giá độ chính xác của phương pháp	50



## **DANH MỤC HÌNH VẼ**

	Trang
Hình 1.1: Cấu trúc các ochratoxins	4
Hình 2.1: Mô hình hệ thống LC-MS	11
Hình 2.2: Sơ đồ đơn giản của hệ thống sắc ký lỏng	11
Hình 2.3: Sơ đồ cấu trúc của máy khối phổ MS	13
Hình 2.4: Bộ nguồn ion hoá	14
Hình 2.5: Bộ phân tích tứ cực	16
Hình 2.6: Mô hình bộ phận phân tích rúr cực chập ba	17
Hình 3.1: Sắc đồ tỷ lệ các ion của các ochratoxins	24
Hình 3.2: Sắc đồ của ochratoxin A, B nồng độ 10 ppb khi dung dung môi pha động là $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 10mM	29
Hình 3.3: Sắc đồ rửa giải các chất tại tốc độ dòng 0,8 ml/phút	29
Hình 3.4: Sắc đồ rửa giải các chất tại tốc độ dòng 1,0 ml/phút	30
Hình 3.5: Sắc đồ rửa giải các chất tại tốc độ dòng 1.2 ml/phút	30
Hình 3.6: Sắc đồ khi chạy sắc ký bằng chương trình gradient 1	32
Hình 3.7: Quy trình xử lý mẫu dự kiến	35
Hình 3.8: Đồ thị sự phụ thuộc của diện tích pic vào giá trị pH chiết mẫu	40
Hình 3.9: Quy trình xử lý mẫu tối ưu	41
Hình 3.10: Sắc đồ mẫu trắng	43
Hình 3.11: Sắc đồ mẫu trắng thêm chuẩn 2.5ppb	43
Hình 3.12: Sắc đồ ochratoxins tại LOD	44
Hình 3.13: Đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc của diện tích pic vào nồng độ OTA	46
Hình 3.14: Đồ thị sự phụ thuộc của diện tích pic vào nồng độ OTB	47
Hình 3.15: Đường chuẩn của OTA	47
Hình 3.16: Đường chuẩn của OTB	48
Hình 3.17: Sắc đồ OTs tại mức thêm chuẩn 2,5 ppb	52
Hình 3.18: Sắc đồ mẫu rượu không có ochratoxin A,B	54
Hình 3.19: Sắc đồ mẫu ngô không có ochratoxin A,B	54
Hình 3.20: Sắc đồ mẫu lạc không có ochratoxin A,B	54
Hình 3.21: Sắc đồ mẫu lạc có ochratoxin A	55
Hình 3.22: Sắc đồ mẫu ngô có ochratoxin A,B	55

## MỞ ĐẦU

Vấn đề an toàn vệ sinh thực phẩm ngày càng được quan tâm bởi nó liên quan trực tiếp tới sức khỏe của tất cả người tiêu dùng. Thời gian vừa qua trong nước liên tiếp phát hiện các vụ ngộ độc thực phẩm trong đó có các vụ ngộ độc mycotoxin đặc biệt nghiêm trọng ...đã gây ra tâm lý lo ngại cho người tiêu dùng khi lựa chọn thực phẩm cũng như sử dụng thực phẩm thế nào là đúng cách. Theo thống kê của Cục An toàn thực phẩm về các vụ ngộ độc thực phẩm trong những năm gần đây trên cả nước:

- Năm 2009: Toàn quốc xảy ra 147 vụ ngộ độc thực phẩm, có 5026 người mắc; 3958 người nhập viện; 33 người tử vong.

- Năm 2010: Tình hình NĐTP trong năm 2010 phức tạp. Toàn quốc đã xảy ra 175 vụ ngộ độc trong đó có 34 vụ ngộ độc trên 30 người làm 5664 người mắc 42 trường hợp tử vong, so sánh với số liệu trung bình trên năm của giai đoạn 2006-2009, số vụ ngộ độc giảm 9,1%; số mắc giảm 17,6% và số tử vong giảm 19,2%.

- Năm 2011: 148 vụ, 4700 người mắc, 27 người tử vong.

- Năm 2012: 168 vụ, 5541 người mắc, 34 người tử vong.

Theo TS Trần Quang Trung, Cục trưởng Cục An toàn thực phẩm - Bộ Y tế, trong 9 tháng của năm 2013, cả nước đã có 108 vụ ngộ độc thực phẩm làm hơn 2.800 người mắc, trong đó có 18 ca tử vong. Trong 40 vụ ngộ độc thực phẩm được thống kê trong quý III này thì nguyên nhân do vi sinh vật là 23 vụ, do độc tố tự nhiên 4 vụ, do hóa chất 2 vụ và 11 vụ chưa xác định được nguyên nhân. Các vụ ngộ độc xảy ra khắp nơi, từ gia đình riêng đến tập thể.

Ochratoxin là một loại độc tố được sinh ra bởi các chủng nấm mốc thuộc các giống *Aspergillus ochraceus* và *Penicillium verrucosum* và là loại độc tố có tiềm năng gây ung thư và viêm thận ở người và động vật. Độc tố này đã được phát hiện trên nhiều nông sản khác nhau bao gồm ngũ cốc và các sản phẩm của chúng. Điều đáng lo ngại là khi chúng ta ăn phải thức ăn bị nhiễm ochratoxin nó không gây ngộ

độc cấp tính mà tích lũy dần trong cơ thể - là nguy cơ tiềm ẩn đe dọa sức khỏe cho con người.

Trong số 10.000 loại nấm mốc khác nhau được biết đến thì có khoảng 50 loại là có hại đối với gia súc gia cầm và con người. Các loại nấm này sản sinh ra các độc tố được gọi chung là Mycotoxin... Mycotoxin là chất độc sinh ra từ nấm mốc, được hình thành khi nấm chuyển hóa các chất dinh dưỡng có trong thức ăn và nguyên liệu. Theo tổ chức lương thực và nông nghiệp Liên Hiệp Quốc (FAO), khoảng 25% số ngũ cốc thế giới có chứa một hàm lượng mycotoxin ở một mức độ nào đó. Tùy vào địa lý, khả năng nhiễm mycotoxin lại khác nhau. Ở điều kiện nhiệt đới và cận nhiệt đới, nguy cơ nhiễm mycotoxin càng cao. Đặc thù khí hậu và nền sản xuất nông nghiệp ở Việt Nam tình trạng nhiễm độc tố nấm mốc là khá phổ biến. Sự hình thành nấm mốc và độc tố của chúng có thể bắt đầu từ khi cây còn ở trên đồng, lúc thu hoạch, trong khi bảo quản hoặc ngay cả trong quá trình chế biến thức ăn cho vật nuôi. Như vậy, không nơi nào trên thế giới có thể thoát khỏi nấm mốc và độc tố từ chúng, và tác hại của chúng là vô cùng to lớn đối với năng suất vật nuôi và sức khỏe con người.

Để kiểm soát mức độ nhiễm ochratoxin trong thực phẩm, ở Việt Nam cũng như trên thế giới đã có nhiều phương pháp phân tích được nghiên cứu và ứng dụng. Nhưng với những đặc điểm ưu việt và độ chính xác cao nên các phương pháp phân tích sắc ký lỏng khối phổ 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.

Xuất phát từ tính cấp thiết của xã hội và tính ưu việt của phương pháp phân tích, chúng tôi xây dựng phương pháp nghiên cứu:

***"Xác định hàm lượng Ochratoxin trong thực phẩm bằng phương pháp sắc ký lỏng hai lần khối phổ (LC-MS/MS)".***

Mục tiêu của thực hiện đề tài nghiên cứu là:

1. Xây dựng phương pháp xác định hàm lượng của Ochratoxin trong thực phẩm bao gồm:
  - Khảo sát các điều kiện trên máy sắc ký lỏng hai lần khối phổ

- Khảo sát các điều kiện xử lý mẫu.
  - Thẩm định phương pháp đã xây dựng.
2. Áp dụng phương pháp xác định ochratoxin trong ngũ cốc, sản phẩm từ ngũ cốc, rượu lên men trên thị trường trong nước.

## CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN

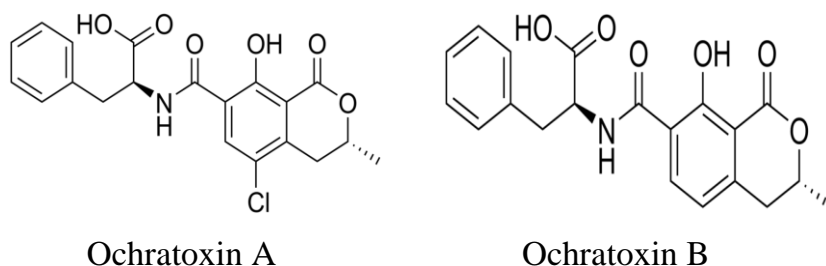
### 1.1. Giới thiệu chung [14-15]

#### 1.1.1. Định nghĩa

Độc tố ochratoxin, là một sản phẩm chuyển hoá thứ cấp của một số loài nấm mốc. Ochratoxin có mặt trong khắp các loại nông sản thực phẩm: ngũ cốc, thảo dược, bia, cà phê... trong các sản phẩm có nguồn gốc động vật do bị lây nhiễm trước. Ochratoxins được biết đến là sản phẩm của các loài nấm *Aspergillus* và *Penicillium* và thường được tìm thấy trong nhiều loại sản phẩm lương thực và thức ăn chăn nuôi.

Ochratoxin A lần đầu tiên được tìm thấy ở nấm mốc *A. ochraceus* vùng Nam Phi bởi Scott (1965) trên hạt lúa bị nhiễm *A. ochraceus*. Ở Đức tìm thấy Ochratoxin thường xuyên trong thịt. Ở Anh, chúng được tìm thấy trong đậu nành, bắp bột, ca cao. M. Nakajima năm 1997 đã ghi nhận tỷ lệ nhiễm 30% ở hàm lượng OTA từ 0.1 – 17,4 µg/kg ở 47 mẫu café được nhập vào Nhật Bản từ các nước Nam Phi, và một số nước ASIAN. Tại Việt Nam, nghiên cứu tiến hành trên 123 mẫu ngô của 2 xã Cán Tỷ và Lũng Tám huyện Quân Bạ tỉnh Hà Giang. Kết quả cho thấy: trong 123 mẫu ngô được phân tích có tới 50 mẫu (40,7 %) phát hiện có ochratoxin A, trong số đó có 2 mẫu (1,6 %) vượt mức dư lượng theo quy định của Bộ Y tế.

Cho tới nay đã phát hiện được 3 loại ochratoxin khác nhau. Trong khuôn khổ luận văn chúng tôi quan tâm nghiên cứu đến ochratoxin A và B



Hình 1.1: Cấu trúc các Ochratoxins

### **1.1.2. Tính chất hóa lý của Ochratoxins**

Ochratoxins là độc tố tinh thể không màu, bền với nhiệt, tan trong dung môi hữu cơ phân cực như chloroform, methanol, ..., ít tan trong nước và tan trong đệm carbonat loãng). Ochratoxins rất bền vững với các xử lý nhiệt và hóa chất. Độc tố được sản sinh nhiều nhất ở nhiệt độ từ 20-25<sup>0</sup>C. Sự sản sinh ochratoxins phụ thuộc chủng nấm mốc, hoạt tính của nước trong hạt, cơ chất, nhiệt độ. Ochratoxins dễ bị phân hủy bởi ánh sáng, trong môi trường kiềm hoặc chất tẩy rửa.

Ochratoxin A phát huỳnh quang và hấp thụ UV cực đại tại 365nm. Ochratoxin A có điểm nóng chảy ở 169<sup>0</sup>C. Phổ hồng ngoại trong cloroform cho các pic có độ dài 3380, 1723, 1678, 1655 cm<sup>-1</sup> OTA có tính axit yếu pK<sub>a1</sub> = 4,2-4,4 và pK<sub>a2</sub> = 7,0-7,3. Ochratoxin A phát huỳnh quang xanh khi dùng thiết bị sắc ký lớp mỏng (TLC) chiếu tia UV ở 366nm.

Ochratoxin B có trọng lượng phân tử 369,37. Ochratoxin B có thể phát huỳnh quang màu xanh khi chiếu tia UV bước sóng 318 nm. Nhiệt độ nóng chảy khoảng 221<sup>0</sup>C.

Cơ chế tác động của ochratoxins: ochratoxins gây ức chế sự vận chuyển của ribonucleic axit (tARN) và các axitamin. Ochratoxins còn ức chế vi khuẩn, nấm men và phenylalanine - tARN ở gan. Tác động làm ức chế sự tổng hợp protein trong tế bào và cơ thể. Sự ức chế miễn dịch của ochratoxin được biểu hiện làm giảm thực bào và ức chế tế bào lympho. Ức chế tương tự như trên các amino axit synlaza tARN tương ứng ochratoxin A gây ức chế hydroxylase phenylalanine, một nửa phenylalanine của ochratoxin A là một phần hydroxyl hóa để tyrosin gây bệnh các tế bào gan trong cơ thể. Ochratoxin ức chế sự tổng hợp ARN làm ảnh hưởng đến các protein trong vòng tuần hoàn. Tác động đến các tế bào màng ti thể và gây ra các hiệu ứng khác nhau trên ti thể. Kích thích sự hình thành ADN trong thận, gan và lá lách. Các ADN này là các sợi đơn bị phá vỡ.

Các nguyên liệu dễ nhiễm độc tố này như cám gạo, lúa mì, bột mì, bắp, đậu nành, cà phê. Dư lượng ochratoxin cũng được tìm thấy trong thịt heo và thịt gia

cầm. Độc tố này gây hại đến gan và thận động vật. Với nồng độ lớn hơn 1 ppm có thể làm giảm sản lượng trứng ở gà đẻ, nồng độ lớn hơn 5 ppm có thể gây nên những tổn thương ở gan và ruột. Tương tự như Aflatoxin, độc tố này cũng gây nên sự giảm sức đề kháng và là tác nhân gây ung thư ở người.

- Gây tổn thương tế bào gan: tất cả các trường hợp xác định sự ngộ độc Ochratoxin đều có bệnh tích giống nhau ở chỗ gan bị hư hại nặng. Tùy theo mức độ nhiễm ít hay nhiều, lâu hay mau mà tình trạng bệnh trên gan khác nhau. Biểu hiện chung là ban đầu gan động vật (điển hình là gà) biến thành màu vàng tươi, mật sưng sau đó gan sưng phồng và bắt đầu nổi các mụn nhỏ trên bề mặt làm cho nó gồ ghề đôi khi có những nốt hoại tử màu trắng, sau cùng do nhiễm khuẩn mà gan trở nên bở và dễ vỡ

- Thận sưng to làm cho việc đào thải chất độc ra khỏi cơ thể trở nên hết sức khó khăn, từ đó làm cho triệu chứng ngộ độc trở nên trầm trọng

- Làm giảm khả năng đề kháng của động vật, ức chế hệ thống sinh kháng thể, có thể gây tử vong cho động vật. Khi nhiễm độc ochratoxin cơ thể rất mẫn cảm với các loại bệnh thông thường

- Bào mòn niêm mạc của ống tiêu hóa do lớp tế bào niêm mạc bị chết bong ra và bị khô lại hình thành nên một lớp màng bọc làm cản trở sự chuyển thức ăn đi trong ống tiêu hóa

- Làm thay đổi hoạt động sinh lý bình thường gây rối loạn sinh sản. Ở thú mang thai có thể gây chết thai. Đối với gia cầm có thể gây tỷ lệ chết phôi ở giai đoạn đầu rất cao, tỷ lệ nở thấp

- Làm giảm tính ngon miệng đối với thức ăn do sự phát triển của nấm mốc làm mất mùi thức ăn

- Làm hư hại các vitamin trong thức ăn do sự lên men phân giải của nấm mốc

- Ngoài các tác hại trên nấm mốc có trong thức ăn còn lên men phân giải các nguồn dưỡng chất (glucid, protein, acid amin, vitamin...) làm cho thức ăn bị giảm

giá trị nghiêm trọng, làm mất mùi tự nhiên, chuyển sang mùi hôi mốc, vật nuôi không thích ăn.

Như vậy có thể nói rằng độc tố nấm gây ra những tác hại rất lớn và hậu quả vô cùng nghiêm trọng cho cơ thể của người và động vật.

Tùy theo từng loại mà độc tố nấm mốc có thể gây nhiễm độc cấp tính và mãn tính. Độc tố nấm mốc ít khi gây ra ngộ độc cấp tính, nó gây hại cơ thể từ từ do đó làm cho chúng ta không hề hay biết. Nhưng khi phát sinh triệu chứng thì những cơ quan bộ phận chúng tấn công đã hư hại nghiêm trọng khó chữa trị. Tuy nhiên, các độc tố nấm mốc trong thức ăn sẽ gây nên những huỷ hoại thầm lặng đối với hệ thống miễn dịch của gia súc, làm cho chúng mắc cảm hơn đối với bệnh.

Khác với bệnh nhiễm trùng là kháng sinh không điều trị được nhiễm độc tố nấm mốc. Cách tốt nhất là ngăn ngừa không cho độc tố nấm mốc nhiễm vào trong thức ăn.

Trên heo: Liều gây chết : LD50 1-6 mg/kg, Ở gà: LD50 3,6 mg/kg đối với gà con 10 ngày tuổi

### **1.1.3. Giới hạn tồn dư tối đa cho phép (MRL)**

- Mức dư lượng tối đa cho phép là giới hạn dư lượng của một loại thuốc, được phép tồn tại về mặt pháp lý hoặc xem như có thể chấp nhận được ở trong nông sản, thức ăn mà không gây hại cho người sử dụng và vật nuôi khi dùng.

**Bảng 1.1: Mức dư lượng tối đa cho phép của Ochratoxin A ở Việt Nam**

Loại	µg/g
Ngũ cốc chưa qua chế biến	5
Hạt cà phê rang, cà phê bột	5
Cà phê uống liền	10
Rượu vang, nước nho ép	2
Thực phẩm dành cho trẻ dưới 36 tháng tuổi	0,5
Gia vị	30
Sản phẩm chiết xuất từ cam thảo	80
Ngũ cốc và bột ngũ cốc	3



Hiện chưa có quy định cụ thể nào về mức MRL cho ochratoxin B kể cả trong nước và tiêu chuẩn Châu Âu (EN).

## **1.2 Các phương pháp xác định**

### **1.2.1 Phương pháp ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).**

Nguyên tắc dựa trên sự kết hợp đặc hiệu giữa kháng nguyên và kháng thể. Ochratoxin chuẩn được cộng hợp với enzyme, tạo thành phức hợp Ochratoxin-enzyme và được sử dụng như một kháng nguyên ở nồng độ nhất định, cạnh tranh với ochratoxin có trong mẫu. Kháng thể đặc hiệu với ochratoxin được gắn lên bề mặt giếng nhựa polystyren. Dịch chiết mẫu trong methanol 70% được trộn cộng hợp với ochratoxin – enzyme và được cho vào giếng có phủ kháng thể, các ochratoxin có trong mẫu (nếu có) sẽ cạnh tranh với phức hợp ochratoxin-enzyme để gắn vào kháng thể cố định trên polystyren. Sau đó rửa sạch các phức hợp thừa, cơ chất phản ứng với enzyme được đưa vào tạo màu. Ở một thời gian sau đó thêm vào dung dịch ngưng phát màu để tạo điều kiện đồng đều về thời gian cho mọi giếng. Tiến hành đo độ hấp thụ của mẫu và dãy chuẩn bằng máy đo màu, từ đó tính được nồng độ của ochratoxin có trong mẫu. Màu càng đậm chứng tỏ cộng hợp ochratoxin – enzyme được giữ trong giếng càng nhiều, đồng nghĩa với nồng độ ochratoxin trong mẫu càng thấp. Ngược lại, màu càng nhạt thì nồng độ Ochratoxin càng cao.

Sử dụng phương pháp ELISA để xác định ochratoxin có thể kể đến một số nghiên cứu sau:

Nhóm tác giả Aihua Zhang, Yanna Ma, Lulu Feng, Ying Wang, Chenghua He, Xichun Wang, Haibin Zhang [14] xác định Ochratoxin trên đối tượng mẫu ngũ cốc nguyên liệu tại Nanjing, Trung Quốc. Phương pháp phân tích có giới hạn phát hiện 0,15 ng/ml. Độ thu hồi của phương pháp đạt từ 87-101% tại mức thêm chuẩn 2,5-10 ppb. Nhóm tiến hành phân tích trên 65 mẫu ngô, gạo, lúa mì. Kết quả cho thấy 8 trong số 22 mẫu lúa mì chứa Ochratoxin A trong khoảng 2- 9 ppb (chiếm 36% tổng số mẫu), 6 trong số 23 mẫu ngô (chiếm khoảng 26% tổng số mẫu) dương

tính với Ochratoxin A trong khoảng 3-23 ppb, 3 trong số 20 mẫu gạo (chiếm khoảng 15% tổng số mẫu) dương tính với Ochratoxin A trong khoảng 2-3 ppb.

Nhóm tác giả Pedro Novoa, Géraud Moulasa, Duarte Miguel Franc, Prazeresb, Virginia Chua, João Pedro Conde [32] đã xác định Ochratoxin trong mẫu rượu với giới hạn phát hiện là 0,85 ng/ml. Ochratoxin được phát hiện trong dung dịch đệm PBS với việc sử dụng cấu hình một kênh thẳng.

Kỹ thuật có ưu điểm: nhanh, đơn giản, tiết kiệm dung môi, đặc hiệu và khá nhạy nhưng so với phương pháp HPLC thì kém hiệu quả hơn do dễ cho kết quả dương tính giả hoặc âm tính giả

### **1.2.2 Phương pháp sắc ký khí (Gas chromatography-GC)**

Phương pháp sắc ký khí đã được một số tác giả ứng dụng để xác định các loại độc tố Ochratoxin. Tuy nhiên phương pháp chỉ phân tích được những chất dễ bay hơi, còn các chất khó bay hơi thì phải tạo dẫn xuất nên tốn thời gian và hóa chất. Hơn nữa, để phân tích được đồng thời các chất thì cần thời gian phân tích dài. Do vậy, phương pháp ít được ứng dụng để phân tích các loại độc tố Ochratoxin này

Tác giả Yuying Jiao và các cộng sự [31] đã tiến hành xác định Ochratoxin trong thực phẩm bằng phương pháp sắc ký khí. Ở đó Ochratoxin A được chuyển thành dạng dẫn xuất ester O-methyl ochratoxin A và được xác định bằng sắc ký khí khối phổ với chế độ ESI âm.

### **1.2.3. Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) và cột ái lực miễn dịch (IAC)**

Giống như ELISA, cột ái lực miễn dịch cũng dựa trên sự kết hợp đặc hiệu giữa kháng nguyên và kháng thể. Kháng thể đặc hiệu với ochratoxin được gắn lên giá rắn của cột sắc ký (thường dùng Sepharose 4B), tạo cho IAC đặc tính vừa tinh sạch vừa cô đặc ochratoxin. Mẫu được chiết với acetonitril/H<sub>2</sub>O, sau đó được pha loãng và cho qua cột ái lực miễn dịch. Cột được rửa sạch những tạp chất không gắn lên kháng thể và được giải hấp bằng methanol. Tiến hành định lượng bằng HPLC với detector huỳnh quang. Bản thân Ochratoxin là chất phát huỳnh quang tại bước

sóng hấp thụ 333 nm, bước sóng phát xạ 460 nm nên đã có rất nhiều nghiên cứu sử dụng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao với detector huỳnh quang để xác định.

