Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam 2026, 24(3): 340-347 https://doi.org/10.31817/tckhnnvn.2026.24.03.06
vie.vjas.vn

PHÂN TÍCH HISTAMINE TRONG MẪU TƯƠNG TRUYỀN THỐNG BẰNG PHƯƠNG PHÁP UPLC-MS/MS

Nguyễn Thị Hồng[1], Phạm Thị Dịu[1], Nguyễn Văn Tài[1], Phan Thị Phương Thảo[1], Nguyễn Thị Thanh Thủy[1], Chu Đình Bính[2*]

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

[*]Tác giả liên hệ: binh.chudinh@hust.edu.vn

Ngày nhận bài: 28.11.2025 Ngày chấp nhận đăng: 22.01.2026

TÓM TẮT

Nghiên cứu này tập trung phát triển phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao ghép nối với phổ khối hai lần để phân tích histamine trong sản phẩm tương truyền thống. Histamine được tách bằng sắc ký lỏng sử dụng cột tách z-HILIC và nhận biết bằng MS/MS sử dụng nguồn ion hóa phun điện ở chế độ phân cực dương khoảng tuyến được được thiết lập khoảng nồng độ từ 0,02 đến 7,05 mg/kg với hệ số hồi quy tuyến tính tốt. Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) tương ứng là 3,0 µg/kg và 11 µg/kg. Độ lặp lại và độ tái lặp của phương pháp tốt với RSD tương ứng là 2,74% và 3,74%. Độ thu hồi được thực hiện qua mẫu thêm chuẩn và đạt được trong khoảng 86,26% đến 100,1%. Áp dụng phương pháp đã xác nhận sử dụng để phân tích histamine trong 37 mẫu tương truyền thống, kết quả cho thấy hàm lượng histamine nằm trong khoảng LOQ đến 70,5 µg/kg với giá trị trung bình là 17,7 µg/kg. Bên cạnh đó, kết quả thực nghiệm chỉ ra rằng không có mối tương quan cao giữa histamine và hàm lượng nitơ tổng số.

Từ khóa: Histamine, UPLC-MS/MS, xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp, tương truyền thống, an toàn thực phẩm.

Analysis of Histamine in Vietnamese Traditional Fermented Soya Source by UPLC-MS/MS

ABSTRACT

In this work, an ultra-high performance liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry was developed and validated for analysis of histamine in the Vietnamese traditional soya sauce. Histamine was separated using z-HILIC column and detected by tandem mass spectrometry employing with electrospray ionization in positive mode. Linearity of histamine ranged from 0.02 to 7.05 mg/kg with a good regression coefficiency. The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) were achieved 3.0 µg/kg and 11 µg/kg, respectively. Repeatability and reproducibility of the method corresponded to 2.74% and 3.74%. The recovery was investigated by spiking experiments and achieved from 82.3% to 100.1%. Analysis of histamine in 37 samples by the developed and validated analytical method, the results indicated that the concentration of histamine ranged from LOD to 70.5 µg/kg with mean value was 17.7 µg/kg. The concentration of histamine and total nitrogen content in the analyzed samples showed low correlation coefficient.

Keywords: Histamine, UPLC-MS/MS, method validation, Vietnamese tradional soya sauce, food safety.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Thực phẩm lên men đóng vai trò quan trọng trong chế độ ăn uống của hàng tỷ người trên thế giới, với hơn 5.000 loại đã được ghi nhận, trải dài từ các sản phẩm phổ biến đến đặc sản vùng miền (Tamang, 2010). Trong đó, các sản phẩm từ đậu nành lên men chiếm một vị trí đặc biệt nhờ hàm lượng protein cao, giàu axit amin thiết yếu, cùng nhiều hợp chất có lợi cho sức khỏe. Ở Việt Nam, tương là sản phẩm lên men truyền thống tiêu biểu, phổ biến ở Đồng bằng sông Hồng và nhiều địa phương khác. Thông thường, tương được chế biến từ đậu tương và gạo nếp,

