

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Nguyễn Thành Duy

**NGHIÊN CỨU PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO ĐẦU DÒ
HUỖNH QUANG ĐỂ PHÂN TÍCH ĐỒNG THỜI AFLATOXIN B1, B2, G1, G2
TRONG MỘT SỐ LOẠI THỰC PHẨM**

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ KHOA HỌC VẬT CHẤT

Ngành: Hoá Phân Tích

Mã số: 9.44.01.18

Hà Nội - 2025

Công trình được hoàn thành tại: Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Người hướng dẫn khoa học:

1. Người hướng dẫn 1: PGS.TS. Nguyễn Tiến Đạt, Trung Tâm Nghiên Cứu và Phát Triển Công Nghệ Cao, VAST, 18 Hoàng Quốc Việt, Quận Cầu Giấy, Hà Nội
2. Người hướng dẫn 2: TS. Nguyễn Quốc Hùng, Trung Tâm Dịch Vụ Phân Tích Thí Nghiệm TPHCM, số 2 Nguyễn Văn Thủ, Phường Đa Kao, Q1, TPHCM

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

Luận án được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện họp tại Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam vào hồi giờ, ngày tháng năm

Có thể tìm hiểu luận án tại:

1. Thư viện Học viện Khoa học và Công nghệ
2. Thư viện Quốc gia Việt Nam

DANH MỤC CÁC BÀI BÁO ĐÃ XUẤT BẢN LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. **Nguyễn Thành Duy**, Nguyễn Thuý Ngân Hà, Nguyễn Lâm Kiều Diễm, Đặng Thị Kim Hằng, Lý Tuấn Kiệt, **Nguyễn Quốc Hùng**, Lê Thành Thọ, Chu Vân Hải, **Nguyễn Quang Trung** (2022), *Xây dựng và thẩm định quy trình phân tích aflatoxin B1, B2, G1, G2 trong bột ăn dặm bằng kỹ thuật sắc ký lỏng siêu hiệu năng đầu dò huỳnh quang UPLC-FD*, Tạp chí Phân tích Hóa, Lý và Sinh học, số 1, tập 27, trang 77-81.
2. **Nguyễn Thành Duy**, Nguyễn Thuý Ngân Hà, Nguyễn Lâm Kiều Diễm, Đặng Thị Kim Hằng, Lý Tuấn Kiệt, **Nguyễn Quốc Hùng**, Lê Thành Thọ, Chu Vân Hải, **Nguyễn Quang Trung** (2022), *Thẩm định phương pháp phân tích aflatoxin B1, B2, G1, G2 trong bắp bằng phương pháp sắc ký lỏng đầu dò huỳnh quang UPLC-FD và khảo sát một số mẫu bắp và sản phẩm từ bắp trên địa bàn TP HCM*, Tạp chí Phân tích Hóa, Lý và Sinh học, số 2, tập 27, trang 183-188.
3. **Thanh Duy Nguyen**, Thuy Ngan Ha Nguyen, Tuan Kiet Ly, **Quoc Hung Nguyen**, Thanh Tho Le, Van Hai Chu, **Tien Dat Nguyen**, Dinh Vu Le (2023), *A high-performance method for quantitation of aflatoxins B1, B2, G1, G2: Full validation for raisin, peanut matrices, and survey of related products at Ho Chi Minh City*, Food Science and Nutrition, Vol 11, Issue10, pp, 5639-6707, (<https://doi.org/10.1002/fsn3.3594>).
4. **Thanh Duy Nguyen**, Thuy Ngan Ha Nguyen, Tuan Kiet Ly, **Quoc Hung Nguyen**, Thanh Tho Le, **Tien Dat Nguyen**, Ngoc Minh Truong (2024), *Health risk assessment of dietary aflatoxin B1 exposure in common food matrices in Vietnam*, Acta Chromatographica (<https://doi.org/10.1556/1326.2024.01286>)
5. **Nguyễn Thành Duy**, Nguyễn Thuý Ngân Hà, Nguyễn Lâm Kiều Diễm, Đặng Thị Kim Hằng, Lý Tuấn Kiệt, (2024), *Quy trình phân tích định lượng đồng thời độc tố aflatoxin B1, G1, B2, G2 trong bột ớt bằng phương pháp không dẫn xuất với kỹ thuật sắc ký lỏng siêu hiệu năng đầu dò huỳnh quang*, Bằng sáng chế độc quyền giải pháp hữu ích số 3872 do Cục Sở Hữu Trí Tuệ đã cấp theo quyết định số 142123/QĐ-SHTT, ngày cấp 04/12/2024.

MỞ ĐẦU

Việt Nam là một quốc gia có tỷ trọng sản xuất nông nghiệp cao với nhiều sản phẩm xuất khẩu có giá trị. Tuy nhiên, một trong những thách thức đối với ngành sản xuất này là sản phẩm có thể bị nhiễm độc tố vi nấm, trong đó có aflatoxin (AF). Nấm *Aspergillus* là tác nhân chính sản sinh AF, một loại độc tố có khả năng gây hại nghiêm trọng cho sức khỏe con người và động vật, bao gồm tổn thương DNA, ung thư và dị tật phát triển. Tiếp xúc lâu dài với AF có thể dẫn đến ngộ độc cấp tính, gây tổn thương gan nghiêm trọng. Trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ là nhóm dễ bị ảnh hưởng nhất do hệ trao đổi chất chưa hoàn thiện và tỷ lệ hấp thụ cao hơn so với người lớn. Aflatoxin phổ biến gồm aflatoxin B1 (AFB1), aflatoxin B2 (AFB2), aflatoxin G1 (AFG1) và aflatoxin G2 (AFG2), trong đó AFB1 được phân loại là chất gây ung thư nhóm 1 theo Cơ quan Nghiên cứu Quốc tế về Ung thư (IARC). Các thực phẩm như loại hạt có dầu (đậu tương, đậu phộng, hạt hướng dương và hạt bông), ngũ cốc (bắp, lúa miến, lúa mì, và gạo), gia vị (ớt, hạt tiêu đen, rau mùi, nghệ, và gừng) và các loại trái cây khô (nhô khô, quả hồ trăn, hạnh nhân, và quả óc chó) thường bị nhiễm aflatoxin sinh ra bởi loại nấm *Aspergillus spp.* Ngoài tác động đến sức khỏe con người, AF còn dẫn đến thiệt hại kinh tế đáng kể do thực phẩm bị ô nhiễm trên diện rộng.

Trong số các thực phẩm có nguy cơ nhiễm AF cao, nhô khô, bột ớt, bắp hạt và đậu phộng là những sản phẩm phổ biến, có giá trị dinh dưỡng cao và đóng vai trò quan trọng trong khẩu phần ăn hàng ngày. Nhô khô rất giàu chất dinh dưỡng và năng lượng, thường được tiêu thụ trực tiếp hoặc sử dụng trong chế biến thực phẩm. Bột ớt là một loại gia vị quan trọng, góp phần tạo hương vị đặc trưng cho nhiều món ăn. Bắp hạt là thực phẩm phổ biến, được sử dụng đa dạng trong chế biến từ thực phẩm tươi sống đến các sản phẩm công nghiệp chế biến sẵn. Đậu phộng là loại hạt dinh dưỡng quen thuộc, được tiêu thụ rộng rãi dưới nhiều hình thức như ăn trực tiếp, làm bơ đậu phộng, bánh kẹo và dầu ăn. Ngoài tầm quan trọng trong thực phẩm và chế độ ăn uống, cả bốn sản phẩm này đều thuộc nhóm thực phẩm qui định mức giới hạn tối đa cho phép theo tiêu chuẩn Việt Nam và quốc tế cần được kiểm soát nghiêm ngặt. Vì vậy, việc phát hiện và định lượng AF trong nhóm thực phẩm này bằng một phương pháp xanh, nhạy và hiệu quả là điều cần thiết để đảm bảo an toàn thực phẩm và ngăn ngừa các nguy cơ tiềm ẩn về sức khỏe con người.

