

PHÂN TÍCH CÁC AMIN SINH HỌC TRONG RƯỢU VANG BẰNG PHƯƠNG PHÁP LC-MS/MS

Nguyễn Thị Hồng¹, Phạm Thị Diệu¹, Nguyễn Thị Phương Anh¹,
Nguyễn An Khánh¹, Vũ Tuấn Dương¹, Nguyễn Thị Thúy An¹, Trần Thị Mai Hương¹,
Phan Thị Phương Thảo¹, Chu Đình Bình², Nguyễn Hoàng Anh^{1*}

¹Khoa Công nghệ thực phẩm, Học viện Nông nghiệp Việt Nam
²Khoa Hóa học, Trường Hóa và Khoa học Sự sống, Đại học Bách khoa Hà Nội

*Tác giả liên hệ: hoanganhcntp@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 03.05.2024

Ngày chấp nhận đăng: 15.09.2024

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, phương pháp sắc ký lỏng ghép khối phổ hai lần (LC-MS/MS) được phát triển và áp dụng vào phân tích một số amin sinh học trong rượu vang. Histamine, tyramine, tryptamine, phenylethylamine, putrescine, cadaverine, ethanolamine, 5-hydroxytryptamine được phân tích bằng phương pháp LC-MS/MS sử dụng cột tách HILIC để tách trực tiếp các amin sinh học không qua bước dẫn xuất hóa học. Các thông số quan trọng phương pháp phân tích như lựa chọn ion mẹ, ion con, năng lượng va chạm, thành phần pha động... được khảo sát và tối ưu hóa. Khoảng tuyến tính được thực hiện nằm trong khoảng từ 5 đến 7.000 µg/l, hệ số tương quan $R^2 > 0,995$; giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) của phương pháp tương ứng nằm trong khoảng 0,4 -31,0 µg/l và 1,3-103,3 µg/l. Độ lặp lại và độ tái lập của phương pháp tương ứng nằm trong khoảng 1,3-4,8% và 2,8-5,0%. Hiệu suất thu hồi của phương pháp là 80,2-100,6%. Phương pháp LC-MS/MS đã được ứng dụng để phân tích 8 amin sinh học trong 5 mẫu rượu vang thu thập trên thị trường. Kết quả tổng hàm lượng của các amin sinh học dao động từ 1.088-3.394 µg/l. Trong đó hàm lượng histamine, amin sinh học đang được quan tâm nhất, xuất hiện trong tất cả các mẫu phân tích nhưng hàm lượng của nó nằm trong ngưỡng an toàn theo tiêu chuẩn của EFSA.

Từ khóa: Amin sinh học, rượu vang, phổ khối lượng MS/MS, HILIC, xác nhận giá trị sử dụng.

Analysis of Biogenic Amine in Wine by Liquid Chromatography in Combination with Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)

ABSTRACT

In this work, liquid chromatography in combination with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) was developed and applied to analyze biogenic amines in wine. Histamine, tyramine, tryptamine, phenylethylamine, putrescine, cadaverine, ethanolamine, and 5-hydroxytryptamine were directly analyzed by LC-MS/MS using a HILIC column without a pre-column chemical derivatization step. Some critical parameters affecting the selectivity and sensitivity of method such as selection of precursor and product ions, collision energy, component of mobile phase... were investigated and optimized. Linearity range was established from 5 to 7.000 µg/l association with regression coefficient $R^2 > 0.995$; The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) of the method were 0.4-31.0 µg/l and 1.3-103.3 µg/l, respectively. Relative standard deviation of repeatability and reproducibility were in the range of 1.3-4.8% and 2.8-5.0%, respectively. The recovery of 8 biogenic amines was from 80.2% to 100.6%. The validated LC-MS/MS method was then applied to analyze 8 biogenic amines in 5 wine samples collected on the local market. Experimental results indicated that total biogenic amines range from 1,088-3,394 µg/l in analyzed samples. Histamine, considered as the most toxic and food safety relevant, was presents in all analyzed samples. However, the concentration of this compound in all analyzed samples was below the safe level according to EFSA.

Keywords: Biogenic amines, wine, LC-MS/MS, HILIC, validation of analytical method.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Rượu vang là một loại đồ uống có cồn có

nguồn gốc từ châu Âu và được sản xuất từ quá trình lên men hoa quả, đa phần là từ nho. Trên thế giới, rượu vang đã được sử dụng cách đây

hơn 2.000 năm. Rượu vang đã được chứng minh là khi sử dụng một lượng cho phép sẽ có lợi cho sức khỏe tim mạch (Apostolidou & cs., 2015). Trong quá trình hội nhập, rượu vang ngày càng được ưa chuộng tại thị trường Việt Nam, theo báo cáo tổng quan gần đây nhất, tháng 4 năm 2023, thị trường rượu vang tăng 0,29% (Tổng cục Thống kê, 2023). Tuy nhiên, khi dùng nạp một lượng lớn rượu vang có thể dẫn tới hiện tượng dị ứng và đau nửa đầu. Hai hiện tượng này xảy ra khi cơ thể dung nạp quá nhiều amin sinh học (Jackson, 2008). Do vậy, hàm lượng amin sinh học trong rượu vang được quan tâm tới nhiều hơn trong những năm gần đây dưới góc độ an toàn thực phẩm. Amin sinh học là các hợp chất nitơ hữu cơ có khối lượng phân tử thấp, được hình thành trong quá trình trao đổi chất của sinh vật (Romano & cs., 2007). Các amine sinh học là các bazơ hữu cơ có cấu trúc không vòng, vòng thơm hoặc dị vòng có thể được tìm thấy trong một số loại thực phẩm (Silla, 1996). Một số các amine sinh học như histamine, tyramine, tryptamine, phenylethylamine,... khi dung nạp quá ngưỡng cho phép sẽ gây ra nhiều triệu chứng có hại cho người tiêu dùng như đau đầu, tiêu chảy, nôn mửa, dị ứng, tăng nhịp tim, tăng và giảm huyết áp (Saha & cs., 2024). Trong quá trình lên men tạo vang, ngoài các sản phẩm chính như CO₂ và rượu, chúng còn sinh ra các sản phẩm thứ cấp như amin sinh học (Haseeb & cs., 2019).