trải qua quá trình lên men kéo dài nhờ nấm mốc *Aspergillus oryzae* (Pang & cs., 2024), giúp tăng hàm lượng protein, giảm hàm lượng chất xơ thô và tạo hương và vị đặc trưng. Tuy nhiên, quá trình lên men tự nhiên kéo dài trong cách chế biến truyền thống tiềm ẩn nguy cơ hình thành amin sinh học (biogenic amines - BA) nói chung, đặc biệt là histamine. Các hợp chất BA này được tạo ra từ phản ứng khử carboxyl của axit amin tự do do vi sinh vật xúc tác. Ở nồng độ thấp, BA có thể đóng vai trò sinh lý bình thường, nhưng khi tích tụ ở mức cao, chúng có thể gây ra hàng loạt tác động bất lợi như rối loạn huyết áp, đau đầu, buồn nôn, dị ứng giả và thậm chí tử vong (Yang & cs., 2017). Nhiều quốc gia đã đưa ra giới hạn an toàn cho hàm lượng một số BA nhất định trong thực phẩm, đặc biệt là histamine. Tuy nhiên, Việt Nam vẫn thiếu số liệu hoàn chỉnh về BA nói chung và histamine nói riêng trong các sản phẩm tương truyền thống.

Nhiều phương pháp phân tích BA nói chung và histamine nói riêng đã được áp dụng rộng rãi bao gồm quang phổ UV-Vis, sắc ký lỏng hiệu năng cao sử dụng cột tách pha đảo (RP-HPLC) và HPLC kết hợp huỳnh quang (Ferreira & Pinho, 2006). Tuy nhiên, những kỹ thuật này thường đòi hỏi bước dẫn xuất phức tạp, thời gian phân tích dài, độ chọn lọc chưa tối ưu và hạn chế khả năng phân tích đồng thời nhiều hợp chất. Trong khi đó, sắc ký lỏng ghép nối khối phổ ba tứ cực (LC-MS/MS) với đặc điểm có độ nhạy cao, độ đặc hiệu tốt, thời gian phân tích tối ưu và khả năng định lượng đồng thời nhiều hợp chất, đặc biệt khi sử dụng cột tách có kích thước hạt nhồi nhỏ. Bên cạnh đó, phương pháp LC-MS/MS chưa được áp dụng rộng rãi để định lượng và đánh giá hàm lượng BA nói chung và histamine trong sản phẩm tương truyền thống.

Trong nghiên cứu này, phương pháp UPLC-MS/MS sử dụng cột tách z-HILIC được phát triển và tối ưu để phân tích histamine trong mẫu tương truyền thống. Các điều kiện tách sắc ký và các điều kiện nhận biết bằng MS/MS được tối ưu hóa nhằm thu được độ nhạy và độ chọn lọc cao nhất. Các thông số quan trọng dùng cho xác nhận giá trị sử dụng như khoảng tuyến tính, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng, độ lặp lại độ tái lặp và độ thu hồi được khảo sát và đánh giá. Áp dụng phương pháp đã xác nhận giá trị sử dụng vào phân tích 37 mẫu tương truyền thống và đánh giá mối tương quan giữa nồng độ histamine và hàm lượng nitơ tổng số.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Hóa chất

Chất chuẩn histamine (His, độ tinh khiết 98,8%), được mua từ hãng CATO Research Chemicals, Trung Quốc và Histamine-D4 (His-d4, độ tinh khiết 97%) mua từ Sigma Aldrich, Singapore. Dung dịch chuẩn gốc của histamine và nội chuẩn 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 tại nhiệt độ -35°C. Dung dịch chuẩn làm việc được chuẩn bị bằng cách trộn dung dịch chuẩn gốc trong axit HCl 0,1M. Dung dịch làm việc được pha loãng hàng ngày từ dung dịch chuẩn trong hỗn hợp acetonitrile và nước deion. Pha động sử dụng trong LC-MS bao gồm hai kênh: kênh A được chuẩn bị bằng cách hòa tan lượng cân ammonium formate trong nước deion (Merck Millipore, Đức) thêm 0,1% axit fomic. Kênh B là acetonitrile thêm ammonium fomate và axit fomic với lượng tương đương kênh A. Pha động được loại lọc qua màng lọc 0,2µm và loại khí hòa tan bằng siêu âm trước khi sử dụng.

2.2. Mẫu phân tích

Mẫu phân tích: 37 mẫu tương truyền thống được thu thập trực tiếp tại các cơ sở sản xuất trên địa bàn các tỉnh Hà Nội, Hưng Yên, Nghệ An, Hà Nam, Thái Bình, Bắc Ninh, Bắc Giang và được mã hóa. Sau đó mẫu được chuyển tới phòng thí nghiệm, chai chứa mẫu được lắc đều trước khi chuyển qua ống falcon 50ml. Mẫu sử dụng để phân tích bảo quản nhiệt độ phòng. Mẫu chưa phân tích bảo quản giống như điều kiện bảo quản tương thông thường.