Hiện nay, các phương pháp phân tích thường được sử dụng để xác định AF là sắc ký bản mỏng, ELISA, sắc ký lỏng hiệu năng cao với đầu dò huỳnh quang (HPLC-FD) kết hợp dẫn xuất trước cột hoặc sau cột, sắc ký lỏng kết hợp khối phổ (LC-MS/MS). Tuy nhiên, các phương pháp này vẫn còn tồn tại một hoặc một số hạn chế như: độ nhạy thấp, dương tính giả, quy trình phức tạp hoặc chi phí cao. Trong khi đó, sắc ký lỏng siêu hiệu năng với đầu dò huỳnh quang (UPLC-FD) được thiết kế với một buồng đo tín hiệu huỳnh quang có thể tích dòng chảy lớn và đèn thủy ngân-xenon, tối ưu hóa độ nhạy mà không cần dẫn xuất. Phương pháp này nổi bật nhờ khả năng tiết kiệm thời gian, giảm dung môi và thân thiện với môi trường. Tuy nhiên, các nghiên cứu về phân tích đồng thời aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) bằng UPLC-FD ở Việt Nam còn rất hạn chế.

Do đó, đề tài luận án “Nghiên cứu phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao đầu dò huỳnh quang để phân tích đồng thời aflatoxin B1, B2, G1, G2 trong một số loại thực phẩm” được thực hiện với mong muốn đóng góp phần vào việc phát triển một phương pháp phân tích hiệu quả nhằm xác định đồng thời AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 trong bốn loại thực phẩm thường có nguy cơ phơi nhiễm là đậu phộng, bột ớt, nhô khô và bắp. Luận án được thực hiện với các mục tiêu sau:

➤ Nghiên cứu phát triển phương pháp phân tích đồng thời aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) trong đậu phộng, bột ốt, nho khô, bắp bằng UPLC-FD, không dẫn xuất, giúp tiết kiệm thời gian, giảm dung môi và đơn giản hoá quy trình.

➤ Nghiên cứu xác định hàm lượng aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) trong các mẫu đậu phộng, bột ốt, nho khô và bắp hạt thu thập tại các chợ trên địa bàn Tp.HCM trong năm 2020-2022.

➤ Nghiên cứu đánh giá mối nguy hại độc tố aflatoxin thông qua chỉ số lượng ăn vào cơ thể hàng ngày (EDI) và biên độ phơi nhiễm (MOE) đối với cả người nam và nữ trưởng thành theo 3 thể trạng gầy, bình thường và thừa cân.

Những đóng góp mới của luận án

- Lần đầu tiên tại Việt Nam, nghiên cứu chuẩn hóa phương pháp phân tích đồng thời aflatoxin B1, B2, G1, G2 trong đậu phộng, bột ốt, nho khô và bắp trên thiết bị sắc ký lỏng siêu hiệu năng cao đầu dò huỳnh quang UPLC-FD không dẫn xuất. Phương pháp này có nhiều ưu điểm vượt trội: quy trình đơn giản, độ nhạy cao (LOD 0,1 µg/kg; LOQ 0,3 µg/kg), tiết kiệm thời gian và dung môi, thân thiện với môi trường, bảo vệ sức khỏe và đáp ứng mức giới hạn cho phép theo QCVN 8-1/2011/BYT, dễ ứng dụng trong phòng thí nghiệm.

- Đánh giá ban đầu về sự hiện diện và phân bố aflatoxin trong các mẫu thực phẩm thu thập tại TP.HCM; phát hiện mối tương quan chặt chẽ giữa AFB1 và tổng aflatoxin, đề xuất mô hình dự báo nguy cơ nhiễm độc tố.

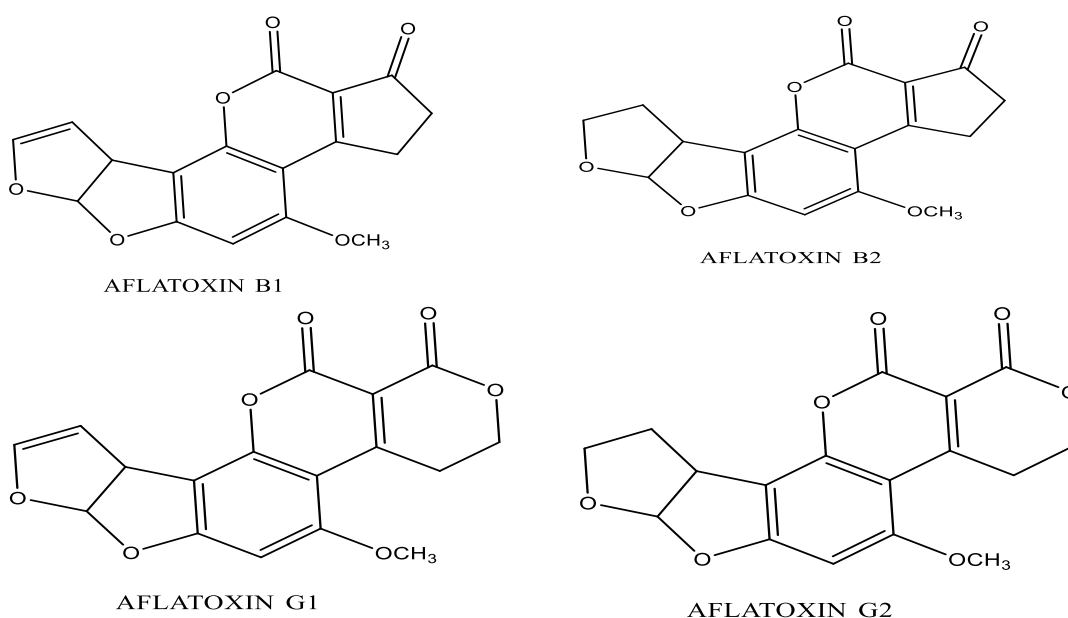
- Lần đầu tiên đánh giá phơi nhiễm AFB1 qua khẩu phần ăn ở ba nhóm thể trạng (gầy, bình thường, thừa cân) của người trưởng thành tại Việt Nam, cung cấp dữ liệu quan trọng cho đánh giá rủi ro sức khỏe cộng đồng.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

1.1. Giới thiệu về độc tố nấm mốc aflatoxin

Các aflatoxin thường nhiễm trên các loại nông sản thực phẩm. Hiện nay người ta đã tìm thấy khoảng 18 loại aflatoxin khác nhau: B (B1, B2); B2a ; B3 (Parasiticol); G (G1, G2); G2a ; M (M1, M2); M2a ; GM1, GM2, GM2a ; P1, Q1, Q2a; Aflatoxicol R0; Aflatoxicol M1; Aflatoxicol H1; Aspertoxin. Tuy nhiên có 4 loại chính thường gặp nhất gồm 4 hợp chất của nhóm bis-furanocoumarin, là sản phẩm trao đổi chất tạo bởi nấm *Aspergillus flavus* và *Aspergillus parasiticus*, được đặt tên là B1, B2, G1, G2. Bốn chất được phân biệt trên cơ sở màu phát quang của chúng. Kí hiệu “B” là chữ viết tắt của Blue (màu xanh dương) dưới tia UV và chữ G là chữ viết tắt của Green (màu xanh lá cây).

Aflatoxin G1 có cấu trúc rất gần với cấu trúc AFB1: nó có hai chức lactone, còn AFB1 chỉ có một (Hình 1.1). Bằng cách hydro khử nối đôi trong nhân hydrofuran tận cùng của AFB1 và AFG1, hai sản phẩm độc khác sẽ thu được là AFB2 và AFG2 của aflatoxin B1 và G1, ta thu được hai sản phẩm độc khác là aflatoxin B2 và G2.



Hình 1.1: Cấu trúc phân tử của 4 loại chính aflatoxin

1.2. Độc tính và giới hạn cho phép của aflatoxin

1.2.1. Độc tính của aflatoxin

Aflatoxin B1 được phân loại là nhóm I, nhóm các chất gây ung thư theo Cơ quan quốc tế nghiên cứu ung thư (IARC). Các bệnh gây ra bởi việc tiêu thụ AF được gọi là aflatoxicosis. Aflatoxicosis mãn tính dẫn đến ung thư, ức chế miễn dịch và một số bệnh lý khác với diễn biến bệnh lý chậm. Trong khi đó aflatoxicosis cấp tính có thể dẫn đến tử vong.