Hiện nay, nhiều phương pháp phân tích hàm lượng amin sinh học trong thực phẩm đã được nghiên cứu và phát triển như phương pháp UV-Vis, sắc ký lỏng hiệu năng cao sử dụng cột tách pha đảo dùng detector UV-Vis, detector huỳnh quang, sắc ký khí, sắc ký lỏng ghép với phổ khối hai lần (Tašev & cs., 2017; Tiris & cs., 2023). Amin sinh học cũng được phân tích bằng GC-MS sau khi đã chuyển các hợp chất này thành các hợp chất dễ bay hơi và bền nhiệt sử dụng chất dẫn xuất hóa thích hợp (Fabjanowicz & cs., 2022). Do các hợp chất này kém hoặc không bị lưu giữ trên cột tách pha đảo. Các hợp chất amin sinh học thường được dẫn xuất hóa hóa học nhằm tăng khả

năng lưu giữ trên cột tách pha đảo cũng như tăng độ nhạy của phương pháp. Hầu hết đều dựa vào việc tách các amin sinh học trên cột tách sau khi đã dẫn xuất hóa bằng tác nhân hóa học thích hợp như OPA, Dynascyl (Liu & cs., 2020; Manetta & cs., 2016; Milheiro & cs., 2019). Nhược điểm chính của phản ứng dẫn xuất hóa là khó kiểm soát hiệu suất của phản ứng, đặc biệt là trong nền mẫu phức tạp như mẫu thực phẩm, do đó thường làm tăng độ không đảm bảo đo của phương pháp phân tích. Mục tiêu của nghiên cứu này là phát triển phương pháp dùng cho phân tích trực tiếp amin sinh học không bước dẫn xuất hóa.

Do đó, nghiên cứu này tập trung vào phát triển phương pháp phân tích các amin sinh học trong mẫu rượu vang bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao sử dụng detector phổ khối lượng (LC-MS/MS). Từ cấu trúc hóa học của các amin sinh học, các chất này có độ phân cực lớn nên không hoặc kém lưu giữ trên cột tách pha đảo. Vì vậy, cơ chế tách HILIC với ưu điểm là tách và lưu giữ tốt chất phân cực được sử dụng. Khác với sắc ký pha đảo mà trong pha tĩnh không phân cực và pha động phân cực, với HILIC cả pha tĩnh và pha động đều phân cực. Cơ chế tách chính được cho là sự phân bố của chất phân tích giữa pha động có chứa hàm lượng dung môi hữu cơ cao và lớp nước bị hấp phụ trên bề mặt pha tĩnh. Dung môi hữu cơ thường được sử dụng là acetonitrile và dung môi này hoàn toàn thích hợp cho phép đo phổ khối lượng. Do đó, các amin sinh học trong mẫu rượu vang được tách trực tiếp bằng sắc ký lỏng với cột tách HILIC sử dụng pha động có chứa amoni acetate và axit formic. Các amin sinh học sau đó được nhận biết bằng phổ khối lượng MS/MS ở chế độ đo giám sát chọn lọc phản ứng đa ion (MRM: Multiple Reaction Monitoring). Các thông số quan trọng của phương pháp phân tích như khoảng tuyến tính, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng, độ lặp lại, độ tái lập... được khảo sát và đánh giá. Phương pháp phân tích sau khi đã được xác nhận giá trị sử dụng được áp dụng và phân tích amin sinh học trong mẫu rượu vang thu thập ở ngoài thị trường.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Hóa chất

Các chất chuẩn amin sinh học bao gồm tyramine (TYR, độ tinh khiết 99,6%), putrescine (PUT, 93,7%), cadaverine (CAD, 97%), histamine (HIS, 98,8%), 2-phenylethylamine (PHE, 98,4%), tryptamine (TRY, 98,6%), ethanolamine (ETA, 98%), 5-hydroxytryptamine (5-HT, 98,2%) được mua từ hãng CATO Research Chemicals, Trung Quốc. Dung dịch chuẩn gốc đơn của các amin sinh học được chuẩn bị bằng cách hòa tan lượng chất chuẩn cân trước trong dung dịch axit HCl 0,1M. Dung dịch chuẩn gốc đơn được bảo quản trong ống đựng mẫu màu nâu và bảo quản ở -35°C. Dung dịch chuẩn hỗn hợp được chuẩn bị bằng cách trộn dung dịch chuẩn gốc đơn trên trong axit HCl 0,1M. Dung dịch làm việc được pha loãng hàng ngày từ dung dịch chuẩn hỗn hợp trong axit HCl 0,1M hoặc trong pha động. Metanol, acetonitrile (ACN), NH₃ (28%), axit formic đặc (98%) và amoni axetat loại tinh khiết

dùng cho LC-MS được mua từ hãng Sigma Aldrich, Singapore.

Pha động sử dụng trong LC-MS/MS bao gồm hai kênh: kênh A được chuẩn bị bằng cách hòa tan lượng cân amoni axetat trong nước deion (Merck Millipore, Đức) và điều chỉnh tới pH thích hợp bằng axit formic. Kênh B là acetonitrile. Pha động được lọc qua màng lọc kích thước 0,22µm và loại khí hòa tan bằng siêu âm trước khi sử dụng.

2.2. Mẫu phân tích

Mẫu phân tích: Mẫu rượu vang được thu thập tại một số siêu thị tại địa bàn huyện Gia Lâm, Hà Nội và được mã hóa tương ứng là các mẫu BT, CA, DF, DT và DD. Sau đó mẫu rượu vang được chuyển đến phòng thí nghiệm, chai chứa mẫu được lắc đều trước khi chuyển ra ống falcon polypropylen 15ml. Mẫu sử dụng để phân tích ngay được bảo quản ở nhiệt độ 4°C. Các mẫu chưa phân tích được bảo quản ở -35°C.