Chuẩn bị mẫu dùng cho phân tích bằng UPLC-MS/MS: Trước khi xử lý, mẫu được đưa

vào bể siêu âm để đuổi khí và đồng nhất mẫu bằng cách nghiền mịn trong máy xay sinh tố. Sau khi đã đồng nhất mẫu, 5g mẫu được lấy để phân tích. Mẫu sau đó được thêm nội chuẩn đánh dấu đồng vị và để yên ở nhiệt độ phòng ít nhất 2 giờ. Sau đó mẫu được thêm 5ml nước deion và trộn đều bằng vontex ở tốc độ 2.000 vòng trong 2 phút. Sau khi chiết, mẫu được ly tâm ở 4°C với tốc độ là 6.000 vòng trong 10 phút. Dịch trong phía trên được thu lại và thêm 5ml acetonitrile, vortex sau đó tiếp tục ly tâm với điều kiện như trên. Dịch mẫu sau khi thu được lọc qua màng 0,22µm và chuyển vào ống chứa mẫu dùng cho bộ bơm mẫu tự động. Hàm lượng histamine trong mẫu được phân tích bằng UPLC-MS/MS. Mẫu trắng được chuẩn bị bằng cách thay mẫu tương bằng nước deion và lặp lại các bước xử lý như mẫu tương truyền thống.

2.3. Phương pháp UPLC-MS/MS

Hệ thống LC-MS/MS model 8050 của hãng Shimadzu (Kyoto, Nhật Bản) được sử dụng dùng để phân tích histamine. 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 CTO-40S, Phổ khối lượng MS/MS mode 8050 kèm theo nguồn ion hóa phun điện được sử dụng như một detector cho sắc ký lỏng. Cột sắc ký lỏng Waters Xbridge z-HILIC (1,7µm; 2,1mm × 150mm) được dùng để phân tích histamine. Pha động bao gồm hai kênh: kênh A 10mM ammonium formate trong nước deion và 0,1% axit formic. Kênh B bao gồm acetonitrile : nước deion (tỷ lệ 9:1 về thể tích) có chứa 10mM ammonium formate và 0,1% axit formic. Chi tiết các điều kiện tách và nhận biết histamine bằng UPLC-MS/MS được liệt kê trong bảng 1.

Histamine được tách sử dụng cột tách z-HILIC sử dụng gradient thành phần pha động bao gồm hai kênh A và B. Chương trình này được cài đặt như sau: Bắt đầu với 100% kênh B trong khoảng 5 phút sau đó tiếp tục với 80% kênh B và 20% kênh A trong 1 phút, 70% kênh B và 30% kênh A trong 1 phút tiếp theo sau đó là 50% kênh A và 50% kênh B trong 1 phút. Cuối cùng là 20% kênh B và 80% kênh A trong 3 phút. Và sau đó cân bằng cột với 100% kênh B trong 7 phút cho lần bơm mẫu tiếp theo.

2.4. Phân tích hàm lượng N tổng số

Hàm lượng N tổng số được phân tích theo tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 3705-90, qui trình phân tích có thể tóm tắt như sau: cân khoảng 0,5g mẫu đã được đồng nhất chuyển vào bình phân hủy mẫu, mẫu được vô cơ hóa bằng axit H_2SO_4 đặc, nitơ có trong mẫu được chuyển thành amoni sunfat. Dùng kiềm đặc đẩy ammoniac từ amomi sunfat trong máy cất đạm tạo thành amoni hydroxit sau đó định lượng chất này bằng phương pháp chuẩn độ axit-bazơ sử dụng chất chỉ thị methyl đỏ. Hàm lượng nitơ tổng số được biểu diễn dưới dạng g N có trong 1kg mẫu.

2.5. 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. Tỷ lệ diện tích pic của chất phân tích được tính toán bằng cách chuẩn hóa diện tích pic của chất phân tích theo diện tích pic của chất chuẩn nội được đánh dấu đồng vị và sử dụng định lượng His trong mẫu theo phương pháp đường chuẩn. Sự có mặt của His trong mẫu phân tích được xác định đồng thời bằng ba thông số: thời gian lưu trên cột tách z-HILIC, sự xuất hiện đồng thời của hai bước chuyển khối MS/MS và tỷ lệ tín hiệu tương đối (tỷ lệ ion) của hai bước chuyển khối này kèm theo độ không đảm bảo cho trước. Mẫu trắng được được sử dụng trong xử lý mẫu và bơm mẫu trên hệ UPLC-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 2025 (Microsoft, Mỹ) và Skyline MS (MacCross Lab, University of Washington, Mỹ).