1.2.2. Giới hạn cho phép của aflatoxin

Do độc tính và khả năng gây ung thư cao của aflatoxin, giới hạn tối đa cho phép (Maximum Limit, ML) của AFB1 và tổng AF được quy định rất thấp. Theo QCVN 8-1:2011/BYT quy định mức

ML của AFB1 và tổng AF trong nền đậu phộng và bắp là 2 µg/kg và 4 µg/kg, trong khi nền bột ót và nho khô là 5 µg/kg và 10 µg/kg.

1.3. Phơi nhiễm và nhiễm độc của con người đối với độc tố aflatoxin

1.3.1. Nguy cơ nhiễm aflatoxin trong thực phẩm

Aflatoxin là một trong những độc tố vi nấm nguy hiểm nhất, xuất hiện phổ biến trong thực phẩm do sự xâm nhiễm của các loài *Aspergillus*, đặc biệt là *A. flavus* và *A. parasiticus*. Trong đó, *A. flavus* chủ yếu sản sinh AFB1 và AFB2, thường được tìm thấy trong ngũ cốc, đậu phộng và gia vị. Trong khi đó, *A. parasiticus* không chỉ tạo ra AFB1 và AFB2 mà còn tổng hợp thêm AFG1 và AFG2, gây nhiễm chủ yếu trong các loại hạt có dầu và trái cây khô.

Các điều kiện môi trường như độ ẩm cao, nhiệt độ ẩm áp và phương pháp bảo quản không hợp lý là những yếu tố quan trọng thúc đẩy sự phát triển của nấm mốc và sự hình thành aflatoxin. Trong chuỗi cung ứng, từ khâu thu hoạch, chế biến, vận chuyển đến bảo quản, các điều kiện không đảm bảo có thể thúc đẩy sự phát triển của nấm *Aspergillus spp.*, tác nhân chính sản sinh AF.

1.3.2. Đánh giá mức độ phơi nhiễm aflatoxin và tác động đến sức khỏe con người

Mức tiêu thụ trung bình hàng ngày của đậu phộng, bột ót, nho khô và bắp hạt tại Việt Nam trong khoảng thời gian 2019 – 2021 theo báo cáo của tổ chức lương thực và nông nghiệp liên hiệp quốc là 0,01493 kg/người/ngày; 0,00029 kg/người/ngày; 0,000030 kg/người/ngày và 0,02219 kg/người/ngày.

Theo kết quả công bố thống kê của tổng điều tra Dinh dưỡng toàn quốc giai đoạn 2019 – 2020 được Bộ Y tế công bố năm 2021, chiều cao trung bình đối với nam là 168,1 cm và nữ 156,2 cm và dựa vào chỉ số BMI đối với thể trạng người gầy (16 – 18,4); bình thường (18,5 – 24,9); người béo phì (25 – 40) tương ứng trọng lượng cơ thể trung bình (kg b.m/người) đối với nam 48,60; 61,32; 91,84 và đối với nữ 41,96; 52,94; 79,29

Các thông số đánh giá để đánh giá mức độ gây hại của AF đối với sức khỏe con người là lượng hấp thụ hàng ngày ước tính (EDI), biên độ phơi nhiễm (MOE) và chỉ số nguy cơ (HI).

1.3.3. Tình hình nhiễm độc tố AF ở nước ngoài

Việc phân tích hàm lượng AF trong thực phẩm luôn là một phần quan trọng trong kế hoạch đánh giá an toàn thực phẩm hàng năm của các quốc gia. Điều này được minh chứng qua 53 công trình khoa học từ hơn 30 quốc gia, nghiên cứu trên 17 loại thực phẩm, được công bố bởi các tác giả Mahato (2005–2017) và Jallow (2015–2020). Trong số đó, đậu phộng, các loại hạt, quả sung, bắp, gạo, gia vị, ót và trái cây khô được ghi nhận là những sản phẩm chứa hàm lượng AF cao.

1.3.4. Tình hình nhiễm độc tố AF tại Việt Nam

Nghiên cứu về AF trong thực phẩm được công bố với ba công trình tiêu biểu của các tác giả Mai Hương (2016), Thanh Xuân (2019) và Hữu Tuấn (2020). Các nghiên cứu này được thực hiện tại Hà Nội, Hà Giang, Lào Cai và Thanh Hóa, cho thấy bắp, đậu phộng và gia vị là những sản phẩm có mức độ nhiễm AF cao.

Bên cạnh đó, một số khảo sát về tình hình nhiễm độc tố AF cũng đã được công bố tại các hội thảo khoa học trong nước và qua báo đài cho thấy sự tiềm ẩn nhiễm độc tố AF trong một số thực phẩm tại các chợ dân sinh, hộ kinh doanh tại các chợ.

1.4. Phương pháp phân tích Aflatoxin trong thực phẩm

1.4.1. Phương pháp chiết và làm sạch aflatoxin

Một số phương pháp chiết và làm sạch như Chiết lỏng-lỏng (LLE); Chiết lỏng-rắn (LSE); Chiết siêu âm; Chiết chất lỏng siêu tới hạn (SFE) và chiết pha rắn (SPE). Trong đó, kỹ thuật chiết pha rắn được coi là phương pháp chính xác và đáng tin cậy nhất để làm sạch hỗn hợp trước khi ước tính định tính và định lượng. Với sự trợ giúp của SPE, chất phân tích cần thiết có thể được tách riêng và các thành phần không mong muốn có thể gây trở ngại trong quá trình phân tích có thể được loại bỏ một cách chính xác.

Một ứng dụng đặc trưng của SPE là cột làm sạch ái lực miễn dịch (IAC) và cột làm sạch đa chức năng (MFC) bao gồm cột MultiSep®, MycoSep® và Myco6in1. Việc chiết xuất AF thường được thực hiện sau bước làm sạch. Kỹ thuật làm sạch phổ biến được sử dụng là sắc ký cột ái lực miễn dịch (IAC) và cột làm sạch đa chức năng MycoSep (MFC). Các kỹ thuật làm sạch này được coi là lựa chọn tốt nhất để phân lập mục tiêu chất phân tích AF và làm sạch hoặc loại bỏ các thành phần không mong muốn trước khi ước định lượng bằng HPLC.

1.4.2. Các phương pháp phát hiện và định lượng aflatoxin

Đối với các phương pháp sử dụng sắc ký bản mỏng TLC, cột mini column, kit Elisa thường dùng định tính tổng hàm lượng 4 aflatoxin B1, B2, G1, G2, phương pháp nhanh nhưng dễ bị dương tính giả và khó khăn trong việc định lượng chính xác từng AF trong mẫu.

Phương pháp sử dụng sắc ký lỏng đầu dò huỳnh quang là phương pháp định lượng và cho kết quả chính xác, đáp ứng yêu cầu khắt khe mức cho phép độc tố AF trong thực phẩm của Bộ y tế và các nước trên thế giới. Tuy nhiên, các phương pháp trên sử dụng dung môi ly trích như chloroform, benzene và sử dụng các dẫn xuất sau cột và trước cột độc hại và gây ảnh hưởng xấu đến môi trường.

Phương pháp sử dụng sắc ký lỏng đầu dò khối phổ cũng là một trong những phương pháp định lượng và cho kết quả chính xác cao, tuy nhiên giá thành đầu tư cao rất nhiều so với sắc ký lỏng đầu dò huỳnh quang, thêm vào đó kỹ thuật vận hành thiết bị rất phức tạp.