Bảng 1. Điều kiện phân tích amin sinh học bằng LC-MS/MS

Đại lượng	Thông số
Các đại lượng sắc ký	
Cột tách	Waters HILIC Xbride (3,5µm; 2,1mm × 150mm)
Nhiệt độ cột tách	40°C
Pha động	Kênh A: 40mm amoni axetat trong nước deion, điều chỉnh pH 4 bằng axit formic, Kênh B: ACN
Chế độ rửa giải	Gradient pha động
Tốc độ pha động	0,3 ml/phút
Nhiệt độ buồng giữ mẫu	10°C
Thể tích bơm mẫu	3µl
Các đại lượng MS	
Nguồn ion hóa	Phun điện ESI
Chế độ ion hóa	Dương (+ESI)
Nhiệt độ ion hóa	300°C
Thế ion hóa	+ 4kV
Nhiệt độ loại dung môi	525°C
Tốc độ khí làm khô	10 l/phút
Tốc độ khí tạo sol	3 l/phút
Tốc độ khí gia nhiệt	10 l/phút
Chế độ ghi nhận tín hiệu	MRM (multiple reaction monitoring)
Chế độ định lượng	Ngoại chuẩn sử dụng điện tích píc

Xử lý mẫu: Trước khi xử lý mẫu, mẫu được đưa vào bể siêu âm trong 20 phút để đuổi khí đồng nhất mẫu. Sau đó, mẫu được làm sạch bằng phương pháp chiết pha rắn (SPE) sử dụng cột chiết trao đổi cation kết hợp với pha đảo (Cột MCX của hãng Waters, Mỹ, thể tích 3ml 100mg chất nhồi). Cột SPE đầu tiên được hoạt hóa bằng 5ml MeOH, sau đó bằng 5ml nước deion và cuối cùng bằng 5ml dung dịch axit formic trong nước deion, pH 3. Sau đó, 1ml mẫu được chuyển lên cột chiết SPE và chất gây ảnh hưởng được rửa bằng nước deion. Chất phân tích được rửa giải bằng dung dịch MeOH/NH₃ 28% (95/5 theo thể tích) và thu lại. Dung dịch rửa giải được thổi khô dưới dòng khí N₂. Hoà tan mẫu thu được bằng 1ml dung dịch 90% ACN + 10% nước deion. Dung dịch mẫu được lọc qua màng lọc 0,22µm và chuyển vào ống chứa mẫu dùng cho bộ bơm mẫu tự động và phân tích bằng LC-MS/MS. Mẫu trắng được chuẩn bị bằng cách thay mẫu vang bằng nước deion và tiến hành xử lý mẫu giống như của mẫu thực.

2.3. Phương pháp LC-MS/MS

Hệ thống LC-MS/MS model 8050 của hãng Shimadzu (Nhật bản) được sử dụng dùng để phân tích các amin sinh học. Hệ thống sắc ký lỏng bao gồm bộ loại khí trực tuyến (online) cho pha động model DGU 405, bơm cao áp bốn kênh model LC-40D X3, bộ trộn dung môi áp suất thấp, bộ bơm mẫu tự động model SIL40C X3, buồng ổn nhiệt cho cột tách model CTO-40S, phổ khối lượng MS/MS model 8050 kèm theo nguồn ion hóa phun điện được sử dụng như một detector cho sắc ký lỏng. Cột sắc ký lỏng Xbridge HILIC (chiều dài cột 150mm × đường kính trong cột tách 2,1mm × kích thước hạt nhồi 3,5µm của hãng Waters, Mỹ) được dùng để tách các amin sinh học. Pha động bao gồm hai kênh: kênh A 40 mM amoni axetat trong nước deion, điều chỉnh pH 4 bằng axit formic đặc và kênh B chứa acetonitrile. Chi tiết các điều kiện vận hành của LC-MS/MS cho phân tích amin sinh học được liệt kê trong bảng 1.

Các amin sinh học được tách sử dụng chương trình thành phần pha động. Chương trình này được cài đặt như sau: Bắt đầu với 80% kênh B và 20% kênh A trong khoảng 0,5 phút,

sau đó tăng lên 80% kênh A và 20% B trong 7 phút và giữ tại thành phần pha động này trong 2 phút. Pha động sau đó quay lại 80% kênh B và 20% kênh A và giữ ở điều kiện pha động này 8 phút để cân bằng và hoạt hóa cột tách sắc ký cho lần bơm mẫu tiếp theo. Phần mềm điều khiển LabSolution, phiên bản 5.1.18 (Shimadzu, Nhật Bản) dùng để thu nhận và xử lý tín hiệu từ hệ thống LC-MS/MS được sử dụng.

2.4. Xử lý số liệu

Phần mềm LabSolution version 5.1.18 (Shimadzu, Nhật Bản) được sử dụng để tối ưu, điều khiển, thu nhận và xử lý tín hiệu. Diện tích pic được lấy tích phân kế và sử dụng để định lượng các amin sinh học trong mẫu theo phương pháp đường chuẩn. Sự có mặt của amin sinh học trong mẫu phân tích được xác định đồng thời bằng ba thông số: thời gian lưu trên cột tách HILIC, sự xuất hiện đồng thời của hai bước chuyển khối MS/MS và tỉ lệ tín hiệu tương đối (tỉ lệ ion) của hai bước chuyển khối này kèm theo độ không đảm bảo đo cho trước. Tất cả các thí nghiệm được tiến hành lặp lại ít nhất ba lần và giá trị trung bình (diện tích pic, thời gian lưu) được sử dụng để đánh giá và biểu diễn thông qua độ lệch chuẩn tương đối. Mẫu trắng được sử dụng trong xử lý mẫu và bơm mẫu trên hệ LC-MS/MS nhằm đánh giá nhiễm chéo trong quá trình chuẩn bị mẫu phân tích và phân tích mẫu. Bên cạnh đó, số liệu thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm Excel 2019 (Microsoft, Mỹ) và Skyline MS (MacCross Lab, University of Washington, Mỹ),

Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) được xác định dựa vào tỉ số tín hiệu (S, chiều cao pic sắc ký) chia cho nhiễu đường nền (N). Nhiễu đường nền được xác định ở cả hai phía đường nền của pic sắc ký chất phân tích với bề rộng mỗi bên tối thiểu gấp 10 lần chiều rộng của pic tại nửa chiều cao. LOD và LOQ được xác định là nồng độ nhỏ nhất cho tỉ lệ S/N tương ứng bằng 3 và 10. Trong nghiên cứu này, tỉ lệ S/N được xác định dựa vào mẫu thêm chuẩn ở nồng độ thấp nhất trong đường chuẩn, xử lý mẫu và phân tích bằng LC-MS/MS. Độ lặp lại của phương pháp phân tích được đánh giá thông qua phân tích lặp lại mẫu 06 lần, diện tích pic được dùng để đánh giá và biểu diễn