Bảng 1. Điều kiện phân tích histamine bằng UPLC-MS/MS

Đại lượng	Thông số
Các đại lượng sắc ký	
Cột tách	Waters Xbridge z-HILIC (1,7µm; 2,1mm × 150mm)
Nhiệt độ cột tách	40°C
Pha động	Kênh A: 10mM amoni format trong nước deion thêm 0,1% axit fomic, Kênh B: 10mM amoni format + 0,1% axit formic trong hỗn hợp ACN và nước deion (9/1 theo thể tích)
Chế độ rửa giải	Gradient thành phần 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 mornitoring)
Chế độ định lượng	Đường chuẩn sử dụng nội chuẩn đánh dấu đồng vị

Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) được xác định dựa trên tỷ số giữa tín hiệu (S, chiều cao píc sắc ký của chất phân tích) và nhiễu nền (N). Nhiễu nền được đo ở hai bên của píc phân tích, trong đó mỗi vùng đo có độ rộng tối thiểu gấp 10 lần chiều rộng của píc tại nửa chiều cao. Trong đó LOD được xác định là nồng độ thấp nhất cho tỷ lệ S/N 3 và LOQ được xác định là nồng độ thấp nhất cho tỷ lệ S/N 10. Trong nghiên cứu này, tỷ lệ S/N được xác định từ mẫu có thêm chất chuẩn ở nồng độ thấp nhất, sau khi xử lý mẫu và phân tích bằng UPLC-MS/MS. Độ lặp lại của phương pháp được đánh giá thông qua phân tích lặp lại mẫu 6 lần. Giá trị diện tích píc thu được được sử dụng để đánh giá độ lặp lại và trình bày kết quả thông qua độ lệch chuẩn tương đối. Độ tái lặp của phương pháp được đánh giá thông qua phân tích mẫu lặp lại giữa các ngày khác nhau (thực hiện trong 3 ngày, mỗi thí nghiệm lặp lại 5 lần).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tối ưu các điều kiện phân tích histamine bằng UPLC-MS/MS

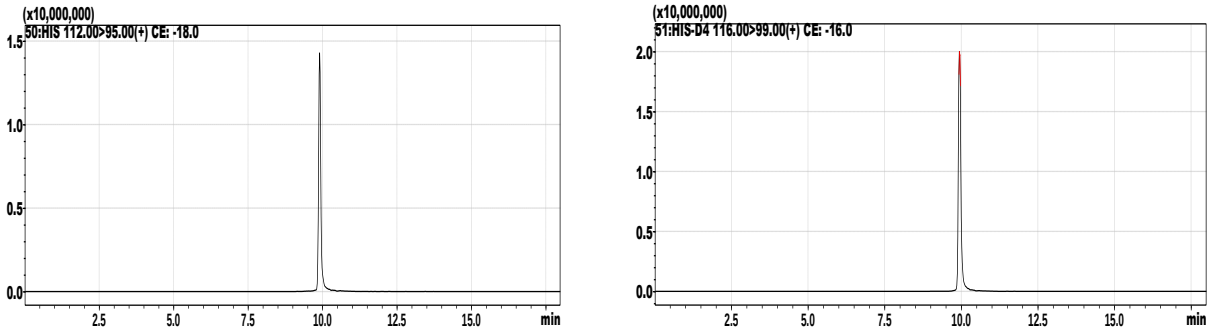
Các điều kiện phân tích bằng MS/MS: Phương pháp phân tích LC-MS/MS sử dụng kỹ thuật ion hóa phun điện với chế độ phân cực dương (+ESI) được sử dụng phân tích histamine. Do đó, các điều kiện như thông số của nguồn ion hóa, thông số của chế độ đo MS/MS cần được tối ưu hóa nhằm thu được phương pháp đo có 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 His và His-d4 nồng độ 5mM 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 với tốc độ 0,3 ml/phút.