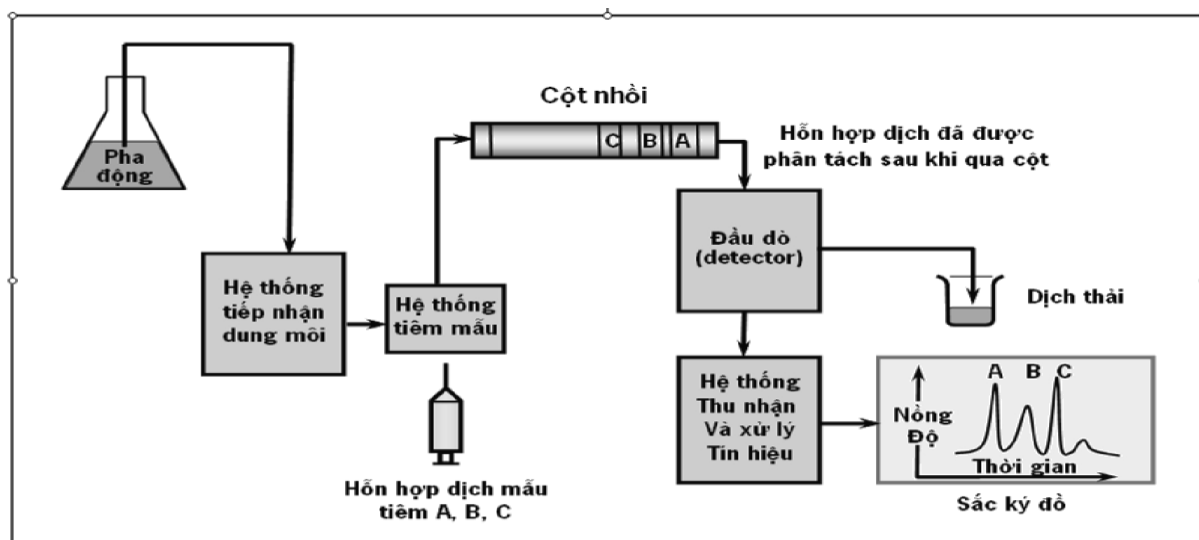
Tác giả Catherine Tessini và cộng sự [18] đã tiến hành thực hiện phân tích 154 mẫu rượu xuất xứ Chi Lê, khảo sát trên cột ái lực miễn dịch với các hệ dung môi khác nhau, giới hạn phát hiện của phương pháp từ 1-9 ppb, hiệu suất thu hồi nằm trong khoảng 60-90%.

Tác giả R. Ghali và cộng sự [27] đã tiến hành thực hiện trên 180 mẫu thực phẩm xuất xứ Tunisia. Mẫu được chiết bằng ACN/H<sub>2</sub>O (80/20) và làm sạch bằng cột ái lực miễn dịch. Độ thu hồi ở mức nồng độ 0,5 và 2 ng/g trong khoảng 84 đến 94 %. Phương pháp có giới hạn phát hiện 0,1 ng/g. Loại mẫu thường bị nhiễm là lúa mạch, lúa mì. Tuy nhiên, khi sử dụng detector huỳnh quang phương pháp có độ nhạy tương đối tốt, nhưng chỉ có thể nhận biết chất phân tích thông qua thời gian lưu. Đối với những nền mẫu phức tạp, các chất phân tích rất dễ bị ảnh hưởng bởi nền mẫu, nếu chỉ dựa vào thời gian lưu sẽ rất khó để có thể khẳng định đúng đắn chất cần phân tích.

#### **1.2.4. Phương pháp sắc ký lỏng khối phổ**

Phương pháp sắc ký lỏng khối phổ, đặc biệt là phương pháp sắc ký lỏng hai lần khối phổ là một kỹ thuật mới được phát triển trong những năm gần đây. Về cơ bản, nó là phương pháp sắc ký lỏng sử dụng bộ phận phát hiện là detector khối phổ. Phương pháp có nhiều ưu điểm như độ chọn lọc cao, giới hạn phát hiện thấp, thời gian phân tích nhanh, có thể định lượng đồng thời các chất có thời gian lưu giống nhau mà phương pháp sắc ký lỏng thường không làm được.

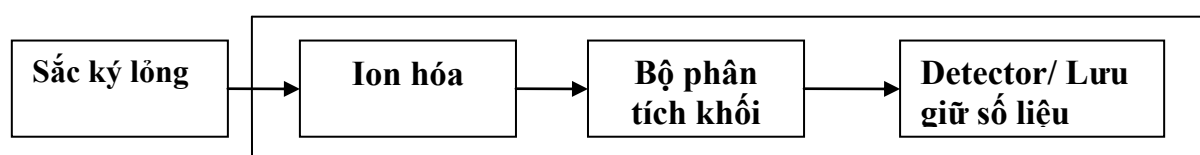
Cơ sở lý thuyết của phương pháp được tóm tắt dưới đây: Cấu trúc của hệ thống LC-MS/MS



Hình 2.1: Mô hình hệ thống LC-MS/MS

#### 1.2.4.1. Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao

Sắc ký là quá trình tách xảy ra trên cột tách với pha tĩnh là chất rắn và pha động là chất lỏng. Mẫu phân tích được chuyển lên cột tách dưới dạng dung dịch. Khi tiến hành chạy sắc ký, các chất phân tích được phân bố liên tục giữa pha động và pha tĩnh. Trong hỗn hợp các chất phân tích, do cấu trúc phân tử và tính chất lí hoá của các chất khác nhau, nên khả năng tương tác của chúng với pha tĩnh và pha động khác nhau. Do vậy, chúng di chuyển với tốc độ khác nhau và tách ra khỏi nhau.



Hình 2.2: Sơ đồ đơn giản của hệ thống sắc ký lỏng.

Trong HPLC, pha tĩnh chính là chất nhồi cột làm nhiệm vụ tách hỗn hợp chất phân tích, đó là những chất rắn, xốp và kích thước hạt rất nhỏ, từ 3 – 7  $\mu\text{m}$ . Tùy theo bản chất của pha tĩnh, trong phương pháp sắc ký lỏng thường chia làm 2 loại: sắc ký pha thường (NP-HPLC) và sắc ký pha ngược (RP-HPLC)

❖ Sắc ký pha thường: pha tĩnh có bề mặt là các chất phân cực (đó là các silica trần hoặc các silica được gắn các nhóm ankyr có ít cacbon mang các nhóm chức phân cực:  $-NH_2$ ,  $-CN...$ ), pha động là các dung môi hữu cơ không phân cực như: n-hexan, toluene....Hệ này có thể tách đa dạng các chất không phân cực hay ít phân cực.

❖ Sắc ký pha ngược: pha tĩnh thường là các silica đã được ankyr hoá, không phân cực, loại thông dụng nhất là  $-C_{18}H_{37}$ , còn pha động phân cực: nước, methanol, axetonitril....Trong rất nhiều trường hợp thì thành phần chính của pha động lại là nước nên rất kinh tế. Hệ này được sử dụng để tách các chất có độ phân cực rất đa dạng: từ rất phân cực, ít phân cực tới không phân cực .

Pha động trong HPLC đóng góp một phần rất quan trọng trong việc tách các chất phân tích trong quá trình sắc ký nhất định. Mỗi loại sắc ký đều có pha động rửa giải riêng cho nó để có được hiệu quả tách tốt

Có thể chia pha động làm hai loại:

❖ Pha động có độ phân cực cao: có thành phần chủ yếu là nước, tuy nhiên để phân tích các chất hữu cơ, cần thêm các dung môi khác để giảm độ phân cực như MeOH, ACN. Pha động loại này được dùng trong sắc ký pha liên kết ngược.

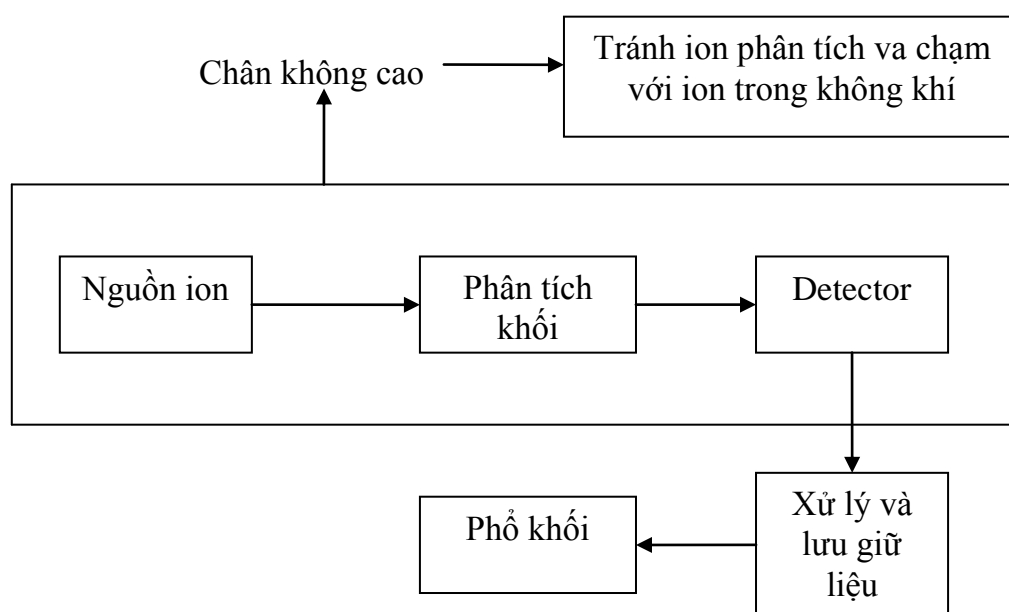
❖ Pha động có độ phân cực thấp: bao gồm các dung môi ít phân cực như cyclopentan, n-pentan, n-heptan, n-hexan, 2-chloropropan, cacbondisulfua ( $CS_2$ ), chlorobutan,  $CCl_4$ , toluene...

Tuy nhiên pha động một thành phần đôi khi không đáp ứng được khả năng rửa giải, người ta thường phối hợp 2 hay 3 dung môi để có được dung môi có độ phân cực từ thấp đến cao phù hợp với phép phân tích. Sự thay đổi thành phần pha động theo thời gian gọi là rửa giải gradient nồng độ.

Detector là bộ phận quan trọng quyết định độ nhạy của phương pháp. Tùy thuộc bản chất lí hoá của chất phân tích mà lựa chọn detector cho phù hợp. Một số loại detector dùng trong HPLC như: Detector quang phổ hấp thụ phân tử (UV-VIS), detector huỳnh quang (RF), detector độ dẫn, detector mảng diot (DAD), detector khối phổ (MS).

#### 1.2.4.2 Khối phổ (Mass Spectrometry)

Khối phổ là thiết bị phân tích dựa trên cơ sở xác định khối lượng phân tử của các hợp chất hóa học bằng việc phân tách các ion phân tử theo tỉ số giữa khối lượng và điện tích ( $m/z$ ) của chúng. Các ion có thể tạo ra bằng cách thêm hay bớt điện tích của chúng như loại bỏ electron, proton hóa,... Các ion tạo thành này được tách theo tỉ số  $m/z$  và phát hiện, từ đó có thể cho thông tin về khối lượng hoặc cấu trúc phân tử của hợp chất.



Hình 2.3: Sơ đồ cấu trúc của máy khối phổ MS.

Cấu tạo của một thiết bị khối phổ bao gồm 3 phần chính: nguồn ion, thiết bị phân tích và bộ phận phát hiện. Trước hết, các mẫu được ion hóa trong nguồn ion, sau đó đưa vào bộ phận phân tích khối để tách các ion theo tỉ số  $m/z$ . Sau đó các ion đi vào bộ phận phát hiện (detector), sẽ được khuếch đại và chuyển thành tín hiệu. Các tín hiệu thu được sẽ chuyển vào máy tính để xử lý và lưu trữ.

#### ❖ Nguồn ion

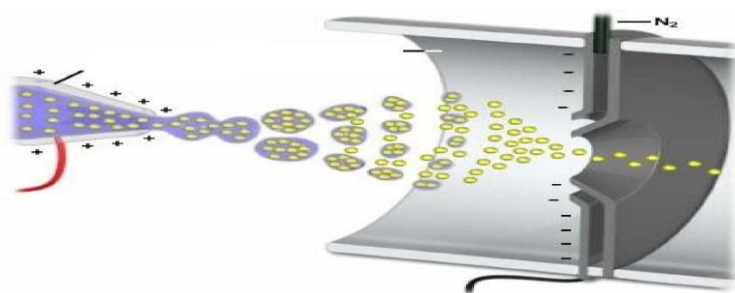
Chất phân tích sau khi ra khỏi cột tách sẽ được dẫn tới nguồn ion để chuyển thành dạng hơi và được ion hóa nguyên tử. Một số kỹ thuật ion hóa thường được sử dụng trong sắc ký lỏng khối phổ như: ion hóa đầu phun điện tử (electrospray

ionization – ESI), ion hóa hóa học ở áp suất khí quyển (atmospheric pressure chemical ionization – APCI).

### **a) Chế độ ion hóa đầu phun điện tử (ESI)**

Kỹ thuật ion hóa phun điện tử bao gồm ba quá trình cơ bản sau:

- + Tạo thành các giọt mang điện tích.
- + Làm giảm kích thước của các hạt, và phân nhỏ các hạt.
- + Quá trình hình thành pha hơi các ion.



Hình 2.4: Bộ nguồn ion hóa.

Khi dung dịch mẫu ra khỏi cột sắc ký, được đưa vào ống mao quản bằng kim loại. Đầu mao quản này được áp điện thế cao (4-6 kV). Khi điện tích dư trên đầu mao quản vượt qua sức căng bề mặt của dịch mẫu thì sẽ tạo thành các giọt mang điện tích. Tiếp đó các giọt mang điện này được làm giảm kích thước nhờ hai quá trình liên tục xảy ra, đó là sự hóa hơi dung môi nhờ dòng khí  $N_2$  được liên tục thổi vào và sự bắn phá của các giọt tích điện cùng nhau. Cuối cùng dẫn đến sự hình thành pha hơi của các ion. Nhờ lực hút tĩnh điện mà các ion này được dẫn vào bộ phân tích khối phổ qua một cửa sổ rất nhỏ. Dung môi và khí trơ  $N_2$  được hút ra ngoài do một dòng khí (Curtain Gas).

Có 2 chế độ bắn phá: bắn phá với chế độ ion dương và ion âm.

- Loại hình thành ion dương.
  - Phù hợp nhất cho phân tích các loại thuốc có tính bazo.
  - Thường hình thành nên ion  $[M+H]^+$ .

- Cũng có thể hình thành ion  $[M+nH]^{n+}$ ,  $[M+Na^+]^+$
- Loại hình thành ion âm.
- Thích hợp nhất cho sự phân tích các loại thuốc có tính axit.
- $[M-H]^-$ ,  $[M-nH]^{n-}$

Đây là kĩ thuật ion hóa mềm, có độ nhạy cao. Kĩ thuật này ứng dụng phân tích các chất không phân cực như: protein, peptit, cacbonhydrat, nucleotit, polyetilen glycol, ... và các chất phân cực có khối lượng phân tử nhỏ.

### **b) Chế độ ion hoá hoá học ở áp suất khí quyển (APCI).**

Chất phân tích và dung môi ở dạng lỏng được chuyển thành các giọt nhỏ rồi hóa hơi ở nhiệt độ cao khoảng 500°C. Một điện thế cao từ 3 – 5kV tạo ra các electron và ion hóa chất phân tích.

Đây cũng là một kĩ thuật ion hóa mềm. APCI được sử dụng để phân tích các chất có khối lượng phân tử trung bình. Kĩ thuật này có thể bắn phá ở 2 chế độ: ion âm và ion dương.

#### **❖ Bộ phận phân tích khối**

Là trái tim của máy khối phổ, có nhiệm vụ phân tách các ion có trị số m/z khác nhau thành từng phần riêng biệt, có nhiều bộ phận tích khối khác nhau như: Bộ phận tích tứ cực, phân tích tứ cực chập ba, phân tích bẫy ion, phân tích thời gian bay... Hiện nay, có ba loại phân tích khối thường được sử dụng nhất, đó là:

- Bộ phận tích tứ cực (Quadrupole Analyser)- Phân giải bằng tổ hợp điện.

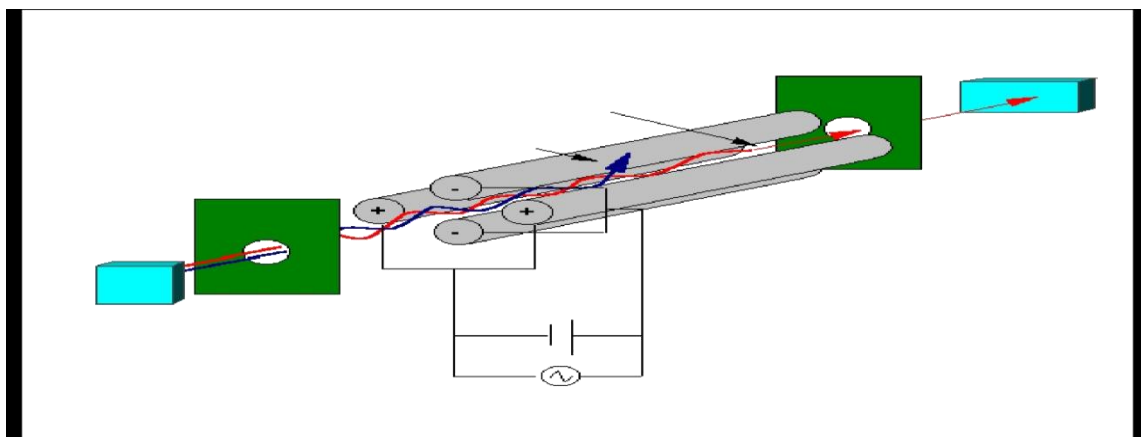
Máy tứ cực dựa trên nguyên tắc các ion có khối lượng khác nhau sẽ dao động khác nhau theo điện áp tổng hợp một chiều và xoay chiều đặt vào môi trường di chuyển của nó.

Máy gồm 4 thanh cực ghép song song nối với nhau từng đôi một đối diện nhau, tạo thành hai cặp, sau đó chúng nối với điện áp một chiều tạo thành 2 cặp dương và âm. Ngoài điện áp một chiều, hai cặp điện cực còn được nối với điện áp xoay chiều. Tổ hợp điện áp này đặc biệt là điện áp xoay chiều sẽ thay đổi theo chu kỳ để quét khối lượng các ion:

+ Ion cộng hưởng



+ Ion không cộng hưởng.



Hình 2.5: Bộ phân tích tứ cực

Một số ion có tỷ số  $m/z$  xác định cộng hưởng với thể xoay chiều xác định có thể đi thẳng qua khoảng không đến detector. Trong khi đó các ion khác không sẽ có quỹ đạo không ổn định và chạm với các cực và bị giữ lại ở đó. Tuy nhiên để thu được tất cả các ion ta quét điện áp theo chu kỳ từ zero đến một điện áp nhất định tăng dần sau đó lại trở lại zero, lần lượt các ion sẽ vượt qua được tứ cực cũng có khối lượng từ nhỏ đến lớn để đến detector

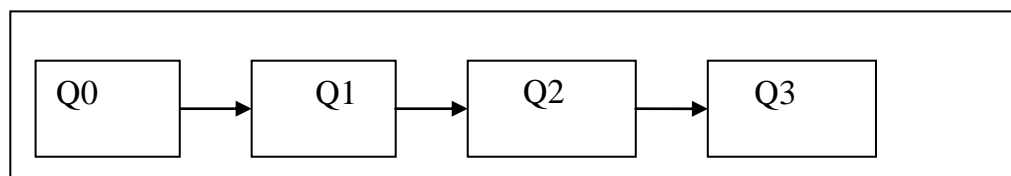
➤ Bộ phân tích tứ cực bẫy ion (Quadrupole Ion-Trap Mass Analyser)

Bẫy tứ cực hoạt động theo nguyên lý bộ phân tích khối tứ cực, chỉ có một điểm khác là các ion được lưu giữ và đưa dần ra khỏi bẫy. Bằng cách thay đổi thể xoay chiều áp vào các cực các ion có tỷ số  $m/z$  khác nhau có thể vượt qua khoảng không để đến detector. Các ion này cũng có thể bị bắn phá trong bẫy để thu được các ion con. Về nguyên tắc loại phân tích khối phổ bẫy ion có thể làm đến MS nhiều lần.

Loại thiết bị này bao gồm một điện cực vòng (*ring electrode*) với nhiều điện cực bao xung quanh, điện cực đầu cột (*end-cap electrode*) ở trên và ở dưới. Trái với lại thiết bị tứ cực ở trên, các ion sau khi đi vào bẫy ion theo một đường cong ổn định được bẫy lại cho đến khi một điện áp RF được đặt trên điện cực vòng. Các ion khác nhau  $m/z$  sau đó trở nên không ổn định và sẽ có hướng đi về phía detector. Do điện áp RF khác nhau trong hệ thống này mà thu được một phổ khối lượng đầy đủ.

- Bộ phân tích tứ cực chập ba (triple Quadrupole Analyser).

Gồm ba tứ cực ghép nối với nhau.



Hình 2.6: Mô hình bộ phân tích tứ cực chập ba

Trong đó:

Q0: Nguồn ion mẹ.

Q1: Bộ tứ cực thứ nhất, có nhiệm vụ tách các ion. Lựa chọn ion mẹ với  $m/z$  nhất định từ nguồn ion chuyển đến để chuyển đến Q2.

Q2: Bộ tứ cực thứ hai, ở điều kiện áp suất cao, các ion mẹ bị phân li do va chạm với khí trơ có mặt như khí  $N_2$ , Ar, He. Bộ Q2 tạo ra phân ly do các ion mẹ bị phân mảnh tiếp theo tạo ra các ion nhỏ hơn, ion con (daughter ions). Q2 không đóng vai trò là bộ lọc ion mà nó chấp nhận tất cả các ion do Q1 chuyển đến. Sau đó tất cả các ion con được chuyển qua bộ tách Q3.

Q3: Bộ tứ cực thứ ba làm nhiệm vụ tách các ion được chuyển từ Q2 để đi tới bộ phận phát hiện.

Thiết bị khối phổ ba tứ cực thường được gọi là máy khối phổ hai lần (LC-MS/MS).

#### ❖ Bộ phận phát hiện.

Sau khi đi ra khỏi thiết bị phân tích khối lượng, các ion được đưa tới phần cuối của thiết bị khối phổ là bộ phận phát hiện ion. Bộ phận phát hiện cho phép khối phổ tạo ra một tín hiệu của các ion tương ứng từ các electron thứ cấp đã được khuếch đại hoặc tạo ra một dòng do điện tích di chuyển. Có hai loại bộ phận phát hiện phổ biến: bộ phận phát hiện nhân electron (electron multiplier) và bộ phận phát hiện nhân quang (photo multiplier).

Bộ phận phát hiện nhân electron là một trong những detector phổ biến nhất, có độ nhạy cao. Một ion đập vào bề mặt diot làm bật ra các electron. Các electron

thứ cấp sau đó được dẫn tới các diot tiếp theo và sẽ tạo ra electron thứ cấp nhiều hơn nữa, tạo thành dòng các electron ( $1-10^6$ )

Bộ phận phát hiện nhân quang cũng giống như thiết bị nhân electron, các ion ban đầu đập vào một diot tạo ra dòng các electron. Khác với detector nhân electron, các electron sau đó sẽ va đập vào một màn chắn photpho và giải phóng ra các photon. Các photon này được phát hiện bởi một bộ nhân quang hoạt động như thiết bị nhân electron. Số lượng các photon tỷ lệ với cường độ tín hiệu. Ưu điểm của phương pháp này là các ống nhân quang được đặt trong chân không nên loại bỏ được các khả năng nhiễu bẩn.

R. Vatinnoa, D. Vuckovica, C.G. Zamboninb, J. Pawliszyna [28] đã tiến hành xác định Ochratoxin trong 96 mẫu nước tiểu bằng phương pháp vi chiết pha rắn kết hợp với sắc ký lỏng khối phổ. Mẫu được chỉnh pH về 3 bằng đệm photphatsalin 0,5 M trước khi vi chiết pha rắn. Chương trình sắc ký lỏng được gradient ở khoảng 8 phút đã có thể cho ra chất phân tích với tín hiệu tốt. Độ thu hồi, độ chụm được tiến hành đo ở 3 mức nồng độ 1, 10, 50 ng/ml. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng ở trong nước tiểu tương ứng là 0,3 và 0,7 ng/ml. Cột sắc ký sử dụng là cột C18 – Waters, tốc độ dòng 0,5 ml/phút. Pha động: 90% kênh A (nước, acetonitril, acetic acid 90:10:0,1) trong 1 phút, tăng tỷ lệ 60% A/40%B (acetonitril và acetic acid 100:0,1) trong 6 phút, đưa về 90% B ở giây tiếp theo và giữ trong vòng 1 phút. Tổng thời gian chạy sắc ký là 8 phút. Detector khối phổ thực hiện ở chế độ ion âm, IS=-4V, nhiệt độ nguồn 400°C, với ochratoxin A có các thông số tương ứng: DP=-20V, FP=-74V, EP=-8,6, CE=-25V, CXP=-9,5V, với ochratoxin B có các thông số tương ứng: DP=-20V, FP=-86, EP=-8,6, CE=-44,41V, CXP=-15,11V. Ion định dạng: OTA: m/z 402.1->357.9, OTB: m/z 368.0->133.1. ở trong nghiên cứu này tác giả coi ochratoxin B như là một nội chuẩn, được thêm vào từ đầu để kiểm soát hiệu suất thu hồi. Đầu vi chiết pha rắn được nhúng vào 1 ml mẫu ở tốc độ khuấy 850 rpm, thời gian hấp thụ và giải hấp thụ là 1 giờ 15 phút. Phương pháp có ưu điểm tính tự động hóa cao, ít độc hại cho người phân tích.