thông qua độ lệch chuẩn tương đối. Độ tái lập của phương pháp được đánh giá thông qua phân tích mẫu lặp lại giữa các ngày khác nhau (thực hiện trong 03 ngày, mỗi thí nghiệm lặp lại 05 lần). Hiệu ứng nền mẫu được đánh giá thông qua so sánh hệ số góc của hai đường chuẩn trong dung môi và trong nền mẫu thực của cùng một chất trong cùng một khoảng nồng độ. Hiệu ứng nền mẫu được tính theo công thức ($ME (\%) = 100 \times a'/a$) trong đó a' và a là hệ số góc của đường chuẩn trong nền mẫu và trong dung môi. Nền mẫu được coi là ít ảnh hưởng khi ME nằm trong khoảng từ 80-120% (Peters & cs., 2007). Độ chọn lọc của phương pháp được xác định dựa trên điểm IPs, sự xuất hiện của pic chất tại cùng thời gian lưu trong mẫu thêm chuẩn và không xuất hiện của chất đó trong mẫu trắng. Hiệu suất thu hồi được xác định dựa trên mẫu thêm chuẩn ở ba nồng độ, tại nồng độ giới hạn định lượng, ba lần nồng độ giới hạn định lượng và năm lần nồng độ giới hạn định lượng. Hàm lượng amin sinh học trong mẫu rượu vang được biểu diễn là giá trị trung bình của ba lần phân tích với đơn vị $\mu\text{g/l}$.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tối ưu các điều kiện phân tích amin sinh học bằng LC-MS/MS

Tối ưu hóa điều kiện MS: Phương pháp phân tích LC-MS/MS sử dụng kỹ thuật ion hóa phun điện chế độ phân cực dương (+ESI) được sử dụng phân tích amin sinh học. Do đó các điều kiện như thông số của nguồn ion hóa, thông số của chế độ đo MS/MS cần được tối ưu hóa nhằm thu được phương pháp đo có độ nhạy và độ chọn lọc cao nhất. Để khảo sát và tối ưu các điều kiện của MS/MS, dung dịch chuẩn chứa hỗn hợp 8 chất amin sinh học nồng độ $5.000 \mu\text{g/l}$ trong hỗn hợp acetonitrile/nước deion (90/10 theo thể tích) được sử dụng. Tối ưu hóa các điều kiện của MS/MS được thực hiện thông qua kỹ thuật bơm mẫu dòng chảy sử dụng chất mang gồm 50% kênh A và 50% kênh B ở tốc độ $0,3 \text{ ml/phút}$. Từ công thức hóa học của các amin sinh học, ion mẹ của các chất phân tích này là ion có tỉ số khối lượng/điện tích (m/z) trùng với khối lượng phân tử bị proton hóa ($[M+H]^+$) trong pha động có tính axit và chế độ ion hóa dương. Các ion con

được lựa chọn bằng cách phân mảnh ion mẹ với năng lượng bắn phá thích hợp và các ion con sinh ra độ chọn lọc và có cường độ cao nhất ứng với mỗi amin sinh học cụ thể. Ví dụ trường hợp của histamine, khối lượng phân tử là $111,15 \text{ g/mol}$ tương ứng với công thức phân tử là $C_5H_9N_3$ sau khi bị ion hóa ở chế độ ion hóa dương sẽ hình thành ion mẹ có tỉ số m/z 112amu tương ứng với cấu tạo ion $[C_5H_9N_3+H]^+$ và ion này khi phân mảnh tạo thành hai ion con có tỉ số m/z tương ứng là 68amu và 95amu. Hai ion con được hình thành từ ion mẹ của histamine có công thức hóa học tương ứng là $[C_3NH_6]^+$ và $[C_5H_7N_2]^+$. Sự xuất hiện của ion mẹ và các ion con của histamine đã được so sánh với thư viện phổ MS/MS NIST phiên bản 2.0 (NIST, Viện Khoa học và Công nghệ, Mỹ) và trong công bố trước đây (Gianotti & cs., 2008; Saccani & cs., 2005). Chi tiết về các ion mẹ và ion con của 8 amin sinh học được liệt kê trong bảng 2.

Tối ưu hóa điều kiện tách sắc ký: Từ cấu trúc hóa học của các hợp chất amin sinh học, các hợp chất là có độ phân cực lớn, đặc biệt là có thể tồn tại ở trạng thái ion hóa trong môi trường axit. Vì vậy, trong nghiên cứu này, cột tách sắc ký XBridge HILIC được sử dụng cho phân tích trực tiếp các amin sinh học. Với cột tách HILIC, pha động sử dụng thường chứa dung môi hữu cơ với tỉ lệ cao. Bên cạnh đó, chất điện ly dễ bay hơi như amoni axetat, axit acetic, axit formic... cũng được thêm vào pha động nhằm điều chỉnh lực rửa giải và pH của pha động.

Do đó thành phần pha động dùng để tách các amin sinh học bao gồm ACN, nước deion, amonium acetate, axit formic. Các đại lượng ảnh hưởng tới khả năng lưu giữ và phân tách của các amin sinh học trên cột tách HILIC gồm pH (gồm ba điểm, pH 5,0, 4,5 và 4,0; thành phần pha động (02 chương trình pha động) được khảo sát và đánh giá để đạt được khả năng lưu giữ và độ phân giải sắc ký cao nhất. Bên cạnh đó, độ nhạy của phương pháp phân tích cũng là một tiêu chuẩn dùng để đánh giá và lựa chọn các điều kiện tách. Kết quả thực nghiệm chỉ ra rằng pH tối ưu cho tách các amin sinh học là 4.0 và gradient thành phần pha động tối ưu là gradient thành phần pha động đã trình bày trong mục 2.3. Sắc đồ LC-MS/MS của 8 amin sinh học được trình bày ở hình 1.