Đối với histamine, khối lượng phân tử là 111,15 g/mol tương ứng với công thức phân tử là $C_5H_9N_3$, sau khi được ion hóa ở chế độ ion hóa dương sẽ hình thành ion mẹ có tỉ số m/z 112 amu 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 68 amu và 95 amu. Hai ion con được hình thành từ ion mẹ của histamine có công thức hóa học tương ứng là $[C_3N_2H_4]^+$ 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). Bên cạnh đó, cơ chế phân mảnh ion cũng được đối chứng với nội chuẩn đánh dấu đồng vị (His-d4). Tương tự như His, His-d4 có khối lượng phân tử là 115,09 g/mol do đó ion mẹ được chọn có tỉ số m/z 116 amu (tương ứng với công thức hóa học là $[C_5H_5D_4N_3+H]^+$) và ion con có tỉ số m/z 99 amu tương ứng với công thức hóa học là $[C_5H_3D_4N_2]^+$.

Các điều kiện tách sắc ký: Do bản chất cấu trúc hóa học của His và His-d4, 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. Do đó các hợp chất này thường kém hoặc không bị lưu giữ trên cột tách pha đảo. Vì vậy, cột tách sắc ký Waters Xbridge z-HILIC được sử dụng cho phân tích trực tiếp các amin sinh học trong nghiên cứu này. Khi sử dụng cột tách Waters Xbridge z-HILIC để tách các chất phân cực, pha động sử dụng thường chứa dung môi hữu cơ với tỷ lệ cao. Bên cạnh đó, chất điện ly dễ bay hơi như amoni format, 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 histamine bao gồm acetonitrile (ACN), nước deion, amonium format, axit formic được khảo sát trong nghiên cứu này. Các đại lượng ảnh hưởng tới khả năng lưu giữ và hiệu quả tách của His và His-d4 trên cột tách Waters Xbridge z-HILIC gồm pH và thành phần pha động đã 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. Sắc đồ UPLC-MS/MS của His và His-d4 được minh họa ở hình 1.

Bảng 2. Công thức hóa học, khối lượng phân tử, ion mẹ, ion con của histamine 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)	Ion mẹ (m/z, amu)	ion con (m/z, amu)	Năng lượng va chạm (eV)
His	$C_5H_9N_3$	111,15	10,5	112	68	-23
				112	95	-18
His-d4	$C_5H_5H'_4N_3$	115,15	10,5	116	99	-16



(a) His (112→95) (b) His-d4 (116→99)

Hình 1. Sắc đồ UPLC-MS/MS của (a) **- His và** (b) **- His-d4**

Gradient thành phần pha động tối ưu là gradient thành phần pha động đã trình bày trong mục 2.3. Như trình bày trong hình 1, His và His-d4 được lưu giữ tốt trên cột Waters Xbridge z-HILIC, các pic thu được có độ đối xứng cao (hệ số bất đối xứng của His và His-d4 tương ứng là 0,82 và 1,35). Do đó, có thể kết luận cột tách Waters Xbridge z-HILIC đáp ứng khả năng lưu giữ His và His-d4 khi sử dụng pha động gồm nước deion (có chứa10mM amoni format và 0,1% axit formic) và acetonitrile và nước deion (với tỷ lệ 90% acetonitrile và 10% nước deion theo thể tích, có chứa 10mM amoni format và 0,1% axit formic).

Bên cạnh đó, dung môi hòa tan mẫu cũng sẽ ảnh hưởng đến hiệu quả tách và hình dạng píc sắc ký. Trong nghiên cứu này, ba dung môi gồm, nước, acetonitrile và hỗn hợp ACN - nước được sử dụng khảo sát để hòa tan histamine trước khi bơm mẫu. Kết quả thực nghiệm chỉ ra rằng píc sắc ký thu được sắc nét và tính đối xứng cao khi hỗn hợp acetonitle và nước (tỷ lệ 90/10 về thể tích) được sử dụng. Do đó, hỗn hợp dung môi acetonitrile và nước được sử dụng để hòa tan cho các nghiên cứu tiếp theo.