Tại Viện nghiên cứu thuốc trừ sâu và nước, Đại học Jaume, Tây Ban Nha, nhóm tác giả Eduardo Beltrán [20] đã nghiên cứu xác định một số mycotoxin trong thực phẩm và sữa bằng sắc ký lỏng khối phổ. Mẫu được chiết bởi acetonitril: nước (80:20), làm sạch mẫu bằng cột ái lực miễn dịch (Aflaochra HPLCTM) được cung cấp bởi Vicam (Tecasa, Madrid, Tây Ban Nha). Phương pháp cho độ thu hồi 80-110% tại mức thêm chuẩn 0,025 và 0,1 ng/g, RSD nhỏ hơn 15%.

Với những ưu điểm trên, chúng tôi đã chọn phương pháp sắc ký lỏng khối phổ để nghiên cứu xác định các loại độc tố ochratoxins có trong sản phẩm rượu và các loại ngũ cốc và các sản phẩm làm từ ngũ cốc.

## **CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **2.1. Đối tượng và nội dung nghiên cứu**

#### **2.1.1. Đối tượng nghiên cứu**

- Ochratoxin là độc tố gây tác hại vào các cơ quan quan trọng của cơ thể như: thần kinh, gan, thận và hệ miễn dịch. Ochratoxin A gây hậu quả nghiêm trọng đối với người và động vật nuôi ở nồng độ cực thấp (ppb). Ochratoxin B có tính độc ít hơn ochratoxin A, tuy nhiên chúng đều là chất độc thuộc nhóm IIB theo Tổ chức nghiên cứu ung thư Quốc tế IARC.

- Nền mẫu phân tích: ngũ cốc và các sản phẩm từ ngũ cốc, các loại rượu lên men.

#### **2.1.2. Nội dung nghiên cứu**

Nội dung nghiên cứu bao gồm:

➤ Tối ưu hóa điều kiện chạy máy xác định độc tố Ochratoxin có trong sản phẩm rượu lên men, ngũ cốc và sản phẩm từ các loại ngũ cốc bằng phương pháp sắc ký lỏng khối phổ (LC-MS/MS).

➤ Xây dựng quy trình tách chiết chất phân tích.

➤ Thẩm định phương pháp:

- ✓ Độ đặc hiệu/chọn lọc của phương pháp.
- ✓ Giới hạn phát hiện LOD, giới hạn định lượng LOQ
- ✓ Khoảng tuyến tính.
- ✓ Độ chính xác của phương pháp (độ đúng và độ chụm)

➤ Áp dụng phương pháp để xác định Ochratoxins trong các loại mẫu thực phẩm, rượu lên men.

### **2.2. Phương pháp nghiên cứu**

#### **2.2.1. Phương pháp tách chiết mẫu**

Chọn dung môi dễ hoà tan chất phân tích để chiết chất phân tích ra khỏi nền mẫu. Dung môi đó có thể là: chloroform, methanol, dung dịch cacbonate loãng,... Vì loại dung môi này thường kéo theo rất nhiều chất tạp khác có tính chất

tương tự chất phân tích bị chiết vào nên rất cần loại bớt các chất tạp này. Chiết pha rắn là một phương pháp chuẩn bị mẫu để là giàu và làm sạch mẫu phân tích từ dung dịch bằng cách hấp phụ lên cột chiết pha rắn. Sau đó chất phân tích được rửa giải bằng một lượng nhỏ dung môi thích hợp.

### **2.3. Phương tiện nghiên cứu**

#### **2.3.1. Thiết bị, dụng cụ**

##### *2.3.1.1. Thiết bị*

- Hệ thống sắc ký lỏng khối phổ khối phổ LC-MS/MS của Shimadzu bao gồm:
  - + Máy sắc ký lỏng của Shimadzu. Model 20 AD-UFLC.
  - + Máy khối phổ.
    - Nước sản xuất: Mỹ
    - Model: AB sciex Triplequad 5500
- Cột sắc ký: Water- cột C<sub>18</sub> (250mm × 2,1mm × 5μm) và tiền cột C<sub>18</sub> (4mm × 2,1mm × 3μm)
- Máy lắc Vortex.
- Cân phân tích (có độ chính xác 0,1mg và 0,01mg) (Mettler Toledo).
- Cân kỹ thuật (có độ chính xác 0,01g) (Mettler Toledo).
- Máy cắt quay chân không (Eyela).
- Bộ chiết pha rắn (Supelco) và máy hút chân không (New Askir 30).
- Bộ thổi khô (OA-Sys).

##### *2.3.1.2. Dụng cụ*

- Bình định mức: 5, 10, 50, 100 ml.
- Ống ly tâm 50 ml
- Bình cô quay 50 ml, 100 ml
- Vial loại 1,8 ml.
- Ống đông, phễu, giấy lọc.
- Autopipet loại 200 μl, 1000 μl, 5000 μl, và đầu côn tương ứng.

#### **2.3.2. Dung môi, hóa chất**

Các loại hoá chất sử dụng đều thuộc loại tinh khiết phân tích.

- Chất chuẩn của Supelco
- Methanol (Merk)
- n-hexan (Merk)
- Amoniacetat  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  (Merk)
- Axit acetic (Merk), acetonitril (Merk)
- Nước cất 2 lần

\* Chuẩn bị dung dịch chuẩn.

- Dung dịch chuẩn trung gian 500  $\mu\text{g/l}$ : Lấy chính xác khoảng 10 $\mu\text{l}$  chất chuẩn lần lượt của từng chuẩn gốc có nồng độ 50000  $\mu\text{g/l}$  vào một vial màu nâu nắp kín, thổi khô, hoà tan căn trong 1 ml MeOH. Chuẩn gốc được bảo quản ở nhiệt độ từ 0 – 5°C, trong 6 tháng.

- Dung dịch chuẩn hỗn hợp làm việc: được pha tùy vào mục đích xây dựng khoảng đường chuẩn, thông thường nồng độ chuẩn được pha trong khoảng nồng độ từ 2,5  $\mu\text{g/l}$  - 50  $\mu\text{g/l}$

***Bảng 2.1: Bảng pha dung dịch chuẩn chạy máy***

Nồng độ hỗn hợp chuẩn làm việc ( $\mu\text{g/l}$ )	500	50	50	50	25
Thể tích lấy chuẩn làm việc ( $\mu\text{l}$ )	100	100	500	200	100
Định mức (ml)	1	1	1	1	1
<b>Nồng độ chuẩn (<math>\mu\text{g/l}</math>)</b>	<b>50</b>	<b>5</b>	<b>25</b>	<b>10</b>	<b>2,5</b>

### 2.3.3 Lấy mẫu

- Đối tượng mẫu: các loại ngũ cốc: ngô, lạc, đỗ, gạo,..., các loại rượu
- Phương pháp lấy mẫu: ngẫu nhiên

- Địa điểm: một số chợ trên địa bàn nội thành Hà Nội, Bắc Giang, Thanh Hoá, Nghệ An.

- Khối lượng mẫu lấy: 100 – 500 g/mẫu

- Bảo quản: nhiệt độ thường



### CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1 Tối ưu các điều kiện chạy máy LC-MS/MS

##### 3.1.1 Tối ưu các điều kiện chạy của máy khối phổ MS/MS

###### 3.1.1.1 Khảo sát ion mẹ và ion con

Vì ochratoxin A, B là những chất có khối lượng phân tử không lớn và độ phân cực trung bình. Qua tham khảo tài liệu chúng tôi tiến hành khảo sát xác định các ochratoxin bằng kỹ thuật ion hóa phun điện tử ESI với chế độ bắn phá ion âm. Để tối ưu hóa điều kiện khối phổ, dùng xilanh bơm hỗn hợp 2 chất chuẩn 50 ng/ml tiêm trực tiếp vào detector khối phổ để khảo sát. Chọn chế độ khảo sát tự động đối với từng chất để chọn được ion mẹ, ion con dùng để định lượng và định tính đối với từng chất.

Ion mẹ của từng chất được chỉ ra ở bảng 3.1.

**Bảng 3.1: Ion mẹ của từng chất**

Chất	Khối lượng phân tử (g/mol)	Ion mẹ (m/z)
Ochratoxin A	403	402 [M-H] <sup>-</sup>
Ochratoxin B	369	368[M-H] <sup>-</sup>

**Bảng 3.2 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

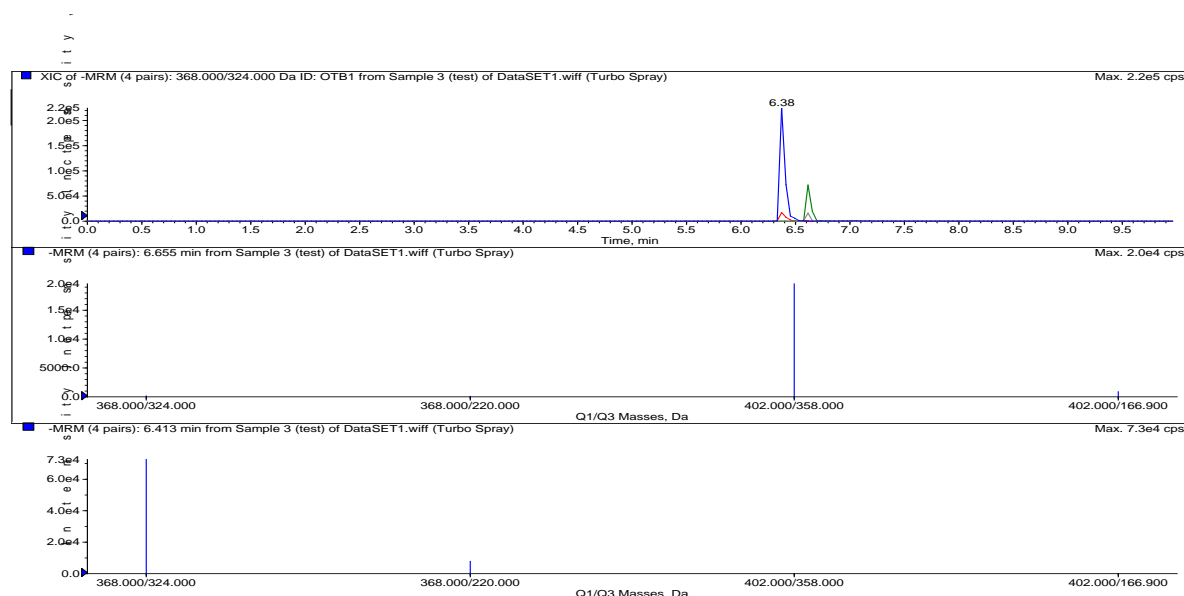
Trong đó:

+ DP (Declustering Potential): Thế đầu vào, thế áp vào màn chắn của bộ phận phân tích khối. Nó có tác dụng bẻ gãy cụm ion  $[M+H_3O]^+$  và khử nhiễu hóa học tạo thành, làm tăng độ nhạy của phép phân tích. Tuy nhiên, thế này cũng không được quá cao, vì nó có thể bẻ gãy luôn cả cấu trúc của phân tử ion mẹ.

+ CXP (Collision Cell Exit Potential): Thế áp giữa bộ tứ cực Q2 và Q3.

+ CE (Collision Energy): Là năng lượng va chạm được tạo ra do thế áp vào bộ tứ cực Q2, tạo ra năng lượng để phân mảnh ion mẹ.

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



Hình 3.1: Sắc đồ tỷ lệ các ion của các ochratoxins

Kết luận: Sau khi tiến hành khảo sát, chúng tôi chọn được ion mẹ và ion con thích hợp cho các ochratoxins tại các điều kiện MS như ở bảng trên.

### 3.1.1.2 Tối ưu các điều kiện MS

Để tối ưu hóa điều kiện MS cho từng chất, chúng tôi sử dụng kỹ thuật FIA, nghĩa là hỗn hợp chuẩn được bơm trực tiếp vào máy MS mà không qua bộ HPLC với điều kiện như sau: Pha động là amoni acetate 10 mM : methanol (95/5), hỗn hợp chuẩn có nồng độ 50 ppb, thể tích bơm 10  $\mu$ l, thời gian 1 phút. Chọn chế độ khảo sát tự động đối với từng ion con định lượng và định tính của từng chất.

✚ Các thông số cho bộ phận tạo nguồn ion.

+ IS (IonSpray Voltage): Thế ion hóa, thế này được áp lên đầu phun và màn chắn của bộ phận phân tích ion. Thế này sẽ quyết định loại ion chuyển đến bộ phận phân tích khối. Đối với loại ion dương 4000 – 5500V, ion âm (-)3000 – (-)4000V.

+ GS1 (Ion Source Gas 1): Tạo áp suất khí hai bên đầu phun, có tác dụng làm cho sự hình thành nên các giọt được dễ dàng hơn. Tốc độ khí của Gas 1 thường cao hơn so với Gas 2.

+ TEM ( Temperature): Nhiệt độ của nguồn khí nóng thổi vào (Gas2). Nó thúc đẩy quá trình hóa hơi các giọt chất phân tích khi đi ra khỏi đầu phun.

+ GS2 (Ion Source Gas 2): Tạo áp suất của luồng khí nóng, hỗ trợ quá trình làm bay hơi dung môi, tăng hiệu quả của quá trình ion hóa.

+ CUR (Curtain Gas): Luồng khí N<sub>2</sub> tinh khiết được thổi vào khe giữa 2 màn chắn của bộ phận ion hóa và bộ phận phân tích phổ. Nó có tác dụng đẩy các giọt dung môi và các phân tử trung hòa, để giữ cho Q<sub>0</sub> (nguồn ion mẹ ) sạch hơn.

✚ Các thông số của bộ phận phân tích khối:

+ DP, CE, CXP như đã giải thích ở trên.

+ EP (Entrance Potential): Thế áp vào nguồn ion mẹ Q<sub>0</sub>.

+ CAD (Collision Gas Pressure): Kiểm soát áp suất khí N<sub>2</sub> trong bộ tứ cực Q<sub>2</sub>, thúc đẩy quá trình phân mảnh thứ cấp, ngoài ra còn có tác dụng làm mát các ion con và hướng chúng đến bộ tứ cực Q<sub>3</sub>.

Tự động khảo sát các thông số cho từng chất trên với các giá trị như sau:

- ✓ IS (V): -4000,0; 4500,0; -3500,0; -3000,0;
- ✓ TEM (°C) : 250,0; 300,0; 350,0; 400,0;450,0
- ✓ GS1 (psi): 25,0; 30,0; 10,0;15,0
- ✓ GS2 (psi): 8,0; 9,0; 10,0; 5,0; 2,0;
- ✓ CUR (psi): 15,0;20,0; 5,0; 10,0;
- ✓ DP (V) :-110,0; -120,0; -100,0; -90,0; -80,0;
- ✓ EP (V) : -7,0; -8,0; -9,0; -10,0; -11,0;
- ✓ CAD (psi): 7,0; 8,0; 9,0; 5,0; 6,0;

- ✓ CXP (V): -18,0; -21,0; -22,0; -24,0; -26,0; -15,0; -12,0;
- ✓ CE (V): -20,0; -24,0; -28,0; -32,0; -35,0; -40,0; -44,0;

Qua khảo sát ta thu được giá trị tối ưu của từng thông số trên cho cả các chất nghiên cứu. Giá trị được liệt kê trong bảng 3.3

Bảng 3.3: Các thông số tối ưu MS/MS.

Thông số	Ochratoxin A		Ochratoxin B	
	OTA1	OTA2	OTB1	OTB2
EP (V)	-5	-5	-12	-11
CE (V)	-24	-35	-24	-32
CXP (V)	-25	-25	-21	-15
IS (V)	-3500		-3500	
TEM (°C)	400		400	
GS1 (psi)	10		10	
GS2 (psi)	5		5	
CUR (psi)	10		10	
DP (V)	-100		-100	
CAD (psi)	7		7	

Kết luận: Chúng tôi đã tiến hành khảo sát các điều kiện MS và đưa ra được các điều kiện tối ưu như trong bảng trên.

### **3.1.2 Tối ưu các điều kiện chạy sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)**

#### **3.1.2.1 Pha tĩnh**

Cột tách là bộ phận quan trọng của hệ thống sắc ký, nó đóng góp một phần quan trọng trong việc quyết định quá trình tách. Ochratoxin là chất kém phân cực, do đó cột tách được sử dụng là cột pha đảo. Hơn nữa, chất nhồi pha đảo sử dụng hệ dung môi phân cực có tính kinh tế cao, phù hợp với điều kiện của phòng thí nghiệm. Trong nghiên cứu này, chúng tôi chọn cột pha đảo C<sub>18</sub> để tách các chất. Để bảo vệ cột, chúng tôi sử dụng thêm tiền cột. Thông số cột tách và tiền cột:

❖ Cột: Waters- cột  $C_{18}$  ( $250\text{ mm} \times 4,6\text{ mm} \times 5\text{ }\mu\text{m}$ ).

❖ Tiền cột:  $C_{18}$  ( $4\text{ mm} \times 2,1\text{ mm} \times 5\text{ }\mu\text{m}$ ).

### *3.1.2.2 Khảo sát thành phần pha động*

Trong phương pháp sắc ký lỏng khối phổ, pha động không chỉ ảnh hưởng tới quá trình tách các chất mà nó còn ảnh hưởng tới quá trình ion hóa và tín hiệu của chất phân tích. Với kỹ thuật ion hóa phun điện tử bắn phá ở chế độ ion âm, quá trình ion hóa tăng khi có thêm các chất như acid acetic, acid formic, amoni acetate... Trong phương pháp nghiên cứu, pha tĩnh sử dụng là cột  $C_{18}$ , ít phân cực nên pha động phải là hệ dung môi phân cực. Chất tan ít phân cực sẽ bị lưu giữ trong cột lâu hơn chất tan phân cực. Do tính chất phân cực trung bình của Ochratoxin nên chúng tôi chọn pha động trên 2 kênh:

✚ Kênh A: Dung dịch amoniacetate 10 mM.

✚ Kênh B: Methanol.

Chúng tôi tiến hành dùng dung dịch chuẩn hỗn hợp 50 ng/ml để khảo sát dung môi pha động. Hơn nữa để có thể vừa tách được các chất, vừa tiết kiệm được thời gian phân tích và dung môi, chúng tôi tiến hành chạy pha động với chế độ gradient. Các điều kiện chạy máy được cố định như sau:

❖ Cột: Waters- cột  $C_{18}$  ( $250\text{ mm} \times 4,6\text{ mm} \times 5\text{ }\mu\text{m}$ ).

❖ Tiền cột:  $C_{18}$  ( $4\text{ mm} \times 2,1\text{ mm} \times 5\text{ }\mu\text{m}$ ).

❖ Detector: khối phổ với các thông số như bảng 2.2; 2.3.

❖ Pha động: kênh B cố định là Methanol, kênh A lần lượt là  $\text{CH}_3\text{COOH}$  0,1%,  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  10 mM,  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  20 mM,  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  5 mM.

❖ Chương trình gradient:

- Tốc độ dòng 1,0 ml/phút.

Bảng 3.4: Chương trình gradient pha động

Thời gian (phút)	Tỷ lệ (%) kênh B
0,01	5
4	100
6	100
6,01	5
10	5

Kết quả khảo sát dung môi pha động đến thời gian lưu và diện tích pic được chỉ ra ở bảng sau:

Bảng 3.5: Kết quả khảo sát thành phần pha động

Dung môi	Kết quả	Ochratoxin A	Ochratoxin B
CH <sub>3</sub> COOH 0,1%	t (phút)	6,21	6,23
	S <sub>pic</sub>	1,23*10 <sup>4</sup>	4,62*10 <sup>4</sup>
CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> 10mM	t (phút)	<b>6.90</b>	<b>6.70</b>
	S <sub>pic</sub>	<b>1,44*10<sup>4</sup></b>	<b>8,46*10<sup>4</sup></b>
CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> 20mM	t (phút)	7,05	7,01
	S <sub>pic</sub>	1,52*10 <sup>4</sup>	3,25*10 <sup>4</sup>
CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> 5mM	t (phút)	6,92	7,02
	S <sub>pic</sub>	1,2*10 <sup>4</sup>	3,2*10 <sup>4</sup>

Nhận xét: 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 pic, doãng chân pic. Ngoài ra amoniacetate còn không độc hại, dễ sử dụng. Chúng tôi quyết định chọn nồng độ amoniacetate 10 mM. Nồng độ này cũng phù hợp với các hệ LC/MS/MS.

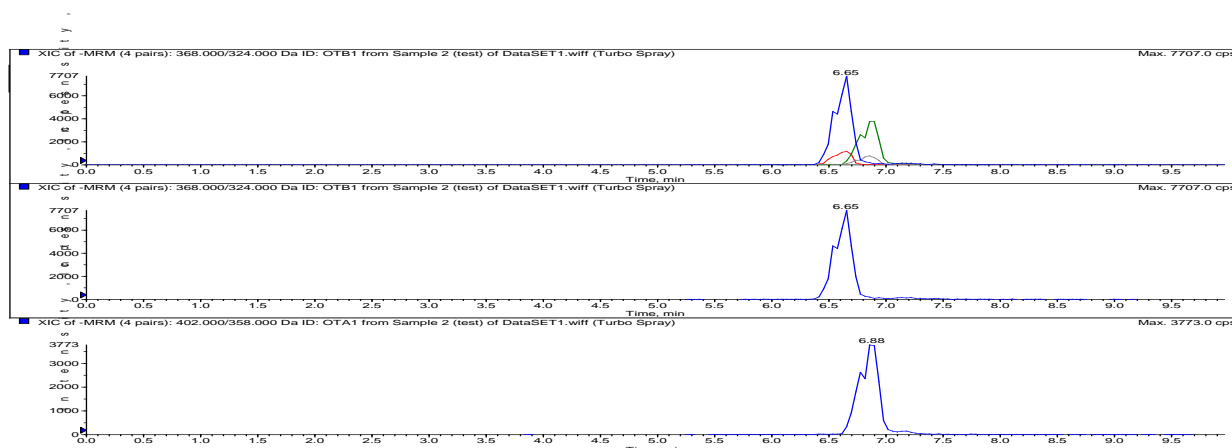


Hình 3.2: Sắc đồ của ochratoxin A, B nồng độ 10 ppb khi dùng dung môi pha động là  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  10 mM

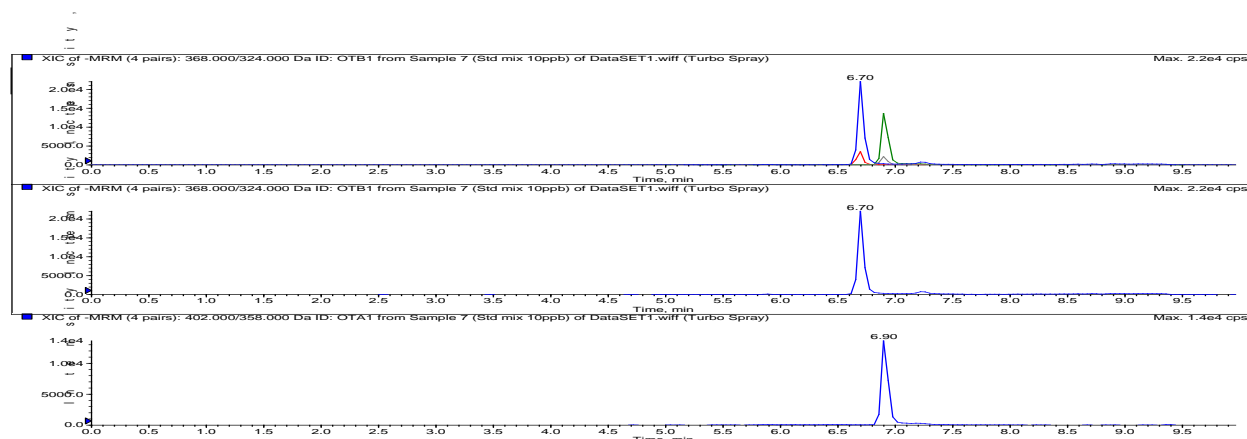
### 3.1.2.3 Khảo sát tốc độ pha động

Tốc độ pha động ảnh hưởng đến thời gian rửa giải và lượng dung môi tiêu tốn. Đặc biệt, với hệ UFLC, tốc độ dòng ảnh hưởng rất nhiều đến sự ổn định của chương trình gradient và độ lặp lại của quá trình sắc ký. Nếu tốc độ quá nhỏ, chương trình gradient sẽ kém ổn định. Tốc độ dòng cao, ảnh hưởng đến áp suất của toàn hệ thống. Cố định các điều kiện:

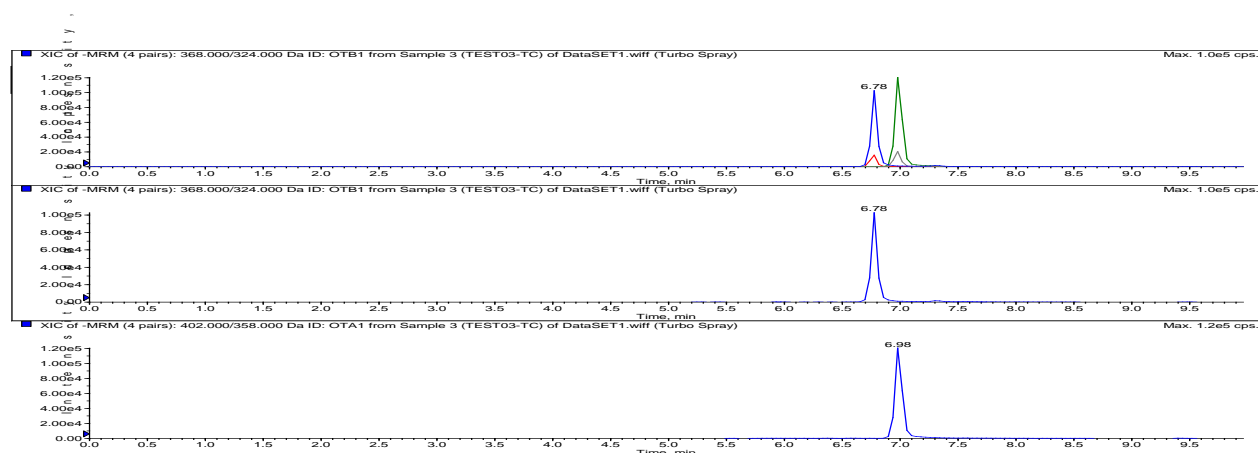
- Cột C18 (250mm  $\times$  2,1mm  $\times$  5 $\mu\text{m}$ )
- Pha động: kênh B (MeOH), kênh A: amoniacetat
- Mẫu phân tích: hỗn hợp chuẩn Ochratoxin A, B nồng độ: 10 ng/ml
- Tốc độ pha động khảo sát lần lượt là: 0,8 ml/phút; 1,0 ml/phút; 1,2 ml/phút.