Bảng 2. Công thức hóa học, khối lượng phân tử, ion mẹ và ion con của amin sinh học và các thông số tối ưu của phép đo MS/MS

Chất phân tích	Công thức phân tử	Khối lượng phân tử (g/mol)	t _R (phút)	Chế độ ion hóa	Ion mẹ (m/z, Da)	Ion con (m/z, Da)	Năng lượng va chạm (eV)	Dwell time (ms)	Tỉ lệ ion (%)
TRY	C ₁₀ H ₁₂ N ₂	160,22	2,1	+ESI	161	144	-10	20	21,0
						117	-15	20	
PHE	C ₈ H ₁₁ N	121,18	2,2	+ESI	122	105	-10	20	21,1
						77	-35	20	
5-HT	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O	176,22	2,2	+ESI	177	160	-10	20	30,0
						115	-16	20	
TYR	C ₈ H ₁₁ NO	137,18	2,3	+ESI	138	121	-14	20	26,3
						103	-20	20	
ETA	C ₂ H ₇ NO	61,08	3,1	+ESI	62	44	-14	20	20,4
						45	-15	20	
HIS	C ₈ H ₉ N ₃	111,15	4,7	+ESI	112	95	-22	20	27,3
						68	-25	20	
PUT	C ₄ H ₁₂ N ₂	88,15	6,1	+ESI	89	72	-15	20	11,0
						30	-39	20	
CAD	C ₅ H ₁₄ N ₂	102,18	6,1	+ESI	103	86	-15	20	10,0
						69	-24	20	

Như trình bày trong hình 1, các amin sinh học được lưu giữ và tách tốt trên cột tách HILIC tốt, các pic thu được có tính đối xứng cao (hệ số bất đối xứng nằm trong khoảng từ 0,94 đến 1,07). Do đó có thể kết luận cột tách HILIC đáp ứng được khả năng phân tách các hợp chất amin sinh học sử dụng pha động gồm kênh A là 40mm amoni axete và 1% axit formic trong nước deion và kênh B là acetonitrile. Bên cạnh đó, dung môi dùng để hòa tan chất phân tích trước khi bơm lên cột tách HILIC cũng ảnh hưởng đến hiệu quả tách. Hai dung môi hòa tan mẫu được sử dụng là nước và ACN và đánh giá khả năng tách thông qua hình dạng pic sắc ký khi sử dụng hai dung môi này. Kết quả thực nghiệm chỉ ra rằng khi sử dụng ACN, hình dạng pic sắc ký thu được sắc nét hơn. Do đó dung môi hòa tan chất phân tích được sử dụng là ACN cho các thí nghiệm tiếp theo.

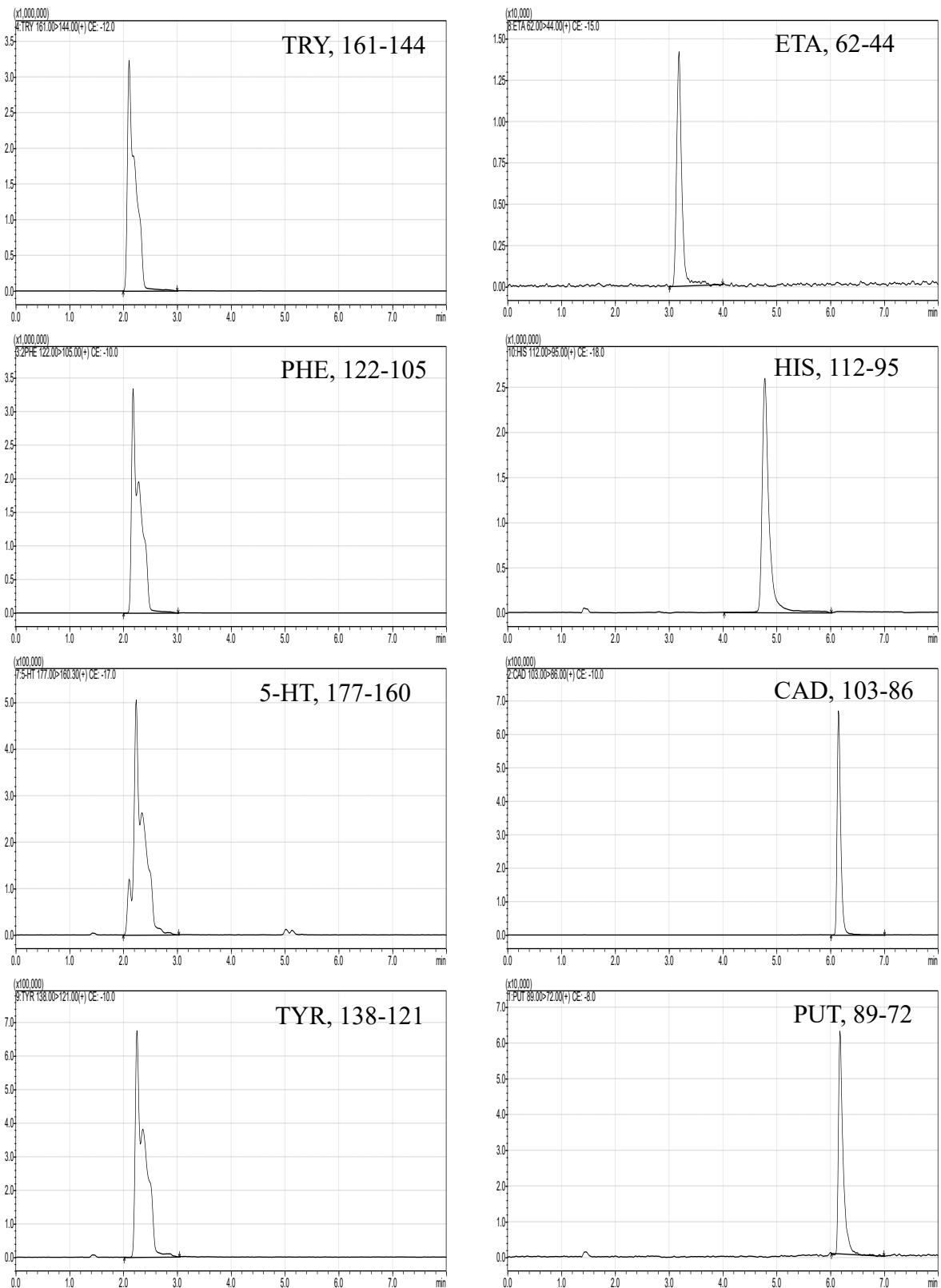
3.2. Xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp phân tích

Khoảng tuyến tính: Khoảng tuyến tính được khảo sát trong khoảng nồng độ từ 0,1 đến

9,1 mg/l đối với tất cả amin sinh học. Diện tích pic của chất phân tích được biểu diễn là một hàm tuyến tính theo nồng độ. Khoảng nồng độ, phương trình hồi qui tuyến tính và hệ số hồi qui R² được liệt kê trong bảng 3.

Bảng 3 cho thấy mối tương quan cao giữa diện tích và nồng độ chất phân tích, r của tất cả các chất đều lớn hơn 0,997.