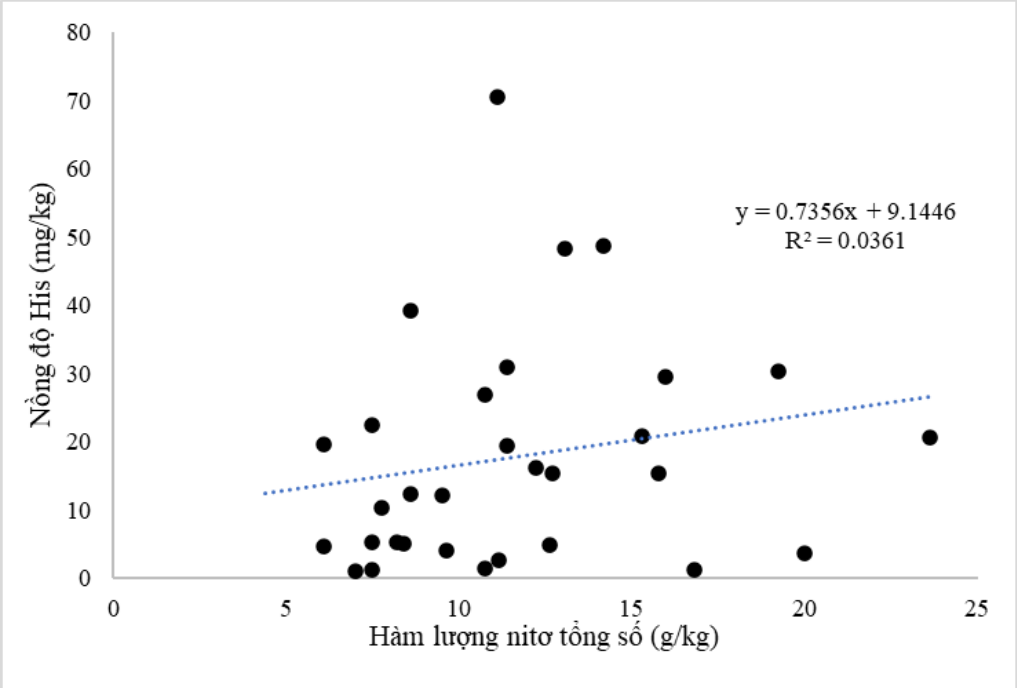
3.2. Xác định giá trị sử dụng của phương pháp phân tích

Khoảng tuyến tính: Các dung dịch chuẩn từ nồng độ His nằm trong khoảng 0,056-4,446 mg/kg và có chứa nội chuẩn (His-d4) được chuẩn bị và phân tích bằng UPLC-MS/MS. Diện tích pic của chất phân tích được biểu diễn là 1 hàm tuyến tính theo nồng độ. Phương trình hồi quy tuyến tính là $y = 0,2318x – 0,5292$, trong đó y là tỉ số diện tích píc, x là tỉ số nồng độ và và hệ số hồi quy tuyến tính R^2 là 0,9971. Giá trị này đều lớn hơn 0,99, cho thấy đường chuẩn được xây dựng có độ phù hợp tuyến tính trong khoảng các nồng độ đã khảo sát từ 0,0556 mg/kg đến 4,446 mg/kg và đạt yêu cầu $0,99 \leq R^2 \leq 1$ theo AOAC, 2016. Điều này đảm bảo rằng các kết quả định lượng His trong mẫu phân tích sẽ chính xác và có độ tin cậy cao.

LOD và LOQ: Trong nghiên cứu này, tỉ số S/N được lấy trực tiếp từ phần mềm ở bước chuyển khối MS/MS định lượng trên nền mẫu thực thêm chuẩn và được sử dụng để tính LOD, LOQ. LOD và LOQ của phương pháp UPLC-MS/MS sử dụng cột tách z-HILIC tương ứng 3 µg/kg và 11 µg/kg và độ nhạy của phương pháp có thể so sánh được độ nhạy của các phương pháp sắc ký pha đảo sử dụng kỹ thuật dẫn xuất hòa trước cột tách dùng cho phân tích histamine và amin sinh học như đã công bố (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 His trong mẫu tương (Čuš & cs., 2022; Han & cs., 2022; Niedźwiedź & cs., 2022; Tašev & cs., 2017).

Độ lặp lại và độ tái lặp: Độ lệch chuẩn tương đối được sử dụng để biểu diễn độ lặp lại của phương pháp. Kết quả thực nghiệm chỉ ra rằng độ lệch chuẩn tương đối của thí nghiệm dánh giá độ lặp lại là 2,74%. Độ lệch chuẩn tương đối này nằm trong khoảng cho phép theo khuyến cáo của AOAC. Độ lệch chuẩn tương đối của thí nghệm đánh giá độ tái lặp của phương pháp là 3,74% và giá trị độ lệch chuẩn tương đối này cũng nằm trong khoảng khuyến cáo theo AOAC. Từ các kết quả thực nghiệm này, có thể kết luận độ lặp lại và độ tái lặp của phương pháp UPLC-MS/MS này tốt và đáp ứng được yêu cầu dùng cho phân tích His trong mẫu tương truyền thống.