Hình 3.3: Sắc đồ rửa giải các chất tại tốc độ dòng 0,8 ml/phút



Hình 3.4: Sắc đồ rửa giải các chất tại tốc độ dòng 1,0 ml/phút



Hình 3.5: Sắc đồ rửa giải các chất tại tốc độ dòng 1,2 ml/phút

*Nhận xét:* Khi tăng tốc độ dòng của pha động, các pic sắc ký có xu hướng nhọn và rõ nét. Tại tốc độ dòng 1,2 ml/phút các pic rất sắc và nhọn. Tuy nhiên, tại tốc độ này, áp suất của hệ cao, ảnh hưởng rất lớn đến áp suất đầu vào của cột và làm giảm tuổi thọ của cột. Do đó, chúng tôi quyết định lựa chọn tốc độ dòng 1,0 ml/phút. Tại tốc độ này, các chất bắt đầu được rửa giải trong khoảng từ 6-8 phút, các pic tách tốt, hình dạng pic sắc nhọn.

#### 3.1.2.4 Chọn chương trình chạy gradient

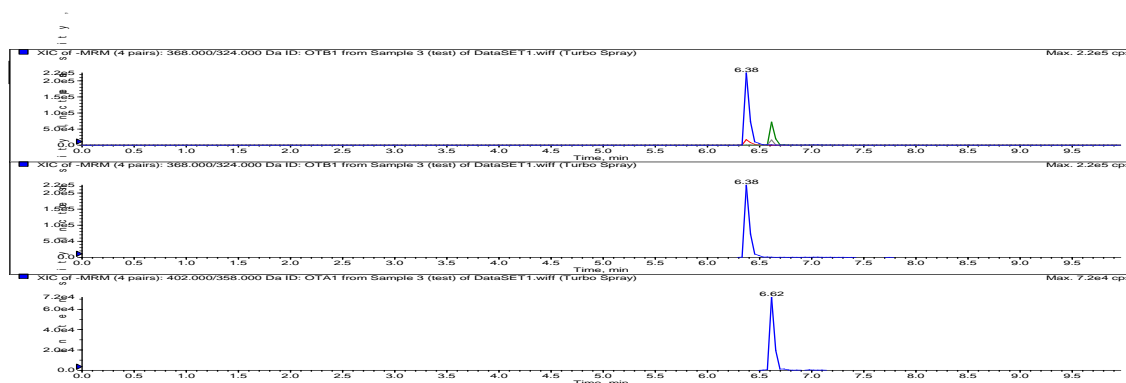
Thực hiện tách và xác định đồng thời 10 hợp chất trong cùng một nhóm, có cấu trúc gần giống nhau, sử dụng chế độ rửa giải đẳng dòng (isocratic) là không phù hợp. Để có thể vừa tách được các chất, vừa tiết kiệm được thời gian phân tích



và dung môi, chúng tôi tiến hành chạy pha động với chế độ gradient. Tiến hành khảo sát các chương trình chạy gradient khác nhau

Bảng 3.6: Khảo sát các chương trình gradient

Chương trình gradient	Thời gian (phút)	Tốc độ dòng (ml/phút)	Kênh A: $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 10 mM	Kênh B: MeOH
1	0,01	1,0	95	5
	4	1,0	0	100
	6	1,0	0	100
	6,01	1,0	95	5
	10	1,0	95	5
2	0,01	1,0	95	5
	4	1,0	0	100
	5	1,0	0	100
	5,01	1,0	95	5
	10	1,0	95	5
3	0,01	1,0	95	5
	4	1,0	0	100
	8	1,0	0	100
	8,01	1,0	95	5
	10	1,0	95	5
4	0,01	1,0	95	5
	4	1,0	20	80
	6	1,0	20	80
	6,01	1,0	5	5
	10	1,0	5	5



Hình 3.6: Sắc đồ khi chạy sắc ký bằng chương trình gradient 1.

Nhận xét: Khi giữ tỷ lệ MeOH 100% quá ít hoặc quá lâu đều làm pic bị chệch và tù, làm giảm độ nhạy của phương pháp.

Qua quá trình khảo sát chúng tôi chọn được chương trình chạy gradient 1 cho tín hiệu pic đẹp nhất, các chất được tách ra khỏi nhau, pic thu được không bị tù, không bị chệch pic, và diện tích pic cũng cao nhất đối với tất cả các chất nghiên cứu.

Tóm lại, các thông số tối ưu cho quá trình chạy sắc ký như sau:

- Cột: Waters- cột C<sub>18</sub> (250 mm × 4,6 mm × 5 μm).
- Tiền cột: C<sub>18</sub> (4 mm × 2,1 mm × 5 μm).
- Thành phần pha động: Kênh A là dung dịch CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> 10 mM, kênh B là MeOH
- Chương trình chạy gradient

Bảng 3.7: Chương trình gradient tối ưu.

Thời gian (phút)	Tốc độ dòng (ml/phút)	Kênh A: CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> 10mM	Kênh B:MeOH
0,01	1,0	95	5
4	1,0	0	100
6	1,0	0	100
6,01	1,0	95	5
10	1,0	95	5

➤ Detector MS/MS với các thông số ở bảng 3.2 và 3.3.

### **3.2 Tối ưu quy trình xử lý mẫu.**

#### **3.2.1 Chọn quy trình xử lý mẫu.**

Ta khảo sát sơ bộ trên 3 quy trình xử lý mẫu sau:

##### Quy trình 1.

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  $\text{CHCl}_3$ , lắc xoáy. Lấy lớp hữu cơ sang ống ly tâm khác, thêm 10ml  $\text{NaHCO}_3$  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 bởi 5ml MeOH, 5 ml  $\text{H}_2\text{O}$ . Sau đó, cột chiết được rửa tạp bằng 2 ml  $\text{H}_2\text{O}$ , 2 ml MeOH: $\text{H}_2\text{O}$  (6:4). Chất phân tích được rửa giải bằng 2 ml MeOH: $\text{CH}_3\text{COOH}$  (99,5:0,5, v/v). Dịch rửa giải được chuyển vào vial đựng mẫu rồi bơm vào hệ thống LC-MS/MS (dịch có thể được lọc trước khi đem đo trên máy bằng màng lọc mẫu cỡ 0,2 µm, nếu dịch bị đục).

##### Quy trình 2 [3].

Cân 10 g mẫu ngô đã đồng nhất vào bình tam giác 250 ml. Thêm 100 µl chuẩn hỗn hợp 100 ng/ml, thêm 200ml  $\text{NaHCO}_3$  1%, lắc 30 phút. Lọc lấy 10 ml dịch chiết, thêm 10 ml đệm phosphat saline (PBS) pH=7-8. Hỗn hợp dịch chiết được qua cột chiết pha rắn C18. Cột được hoạt hóa bằng 10 ml PBS. Sau đó, cột chiết được rửa tạp bằng 5 ml nước cất. Chất phân tích được rửa giải bằng 3 ml MeOH. Dịch rửa giải được đem thổi khô rồi hòa cạn lại bằng 1 ml MeOH, đem đi đo máy.

##### Quy trình 3 [21].

Cân chính xác khoảng 5 g mẫu ngô đã đồng nhất vào ống ly tâm 50 ml. Thêm 100 µl chuẩn hỗn hợp 100 ng/ml, thêm 10 ml ethyl acetate, đem lắc xoáy. Lấy 5 ml dịch chiết đem bay hơi đến khô dưới dòng khí  $\text{N}_2$  ở 40 °C. Hòa cạn bằng 5 ml acetonitril: $\text{H}_2\text{O}$  (84:16), sau đó cho qua cột chiết pha rắn C18. Các bước tiếp theo giống quy trình 1.

Nhằm mục đích tìm được ra quy trình xử lý mẫu tối ưu nhất, chúng tôi đã tiến hành khảo trên 3 quy trình xử lý mẫu đã nêu ở trên. Mỗi quy trình tiến hành làm lặp lại 2 lần và lấy kết quả trung bình. Kết quả thu được chỉ ra trong bảng sau:

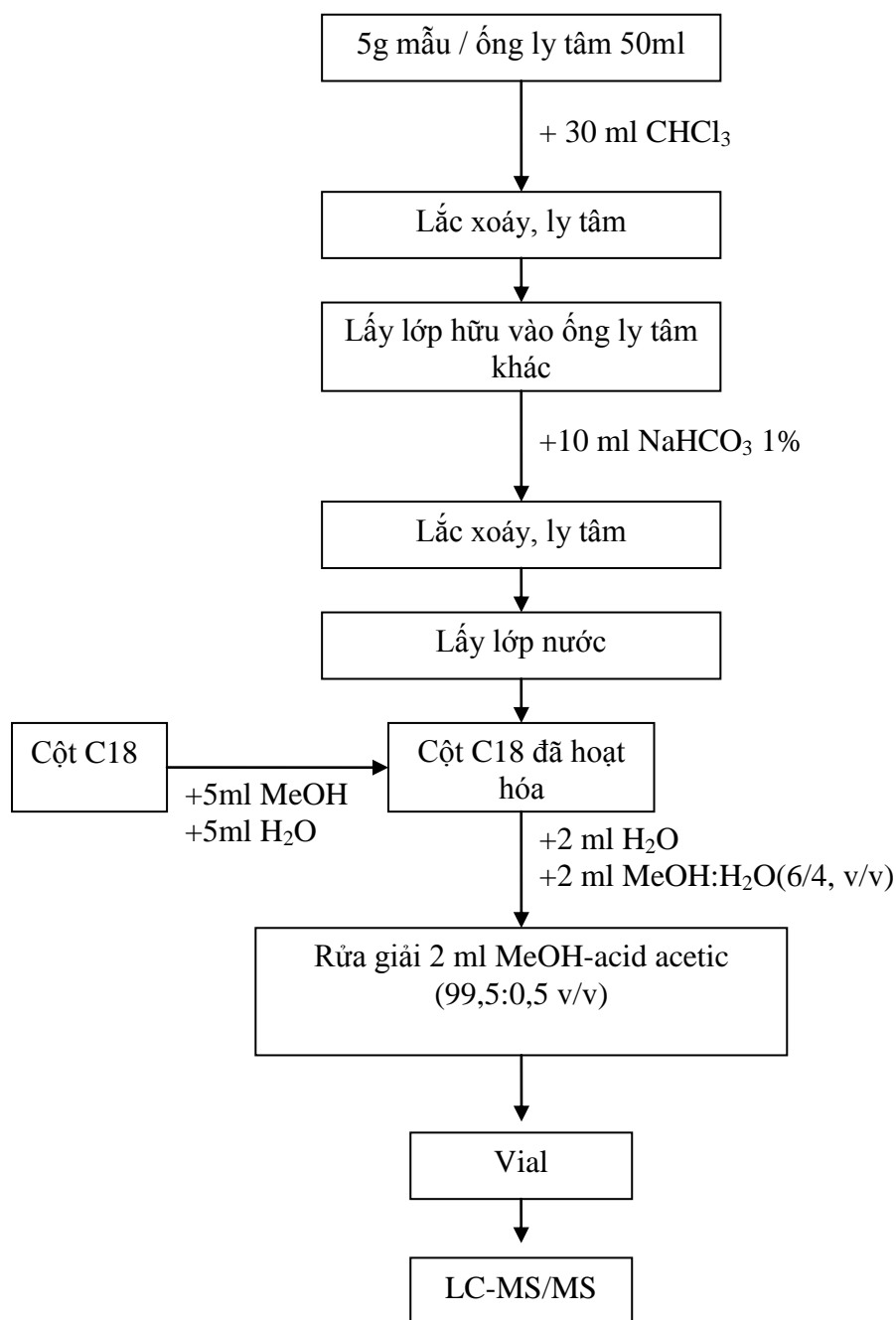
Bảng 3.8: Khảo sát quy trình xử lý mẫu

Quy trình	C thêm chuẩn (ppb)	Kết quả	Ochratoxin A	OchratoxinB
1	5	C(ppb)	4,2	3,9
		R (%)	84	78
2	5	C(ppb)	3,4	2,8
		R (%)	<b>68</b>	<b>56</b>
3	5	C(ppb)	2,6	2,8
		R (%)	52	56

Nhận xét: Từ kết quả thu được ta nhận thấy quy trình 1 cho hiệu suất thu hồi là tốt nhất trong 3 quy trình khảo sát. Nếu chỉ chiết mẫu bằng  $\text{NaHCO}_3$  thì dịch chiết thu được rất đục làm ảnh hưởng đến quá trình qua cột, dễ gây tắc cột. Điều này vừa làm mất nhiều thời gian chiết vừa làm giảm hiệu suất chiết của cột chiết. Trong khi đó, độ phân cực của chloroform là 4,1, của ethylacetate là 4,4 trong khi ochratoxins là các chất có độ phân cực yếu. Do đó dùng ethylacetat để chiết mẫu cũng không cho hiệu suất cao .

Do đó, chúng tôi sẽ tập trung khảo sát các điều kiện của quy trình 1 để đưa ra được một quy trình xử lý mẫu tối ưu nhất .

Quy trình xử lý mẫu dự kiến được mô tả theo sơ đồ sau:



Hình 3.7: Quy trình xử lý mẫu dự kiến.

### 3.2.2 Khảo sát thể tích (số lần chiết) dung môi chiết

Thể tích dung môi chiết ảnh hưởng đến hiệu suất chiết chất cần phân tích. Nếu dung môi chiết quá ít sẽ không hoà tan triệt để chất cần phân tích, nhưng nếu quá nhiều sẽ gây lãng phí và ảnh hưởng đến môi trường.

Chúng tôi sử dụng nền mẫu ngô không phát hiện ochratoxins để tiến hành khảo sát tiếp. Cân chính xác khoảng 5 g bột ngô, thêm 100µl chuẩn hỗn hợp có nồng độ 100 ng/ml. Tiến hành chiết lặp 1, 2, 3 lần các mẫu bằng dung môi CHCl<sub>3</sub> với thể tích mỗi lần chiết lần lượt là 5, 10, 15 ml. Các bước được tiến hành theo quy trình 1. Ta thu được kết quả như sau:

Bảng 3.9: Kết quả sự phụ thuộc của thể tích dung môi chiết và hiệu suất chiết

Số lần chiết	Ochratoxin A				Ochratoxin B			
	Kết quả	V5	V10	V15	Kết quả	V5	V10	V15
1	C(ng/g)	2,9	3,1	3,5	C(ng/g)	2,7	3,1	3,2
	R%	58	62	70	R%	54	62	64
2	C(ng/g)	3,1	3,5	<b>4,2</b>	C(ng/g)	2,9	3,4	<b>4,1</b>
	R%	62	70	<b>84</b>	R%	58	68	<b>82</b>
3	C(ng/g)	3,3	4,1	4,1	C(ng/g)	3,1	4	4,1
	R%	66	82	82	R%	62	80	82

Nhận xét: Qua quá trình khảo sát, chúng tôi nhận thấy chiết cloroform một lần 15 ml thì chất phân tích vẫn chưa chiết được hoàn toàn. Kết quả chiết 2 lần và 3 lần không khác nhau đáng kể. Hiệu suất chiết lặp ba lần mỗi lần 10 ml cho kết quả tương tự khi chiết lặp 2 lần mỗi lần 15 ml. Do đó để tiết kiệm dung môi, chúng tôi chọn chiết lặp 2 lần mỗi lần 15 ml CHCl<sub>3</sub>.

### 3.2.3 Chọn cột chiết pha rắn

Vì Ochratoxin có tính axit yếu nên chúng tôi chọn 2 loại cột để khảo sát là cột C18 và cột Polydivinylbezen-N-vinylpyrrolidon HLB Oasis ( hydrophile lyophile balance).

Sử dụng nền mẫu ngô không phát hiện OTs. Quá trình chiết mẫu được thực hiện theo quy trình 1. Kết quả thu được như sau:

Bảng 3.10: Khảo sát cột chiết pha rắn.

Cột chiết	C thêm chuẩn (ng/ml)	Kết quả	Ochratoxin A	Ochratoxin B
<b>C18</b>	10	C(ng/ml)	8,6	7,4
		R (%)	<b>86</b>	<b>74</b>
HLB	10	C(ng/ml)	6,7	5,8
		R (%)	67	58

Nhận xét: Kết quả chỉ ra rằng để chiết Ochratoxin A, B việc sử dụng cột chiết pha rắn C18 thì tốt hơn so với cột oasis HLB. 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, chúng tôi chọn cột chiết C18 để làm sạch dịch chiết.

### 3.2.4 Khảo sát tốc độ qua cột chiết pha rắn

Tốc độ rửa giải ảnh hưởng khá lớn đến hiệu suất chiết. Nếu tốc độ rửa giải quá lớn sẽ phải sử dụng một lượng lớn dung môi, dễ kéo đi mất chất phân tích làm hiệu suất chiết giảm. Còn nếu tốc độ rửa giải thấp sẽ kéo dài thời gian phân tích mẫu. Do đó, chúng tôi cần khảo sát để tìm tốc độ rửa giải phù hợp.

Chúng tôi khảo sát tốc độ rửa giải tại 0,5 ml/phút, 1 ml/phút, 2 ml/phút để tìm tốc độ tối ưu.

Kết quả phân tích như sau:

Bảng 3.11: Ảnh hưởng của tốc độ rửa giải tới hiệu suất của quá trình chiết mẫu

C (ng/g) thêm chuẩn	Tốc độ rửa giải	C(ng/g)		R%	
		OTA	OTB	OTA	OTB
5	0,5	4,1	3,8	82	76
	1	4,2	4,1	84	82
	2	2,5	2,3	50	46

Từ các kết quả chỉ ra ở bảng chúng tôi nhận thấy tại tốc độ 0,5 ml/phút và 1,0 ml/phút cho hiệu suất chiết không khác nhau nhiều, nhưng để tiết kiệm thời gian chúng tôi chọn tốc độ rửa giải 1 ml/phút .

### **3.2.5 Khảo sát thể tích dung môi rửa giải**

Lượng dung dịch rửa giải phải đủ lớn để chất phân tích có thể được rửa giải ra khỏi cột hoàn toàn. Qua tham khảo tài liệu chúng tôi chọn dung môi rửa giải là dung dịch MeOH-acid acetic (99,5:0,5, v/v).

Sử dụng nền mẫu ngô không phát hiện ochratoxins. Cân chính xác 5 g mẫu trắng bột ngô đã đồng nhất vào ống ly tâm 50 ml, thêm 200  $\mu$ l chuẩn hỗn hợp ở nồng độ 100 ng/ml, tiến hành xử lý mẫu theo quy trình , khảo sát tại 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. Ta thu được kết quả khảo sát như sau:

Bảng 3.12: Kết quả khảo sát thể tích dung dịch rửa giải

<b>V<sub>rửa giải</sub> (ml)</b>	<b>C ng/g</b>	<b>Diện tích OTA</b>	<b>Diện tích OTB</b>	<b>R(%)</b>	
				<b>OTA</b>	<b>OTB</b>
1	10	45630	4620	45	51
2		8820	8520	70	68
6		8930	8540	72	70

Nhận xét: 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. Vì vậy chúng tôi chọn thể tích dung dịch cần để rửa giải là 2 ml dung dịch cho các thí nghiệm tiếp theo.

### **3.2.6 Khảo sát ảnh hưởng pH trong quá trình chiết mẫu**

Khoảng pH chiết mẫu là khá quan trọng liên quan đến hiệu suất chiết. Mỗi chất nghiên cứu có những đặc tính riêng trong khi nền mẫu thực phẩm là rất phức



tạp. Do vậy chúng tôi tiếp tục khảo sát so sánh giữa các quy trình chiết sau mỗi qui trình làm lặp 3 mẫu và tính hiệu suất thu hồi theo công thức sau:

$$H = \frac{C_{tt}}{C_{lt}} \times 100 \quad (1)$$

Trong đó:

H: hiệu suất thu hồi (%)

$C_{tt}$ : Nồng độ thực tế của mỗi OTs thu được (tính theo đường chuẩn) (ng/ml)

$C_{lt}$ : Nồng độ lý thuyết của mỗi OTs tính toán từ lượng chuẩn thêm vào (10 ng/ml)

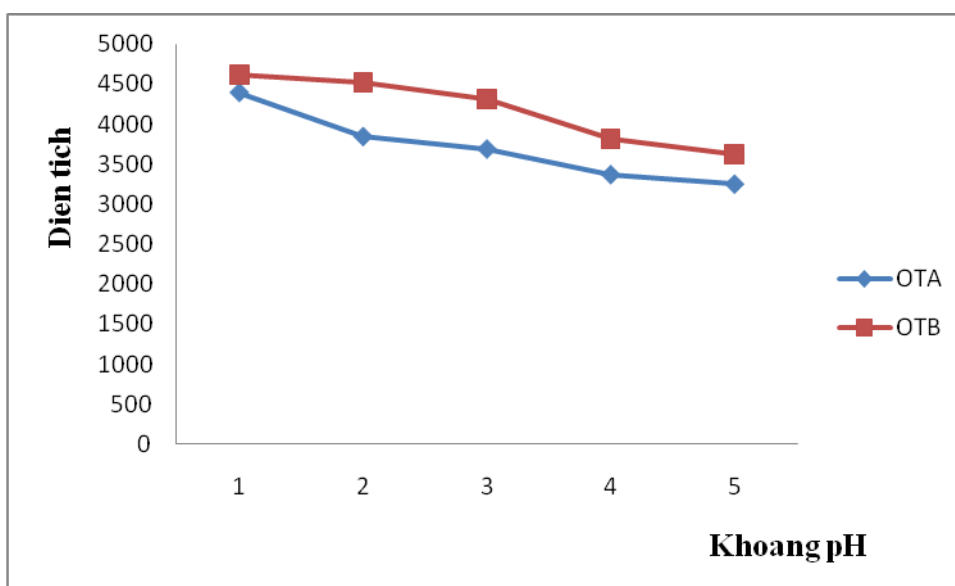
Sử dụng phần mềm định lượng của máy, các mẫu được định dạng ở dạng mẫu “quality control” với nồng độ biết trước là 10 ng/ml. Phần mềm sẽ tự động lập đường chuẩn, tính toán nồng độ thực trong mẫu và đưa ra hiệu suất thu hồi theo công thức trên.