LOD và LOQ: Trong nghiên cứu này, tỉ số S/N được lấy trực tiếp từ phần mềm và được sử dụng để tính LOD, LOQ và được thực hiện trên nền mẫu thực thêm lặp 1 chuẩn. Kết quả LOD và LOQ được trình bày trong bảng 3. Giới hạn của phương pháp LC-MS/MS sử dụng cột tách HILIC nằm trong khoảng từ 0,4 µg/l đến 31 µg/l và có thể so sánh được với độ nhạy của các phương pháp sắc ký pha đảo sử dụng kỹ thuật dẫn xuất hóa trước cột tách dùng cho phân tích amin sinh học (Gil & cs., 2022; Liu & cs., 2020; Lourenço & cs., 2022; Yue & cs., 2021). Bên cạnh đó, LOD và LOQ này cũng đủ nhạy để phân tích trực tiếp các amin sinh học trong mẫu rượu vang (Čuš & cs., 2022; Han & cs., 2022; Niedzwiedz & cs., 2022; Tašev & cs., 2017).



Hình 1. Sắc đồ LC-MS/MS của 8 amin sinh học trong dung dịch chuẩn nồng độ 1.000 $\mu\text{g/l}$ ở điều kiện phân tích tối ưu, bước chuyển khối MS/MS và tên chất tương ứng được chèn trong hình

Bảng 3. Các đại lượng đặc trưng của phương pháp phân tích các amin sinh học bằng LC-MS/MS sử dụng cột tách HILIC

Chất phân tích	Phương trình hồi qui	Khoảng nồng độ ($\mu\text{g/l}$)	R^2	Độ lặp lại (RSD,%)	Độ tái lập (RSD,%)	LOD ($\mu\text{g/l}$)	LOQ ($\mu\text{g/l}$)
TRY	$Y = 997.497.552x - 700.781$	5-6.400	0,9951	2,6	2,8	0,7	2,2
PHE	$Y = 1.180.176.491x - 1.215.986$	5-5.000	0,9952	3,8	4,0	0,4	1,3
5-HT	$Y = 361.061.329x - 402.367$,	10-7.000	0,9951	3,5	4,9	1,7	5,7
TYR	$Y = 263.233.791x - 111.026$,	20-5.500	0,9957	1,3	5,0	4,4	14,6
ETA	$Y = 11.911.743x - 10.384$	70-2.500	0,9955	4,8	4,9	20,5	68,4
HIS	$Y = 1.375.144.474x + 1.888.631$	10-4.500	0,9960	2,2	3,4	1,5	4,9
PUT	$Y = 37.964.635x - 58.059$	100-3.500	0,9974	4,4	5,0	31,0	103,3
CAD	$Y = 213.912.241x - 244.495$	10-4.000	0,9950	4,3	4,4	1,5	5,0

Ghi chú: Y là diện tích pic (counts), x là nồng độ amin sinh học ($\mu\text{g/l}$).

Độ lặp lại: Độ lệch chuẩn tương đối được sử dụng để biểu diễn độ lặp lại của phương pháp và được trình bày trong bảng 3. Kết quả thực nghiệm chỉ ra rằng độ lệch chuẩn tương đối nằm trong khoảng từ 0,08 đến 6,37%. Độ lệch chuẩn tương đối này nằm trong khoảng cho phép theo khuyến cáo của AOAC. Do đó, có thể kết luận độ lặp lại của phương pháp LC-MS/MS này tốt và đáp ứng được yêu cầu dùng cho phân tích amin sinh học trong rượu vang.

Độ tái lập: Độ tái lập của phương pháp phân tích cũng được biểu diễn trong bảng 3. Độ tái lập của phương pháp nằm trong khoảng từ 0,26% tới 6,96%. Từ các kết quả thực nghiệm này, có thể kết luận độ tái lập của phương pháp phân tích tốt và đáp ứng được yêu cầu phân tích các amin sinh học trong rượu vang theo AOAC về xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp phân tích.

Độ chọn lọc: Độ chọn lọc của phương pháp phân tích được đánh giá thông qua điểm nhận dạng IP. Điểm nhận dạng IP của tất cả các amin sinh học đều đạt được 5 theo khuyến cáo về xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp phân tích của Cộng đồng chung châu Âu năm 2021.

Hiệu ứng nền mẫu: Hiệu ứng nền mẫu được đánh giá thông qua so sánh hệ số góc đường chuẩn trên nền mẫu và đường chuẩn trong cùng một khoảng nồng độ. Hiệu ứng nền mẫu nằm trong khoảng từ 60% (TRY) tới 113% (CAD).

Hiệu ứng ức chế ion hóa (khi ME nhỏ hơn 100%) xảy ra đối với TRY có thể được lý giải là do có sự đồng rửa giải của các chất có trong nền mẫu (Peters & cs., 2007). Hiệu ứng nền mẫu còn lại đều nằm trong khoảng từ 80-120%. Có thể kết luận nền mẫu phân tích sạch sau khi chiết pha rắn và ít ảnh hưởng tới tín hiệu phân tích, trừ trường hợp của TRY. Do đó, các chất phân tích được định lượng sử dụng đường chuẩn trong nền mẫu thay vì sử dụng đường chuẩn trong dung môi.

Hiệu suất thu hồi: Hiệu suất thu hồi của toàn bộ quá trình chuẩn bị mẫu được đánh giá thông qua thí nghiệm thêm chuẩn trên nền mẫu thực do không có mẫu chuẩn đối chứng. Mẫu phân tích được thêm chuẩn ở ba nồng độ khác nhau, xử lý mẫu như qui trình chiết pha rắn nêu trên. Mẫu sau đó được phân tích bằng phương pháp LC-MS/MS sử dụng cột tách HILIC ở điều kiện tối ưu. Hàm lượng amin sinh học có trong mẫu, mẫu thêm chuẩn được định lượng dựa vào diện tích pic sử dụng đường chuẩn.

Hiệu suất thu hồi của các amin sinh học nằm trong khoảng từ 80,2% đến 100,6%. Hiệu suất thu hồi của quá trình xử lý mẫu bằng phương pháp chiết pha rắn nằm trong khoảng dao động cho phép theo khuyến cáo (AOAC, 2016). Do đó, có thể kết luận hiệu suất thu hồi này đáp ứng được yêu cầu phân tích amin sinh học trong mẫu rượu vang.