Độ thu hồi: Độ thu hồi của 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 quy trình chiết nêu trên. Mẫu sau đó được phân tích bằng phương pháp UPLC-MS/MS sử dụng cột tách z-HILIC ở điều kiện ở trên. Hàm lượng His có trong mẫu, mẫu thêm chuẩn được định lượng và sử dụng để tính độ thu hồi. Độ thu hồi của His tại ba nồng độ thêm chuẩn 1,11; 2,22 và 4,45 mg/kg tương ứng là 86,26%, 91,04% và 100,05% và độ thu hồi trung bình là (92,45 ± 5,72)%. Độ thu hồi của quá trình xử lý mẫu trên nằm trong khoảng cho phép theo yêu cầu của AOAC (2016). Do đó, có thể kết luận độ thu hồi này đáp ứng được yêu cầu phân tích His trong mẫu tương. Một cách tổng quát, có thể kết luận là phương pháp UPLC-MS/MS phát triển và xác nhận giá trị sử dụng trong nghiên cứu này đáp ứng được yêu cầu phân tích His trong mẫu tương truyền thống.



Hình 2. Mối tương quan giữa nồng độ His với hàm lượng nitơ tổng số

3.3. Histamine trong mẫu tương

Mẫu tương được thu thập trực tiếp tại các cơ sở sản xuất trên các tỉnh thành sau đó được đưa về phòng thí nghiệm. Mẫu được chuẩn bị và phân tích bằng UPLC-MS/MS. Diện tích píc và đường chuẩn được sử dụng để định lượng His trong mẫu. Hàm lượng His trong 37 mẫu tương truyền thống nằm trong khoảng từ LOQ đến 70,47 mg/kg và giá trị trung bình của His trong các mẫu trên là 17,69 mg/kg. Dao động lớn về nồng độ His trong các mẫu phân tích có thể được lý giải do các nguyên nhân như nguyên liệu đầu vào, điều kiện lên men, sản xuất hoặc bảo quản khác nhau giữa các vùng sản xuất dẫn tới sự khác nhau về nồng độ His. Tuy nhiên, hàm lượng His trong tất cả các mẫu phân tích đều nằm dưới ngưỡng an toàn 1.000 mg/l theo Eedag & cs. (2019). Một số mẫu phân tích (6 mẫu trên tổng số 37 mẫu) có hàm lượng His nằm dưới giới hạn phát hiện của phương pháp UPLC-MS/MS.

Hàm lượng nitơ tổng số của các mẫu tương nằm trong khoảng từ 4,4 g/kg đến 23,6 g/kg với giá trị trung bình 11,1 g/kg. Phân tích tương quan Pearson được sử dụng để đánh giá mức độ tương quan giữa nồng độ His và hàm lượng nitơ tổng số trong các mẫu tương phân tích sử dụng phần mềm OriginalPro 2025 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA). Đối với các mẫu có hàm lượng His nhỏ hơn LOD thì được thay thế bằng 0, nhỏ hơn LOQ thì sẽ lấy giá trị LOQ/2 để sử dụng cho mô hình tính toán tương quan. Đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc nồng độ His vào hàm lượng nitơ tổng số được minh họa trong hình 2. Bên cạnh đó, tương quan Pearson cũng được tính toán và hệ số tương quan r = 0,263; P = 0,12. Từ kết quả tính toán có thể kết luận có sự tương quan dương giữa nồng độ His và hàm lượng nitơ tổng số trong mẫu tương, tuy nhiên mối tương quan này là thấp. Mối tương quan dương và thấp giữa nồng độ His và nitơ tổng số trong mẫu đậu lên men cũng đã được khẳng định trong các nghiên cứu trước đây của Liu & cs. (2020) và Zhou & cs. (2023).