Cân chính xác khoảng 5g mẫu đã đồng nhất vào ống ly tâm 50 ml. Thêm 100μl chuẩn hỗn hợp 100 ng/ml, axit hóa bằng HCl 2% đến các pH khác nhau trong khoảng 1-9 (dùng giấy chỉ thị màu để nhận biết). Thêm 15 ml  $\text{CHCl}_3$ , lắc Vortex, ly tâm 6000 v/p trong 3 phút. Lấy lớp hữu cơ sang ống ly tâm khác. Phần bã tiếp tục được chiết với 15 ml cloroform. Gộp dịch chiết vào ống ly tâm, thêm 10 ml  $\text{NaHCO}_3$  1%, lắc Vortex, ly tâm 6000 v/p trong 3 phút. Lấy lớp hữu cơ đem qua cột chiết pha rắn C18. Cột chiết pha rắn được hoạt hóa bởi 5ml MeOH, 5 ml  $\text{H}_2\text{O}$ . Sau đó cột chiết được rửa tạp bằng 2 ml  $\text{H}_2\text{O}$ , 2 ml MeOH: $\text{H}_2\text{O}$  (6:4). Chất phân tích được rửa giải bằng 2 ml MeOH: $\text{CH}_3\text{COOH}$  (99,5:0,5,v/v). Dịch rửa giải được chuyển vào vial đựng mẫu rồi bơm vào hệ thống LC-MS/MS (dịch có thể được lọc trước khi đem đo trên máy bằng màng lọc mẫu cỡ 0,2 μm, nếu dịch bị đục).

Kết quả thu được như sau:

Bảng 3.13: Sự phụ thuộc giữa pH chiết mẫu và diện tích pic sắc ký

Khoảng pH	Giá trị pH	S <sub>OTA</sub>	S <sub>OTB</sub>
1	1-2	4400	4620
2	3-4	3850	4521
3	5-6	3694	4312
4	7-8	3375	3821
5	9-10	3256	3622

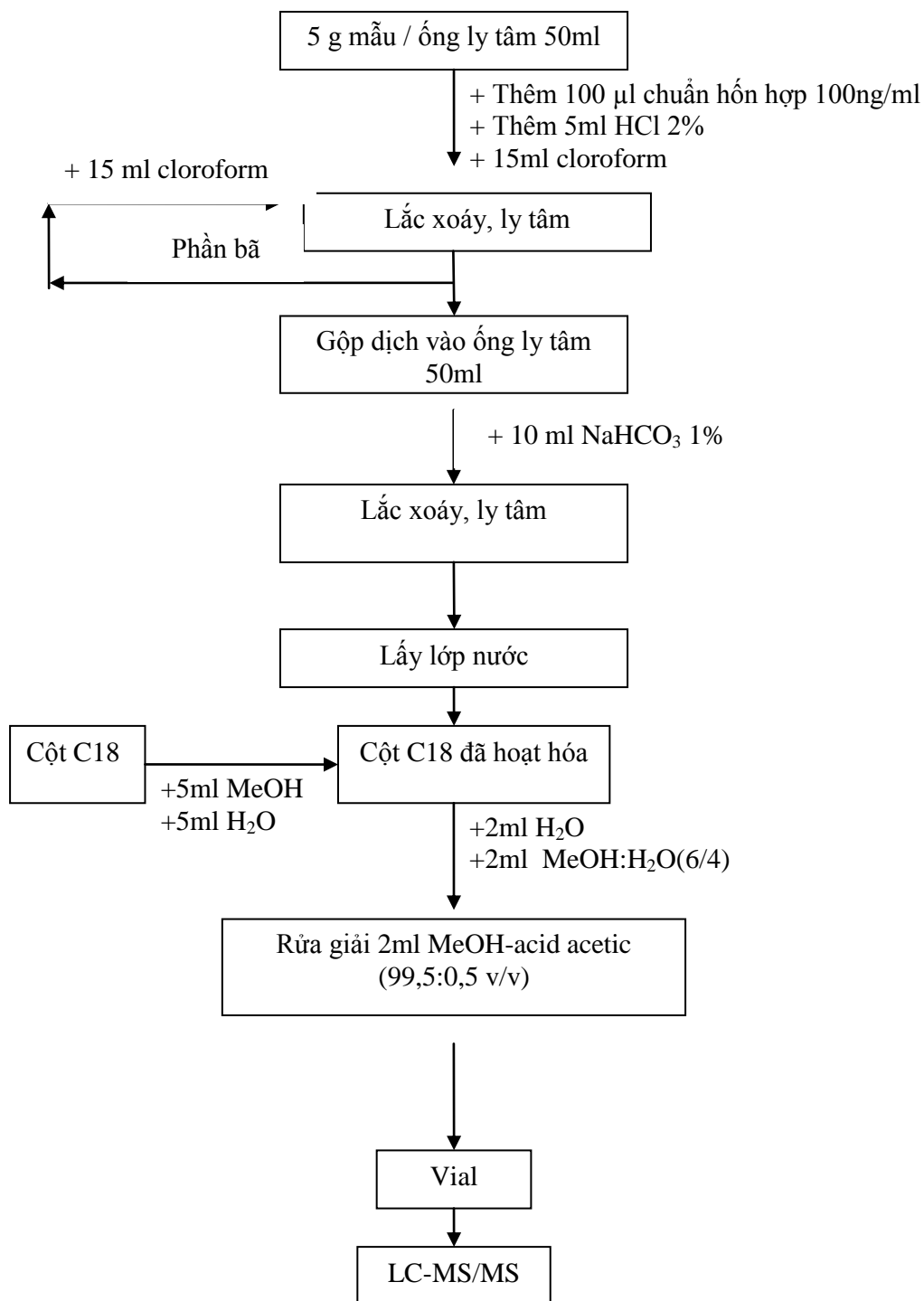


Hình 3.8 Đồ thị sự phụ thuộc của diện tích pic vào giá trị pH chiết mẫu

Kết luận: Ochratoxin chỉ được chiết tốt vào cloroform trong môi trường axit.

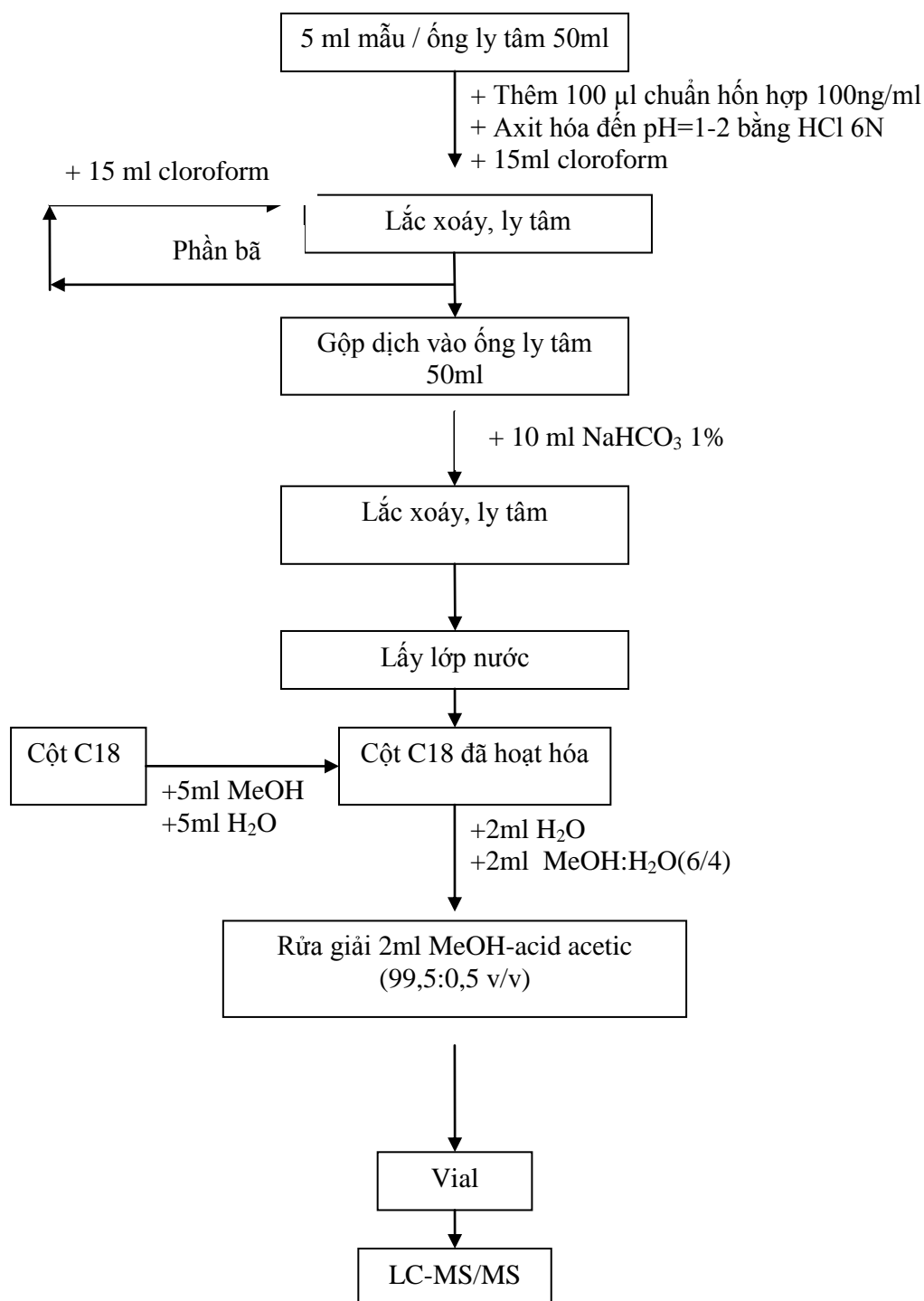
Điều này có thể giải thích: trong môi trường pH=1-2 ochratoxins ở trạng thái đẳng điện, dạng cation và anion ngang bằng, dẫn đến khả năng phân cực giảm. Do đó giúp nó dễ tan vào trong các loại dung môi không phân cực như cloroform. Mặt khác việc axit hóa còn giúp làm ẩm cơ chất, giúp chiết mẫu vào môi trường hữu cơ triệt để hơn

## QUY TRÌNH XỬ LÝ MẪU TỐI ƯU CHO MẪU THỰC PHẨM



Hình 3.9: Quy trình xử lý mẫu tối ưu cho mẫu thực phẩm.

### QUY TRÌNH XỬ LÝ MẪU TỐI ƯU CHO MẪU RƯỢU



Hình 3.10: Quy trình xử lý mẫu tối ưu cho mẫu rượu

### 3.3 Thẩm định phương pháp phân tích

#### 3.3.1 Tính đặc hiệu / chọn lọc

Tính đặc hiệu là khả năng phát hiện các chất phân tích khi có mặt các tạp chất khác như các tiền chất, các chất chuyển hóa, các chất tương tự, tạp chất... Trong phép phân tích định tính đó phải chứng minh được kết quả là dương tính khi có mặt chất phân tích, âm tính khi không có mặt nó, đồng thời kết quả là phải âm tính khi có mặt các chất có cấu trúc gần giống với chất phân tích. Trong phép phân tích định lượng, là khả năng phát hiện chính xác chất phân tích trong mẫu khi bị ảnh hưởng của tất cả các yếu tố, nhằm hướng đến kết quả chính xác [9].

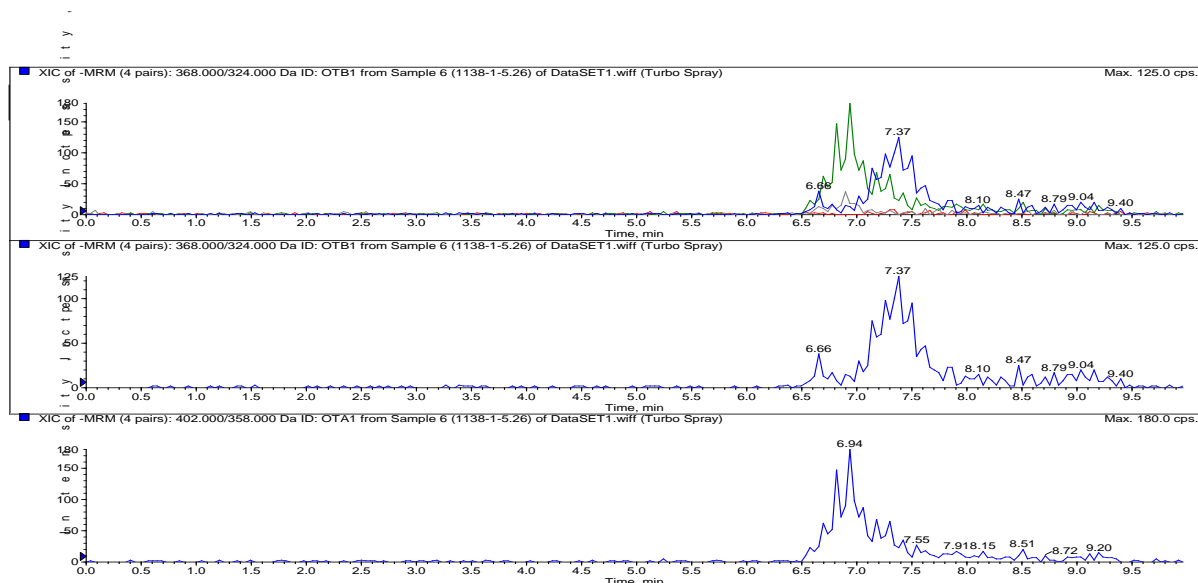
Tính chọn lọc: Là khái niệm rộng hơn tính đặc hiệu, liên quan đến việc phân tích một số hoặc nhiều chất trong một quy trình. Nếu chất cần phân tích phân biệt rõ với các chất khác thì phương pháp phân tích có tính chọn lọc [9].

Để xác định tính đặc hiệu/chọn lọc đối với sắc ký lỏng khối phổ chúng tôi sử dụng các phương pháp xác nhận (confirmation method) . Theo hội đồng Châu Âu điểm IP (điểm nhận dạng- identification point) đối với kỹ thuật sắc ký lỏng khối phổ 2 lần (LC-MS/MS) là 4, tức là cần 1 ion mẹ bắn phá ra 2 ion con.

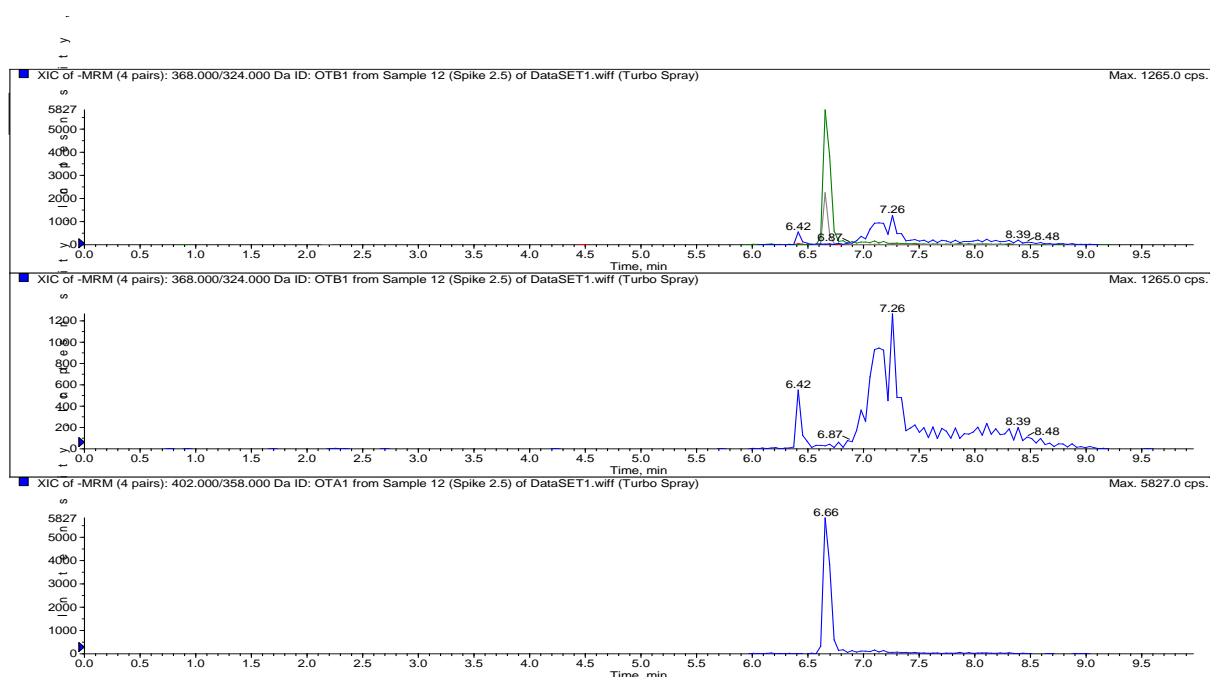
**Bảng 3.13: Ion mẹ và 2 ion con của các chất trong nhóm ochratoxins**

Chuẩn	Ion mẹ	Ion con	Số điểm IP
Ochratoxin A	402	358	4
		166,9	
Ochratoxin B	368	324	4
		220	

Như vậy phương pháp nghiên cứu có tính đặc hiệu đáp ứng được yêu cầu. Hơn nữa để xác định chắc chắn phương pháp nghiên cứu có tính đặc hiệu / chọn lọc cao, chúng tôi đã tiến hành phân tích các mẫu trắng. Kết quả cho thấy mẫu trắng không cho tín hiệu phân tích.



Hình 3.10: Sắc đồ mẫu trắng



Hình 3.11: Sắc đồ mẫu trắng thêm chuẩn 2,5 ng/ml

### 3.3.2 Giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ)

Giới hạn phát hiện LOD được xem là nồng độ thấp nhất của chất phân tích mà hệ thống phân tích còn cho tín hiệu phân tích khác có nghĩa với tín hiệu của mẫu trắng hay tín hiệu nền.

Để xác định giới hạn phát hiện dựa trên độ lệch chuẩn, chúng tôi đã tiến hành làm trên nền mẫu thử. Làm 10 lần song song, cân chính xác khoảng 5 g trắng bột ngô cho vào ống ly tâm 50 ml, thêm chuẩn các chất ở nồng độ 0,5 ng/ml (gấp 5 lần LOD ước lượng, LOD ước lượng là: 0,1 ng/ml). Thực hiện tiến hành xử lý mẫu theo quy trình đã tối ưu hóa ở trên.

Tính LOD: Tính giá trị nồng độ trung bình  $\bar{x}_{tb}$ , độ lệch chuẩn SD (S)

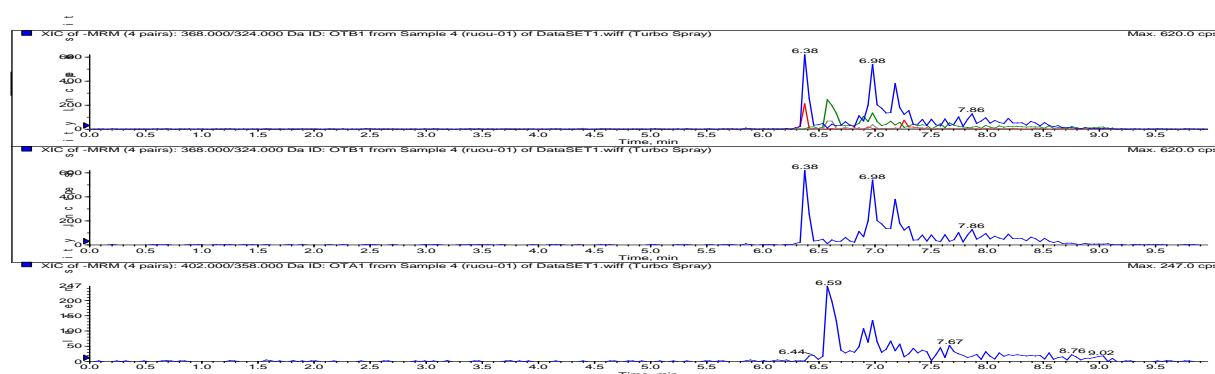
$$LOD = 3.S$$

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N - 1}}$$

Để đánh giá LOD đã tính được ta kiểm tra qua giá trị  $R = \frac{\bar{x}_{tb}}{LOD}$

Nếu  $4 < R < 10$  thì nồng độ dung dịch đem thử là phù hợp và giá trị LOD tính được là đáng tin cậy.

Giới hạn định lượng LOQ được xem là nồng độ thấp nhất mà hệ thống phân tích định lượng được với tín hiệu phân tích khác có ý nghĩa định lượng với tín hiệu của mẫu trắng hay tín hiệu nền. Theo lý thuyết thống kê trong hóa phân tích thì  $LOQ = 3,33 LOD$ .



Hình 3.12: Sắc đồ ochratoxins tại LOD

Bảng 3.14: Kết quả xác định LOD, LOQ của Ochratoxin A, B

KQ	OTA	OTB
$x_i(\text{ng/ml})$	0,42	0,42
	0,48	0,38
	0,39	0,47
	0,41	0,39
	0,46	0,38
	0,42	0,36
	0,46	0,39
	0,41	0,37
	0,39	0,41
	0,47	0,46
$x_{tb}(\text{ng/ml})$	0,431	0,45
SD	0,03	0,03
<b>LOD (ng/ml)</b>	<b>0,1</b>	<b>0,1</b>
<b>LOQ (ng/ml)</b>	<b>0,3</b>	<b>0,3</b>
R	4,2	4,0
RSD(%)	7,7	8,2

Nhận xét: Từ bảng kết quả thu được nhận thấy các chất đều có giá trị R thỏa mãn yêu cầu, hơn nữa giá trị RSD (%) thu được cũng thỏa mãn theo AOAC nên phương pháp áp dụng cũng có độ chụm đạt yêu cầu. Vì vậy các giá trị LOD, LOQ thu được ở bảng trên là đáng tin cậy.