❖ Từ các thông tin và dữ liệu trình bày ở phần tổng quan cho thấy:

Những phát hiện từ các nghiên cứu trước đây nhấn mạnh nguy cơ nhiễm AF của các loại hạt như đậu phộng, nho khô, bắp và bột ớt, nêu bật mối lo ngại đáng kể về an toàn thực phẩm, đặc biệt sự tiềm ẩn nhiễm độc tố AF tại các chợ dân sinh, hộ kinh doanh tại các chợ - nơi cung cấp thực phẩm chủ yếu cho người tiêu dùng nhưng điều kiện bảo quản và kiểm soát chất lượng chưa được thực hiện chặt chẽ. Tại TP.HCM, hệ thống chợ dân sinh đóng vai trò quan trọng trong việc cung cấp thực phẩm hàng ngày cho người dân. Tuy nhiên, việc bảo quản tại chợ thường chưa đáp ứng được các tiêu chuẩn nghiêm ngặt về an toàn thực phẩm, như không kiểm soát tốt nhiệt độ, độ ẩm, dễ xảy ra hiện tượng nhiễm chéo giữa các lô hàng, làm gia tăng nguy cơ nhiễm độc tố vi nấm, trong đó có aflatoxin. Do đó, việc khảo sát hàm lượng AF và đánh giá mức độ ô nhiễm AF trong đậu phộng, bột ớt, nho khô và bắp là hết sức cần thiết, từ đó đánh giá sự phơi nhiễm cũng như những rủi ro về sức khỏe con người khi tiếp xúc với độc tố này.

Về mặt phân tích, hiện nay, các phương pháp tiêu chuẩn như TCVN 7930:2008, TCVN 9522:2012, TCVN 10638:2014, AOAC 2005.08, AOAC 994.08 quy định phân tích đồng thời aflatoxin (B1, B2, G1, G2) trên một số nền mẫu phổ biến như đậu phộng, bắp, quả hồ trăn, bột ớt, ngũ cốc... bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao với đầu dò huỳnh quang (HPLC-FD), có sử dụng kỹ thuật dẫn xuất trước hoặc sau cột để tăng cường tín hiệu phát hiện. Mặc dù đảm bảo yêu cầu về độ

chính xác và độ nhạy, các phương pháp này vẫn tồn tại một số hạn chế, bao gồm thời gian phân tích kéo dài, tiêu tốn lượng lớn dung môi hữu cơ và yêu cầu hệ thống dẫn xuất chuyên biệt, gây ảnh hưởng đến hiệu suất phân tích cũng như tác động môi trường. Bên cạnh đó, một nghiên cứu đã ứng dụng phương pháp UPLC-FD không dẫn xuất, áp dụng trên nền ngũ cốc, với giới hạn phát hiện tổng aflatoxin (AF) cao hơn mức quy định của QCVN 8-1:2011/BYT. Nghiên cứu này kế thừa hệ thống UPLC-FD và quy trình xử lý mẫu từ các nghiên cứu trước, đồng thời tối ưu hóa phương pháp phù hợp với các nền mẫu đa dạng hơn, bao gồm đậu phộng, bột ót, bắp hạt và nho khô, mà không cần sử dụng dẫn xuất. Phương pháp này không chỉ đáp ứng yêu cầu độ nhạy theo QCVN 8-1:2011/BYT, mà còn hướng đến môi trường xanh với những ưu điểm như tiết kiệm thời gian phân tích, giảm lượng dung môi phân tích, ít gây ô nhiễm môi trường, bảo vệ sức khỏe người thao tác, qui trình xử lý mẫu đơn giản. Ngoài ra, nghiên cứu còn hướng đến việc ước lượng mối nguy hại và đánh giá rủi ro ung thư liên quan đến AF, nhằm cung cấp cái nhìn tổng thể hơn về mức độ ảnh hưởng của độc tố AF đối với sức khỏe cộng đồng.

Do đó, những nội dung chính của luận án cần tập trung nghiên cứu bao gồm:

- Nghiên cứu khảo sát điều kiện sắc ký thích hợp để phân tích đồng thời aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) trên hệ thống sắc ký lỏng siêu hiệu năng đầu dò huỳnh quang (UPLC-FD) và nghiên cứu khảo sát qui trình chiết tách aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) trong các loại hạt bao gồm đậu phộng, bột ót, nho khô và bắp hạt.
- Nghiên cứu xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp phân tích aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) trong đậu phộng, bột ót, nho khô và bắp hạt.
- Nghiên cứu xác định hàm lượng aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) trong các mẫu đậu phộng, bột ót, nho khô và bắp hạt thu thập tại các chợ trên địa bàn Tp.HCM trong năm 2020-2022.
- Nghiên cứu đánh giá mối nguy hại độc tố aflatoxin thông qua chỉ số lượng ăn vào cơ thể hàng ngày (EDI) và biên độ phơi nhiễm (MEO) đối với cả người nam và nữ trưởng thành theo 3 thể trạng gầy, bình thường và thừa cân.

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Các chất độc tố AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 và tổng AF (AFB1+AFB2+ AFG1+AFG2) trong đậu phộng, bột ớt, nho khô và bắp.

2.2. Hóa chất, thiết bị và dụng cụ

2.2.1. Hóa chất

Các hóa chất và vật liệu sử dụng trong nghiên cứu bao gồm acetonitril HPLC (ACN, ThermoFisher, Mỹ) với độ tinh khiết $\geq 99,9\%$ và hàm lượng nước $\leq 0,02\%$, acid formic (HCOOH, Merck, Đức) có độ tinh khiết $\geq 99,9\%$ với hàm lượng acid acetic $\leq 0,05\%$, và methanol HPLC (MeOH, Merck, Đức) với độ tinh khiết $\geq 99,9\%$ và hàm lượng nước $\leq 0,02\%$. Cột ái lực miễn dịch aflatoxin (IAC, Vicam, Mỹ) được sử dụng với tốc độ dòng chảy 1-3 mL/phút, mức nhiễm chéo chất khác $< 0,01\%$ và thể tích cột 3 mL. Nước cất hai lần loại ion được lấy từ thiết bị Milli-Q Direct 8 của hãng Merck Millipore. Natri clorua (NaCl, Merck, Đức) có độ tinh khiết $\geq 99\%$ và độ ẩm $\leq 0,5\%$; Dung dịch đệm photphat pH 7.4 (PBS). Dung dịch chuẩn aflatoxin (LGC standards GmbH, Đức) gồm B1: 2 $\mu\text{g/mL}$, B2: 0,5 $\mu\text{g/mL}$, G1: 2 $\mu\text{g/mL}$ và G2: 0,5 $\mu\text{g/mL}$ trong dung môi ACN.

Chuẩn bị dung dịch chuẩn AF được pha theo trình tự sau: Chuẩn gốc C0 (5 $\mu\text{g/mL}$), bao gồm 2 $\mu\text{g/mL}$ AFB1, 0,5 $\mu\text{g/mL}$ AFB2, 2 $\mu\text{g/mL}$ AFG1 và 0,5 $\mu\text{g/mL}$ AFG2 trong dung môi ACN, được lưu trữ ở nhiệt độ 2-8 °C và sử dụng trong 12 tháng. Từ chuẩn gốc, chuẩn trung gian 1 (CTG1, 500 $\mu\text{g/L}$) được pha bằng cách lấy chính xác 1 mL dung dịch C0 vào bình định mức 10 mL và pha loãng đến vạch bằng ACN. Tiếp theo, chuẩn trung gian 2 (CTG2, 50 $\mu\text{g/L}$) được chuẩn bị bằng cách lấy 1 mL CTG1 vào bình định mức 10 mL, sau đó pha loãng bằng dung dịch 0,2% HCOOH/ACN (1:1) và chuẩn trung gian 3 (CTG3, 10 $\mu\text{g/L}$) được pha bằng cách lấy 1 mL CTG2 vào bình định mức 5 mL và pha loãng bằng dung dịch 0,2% HCOOH/ACN (1:1) đến vạch. Cuối cùng, chuẩn làm việc từ 0,5 – 50 $\mu\text{g/L}$ được pha bằng cách lấy một thể tích cần thiết dung dịch chuẩn trung gian vào lọ và thêm 0,2% HCOOH/ACN (1/1) sao cho tổng thể tích là 1 mL (1000 μL).