Bảng 4. Hiệu suất thu hồi của amin sinh học trong mẫu rượu vang

Chất phân tích	Hiệu suất thu hồi (R)						Trung bình (%)
	Nồng độ LOQ	R (%)	Nồng độ 3*LOQ	R (%)	Nồng độ 5*LOQ	R (%)	
TRY	2,2	83,9	6,6	85,8	11,0	98,6	89,4 ± 8,0
PHE	1,3	81,7	3,9	87,0	6,5	99,6	89,4 ± 9,2
5-HT	5,7	82,6	17,1	86,6	28,5	97,9	89,1 ± 7,9
TYR	14,6	80,8	43,8	92,2	73,0	100,6	91,2 ± 9,9
ETA	68,4	85,9	205,2	85,8	342,0	91,5	87,7 ± 3,3
HIS	4,9	89,6	14,7	93,4	24,5	100,3	94,4 ± 5,4
PUT	103,3	80,2	309,9	83,0	516,5	90,6	84,6 ± 5,4
CAD	5,0	83,9	15,0	80,4	25,0	94,1	86,1 ± 7,1

Bảng 5. Hàm lượng amin sinh học trong các mẫu rượu vang (µg/l), giá trị trung bình

Chất phân tích	Mẫu phân tích					Hàm lượng (Thấp nhất - cao nhất)
	BT	CA	DF	DT	DD	
TRY	113 ± 2	141 ± 2	119 ± 2	116 ± 2	120 ± 5	113-120
PHE	125 ± 3	143 ± 1	129 ± 1	127 ± 1	130 ± 3	127-143
5-HT	< LOD	< LOD	203 ± 6	<LOD	205 ± 6	< LOD-205
TYR	63 ± 1	1494 ± 95	77 ± 7	75 ± 4	116 ± 9	63-1495
ETA	96 ± 2	92 ± 2	110 ± 2	110 ± 1	94 ± 3	92-110
HIS	29 ± 2	726 ± 12	39 ± 2	36 ± 3	29 ± 3	29-726
PUT	502 ± 7	592 ± 5	804 ± 11	1.894 ± 17	543 ± 14	502-1894
CAD	126 ± 8	129 ± 7	159 ± 3	128 ± 3	131 ± 2	126-159
Tổng	1.054	3.317	1.632	2.486	1.368	

3.3. Amin sinh học trong một số mẫu rượu vang

Mẫu rượu vang được thu thập tại một số siêu thị trên địa bàn Hà Nội và chuyển về phòng thí nghiệm. Mẫu được chuẩn bị và phân tích phương pháp LC-MS/MS sử dụng cột tách HILIC. Diện tích pic của chất phân tích và đường chuẩn được sử dụng để định lượng các amin sinh học có trong mẫu. Hàm lượng 8 amin sinh học có trong 5 mẫu phân tích được liệt kê trong bảng 5

Hàm lượng của PUT trong mẫu DT là cao nhất (1.894 ± 17 µg/l) và hàm lượng HIS trong mẫu BT có hàm lượng thấp nhất (29 ± 2 µg/l). Xét trên các amin, trong năm mẫu phân tích thì mẫu CA có hàm lượng của bốn amin sinh học cao nhất là HIS, PHE, TYR và TRY. Đối với 5-HT thì chỉ phát hiện trong hai mẫu trong đó

hàm lượng chất này giống nhau trong hai mẫu DD và DF. Còn lại mẫu DF có hàm lượng ETA và CAD cao nhất, mẫu DT có hàm lượng PUT cao nhất. Ngược lại, mẫu CA có hàm lượng ETA thấp nhất. Đối với mẫu BT có tổng hàm lượng các amin sinh học và hàm lượng các amin sinh thấp nhất trong tất cả các mẫu phân tích. Tuy nhiên, khi xét trên từng mẫu, hàm lượng PUT chiếm tỉ lệ nhiều nhất trong hàm lượng amin sinh học tổng số không kể mẫu DT. Hiện nay không có tiêu chuẩn cho tổng hàm lượng amin sinh học trong mẫu rượu vang, tuy nhiên một số nước đã qui định về hàm lượng histamine tối đa như Đức (2 mg/l), Bỉ (5-6 mg/l), Pháp (8 mg/l) và Thụy sỹ (10 mg/l) (Han & cs., 2022; Polo & cs., 2011). Histamine được tìm thấy trong tất cả các mẫu với hàm lượng nằm trong khoảng 29 đến 726 µg/l và thấp hơn ngưỡng an toàn theo khuyến cáo của EFSA (Opinion 2011).