### 3.3.3 Xác định khoảng tuyến tính

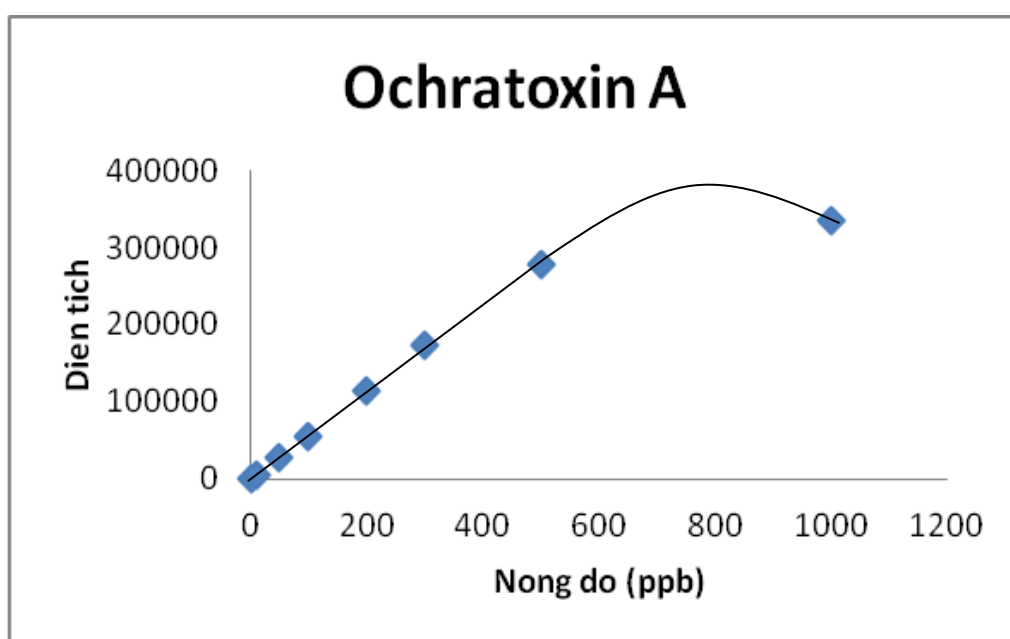
Để xác định khoảng tuyến tính chúng tôi thực hiện đo các dung dịch chuẩn có nồng độ thay đổi từ 1 ng/ml đến 1000 ng/ml và khảo sát sự phụ thuộc của tín hiệu vào nồng độ. Sau đó vẽ đường cong phụ thuộc giữa diện tích pic thu được vào



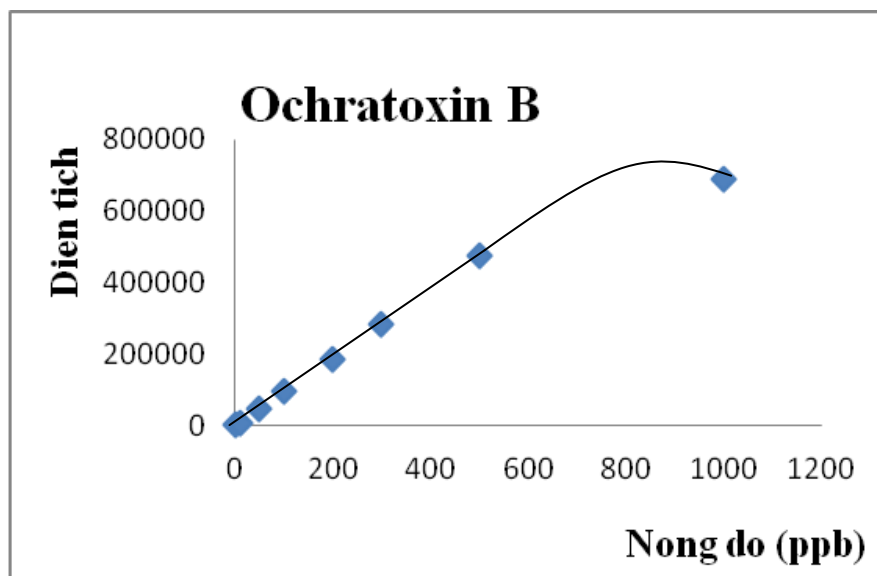
nồng độ, quan sát sự phụ thuộc cho đến khi không còn tuyến tính. Kết quả thu được như sau:

**Bảng 3.15: Sự phụ thuộc của diện tích pic vào nồng độ**

Nồng độ (ng/ml)	1	10	50	100	200	300	500	1000
Diện tích OTA	894	5640	27600	55400	113000	173000	278000	335000
Diện tích OTB	860	9050	48600	95500	185000	286000	474000	691000



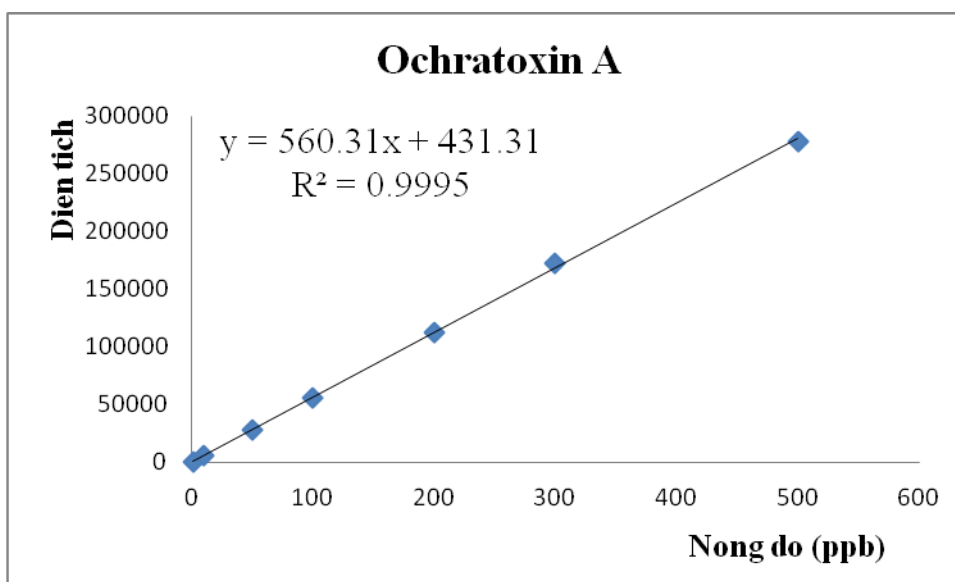
Hình 3.13: Đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc của diện tích pic vào nồng độ OTA.



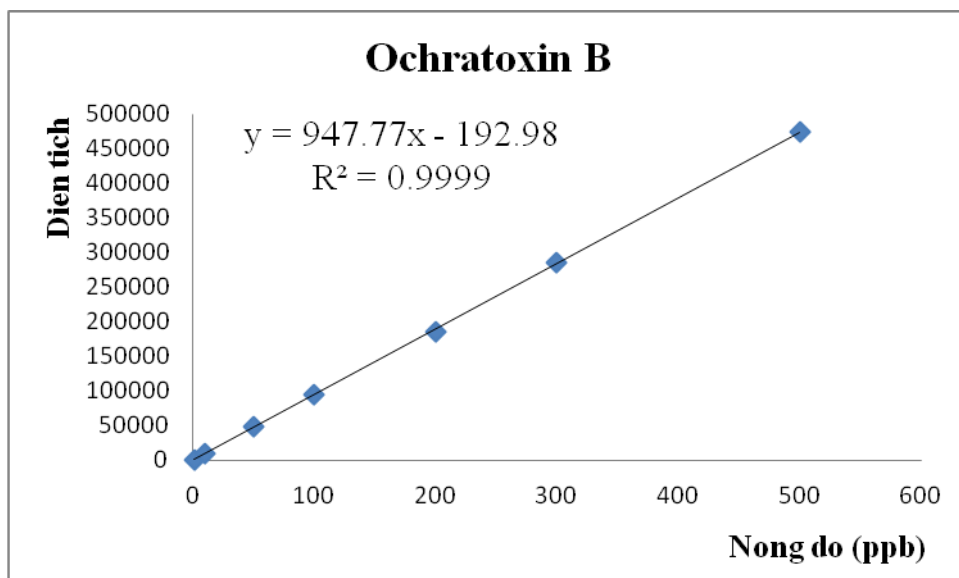
Hình 3.14: Đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc của diện tích pic vào nồng độ OTB. Từ các đồ thị ta thấy giới hạn tuyến tính (LOL) của OTA, OTB là 500 ng/ml. Như vậy từ các kết quả ở trên chúng tôi có thể chỉ ra khoảng tuyến tính của các chất là 1 ng/ml-500 ng/ml.

### 3.3.4 Xây dựng đường chuẩn.

Lập dãy chuẩn có nồng độ từ 1ng/ml đến 500 ng/ml



Hình 3.15: Đường chuẩn của Ochratoxin A



Hình 3.16: Đường chuẩn của Ochratoxin B

Nhận xét: Nhận thấy các hệ số hồi quy tuyến tính  $r$  của các đường chuẩn trên đều nằm trong khoảng:  $0,995 \leq r \leq 1$ . Do vậy các đường chuẩn dựng ở trên đều chấp nhận được.

### 3.3.5 Độ chính xác (accuracy) của phương pháp phân tích (độ đúng và độ chụm) [11]

Độ chụm hay độ lặp lại là mức độ gần nhau của các giá trị riêng lẻ của các phép đo lặp lại. Độ chụm là một khái niệm định tính và được biểu diễn định lượng bằng độ lệch chuẩn  $S$  hay hệ số biến thiên  $CV(\%)$ ..

$$CV(\%) = \frac{S}{\bar{x}} \cdot 100$$

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N - 1}}$$

Trong đó:

- $x_i$  : Nồng độ tính được của lần thử nghiệm thứ  $i$
- $\bar{x}$  : Nồng độ trung bình tính được của  $N$  lần thử nghiệm.
- $N$  : Số lần thử nghiệm.

Độ đúng là mức độ gần nhau của giá trị phân tích với giá trị thực hoặc giá trị được chấp nhận. Độ đúng là khái niệm định tính và được biểu diễn định lượng dưới dạng độ chệch (Bias) hoặc hiệu suất thu hồi (recovery)

$$R(\%) = \frac{C}{C_c} \cdot 100$$

Trong đó:

R: độ thu hồi (%)

C : Nồng độ chất phân tích trong mẫu trắng thêm chuẩn (ng/ml).

C<sub>c</sub> : Nồng độ chuẩn thêm (lý thuyết) (ng/ml).

Để xác định độ chụm và độ đúng của phương pháp phân tích, chúng tôi tiến hành thí nghiệm như sau: Tiến hành thí nghiệm lặp lại trên nền mẫu trắng (mẫu ngô đã được phân tích không chứa chất cần phân tích) thêm chuẩn ở 3 mức nồng độ khác nhau (mỗi mức làm lặp lại 6 lần). Cụ thể thêm chuẩn hỗn hợp ở 3 mức là 2,5 ng/ml , 5 ng/ml , 10 ng/ml. Kết quả thu được như sau:

Bảng 3.16: Kết quả đánh giá độ chính xác của phương pháp

Cspike	Lần	OTA					OTB				
		xi	$\bar{x}$	SD	RSD%	R%	xi	$\bar{x}$	SD	RSD%	R%
2,5	1	2,3	2,1	0,2	9,1	85	1,9	1,9	0,2	11	77
	2	1,8					2,1				
	3	2					2,2				
	4	2,2					2				
	5	2,1					1,8				
	6	2,3					1,6				
5	1	3,9	4,2	0,3	7,6	84	3,8	4	0,3	7,2	79
	2	4,5					3,6				
	3	4,2					3,7				
	4	3,8					4,2				
	5	4,6					4,1				
	6	4,1					4,3				
10	1	8,6	8	0,7	8,9	80	7,4	7,6	0,7	9,0	76
	2	7,4					6,9				
	3	6,9					8,5				
	4	8,5					8,2				
	5	8,1					7,6				
	6	8,6					6,8				

Nhận xét: Theo qui định của Châu Âu 2002/657/EC [27], độ đúng và độ chụm phụ thuộc nồng độ chất như sau:

Bảng 3.16: Qui định độ đúng và độ chụm của các phương pháp định lượng phụ thuộc nồng độ chất theo 2002/657/EC

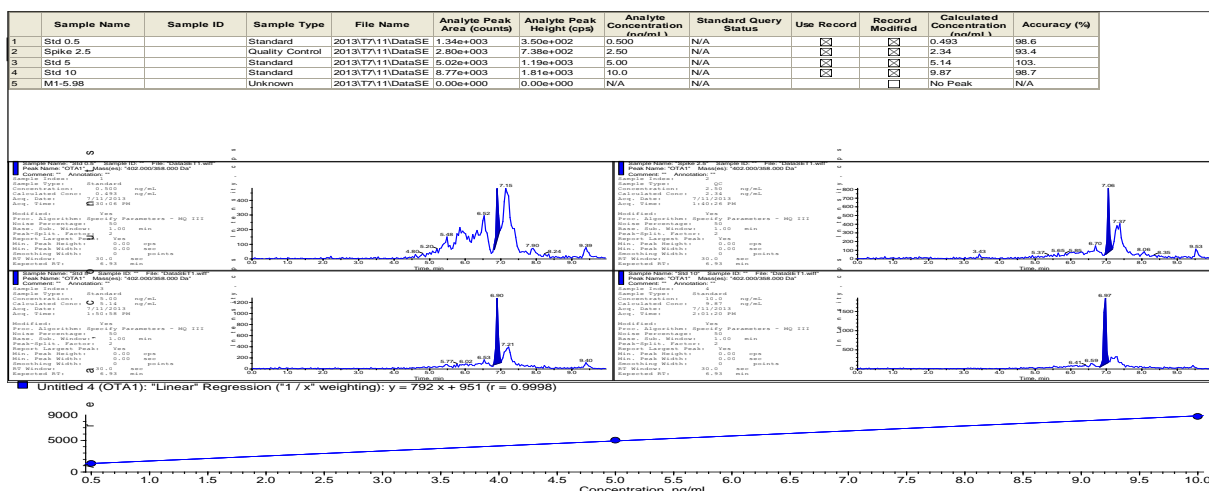
CVs for quantitative methods at a range of element mass fractions

Mass fraction	CV (%)
$\geq 10 \text{ } \mu\text{g/kg}$ to $100 \text{ } \mu\text{g/kg}$	20
$> 100 \text{ } \mu\text{g/kg}$ to $1\,000 \text{ } \mu\text{g/kg}$	15
$\geq 1\,000 \text{ } \mu\text{g/kg}$	10

Minimum trueness of quantitative methods

Mass fraction	Range
$\leq 1 \text{ } \mu\text{g/kg}$	- 50 % to + 20 %
$> 1 \text{ } \mu\text{g/kg}$ to $10 \text{ } \mu\text{g/kg}$	- 30 % to + 10 %
$\geq 10 \text{ } \mu\text{g/kg}$	- 20 % to + 10 %

Theo 2 bảng trên, tại cấp độ từ 10 – 100  $\mu\text{g/kg}$ , hệ số biến thiên  $CV \leq 20\%$ ; hiệu suất thu hồi tại cấp độ từ 1 – 10  $\mu\text{g/kg}$  phải nằm trong khoảng 70 – 110%. Như vậy, phương pháp có độ đúng và độ chụm đạt yêu cầu của Châu Âu.



Hình3.17: Sắc đồ OTs tại mức thêm chuẩn 2,5 ng/ml

Như vậy phương pháp nghiên cứu trên có thể áp dụng vào thực tế để xác định Ochratoxin A, B trong đối tượng mẫu thực tế.

### 3.4. Phân tích mẫu thực tế

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 quy 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%.

Kết quả phân tích các mẫu như sau:

Bảng 3.17: Kết quả phân tích mẫu thực tế.

STT	Đối tượng	m (g) /V(ml)	Diện tích OTA	Diện tích OTB	C-OTA (ng/g. ng/ml)	C-OTB (ng/g. ng/ml)
1	Rượu L'estaminet - Pháp	5	KPH	KPH	KPH	KPH
2	Rượu Raiz - Chi Lê	5	KPH	KPH	KPH	KPH
3	Rượu Mirabeau- Pháp	5	KPH	KPH	KPH	KPH
4	Rượu Piraat - Bỉ	5	KPH	KPH	KPH	KPH
5	Rượu Bordeaux -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

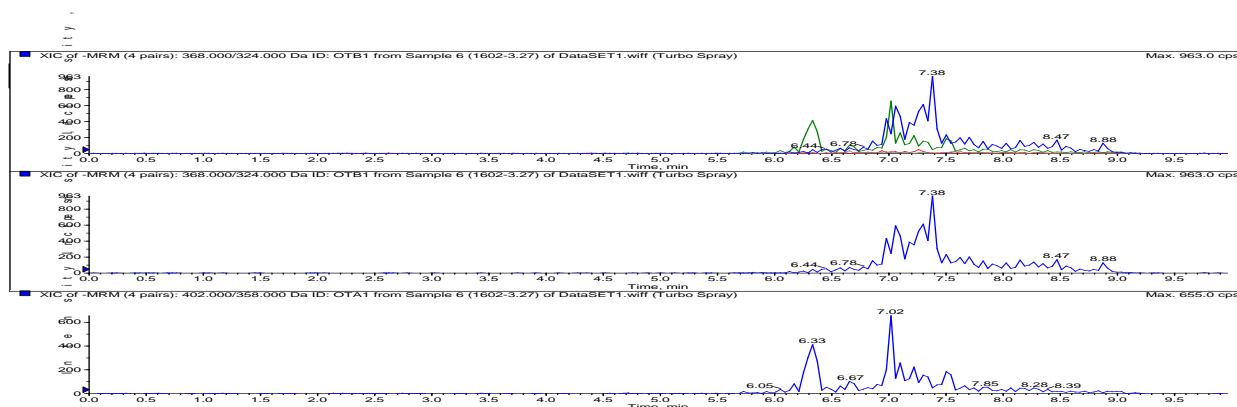
LC: lạc củ

BG: Bắc Giang

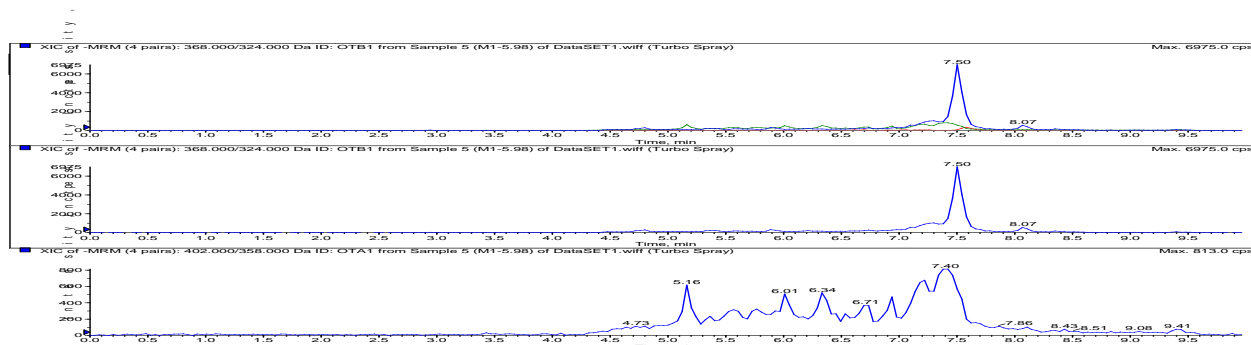
TH: Thanh Hóa



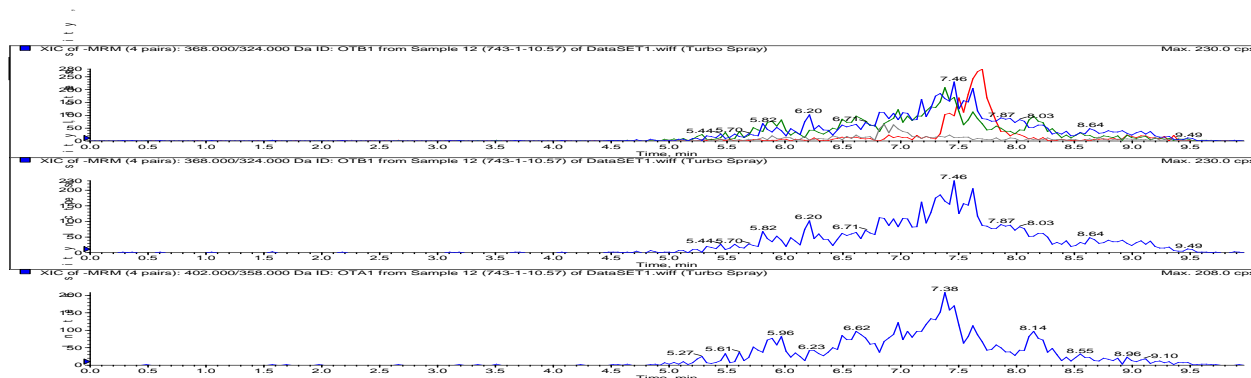
NA: Nghệ An.



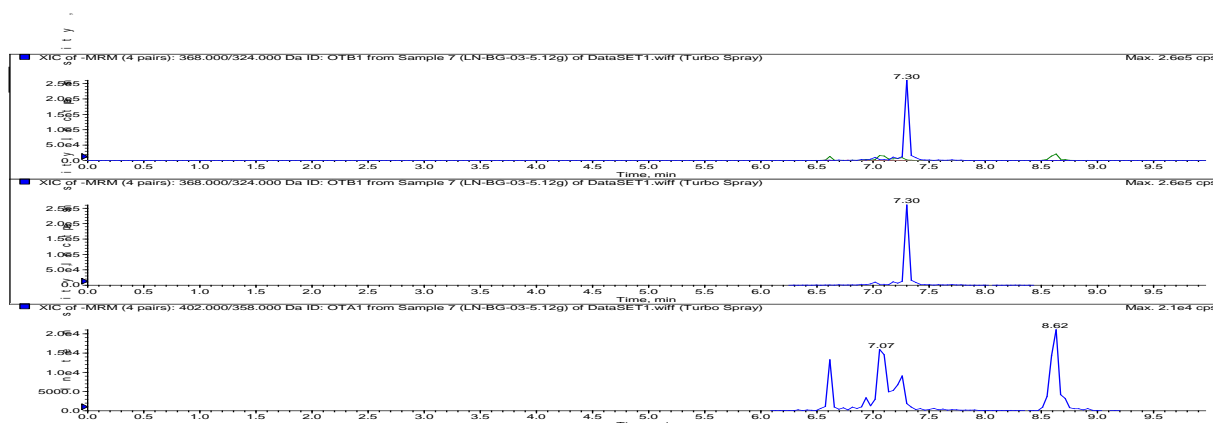
Hình3.18: :Sắc đồ mẫu rượu không có Ochratoxin A, B.



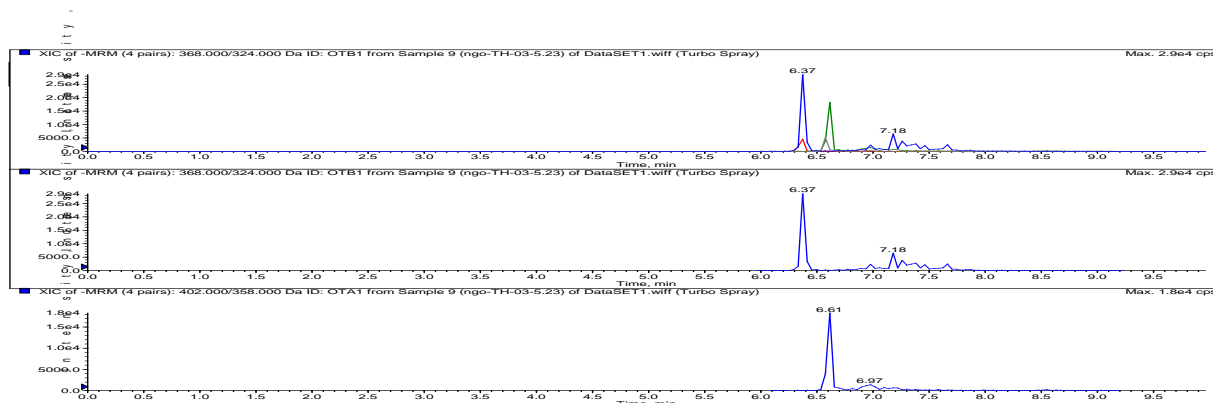
Hình3.19: Sắc đồ mẫu ngô không có Ochratoxin A, B.



Hình 3.20: Sắc đồ mẫu lạc không có Ochratoxin A, B.



**Hình 3.21: Sắc đồ mẫu lạc có Ochratoxin A.**



**Hình 3.22: Sắc đồ mẫu ngô có Ochratoxin A, B**

Chúng tôi tiến hành thêm chuẩn trên nền mẫu ngô và lạc có phát hiện Ochratoxins. Thêm 100 $\mu$ l hỗn hợp chuẩn 100ng/ml ngay sau khi cân mẫu và tiến hành theo quy trình đã tối ưu. Kết quả phân tích như sau:

Bảng 3.18: Kết quả phân tích mẫu ngo-TH-03 và LN-BG-03 thêm chuẩn ở mức 5ppb

Đối tượng	Lần	OTA					OTB				
		xi	$\bar{x}$	SD	RSD%	R%	xi	$\bar{x}$	SD	RSD%	R%
Ngô	1	9.1	8.8	0,2	9,1	86	7.2	6.8	0,2	11	77
	2	9.0					7.1				
	3	8.8					6.8				
	4	8.9					6.5				
	5	8.5					6.7				
	6	9.2					7.0				
Lạc	1	8.9	7,8	0,3	7,6	84	3,8	4	0,3	7,2	79
	2	8.6					3,6				
	3	7.5					3,7				
	4	7.9					4,2				
	5	7.8					4,1				
	6	8.0					4,3				

Kết luận: Kết quả cho thấy phương pháp có độ thu hồi tốt trên hai nền mẫu khảo sát. Độ thu hồi thu được trong khoảng 77-86% trong khoảng nồng độ 5-10 ppb. Độ lặp lại cho giá trị RSD trong khoảng 7.2 – 11% (<15%, theo tiêu chuẩn AOAC).

## KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

### I. Kết luận

Trên cơ sở các kết quả thực nghiệm đã nghiên cứu để xác định Ochratoxin trong thực phẩm bằng phương pháp sắc ký lỏng khối phổ, chúng tôi đã thu được các kết quả sau:

1. Tối ưu hóa các điều kiện MS/MS để xác định Ochratoxin A, B.

- Khảo sát tìm được ion mẹ, ion con định tính và định lượng của từng chất
- Tìm các điều kiện tối ưu của MS:

2. Tối ưu hóa điều kiện chạy sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).

- Pha tĩnh.
  - + Cột: Waters - cột C<sub>18</sub> (250 mm × 2,1 mm × 5 μm).
  - + Tiền cột: C<sub>18</sub> (4 mm × 2,1 mm × 3 μm).
- Pha động là hệ dung môi gồm 2 kênh, kênh A: amoniacetate 10 mM và kênh B: MeOH, tìm được chương trình chạy gradient tối ưu.