Các dung dịch được chuẩn bị như sau:

- Dung dịch 0,1% HCOOH: Lấy 1 mL HCOOH tinh khiết ($\geq 99,9\%$) vào bình định mức 1000 mL, thêm H₂O đến vạch, lắc đều và siêu âm trong 5 phút.
- Dung dịch 0,2% HCOOH: Lấy 2 mL HCOOH tinh khiết ($\geq 99,9\%$) vào bình định mức 1000 mL, thêm H₂O đến vạch, lắc đều và siêu âm trong 5 phút.
- Dung dịch 0,2% HCOOH/ACN (1/1, v/v): Lấy 50 mL dung dịch 0,2% HCOOH vào bình định mức 100 mL, thêm ACN đến vạch, lắc đều và siêu âm trong 5 phút.
- Dung dịch ACN/H₂O (6/4, v/v): Lấy 600 mL ACN vào bình định mức 1000 mL, thêm H₂O đến vạch, lắc đều và siêu âm trong 5 phút.
- Dung dịch MeOH/H₂O (8/2, v/v): Lấy 800 mL MeOH vào bình định mức 1000 mL, thêm H₂O đến vạch, lắc đều và siêu âm trong 5 phút.

2.2.2. Thiết bị và dụng cụ

Các thiết bị và dụng cụ được dùng trong nghiên cứu bao gồm:

- Hệ thống sắc ký lỏng siêu hiệu năng ACQUITY H CLASS UPLC-FD Waters với các thành phần chính bao gồm bơm 4 kênh (Số Seri M15QSM234A; Singapore), bơm mẫu tự động FTN (Số Seri M15SD1942G; Singapore), đầu dò huỳnh quang FD (Số Seri M15UPF301G; Singapore), cột sắc ký.

- Các dụng cụ hỗ trợ khác bao gồm: máy lắc, máy vortex, máy ly tâm, bồn siêu âm, hệ lọc pha động, cân phân tích hiển thị đến 0,0001 g, cân phân tích miligram hiển thị đến 0,001 mg; dụng cụ micropipet có khoảng đo 20-200 μ L; 100-1000 μ L, các ống đong dung tích 100 mL, 500 mL và 1000 mL; bình định mức có dung tích 5 mL, 10 mL, 25 mL và 50 mL, lọ thủy tinh 1,5 mL, bình có nắp đậy loại 1 lít, ống ly tâm nhựa PTFE 50 mL, giấy lọc xanh đường kính 11 cm, màng lọc PTFE với kích thước lọc 0,45 μ m, đường kính 13 mm.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp phân tích đồng thời aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) trên thiết bị UPLC-FD

Tối ưu hóa điều kiện sắc ký để phân tích đồng thời aflatoxin (B1, B2, G1 và G2), nghiên cứu 3 yếu tố bao gồm thay đổi thành phần pha động nhằm cải thiện khả năng tách và phát hiện các chất, đánh giá độ ổn định của tín hiệu, xác định khoảng tuyến tính và đường chuẩn.

Dựa trên các nghiên cứu đã công bố, với pha động được sử dụng có thành phần H₂O/ACN/MeOH với tỷ lệ 64/18/18, cột sắc ký BEH C18 (150 $\times$ 2,1 mm; 1,7 μ m), bước sóng kích thích Ex = 365 nm, bước sóng phát xạ Em = 455 nm và nhiệt độ cột được duy trì ổn định ở 40°C. Trong nghiên cứu này khảo sát 2 điều kiện pha động bao gồm H₂O/ACN/MeOH (56/22/22), H₂O/ACN/MeOH (64/18/18). Các thí nghiệm được thực hiện bằng cách tiêm dung dịch chuẩn hỗn hợp aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) với nồng độ 10 μ g/L vào hệ thống sắc ký lỏng UPLC-FD. Sau khi lựa chọn được điều kiện pha động để khảo sát, nghiên cứu tiếp tục điều chỉnh tỷ lệ phần trăm HCOOH bổ sung vào pha động với các mức nồng độ lần lượt là 0%, 0,1%, và 0,2%.

2.3.2. Phương pháp chiết tách aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) trong nền mẫu đậu phộng, bột ớt, nho khô, và bắp hạt

Phương pháp chiết tách aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) trong mẫu thực phẩm được thực hiện qua 2 khảo sát chính:

- Khảo sát dung môi chiết aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) được đánh giá dựa trên các tiêu chí như hiệu suất thu hồi và độ chính xác trong phân tích.

+ Quy trình được thực hiện khảo sát như sau: Cân 5 g mẫu trên cân phân tích (hiển thị đến 0,1 mg), thêm 20,00 mL MeOH/H₂O (8/2) hoặc ACN/H₂O (6/4), lắc bằng vortex, siêu âm 30 phút, ly tâm 9000 vòng/phút trong 3 phút, lọc qua giấy lọc xanh. Lấy 5,00 mL dịch lọc, thêm 20,00 mL H₂O hoặc đệm PBS, lắc bằng vortex, ly tâm 9000 vòng/phút trong 3 phút, lấy 20,00 mL dịch lọc qua cột ái lực IAC, rửa cột bằng 20 mL H₂O. Rửa giải 3,00 mL MeOH, thổi khô, định mức 1,00 mL dung dịch 0,2% HCOOH/ACN (1/1), qua màng lọc PTFE 0,45 μ m. Mẫu được tiêm vào hệ UPLC-FD.

- Khảo sát ảnh hưởng nền mẫu đến quy trình chiết aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) bằng cách đánh giá phần trăm độ ảnh hưởng nền (%ME)

2.3.3. Phương pháp xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp phân tích aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) trong mẫu đậu phộng, bột ót, nho khô, và bắp hạt

Trước khi áp dụng phương pháp phân tích aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) trên các mẫu thực tế như đậu phộng, bột ót, nho khô và bắp hạt, việc nghiên cứu xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp là bước không thể thiếu.

Xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp qua các thông số quan trọng như độ chọn lọc, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng, độ chụm (độ lặp lại và độ tái lặp) và độ đúng (hiệu suất thu hồi), độ pha loãng mẫu, độ ổn định mẫu, độ không đảm bảo đo và đảm bảo kết quả phân tích để giúp đảm bảo rằng phương pháp đáp ứng các yêu cầu khắt khe về độ chính xác, độ tin cậy và khả năng áp dụng trên các nền mẫu thực phẩm phức tạp.

2.3.4. Phương pháp đánh giá mức độ nguy hại độc tố aflatoxin đối với sức khỏe con người theo 3 thể trạng gầy, bình thường và thừa cân

Phương pháp đánh giá mức độ nguy hại của aflatoxin đối với sức khỏe con người thông qua các chỉ số liều phơi nhiễm hàng ngày (Estimated Daily Intake - EDI), biên độ phơi nhiễm (Margin of Exposure - MOE) và chỉ số nguy hiểm (Hazard Index - HI). Phương pháp thực hiện bao gồm việc thu thập dữ liệu về hàm lượng AF trong đậu phộng, bột ót, nho khô và bắp hạt. Dựa trên các dữ liệu khẩu phần ăn hàng ngày, các nhóm đối tượng được phân chia theo chỉ số cơ thể (Body Mass Index - BMI) để phân tích theo ba thể trạng: gầy, bình thường và béo phì áp dụng cho cả người nam và nữ trưởng thành.

Các chỉ số EDI, MOE và HI được tính toán, sau đó so sánh EDI và MOE giữa các nhóm thể trạng nhằm đánh giá nguy cơ phơi nhiễm AF đối với từng đối tượng.

2.3.5. Phương pháp thu thập và bảo quản mẫu

Trong nghiên cứu này, 400 mẫu đậu phộng bao gồm (370 đậu phộng thô và 30 đậu phộng chế biến); 400 mẫu bột ót; 400 mẫu nho khô và 400 mẫu bắp hạt (100 bắp hạt trắng, 100 hạt vàng, 200 bắp chế biến) được thu thập tại 12 quận (Quận 1 – Quận 12), quận Tân Bình, quận Tân Phú, quận Thủ Đức, quận Phú Nhuận, quận Gò Vấp, quận Bình Thạnh, quận Bình Tân và huyện Hoắc Môn của Thành phố Hồ Chí Minh bằng phương pháp lấy mẫu ngẫu nhiên.