4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, phương pháp phân tích trực tiếp His trong mẫu tương truyền thống dựa trên UPLC-MS/MS sử dụng cột tách z-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 lặp, độ thu hồi đã được khảo sát và đánh giá đầy đủ. Phương pháp phân tích đã được xác nhận giá trị sử dụng cho nền mẫu tương truyền thống và áp dụng để phân tích His trong 37 mẫu tương truyền thống. Kết quả thực nghiệm chỉ ra rằng đã phát hiện histamine trong hầu hết các mẫu phân tích. Bên cạnh đó, hàm lượng histamine trong mẫu phân tích không có tương quan với hàm lương nitơ tổng số. Từ đó, có thể kết luận rằng phương pháp LC-MS/MS sử dụng cột tách z-HILIC trong nghiên cứu này phù hợp để phân tích His trong mẫu tương truyền thống.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ một phần kinh phí từ Học viện Nông nghiệp Việt nam thông qua đề tài mã số T2025VB-8-15.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Association of Offical Analytical Chemists (2016). Offical methods of analysis, Guidelines for standard method performance requirements. Retrieved from https://www.aoac.org/wp-content/uploads/2019/08/app_f.pdf, on Oct 15, 2025.

Del Rio B., Fernández M., Redruello B., Ladero V. & Álvarez M.A. (2024). New insights into the toxicological effects of dietary biogenic amins. Food Chemistry. 435: Article 137558.

EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Scientific opinion on risk-based control of biogenic amine formation in fermented foods. Efsa Journal. 9(10): 2393.

Ferreira I.M. & Pinho O. (2006). Biogenic amines in Portuguese traditional foods and wines. Journal of food protection. 69(9): 2293-2303.

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 R.L., Amorim C.G., Montenegro M.C. & Araújo A.N. (2022). HPLC-potentiometric method for determination of biogenic amines in alcoholic beverages: A reliable approach for food quality control. Food chemistry. 372: 131288.

Han B; Han X., Deng H., Wu T., Li C., Zhan J., Huang W. & Yilin You Y. (2022). Profiling the occurrence of biogenic amines in wine from Chinese market and during fermentation using an improved chromatography method. Food Control. 136: 108859.

Liu B., Cao Z., Qin L., Li J., Lian R. & Wang C. (2020). Investigation of the synthesis of biogenic amines and quality during high-salt liquid-state soy sauce fermentation. LWT. 133: 109835.

Liu J., Jia X., Chen X., Sun H., Li Y., Kramer S. & Lian Z. (2020). Nickel-Catalyzed Intramolecular Desulfitative C-N Coupling: A Synthesis of Aromatic Amines. The Journal of Organic Chemistry. 85(8): 5702-5711.

Lourenço A.S., Nunes T.A., Silva A.C., Ribeiro W.F. & Araujo M.C. (2022). Simultaneous voltammetric determination of Tryptamine and histamine in wines using a carbon paste electrode modified with Nickel Phthalocyanine. Food Analytical Methods, 15(12): 3257-3269.

Niedźwiedź I., Płotka-Wasylka J., Kapusta I. Simeonov V., Stój A., Waśko A., Pawtat J. & Polak-Berecka M. (2022). The impact of cold plasma on the phenolic composition and biogenic amine content of red wine. Food Chemistry. 381: 132257.

Pang H., Zhang X., Chen C., Ma H., Tan Z., Zhang M., Duan Y., Qin G., Wang Y., Jiao Z. & Cai Y. (2024). Combined Effects of Lactic Acid Bacteria and Protease on the Fermentation Quality and Microbial Community during 50 Kg Soybean Meal Fermentation Simulating Actual Production Scale. Microorganisms. 12(7): 1339.

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): 43-50.

Tamang J.P., Watanabe K. & Holzapfel W.H. (2016). Review: Diversity of Microorganisms in Global Fermented Foods and Beverages. Frontiers in Microbiology. 7: 377.

Tamang Jyoti Prakash (2010). Diversity of fermented beverages and alcoholic drinks. Fermented foods and beverages of the world. pp. 85-125.

Tašev K., Ivanova-Petropulos V., & Stefova M. (2017). Ultra-performance liquid chromatography-triple quadruple mass spectrometry (UPLC-TQ/MS) for evaluation of biogenic amines in wine. Food Analytical Methods. 10(12): 4038-4048.

Yue C.S., Selvi C., Tang A.N., Chee K.N. & Ng H.Y. (2021). Determination of biogenic amines in Malaysian traditional wine by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). Analytical Letters. 54(12): 1968-1994.

Zhou K., Zhang X., Huang G.D., Hongsibsong S., Hao G., Li Y.M., Yang J.Y. & Xu Z.L. (2023). Formation of biogenic amines in soy sauce and reduction via simple phytochemical addition. Lwt. 176: 114542.