3. Khảo sát quy trình xử lý mẫu: Chúng tôi đã đưa ra được quy trình xử lý mẫu tối ưu áp dụng chung cho cả 2 loại nền mẫu rắn và. Kết quả chỉ ra rằng hiệu suất thu hồi của phương pháp đạt trên 70%, độ chụm dưới 15% đạt yêu cầu của AOAC

4. Thẩm định phương pháp.

- Tính đặc hiệu / chọn lọc: Kết luận phương pháp nghiên cứu có tính đặc hiệu / chọn lọc cao.
- Giới hạn phát hiện (LOD) của ochratoxin A, B là 0,1ppb , giới hạn định lượng (LOQ) là 0,3ppb.
- Giới hạn tuyến tính (LOL): 500 ng/ml và khoảng tuyến tính 1 ppb – 500 ppb.
- Độ chính xác của phương pháp nghiên cứu: phương pháp nghiên cứu có độ chính xác cao, có thể đem áp dụng để phân tích đồng thời Ochratoxin A và B.

5. Ứng dụng phương pháp để phân tích một số mẫu thực tế: ngũ cốc và các sản phẩm ngũ cốc, các loại rượu lên men. Kết quả phân tích cho thấy 2 mẫu có nhiễm ochratoxins nhưng ở mức hàm lượng dưới mức tồn dư tối đa cho phép (MRL).

## **II. Kiến nghị**

- ❖ Tiếp tục nghiên cứu thêm quy trình phân tích đồng thời các mycotoxin khác trong thực phẩm trên hệ thống LC-MS/MS.
- ❖ Mở rộng thêm đối tượng phân tích như phân tích đồng thời các mycotoxin trong thức ăn chăn nuôi, thực phẩm chức năng, sữa, thịt,...

## **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

### **Tiếng Việt**

1. Cục Quản lý chất lượng nông lâm sản và thủy sản, *Báo cáo kết quả công tác tháng 3/2012 và trọng tâm công tác tháng 4/2012* (ngày 4/4/2012) và *Báo cáo kết quả công tác tháng 4/2012 và trọng tâm công tác tháng 5/2012* (ngày 14/5/2012).
2. Trần Tứ Hiếu, Từ Vọng Nghi, Nguyễn Văn Ri, Nguyễn Xuân Trung (2007), *Hóa học phân tích, phần 2: Các phương pháp phân tích công cụ*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
3. Nguyễn Văn Ri (2009), *Giáo trình Các phương pháp tách*, khoa Hóa học trường Đại học Khoa học Tự Nhiên, Đại học Quốc Gia Hà Nội.
4. Nguyễn Đình Thành (2011), *Cơ sở các phương pháp phổ ứng dụng trong hóa học*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
5. Phạm Luận (1998), *Cơ sở lý thuyết phân tích sắc ký lỏng hiệu năng cao*, ĐH Quốc Gia Hà Nội.
6. Tạ Thị Thảo (2010), *Giáo trình Thống kê trong Hóa học phân tích*, khoa Hóa học trường Đại học Khoa học Tự Nhiên, Đại học Quốc Gia Hà Nội.
7. Mai Tất Tố, Nguyễn Thị Trâm (2007), *Dược lý học tập 1*, NXB Y học.
8. Mai Tất Tố, Nguyễn Thị Trâm (2007), *Dược lý học tập 2*, NXB Y học.
9. TCVN 9524:2012 về Thực phẩm - Xác định hàm lượng ochratoxin A trong rượu vang và bia - Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) có làm sạch bằng cột ái lực miễn nhiễm
10. TCVN 8426:2010 về Cà phê nhân - Xác định ochratoxin A bằng phương pháp sắc ký lỏng có làm sạch bằng cột ái lực miễn nhiễm
11. Trần Cao Sơn, Phạm Xuân Đà, Lê Thị Hồng Hảo, Nguyễn Thành Trung (2010), *Thẩm định phương pháp trong phân tích hóa học & vi sinh vật*, Nxb Khoa Học và Kỹ Thuật.

**Tiếng Anh**

12. Agnieszka Waskiewicz, Monika Beszterda, Jan Bocianowski, Piotr Golinski(2013), “Natural occurrence of fumonisins and ochratoxin A in some herbs and spices commercialized in Poland analyzed by UPLC – MS/MS method”, *Food Microbiology*, 36, pp. 426-431
13. Angel Medina, Francisco M. Valle-Algarra, Jos´ e V. Gimeno-Adelantado, Rufino Mateo, Fernando Mateo, Misericordia Jim´ enez (2006), “New method for determination of ochratoxin A in beer using zinc acetate and solid-phase extraction silica cartridges”, *Journal of Chromatography A*, 1121, pp.178–183
14. Aihua Zhang, Yanna Ma, Lulu Feng, Ying Wang, Chenghua He, Xichun Wang (2011), “Development of a sensitive competitive indirect ELISA method for determination of ochratoxin A levels in cereals originating from Nanjing, China”, *Food Control* 22, 706, pp. 269–277.
15. Arnau Vidal, Sonia Marín, Antonio J. Ramos, German Cano-Sancho, Vicente Sanchis (2013), “Determination of aflatoxins, deoxynivalenol, ochratoxin A and zearalenone in wheat and oat based bran supplements sold in the Spanish market”, *Food and Chemiscal Toxicology*, 53, pp. 133-138
16. Bulent Kabak (2012), “Determination of aflatoxins and ochratoxin A in retail cereal products from Turkey by high performance liquid chromatography with fluorescence detection”, *Food Control*, 28, pp. 1-6
17. Catherine Tessini, Claudia Mardones, Dietrich von Baer, Mario Vega, Erika Herlitz, Roberto Saelzer, Jorge Silva, Olga Torres (2010), “Alternatives for sample pre-treatment and HPLC determination of Ochratoxin A in red wine using fluorescence detection”, *Analytica Chimica Acta*, 660, pp. 119-126
18. 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

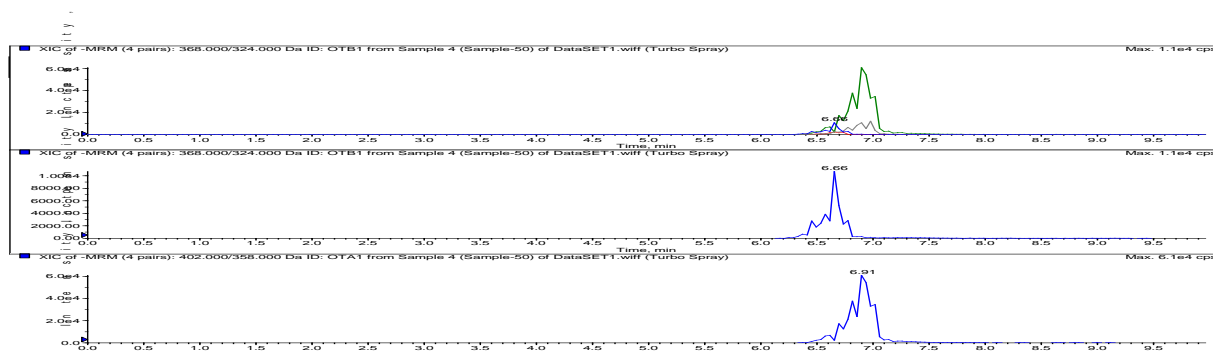
19. Eduardo Beltrán, María Ibáñez, Juan Vicente Sancho, Miguel Ángel Cortés, Vicent Yusà , Félix Hernández (2011), “Simultaneous determination of aflatoxin M, ochratoxin A, zearalenone and zearalenol in milk by UHPLC–MS/MS”, *Food Chemistry*, 126, pp.737–744
20. Mario Vega, Katherine Muñoz, Carolina Sepúlveda, Mario Aranda, Victor Campos, Ricardo Villegas Oriasis Villarroel (2009), “Solid-phase extraction and HPLC determination of Ochratoxin A in cereals products on Chilean market”, *Food Control*, 20, pp. 631-634.
21. Mohammad Hossein Mashhadizadeh Mitra Amoli-Diva, Kamyar Pourghazi (2013), “Magnetic Nanoparticles solid phase extraction for determination of ochratoxin A in cereals using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection”, *Journal Of Chromatography A*, 1320, pp. 17-25.
22. N.A. Al-Hazmi (2010), “Determination of Patulin and Ochratoxin A using HPLC in apple juice samples in Saudi Arabia”, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 17, pp. 353-359.
23. Natalia Arroyo-Manzanares, Laura Gámiz-Gracia, Ana M. García-Campaña (2012), “Determination of ochratoxin A in wines by capillary liquid chromatography with laser induced fluorescence detection using dispersive liquid–liquid microextraction”, *Food Chemistry*, 135, pp. 368-372.
24. 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, zearalenone and zearalenol in milk by UHPLC–MS/MS”, *Food Chemistry*, 146, pp. 242-249.
25. 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.



26. R. Ghali, K. Hmaissia-khlifa, H. Ghorbel, K. Maaroufi A. Hedili (2009), “HPLC determination of ochratoxin A in high consumption Tunisian foods”, *Food Control*, 20, pp.716-720.
27. R. Vatinnoa, D. Vuckovica, C.G. Zamboninb, J. Pawliszyna (2008), “Automated high-throughput method using solid-phase microextraction–liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of ochratoxin A in human urine”, *Journal of Chromatography A*, 1201, pp. 215–221.
28. Vlastimil Dohnal, Vladimír Dvor, František Malír, Vladimír Ostry, Tomáš Roubal (2013), “A comparison of ELISA and HPLC methods for determination of ochratoxin A in human blood serum in the Czech Republic, *Food and Chemiscal Toxicology*, 62, pp. 427-431
29. Yuying Jiao\*, Werner Blaas, Christian Riihl\* and Rudolf Weber (1992), “Short Communication identification of ochratoxin A in food samples by chemical derivatization and gas chromatography-mass spectrometry”, *Journal of Chromatography*, pp.364-367
30. Pedro Novoa, Géraud Moulasa, Duarte Miguel Franc, Prazeresb, Virginia Chua, Joao Pedro Conde (2013), “Detection of ochratoxin A in wine and beer by chemiluminescence-based ELISA in microfluidics with integrated photodiodes”, *Sensors and Actuators B*, pp.232-240.

## PHỤ LỤC

### Phụ lục 1: Sắc đồ khảo sát thành phần pha động



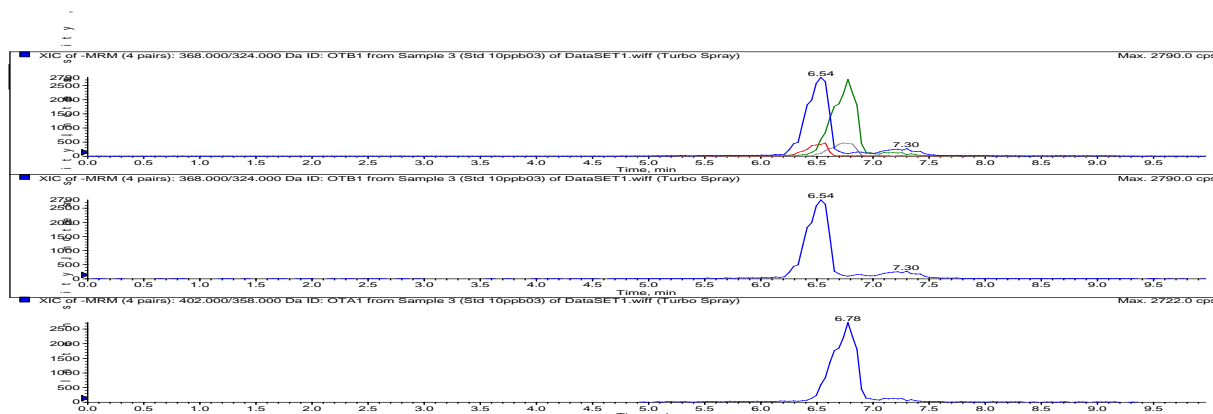
Hình P1.1: Sắc đồ các OTs sử dụng pha động gồm MeOH và axit acetic 1%



Hình P1.2: Sắc đồ OTs sử dụng pha động chứa amoniacetat 10%

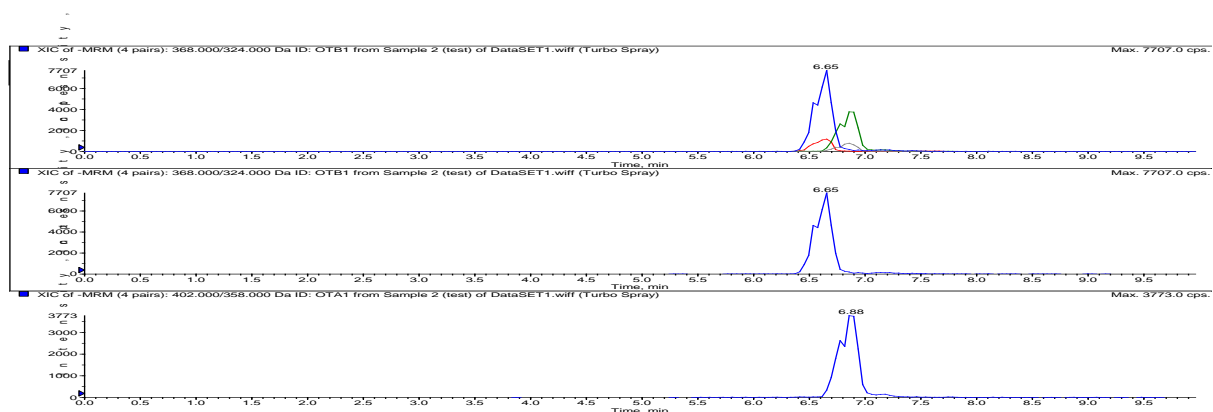


Hình P1.3: Sắc đồ OTs sử dụng pha động chứa amoniacetat 5%

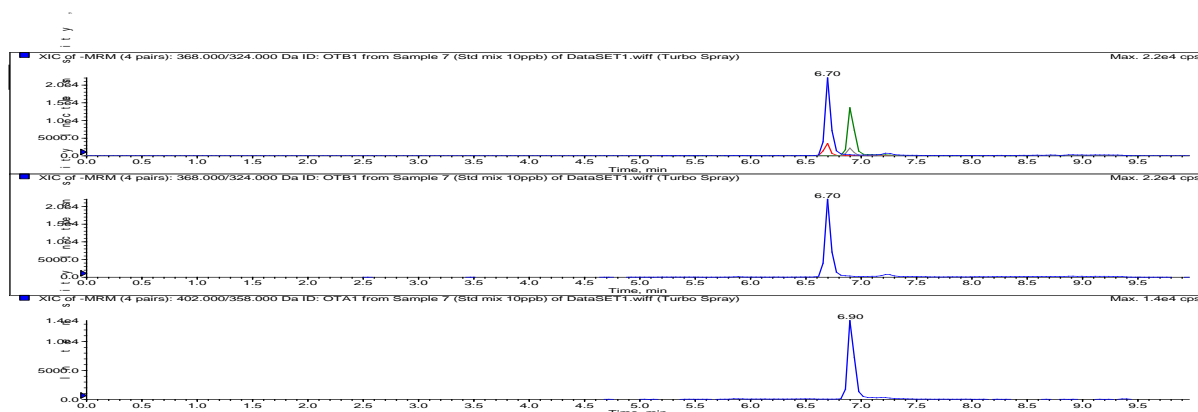


Hình P1.4: Sắc đồ OTs sử dụng pha động chứa amoniacetat 20%

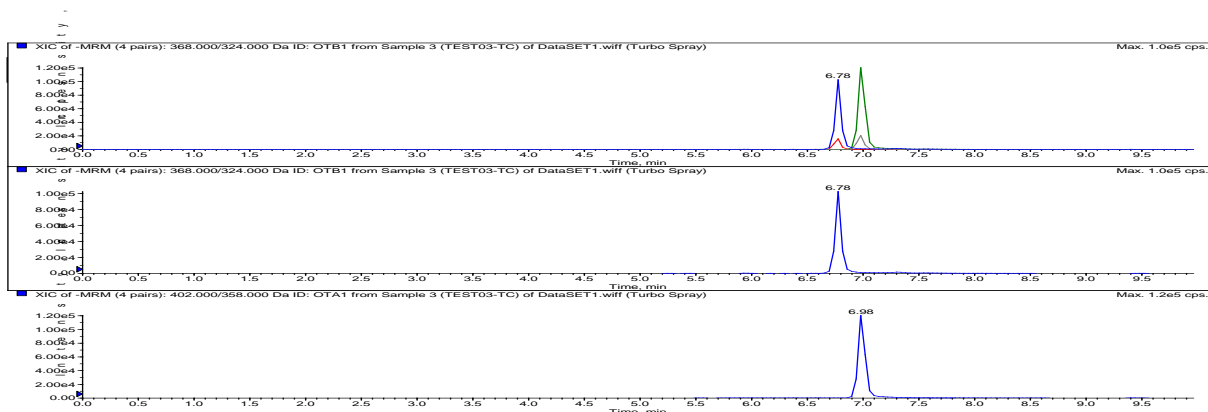
## Phụ lục 2: Kết quả khảo sát tốc độ pha động



Hình P2.1: Sắc đồ OTs sử dụng tốc độ dòng 0,8 ml/phut



Hình P2.2: Sắc đồ OTs sử dụng tốc độ dòng 1,0 ml/phut



Hình P2.3: Sắc đồ OTs sử dụng tốc độ dòng 1,2 ml/phút

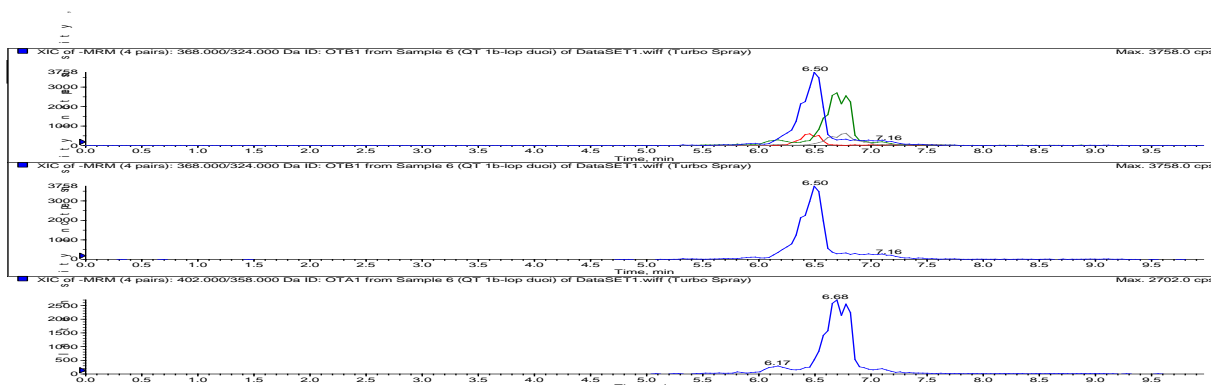
### Phụ lục 3: Kết quả khảo sát gradient pha động



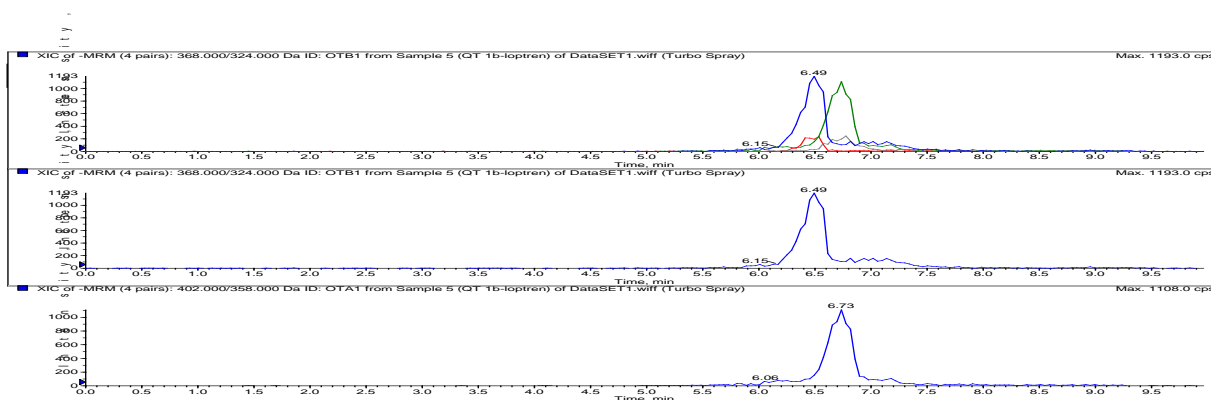
Hình P3.1: Sắc đồ OTs sử dụng gradient 1



Hình P3.2: Sắc đồ OTs sử dụng gradient 2

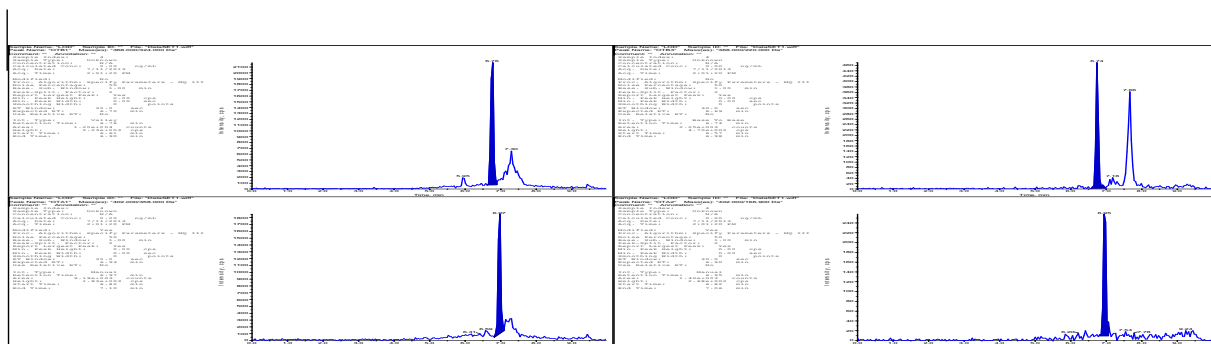


Hình P3.3: Sắc đồ OTs sử dụng gradient 3

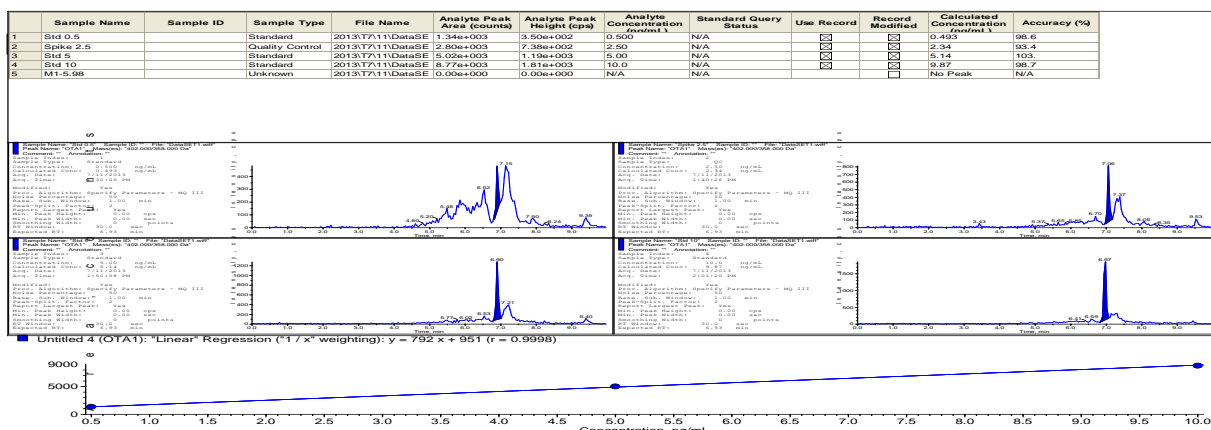


Hình P3.4: Sắc đồ OTs sử dụng gradient 4

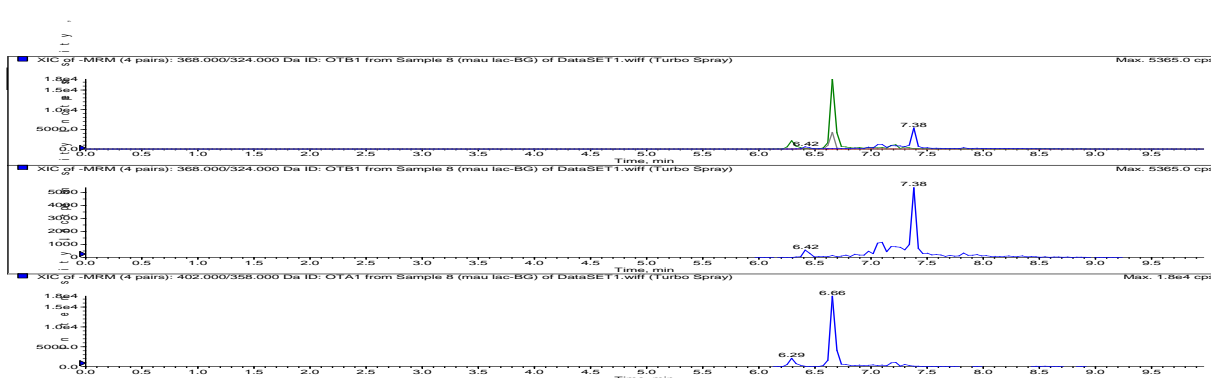
#### Phụ lục 4: Sắc đồ thẩm định phương pháp (LOD, độ lặp lại, độ thu hồi)