Mẫu đậu phộng và mẫu bột ót được thu thập từ tháng 01 đến tháng 04 năm 2021 và từ tháng 01 đến tháng 05 năm 2022 đối với mẫu nho khô và bắp hạt. Mẫu sau khi thu thập sẽ được chuyển đến bộ phận tiếp nhận mẫu của phòng thí nghiệm để tiến hành mã hoá và đồng nhất mẫu. Mẫu được lưu ở nhiệt độ $\leq -20\text{ }^{\circ}\text{C}$ nếu chưa được phân tích ngay trong ngày.

2.3.6. Phương pháp xử lý số liệu

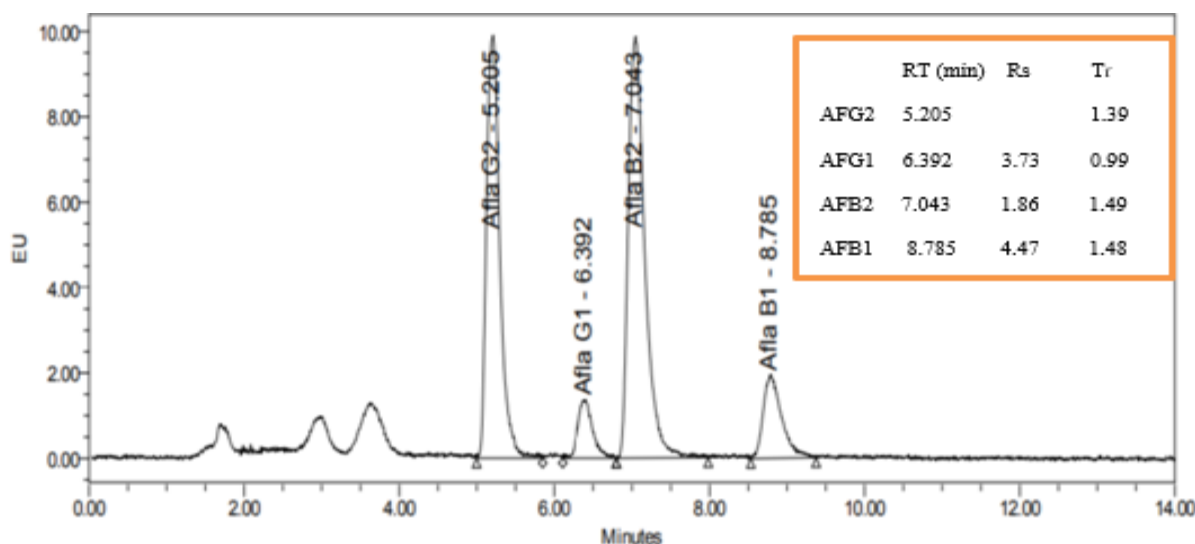
Dữ liệu được xử lý và phân tích thống kê trên phần mềm Microsoft Excel 2019 và phần mềm Empower 3 tính toán từ thiết bị phân tích UPLC-FD Waters. Các mẫu có nồng độ aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) dưới giới hạn phát hiện (thấp hơn LOD) được coi là bằng 0. Phân tích tương quan Pearson, ANOVA, kiểm định t-test và phân tích hồi quy tuyến tính (phần mềm SPSS 22.0) được thực hiện để đánh giá mối liên hệ giữa hàm lượng aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) và tổng AF trong các mẫu đậu phộng, bột ót, nho khô và bắp hạt.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khảo sát điều kiện sắc ký để phân tích đồng thời aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) trên thiết bị sắc ký lỏng UPLC-FD

Kết quả điều kiện sắc ký bao gồm tối ưu hoá thành phần pha động, độ ổn định tín hiệu các peak aflatoxin (B1, B2, G1 and G2) và khoảng tuyến tính đường chuẩn được tóm tắt ở Bảng 3.21

Một sắc ký đồ đại diện chuẩn 10 µg/L định mức bằng ACN/HCOOH 0,2% được thực hiện trên cột phân tích C18 (150 × 2,1 mm; 1,7 µm) ở nhiệt độ 40 °C, với tốc độ dòng 0,2 mL/phút và thể tích tiêm 5 µL, bước sóng kích thích 365 nm và phát xạ 455 nm với Rs thu được giữa các peak AFG1 (3,8), AFB2 (1,9), AFB1 (4,5) được trình bày Hình 3.1



Hình 3.1: Sắc ký đồ chuẩn 10 µg/L định mức bằng ACN/HCOOH 0,2% với thành phần pha động 0,1% HCOOH/ACN/MeOH (64/18/18)

3.2. Khảo sát qui trình chiết aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) trong nền mẫu đậu phộng, bột ớt, nho khô và bắp hạt

3.2.1. Khảo sát dung môi chiết aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) trong nền mẫu đậu phộng, bột ớt, nho khô và bắp hạt

Qui trình chiết aflatoxin (B1, B2, G1, G2) trong nền mẫu đậu phộng, bột ớt, nho khô và bắp hạt được tóm tắt như sau:

Mẫu bắp: Cân 5 g mẫu trên cân phân tích (hiển thị đến 0,1 mg), thêm 20,00 mL MeOH/H₂O (8/2), lắc bằng vortex, siêu âm 30 phút, ly tâm 9000 vòng/phút trong 3 phút, lọc qua giấy lọc đường kính 110 mm. Lấy 5,00 mL dịch lọc, thêm 20,00 mL H₂O, lắc bằng vortex, ly tâm 9000 vòng/phút trong 3 phút, lấy 20,00 mL dịch lọc qua cột ái lực IAC, rửa cột bằng 20 mL H₂O. Rửa giải 3,00 mL MeOH, thổi khô, định mức 1,00 mL dung dịch 0,2% HCOOH/ACN (1/1), qua màng lọc PTFE 0,45 µm. Mẫu được tiêm vào hệ UPLC-FD.

Mẫu bột ớt và nho khô: Cân 5 g mẫu trên cân phân tích (hiển thị đến 0,1 mg), thêm 20,00 mL MeOH/H₂O (8/2), lắc bằng vortex, siêu âm 30 phút, ly tâm 9000 vòng/phút trong 3 phút, lọc qua giấy

lọc đường kính 110 mm. Lấy 5,00 mL dịch lọc, thêm 20 mL PBS, lắc bằng vortex, ly tâm 9000 vòng/phút trong 3 phút, lấy 20,00 mL dịch lọc qua cột ái lực IAC, rửa cột bằng 20 mL H₂O. Rửa giải 3,00 mL MeOH, thổi khô, định mức 1 mL dung dịch 0,2% HCOOH/ACN (1/1), qua màng lọc PTFE 0,45 µm. Mẫu được tiêm vào hệ UPLC-FD.

Mẫu đậu phộng: Cân 5 g mẫu trên cân phân tích (hiển thị đến 0,1 mg), thêm 20,00 mL ACN/H₂O (6/4), lắc bằng vortex, siêu âm 30 phút, ly tâm 9000 vòng/phút trong 3 phút, lọc qua giấy lọc đường kính 110 mm. Lấy 5,00 mL dịch lọc, thêm 20 mL H₂O, lắc bằng vortex, ly tâm 9000 vòng/phút trong 3 phút, lấy 20,00 mL dịch lọc qua cột ái lực IAC, rửa cột bằng 20 mL H₂O. Rửa giải 3,00 mL MeOH, thổi khô, định mức 1,00 mL dung dịch 0,2% HCOOH/ACN (1/1), qua màng lọc PTFE 0,45 µm. Mẫu được tiêm vào hệ UPLC-FD.