4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này phương pháp phân tích trực tiếp các amin sinh học dựa trên hệ LC-MS/MS sử dụng cột tách HILIC đã được phát triển thành công. Các thông số quan trọng của phương pháp phân tích như khoảng tuyến tính, LOD, LOQ, độ lặp lại, độ tái lập, hiệu suất thu hồi đã được khảo sát và đánh giá. Phương pháp phân tích đã được xác nhận giá trị sử dụng cho nền mẫu rượu vang và đã đánh giá khả năng áp dụng của phương pháp thông qua phân tích 8 amin sinh học trong 5 mẫu thực. Kết quả thực nghiệm chỉ ra rằng đã phát hiện các amin sinh học trên trong tất cả các mẫu rượu vang. Trong đó histamine, một amin sinh học được quan tâm nhiều nhất, đã phát hiện trong tất cả các mẫu phân tích. Từ đó, có thể kết luận rằng phương pháp LC-MS/MS sử dụng cột tách HILIC trong nghiên cứu này phù hợp để phân tích các amin sinh học trong mẫu rượu vang. Phương pháp này sẽ được áp dụng để phân tích số lượng mẫu lớn nhằm đánh giá phân bố của các amin sinh học trong mẫu rượu vang trong nghiên cứu tiếp theo.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Học viện Nông nghiệp Việt nam thông qua đề tài “Nghiên cứu phát triển phương pháp phân tích và đánh giá hàm lượng amin sinh học trong một số thực phẩm lên men ở Việt Nam bằng LC-MS/MS” mã số T2024-08-15TD.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Anabel S. Lourenço, Tassio A. Nunes, Amanda C. Silva, Williame F. Ribeiro & Mario C.U. Araujo (2022). Simultaneous Voltammetric Determination of Tryptamine and Histamine in Wines Using a Carbon Paste Electrode Modified with Nickel Phthalocyanine. *Food Analytical Methods* 15(12): 3257-69. doi.org/10.1007/s12161-022-02390-4.
- AOAC International (2016). Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. *AOAC Official Methods of Analysis*. 9.
- Apostolidou C., Adamopoulos K., Lymperaki E., Iliadis S., Papapreponis P. & Kourtidou-Papadeli C. (2015). Cardiovascular Risk and Benefits from Antioxidant Dietary Intervention with Red Wine in Asymptomatic Hypercholesterolemics. *Clinical Nutrition ESPEN*. 10(6): e224–33. doi.org/10.1016/j.clnesp.2015.08.001.
- Čuš, Franc, Helena Baša Česnik, and Špela Velikonja Bolta (2022). Pesticide Residues, Copper and Biogenic Amines in Conventional and Organic Wines. *Food Control*. 132.
- Chen Son Yue, Chellappan Selvi, Aun Nah Tang, Keh Niang Chee & Hon Yeong Ng (2021). Determination of Biogenic Amines in Malaysian Traditional Wine by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). *Analytical Letters* 54(12): 1968-94. doi.org/10.1080/00032719.2020.1831008.
- Fabjanowicz M., Róžańska A., Kalinowska K. & Plotka-Wasyłka J. (2022). Miniaturized, Green Salting-out Liquid-Liquid Microextraction Coupled with GC-MS Used to Evaluate Biogenic Amines in Wine Samples. *Microchemical Journal* 180(May).
- Gianotti V., Chiuminatto U., Mazzucco E., Gosetti F., Bottaro M., Frascarolo P. & Gennaro M.C. (2008). A New Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Method for the Simultaneous Determination of Seven Biogenic Amines in Cheese. *Journal of Chromatography A*. 1185(2): 296-300.
- Gil Renato L., Célia G. Amorim, Maria C.B.S.M. Montenegro & Alberto N. Araújo (2022). HPLC-Potentiometric Method for Determination of Biogenic Amines in Alcoholic Beverages: A Reliable Approach for Food Quality Control. *Food Chemistry*. 372.
- Gizem Týrys, Rabia Sare Yanýkođlu, Burhan Ceylan, Derya Egeli, Evrim Kepekci Tekkeli, Armađan Önal (2023). A Review of the Currently Developed Analytical Methods for the Determination of Biogenic Amines in Food Products. *Food Chemistry*. 398.
- Han Bing, Xiaoyu Han, Huan Deng, Tianyang Wu, Chenyu Li, Jicheng Zhan, Weidong Huang & Yilin You (2022). Profiling the Occurrence of Biogenic Amines in Wine from Chinese Market and during Fermentation Using an Improved Chromatography Method. *Food Control*. 136: 108859. doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.108859.
- Iwona Niedźwiedźa, Justyna Płotka-Wasyłka, Ireneusz Kapusta, Vasil Simeonov, Anna Stój, Adam Waško, Joanna Pawłat, Magdalena Polak-Berecka (2022). The Impact of Cold Plasma on the Phenolic Composition and Biogenic Amine Content of Red Wine. *Food Chemistry* 381(January).
- Jackson R.S. (2008). *Wine science: principles and applications*, third edition. Academic Press.
- Juliana Milheiro, Leonor C. Ferreira, Luís Filipe-Ribeiro, Fernanda Cosme, Fernando M. Nunes

- (2019). A Simple Dispersive Solid Phase Extraction Clean-up/Concentration Method for Selective and Sensitive Quantification of Biogenic Amines in Wines Using Benzoyl Chloride Derivatisation. *Food Chemistry* 274: 110-117. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.116>.
- Lucía Polo, Sergi Ferrer, Almudena Peña-Gallego, Purificación Hernández-Orte & Isabel Pardo (2011). Biogenic Amine Synthesis in High Quality Tempranillo Wines. Relationship with Lactic Acid Bacteria and Vinification Conditions. *Annals of Microbiology*. 61(1): 191-98.
- Liu Yang, Fuliang Han, Yangjie Liu & Wannan Wang (2020). Determination of Biogenic Amines in Wine Using Modified Liquid-Liquid Extraction with High Performance Liquid Chromatography-Fluorescence Detector. *Food Analytical Methods* 13(4): 911-22.
- Manetta Anna Chiara, Lorella Di Giuseppe, Rosanna Tofalo, Maria Martuscelli, Maria Schirone, Melania Giammarco & Giovanna Suzzi (2016). Evaluation of Biogenic Amines in Wine: Determination by an Improved HPLC-PDA Method. *Food Control* 62: 351-56. doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.11.009.
- Opinion, Scientific (2011). Scientific Opinion on Risk Based Control of Biogenic Amine Formation in Fermented Foods. *EFSA Journal*. 9(10): 1-93.
- Peters Frank T., Olaf H. Drummer & Frank Musshoff (2007). Validation of New Methods. *Forensic science international*. 165(2-3): 216-24.
- Romano P., Capece A. & Poeta C. (2007). Biogenic Amine Formation in Alcoholic Fermentation. *Bulletin De L'Oiv*. 80: 251-62.
- Saccani G., Tanzi E., Pastore P., Cavalli S. & Rey M (2005). Determination of Biogenic Amines in Fresh and Processed Meat by Suppressed Ion Chromatography-Mass Spectrometry Using a Cation-Exchange Column. *Journal of Chromatography A* 1082(1 SPEC. ISS.): 43-50.
- Sohaib Haseeb, Bryce Alexander, Ricardo Lopez Santi, Alvaro Sosa Liprandi, Adrian Baranchuk (2019). What's in Wine? A Clinician's Perspective. *Trends in Cardiovascular Medicine* 29(2): 97-106. [doi:10.1016/j.tcm.2018.06.010](https://doi.org/10.1016/j.tcm.2018.06.010).
- Saha Turna, Nikita, Rena Chung & Lorraine McIntyre (2024). A Review of Biogenic Amines in Fermented Foods: Occurrence and Health Effects. *Heliyon*. 10(2): e24501. doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e24501.
- Silla Santos M.H. (1996). Biogenic Amines: Their Importance in Foods. *International Journal of Food Microbiology* 29(2-3): 213-31.
- Tašev Krste, Violeta Ivanova-Petropulos & Marina Stefova (2017). Ultra-Performance Liquid Chromatography-Triple Quadruple Mass Spectrometry (UPLC-TQ/MS) for Evaluation of Biogenic Amines in Wine. *Food Analytical Methods* 10(12): 4038-48.