HìnhP4.1: Sắc đồ OTs tại LOD 0,1 ng/g



Hình P4.2: Sắc đồ OTs tại mẫu ngô thêm chuẩn 2,5 ng/g

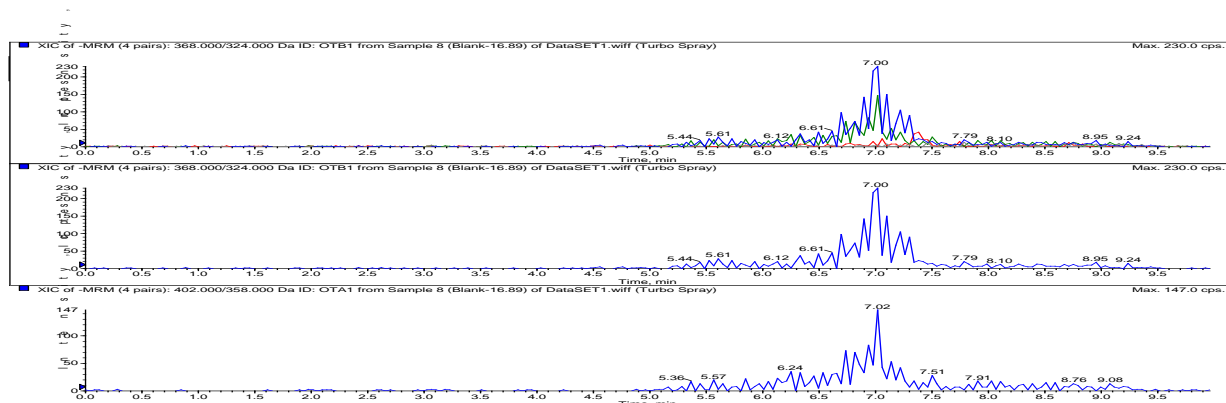


Hình P4.3: Sắc đồ OTs tại mẫu trắng ngô thêm chuẩn 10 ng/g

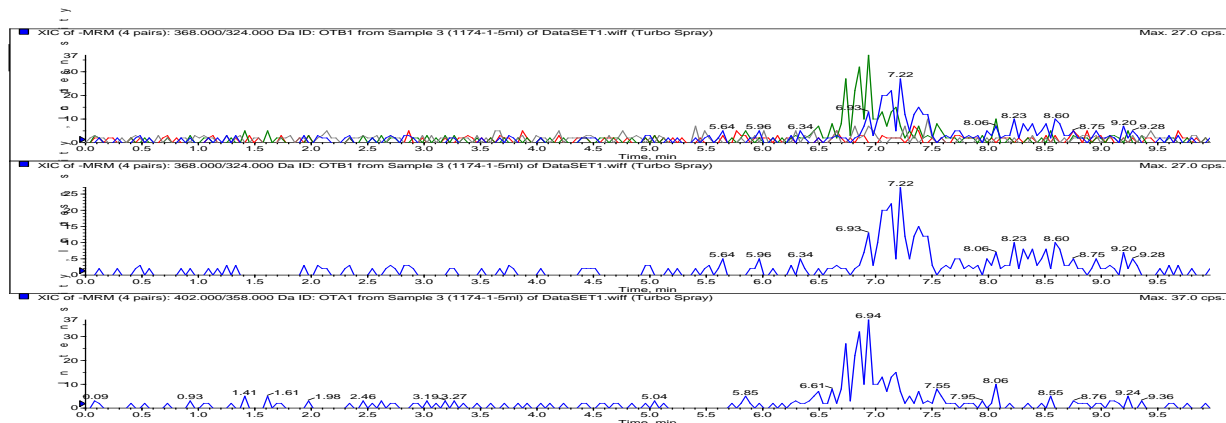
## Phụ lục 5: Một số sắc đồ phân tích mẫu thực tế



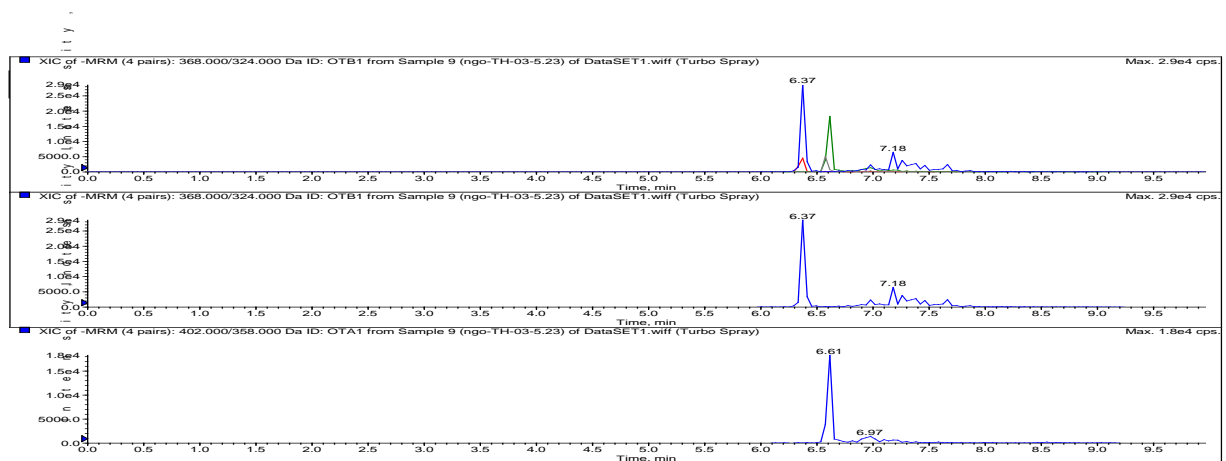
Hình P5.1: Sắc đồ mẫu rượu không có OTs



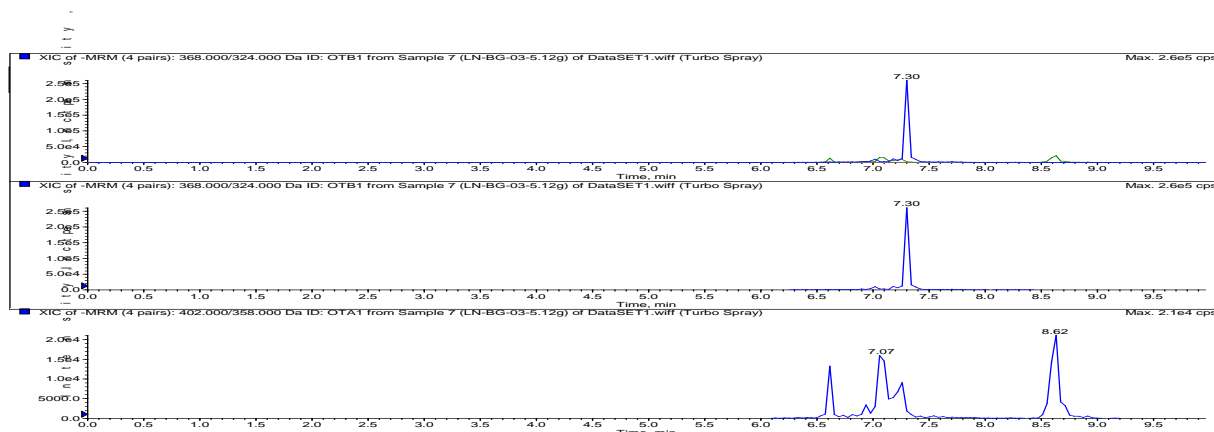
Hình P5.2: Sắc đồ mẫu lạt không có OTs



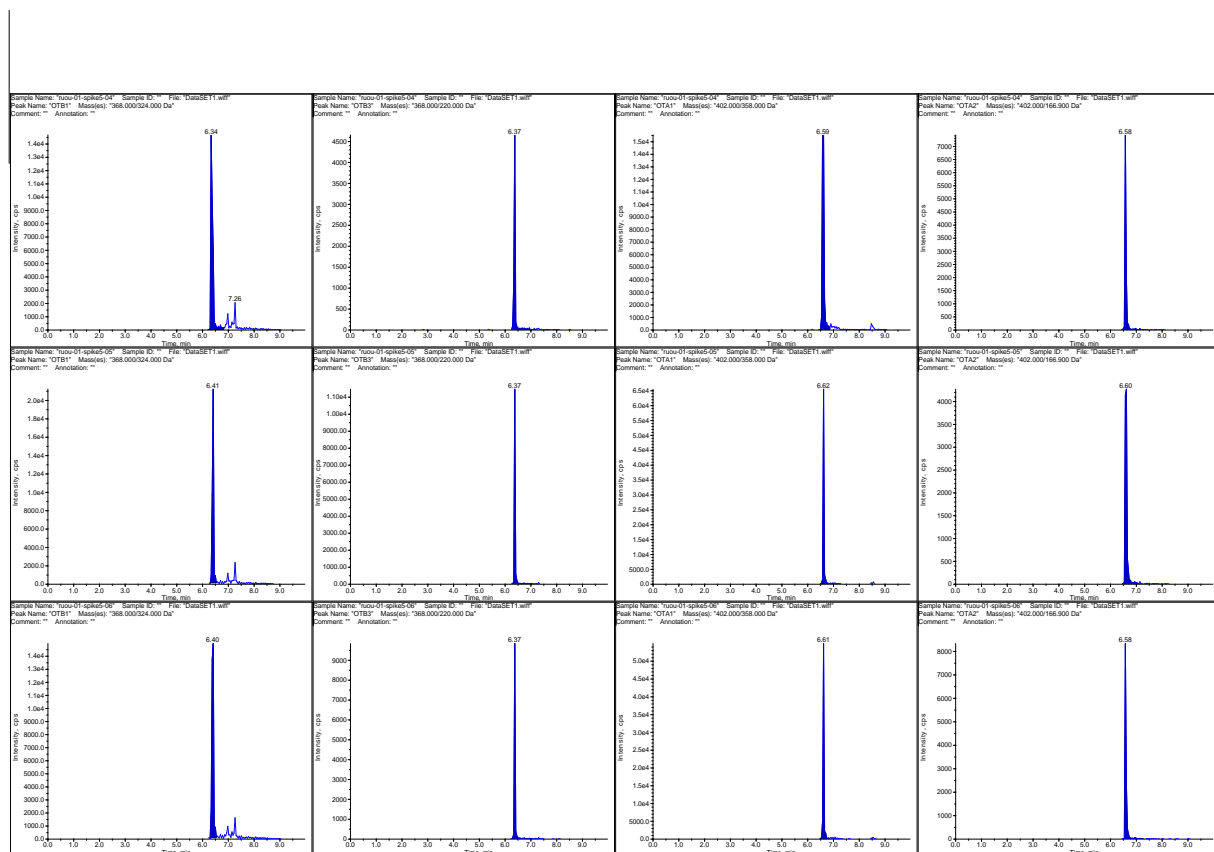
Hình P5.3: Sắc đồ mẫu ngô không có OTs



Hình P5.4 Sắc đồ mẫu Ngo-TH-03 có OTs

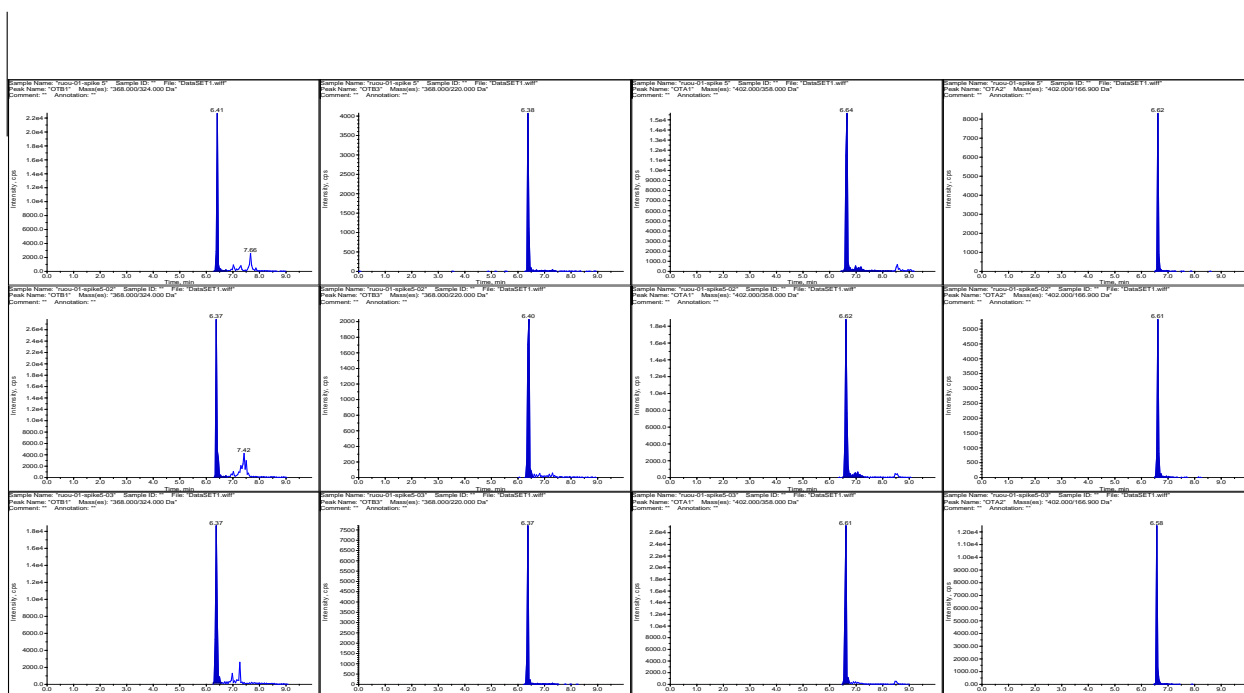


Hình P5.5: Sắc đồ mẫu LN-BG-03

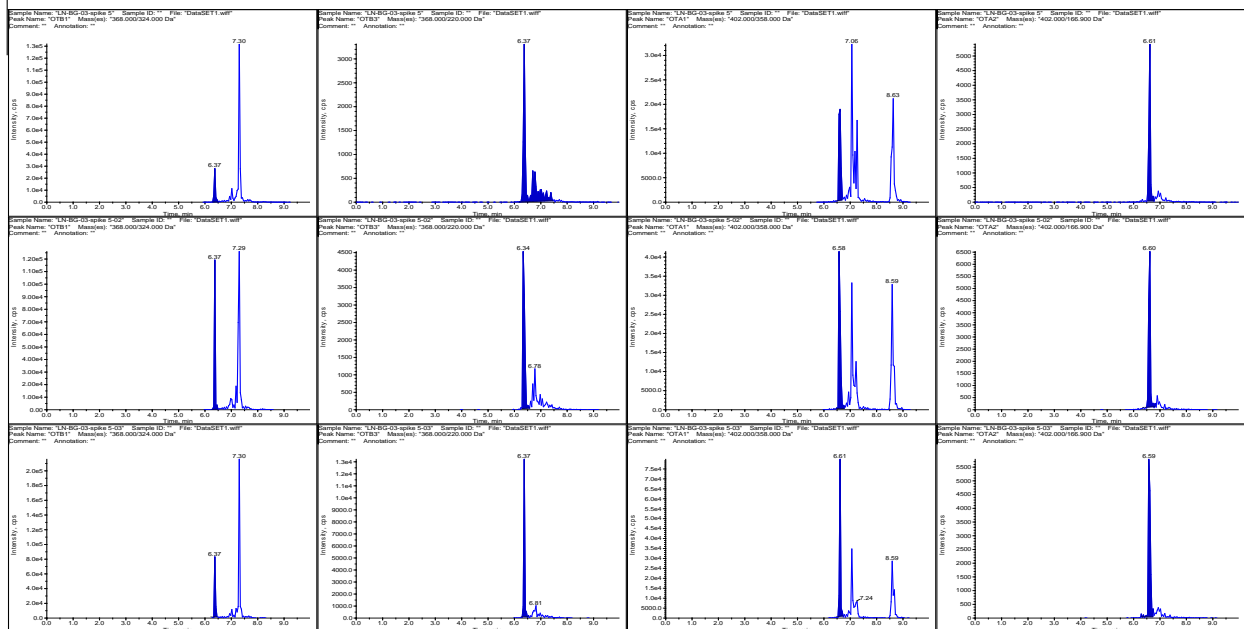


Hình P5.6: Sắc đồ mẫu rượu thêm chuẩn ở mức 5 ppb

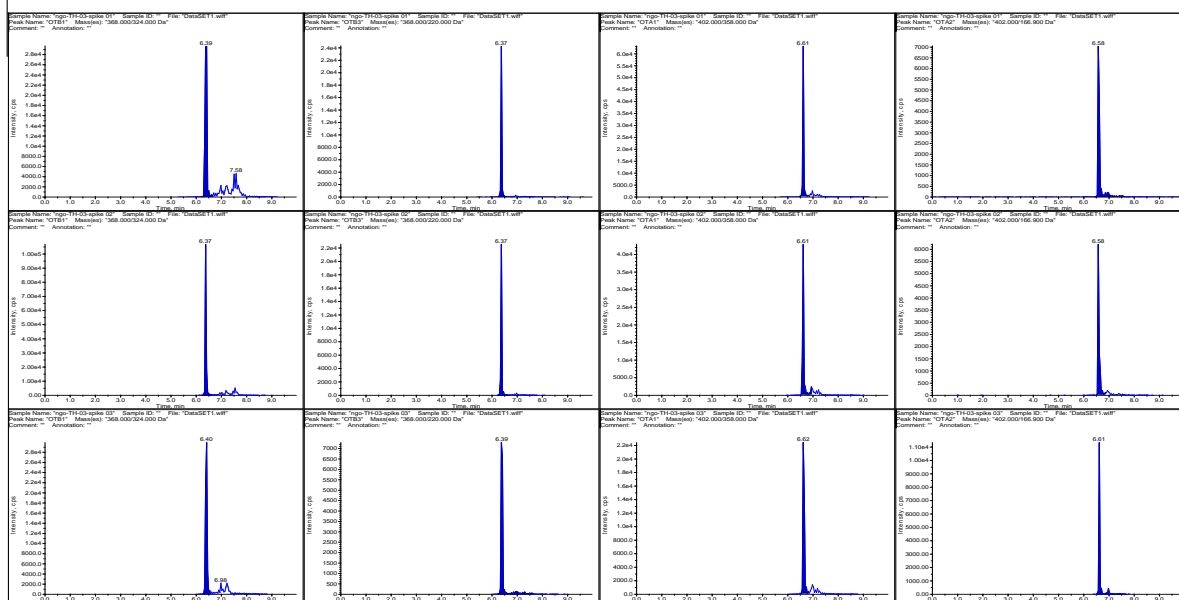
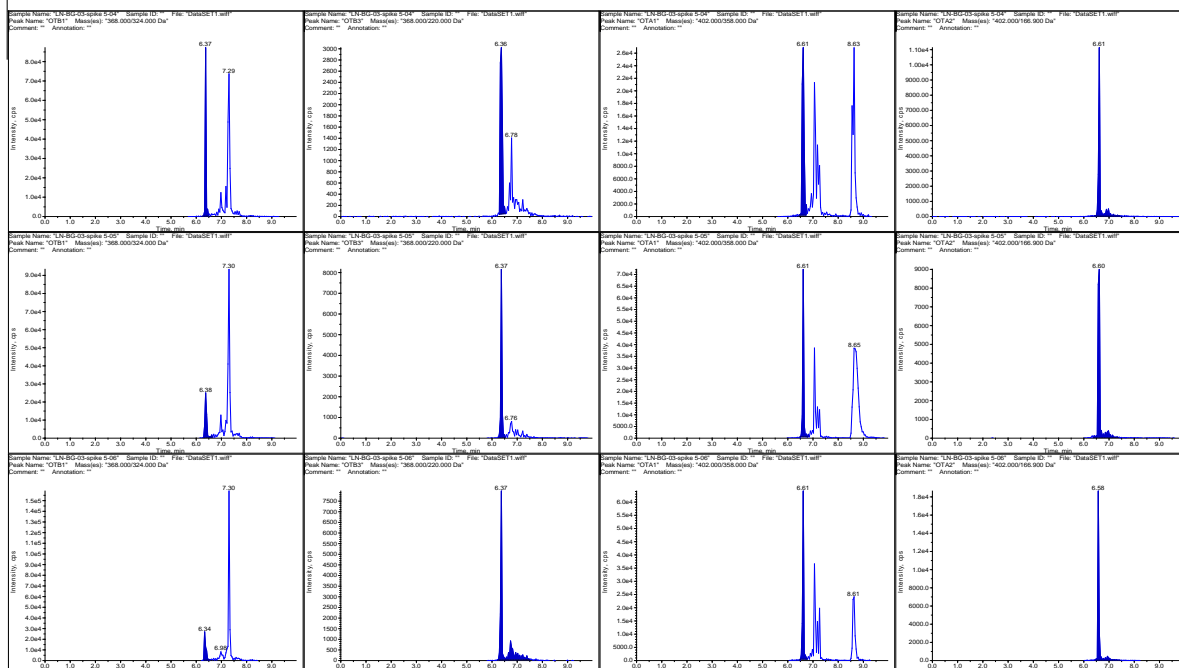


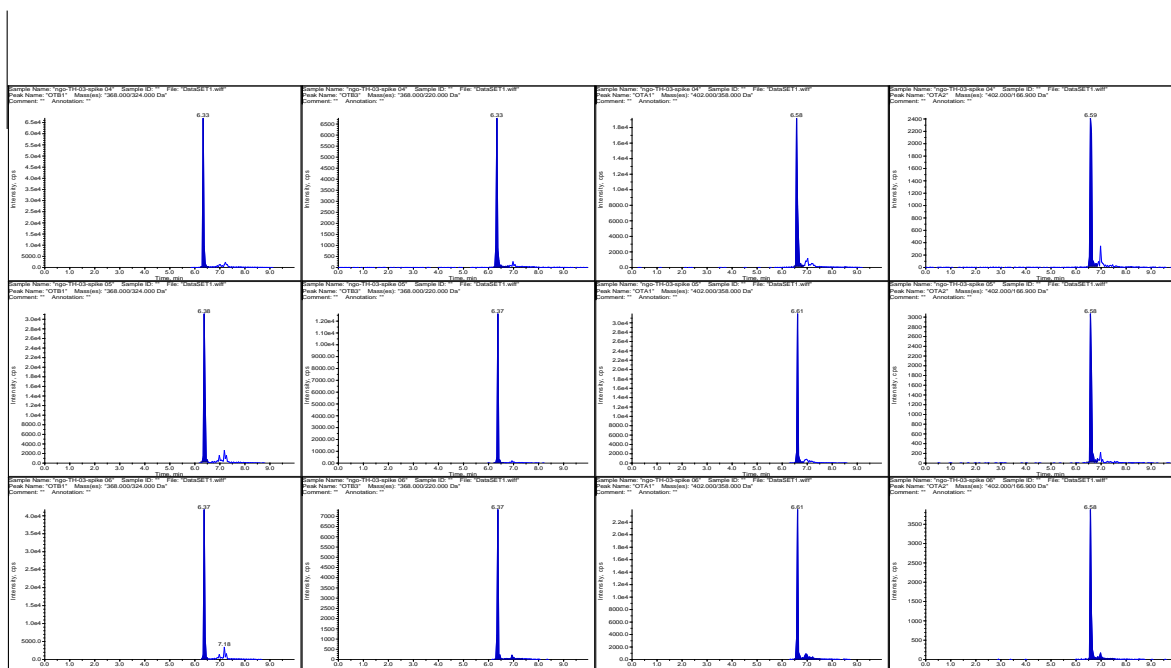


Hình P5.7: Sắc đồ mẫu rượu trắng thêm chuẩn ở mức 5 ppb



Hình P5.8: Sắc đồ mẫu LN-BG-03 thêm chuẩn ở mức 5ppb





Hình P5.12 : Sắc đồ mẫu ngô-TH-03 thêm chuẩn ở mức 5 ppb

Hình P5.13: Sắc đồ tỷ lệ các ion của các ochratoxins