Hiệu suất chiết và độ lặp lại cho từng nền mẫu xem tóm tắt ở Bảng 3.21

3.2.2. Khảo sát ảnh hưởng nền mẫu đến qui trình chiết aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) trong nền mẫu đậu phộng, bột ớt, nho khô, và bắp hạt

Độ ảnh hưởng nền (% ME) trong các nền mẫu đậu phộng, bột ớt, nho khô và bắp hạt đều thấp hơn 20%, nên đường chuẩn trong dung môi được sử dụng để xác nhận giá trị sử dụng phương pháp thay cho xây dựng đường chuẩn trên nền mẫu tốn nhiều công sức, thời gian và hoá chất. (xem tóm tắt ở Bảng 3.21).

3.3. Xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp

Sau quá trình khảo sát và xác nhận giá trị sử dụng phương pháp phân tích đồng thời aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) trong 4 nền mẫu đậu phộng, bột ớt, nho khô và bắp hạt bằng phương pháp không dẫn xuất với kỹ thuật UPLC-FD, các kết quả được tóm tắt trong Bảng 3.21

Bảng 3.21: Tóm tắt kết quả nghiên cứu qui trình đồng thời aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) trên thiết bị UPLC-FD

STT	Nội dung nghiên cứu	Các tiêu chí chấp nhận	Kết quả đạt được
1	Khảo sát điều kiện sắc ký để phân tích đồng thời aflatoxin (B1, B2, G1 và G2)		
1.1	Tối ưu hoá thành phần pha động	Độ phân giải $R_s \geq 1,5$ Hệ số kéo đuôi $0,8 \leq T_f \leq 1,5$	Độ phân giải R_s : 1,9-4,5 Hệ số kéo đuôi T_f : 0,9-1,5 Lựa chọn pha động 0,1%HCOOH/ACN/MeOH (64/18/18)
1.2	Khảo sát độ ổn định tín hiệu trên UPLC-FD	-Thời gian lưu (% RSD $\leq 2\%$) -Diện tích peak (% RSD $\leq 2\%$) -Độ phân giải $R_s \geq 1,5$ -Hệ số kéo đuôi $0,8 \leq T_f \leq 1,5$	Đạt: % RSD = 0,07-0,11% (n=6) Đạt: % RSD = 0,18-0,59% (n=6) Đạt: $R_s = 1,98-4,98$ (n=6) Đạt: $T_f = 1,28-1,5$ (n=6)
1.3	Khảo sát khoảng tuyến tính và đường chuẩn	Đường chuẩn: $0,99 \leq R^2 \leq 1$,	Đạt với hệ số tương quan đường chuẩn: $R^2 = 0,9999$, với khoảng

STT	Nội dung nghiên cứu	Các tiêu chí chấp nhận	Kết quả đạt được
		Độ lệch: nồng độ tính toán được trên từng điểm chuẩn $\leq 15\%$ so với giá trị thực (trừ nồng độ tại điểm MQL $\leq 20\%$)	nồng độ 0,2 - 20,0 $\mu\text{g/L}$ cho AFB1 và AFG1 và 0,05 - 5,0 $\mu\text{g/L}$ cho AFB2 và AFG2. Đạt : % độ lệch: 15-18%
2	Kết quả khảo sát qui trình chiết aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) trong nền mẫu đậu phộng, bột ớt, nho khô và bắp hạt		
2.1	Khảo sát dung môi chiết aflatoxin (B1, B2, G1 và G2)		
2.1.1	Nền đậu phộng	- H% chiết là 60-115% - Độ lặp lại RSDr $\leq 21\%$	Đạt : %H = 85,7 - 99,2% Đạt : %RSDr < 6% Lựa chọn dung môi chiết ACN/H ₂ O (6/4) – H ₂ O
2.1.2	Nền bột ớt	- H% chiết là 60-115% - Độ lặp lại RSDr $\leq 21\%$	Đạt : %H = 70,1 - 97,8% Đạt : %RSDr < 6% Đạt, lựa chọn dung môi chiết MeOH/H ₂ O (8/2)- PBS
2.1.3	Nền nho khô	- H% chiết là 60-115% - Độ lặp lại RSDr $\leq 21\%$	Đạt : %H = 72,4 – 95,4% Đạt : %RSDr < 3% Đạt, lựa chọn dung môi chiết MeOH/H ₂ O (8/2) - PBS
2.1.4	Nền bắp hạt	- H% chiết là 60-115% - Độ lặp lại RSDr $\leq 21\%$	Đạt : %H = 90,3 – 99,8% Đạt : %RSDr < 2% Đạt, lựa chọn dung môi chiết MeOH/H ₂ O (8/2) - H ₂ O
2.2	Khảo sát ảnh hưởng nền mẫu đến qui trình chiết aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) trong nền mẫu đậu phộng, bột ớt, nho khô và bắp hạt		
2.2.1	Nền đậu phộng	Độ ảnh hưởng nền mẫu (%ME)	Đậu phộng: 2,81 – 8,04%
2.2.2	Nền bột ớt	không ảnh hưởng (%ME < 20),	Bột ớt: 13,9 – 18,1%
2.2.3	Nền mẫu bắp hạt	ảnh hưởng trung bình ($20 \leq \%ME \leq 50$), ảnh hưởng đáng kể (%ME > 50).	Bắp hạt: 6,1 – 11,3%
2.2.4	Nền nho khô		Nho khô: 5,63 – 11,4%
3	Xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp		
3.1	Độ chọn lọc	Tại thời gian lưu của các chất AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 trong sắc ký đồ mẫu trắng không xuất hiện nhiễu gây ra	Đạt, phương pháp có tính chọn lọc

STT	Nội dung nghiên cứu	Các tiêu chí chấp nhận	Kết quả đạt được
3.2	Giới hạn phát hiện MDL và định lượng MQL trên 4 nền mẫu đậu phộng, bột ốt, nho khô, và bắp hạt	MDL: Tín hiệu trên nhiều nền đáp ứng tiêu chí $S/N \geq 3$ MQL: Tiêu chí chấp nhận hiệu suất thu hồi khoảng 70-120%, độ tái lập $RSD_R \leq 20\%$	MDL = 0,1 µg/kg cho từng AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 trên 4 nền mẫu với $S/N = 3,10 - 9,61$ Đạt : Nền đậu phộng % H : 94,9 - 99,4% % $RSD_R < 3\%$ Đạt : Nền bột ốt, % H : 81,6 - 94,3% % $RSD_R < 7\%$ Đạt : Nền nho khô % H : 86,4 – 96,9% % $RSD_R < 3\%$ Đạt : Nền bắp hạt % H : 71,8 – 85,7% % $RSD_R < 7\%$ Giới hạn định lượng MQL = 0,3 µg/kg cho từng cho từng AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 trên 4 nền mẫu đậu phộng, bột ốt, nho khô, và bắp hạt,
3.3	Độ chụm (độ lặp lại RSD_R và độ tái lập RSD_R) và độ đúng của phương pháp	Độ chính xác (độ lặp lại RSD_R % và độ tái lập RSD_R %) không vượt quá 22%, độ đúng phải nằm trong khoảng 60-115%	Đạt: Nền đậu phộng % H : 76,5-99,8% % RSD_R và % $RSD_R < 5\%$ Đạt : Nền bột ốt % H : 81,2 - 87,2% % RSD_R và % $RSD_R < 3\%$ Đạt: Nền nho khô % H : 80,9-97,3% % RSD_R và % $RSD_R < 2\%$ Đạt: Nền bắp hạt % H : 80,4-99,2% % RSD_R và % $RSD_R < 2\%$
3.4	Hệ số pha loãng mẫu	Hiệu suất thu hồi và độ tái lập đạt theo tiêu chí AOAC 2019	Hiệu suất thu hồi đạt từ 80,3 – 104 % và độ tái lập < 10%, Pha loãng mẫu bằng ACN/HCOOH 0,2% với các hệ số pha loãng khác nhau không ảnh hưởng đến độ chụm và độ đúng của phương pháp.
3.5	Độ không đảm bảo đo	Độ không đảm bảo đo mở rộng % $U_{exp} < 44$ % tại nồng độ <	Đạt: Nền đậu phộng % U_{exp} : 7,2 - 28,6%

STT	Nội dung nghiên cứu	Các tiêu chí chấp nhận	Kết quả đạt được
		100 µg/Kg	Đạt: Nền bột ót, % Uexp: 28,1 - 31,7% Đạt: Nền nho khô % Uexp : 12,8 – 24,6% Đạt: Nền bắp hạt % Uexp : 25,6 – 37,8%
3.6	Độ ổn định mẫu	Độ sai biệt % D ≤ 15% Hệ số biến thiên % CV ≤ 20%	Đạt: Nền đậu phộng % D : 0,1 – 15,6% % CV: 0,1 – 2,3% Đạt: Nền bột ót % D : 0,1 – 10,9% % CV: 0,1 – 2,8% Đạt: Nền nho khô % D : 0,4 – 16,5% % CV: 0,1 – 3,5% Đạt: Nền bắp hạt % D : 0,1 – 10,4% % CV: 0,1 – 3,9%
3.7	Đảm bảo kết quả thử nghiệm	Kết quả so sánh liên phòng: đánh giá độ tái lập RSD _R % không vượt quá 22% của 3 phòng lab tại nồng độ <100 µg/kg	Đạt: Nền đậu phộng % RSD _R < 6% Đạt :Nền bột ót % RSD _R < 6% Đạt: Nền nho khô % RSD _R < 11% Đạt: Nền bắp hạt % RSD _R < 12%
		Tham gia thử nghiệm thành thạo theo chương trình AF trong bắp (CSSMY021 – M21411AF), Tiêu chí (- 2 ≤ Z-score ≤ 2)	AFs (25,8 µg/kg, Z-score = -0,9), AFB1(20,9 µg/kg, Z-score = -0,9) AFB2 (4,9 µg/ kg, điểm Z = -0,7), Đạt theo tiêu chí (- 2 ≤ Z-score ≤ 2)
		Kiểm soát mẫu QC hàng ngày ở mức nồng độ MQL đối với AFB1 theo biểu đồ Control Chart	Đáp ứng hiệu suất thu hồi tại mức nồng độ MQL theo tiêu chí AOAC 2019 và thống kê dữ liệu, theo dõi biểu đồ control chart

Tóm lại: Quy trình phân tích đồng thời aflatoxin B1, B2, G1, G2 bằng phương pháp không dẫn xuất với kỹ thuật UPLC-FD đã đạt được các ưu điểm như tiết kiệm thời gian phân tích, giảm lượng dung môi chạy máy, ít gây ô nhiễm môi trường, bảo vệ sức khỏe người thao tác, quy trình xử lý mẫu

đơn giản, ít tổn dung môi. Phương pháp phân tích đạt được MDL thấp hơn hoặc tương đương so với các kỹ thuật có dẫn xuất trước hoặc sau cột. Điều này có thể được lý giải bởi một số yếu tố sau:

+ Hệ thống UPLC-FD, với đầu dò huỳnh quang sử dụng đèn thủy ngân-xenon kết hợp với buồng đo tín hiệu huỳnh quang có thể tích dòng chảy lớn, giúp tối ưu hóa độ nhạy mà không cần dẫn xuất hóa.

+ Tối ưu hóa pha động: Thành phần pha động được điều chỉnh để tăng cường khả năng phân tách và đáp ứng huỳnh quang. Đặc biệt, bổ sung HCOOH giúp cải thiện độ sắc nét của pic sắc ký, tăng cường độ nhạy của phương pháp.

+ Quy trình xử lý mẫu hiệu quả: Dung môi ly trích và pha loãng (đệm PBS hoặc H₂O) được tối ưu hóa nhằm tăng khả năng hòa tan aflatoxin, tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình làm sạch bằng cột ái lực miễn dịch.

3.4. Nghiên cứu hàm lượng aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) trong mẫu đậu phộng, bột ớt, nho khô và bắp hạt thu thập trên thị trường

3.4.1. Kết quả phân tích aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) trong mẫu đậu phộng, bột ớt, nho khô và bắp hạt

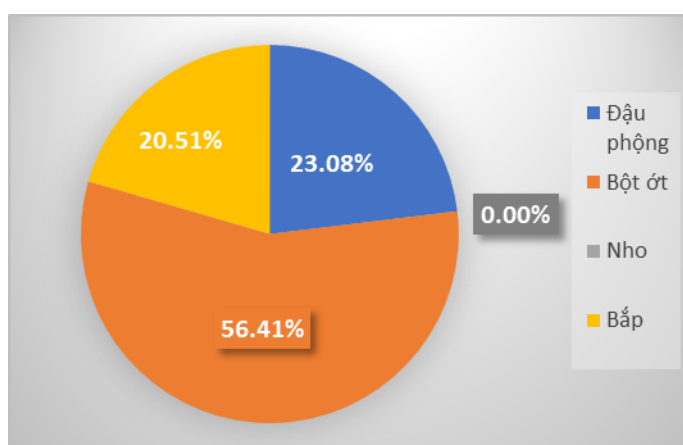
Mẫu đậu phộng, bột ớt, nho khô và bắp hạt được thu thập từ các chợ tại TP.HCM và phân tích đồng thời các loại aflatoxin (B1, B2, G1, G2) bằng phương pháp UPLC-FD không dẫn xuất. Kết quả chi tiết về số mẫu nhiễm từng loại AF và tổng AF được trình bày trong Bảng 3.23 và Hình 3.11.

Bảng 3.23: Bảng tổng hợp chi tiết kết quả khảo sát hàm lượng aflatoxin B1, B2, G1 và G2 trong thực phẩm trên địa bàn Tp,HCM

Nền mẫu	Số mẫu nhiễm (phần trăm, %) Min-max (µg/kg)					Số mẫu vượt ngưỡng AFB1, tỉ lệ (%)	Số mẫu vượt ngưỡng tổng AF, tỉ lệ (%)
	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2	Tổng AF		
Đậu phộng thô và chế biến (n = 400)	117 (29,3%) 0,31 - 554	66 (16,5%) 0,31 - 110	25 (6,3%) 0,30 - 12,5	-	117 (29,3%) 0,31 - 668	62 (15,5%)	59 (14,8%)
Đậu phộng thô (n = 370)	107 (28,9%) 0,31 - 554	60 (16,2%) 0,31 - 110	23 (6,2%) 0,30 - 12,5	-	107 (28,9%) 0,31 - 668	57 (15,4%)	54 (14,6%)
Đậu phộng chế biến (n = 30)	10 (33,3%) 0,32 - 130	6 (20,0%) 0,43 - 24,5	2 (6,7%) 0,35 - 0,62	-	10 (33,3%) 0,32 - 155	5 (16,7%)	5 (16,7%)
Bột ớt (n = 400)	286 (71,5%) 0,30 - 121	152 (38,0%) 0,30 - 8,18	91 (22,8%) 0,30 - 8,54	1 (0,3%) 0 - 0,3 7	286 (71,5%) 0,30 - 127	132 (33,0%)	99 (24,8%)
Bắp hạt trắng, vàng và bắp chế biến (n=400)	104 (26,0%) 0,32 - 494	83 (20,8%) 0,34 - 29,7	49 (12,3%) 0,32 - 4,87	1 (0,3%) 0 - 0,37	104 (26,0%) 0,32 - 525	86 (21,5%)	79 (19,8%)
Bắp hạt trắng (n = 100)	64 (64,0%) 0,38 - 494	61 (61,0%) 0,34 - 29,7	43 (43,0%) 0,32 - 4,87	1 (1,0%) 0 - 0,37	64 (64,0%) 0,38 - 525	62 (62,0%)	60 (60,0%)

Nền mẫu	Số mẫu nhiễm (phần trăm, %) Min-max (µg/kg)					Số mẫu vượt ngưỡng AFB1, tỉ lệ (%)	Số mẫu vượt ngưỡng tổng AF, tỉ lệ (%)
	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2	Tổng AF		
Bắp hạt vàng (n = 100)	5 (5,0%) 0,50 – 6,23	2 (2,0%) 0,43 – 0,5	2 (2,0%) 0,49 – 0,67	-	5 (5,0%) 0,5 – 7,34	2 (2,0%)	2 (2,0%)
Bắp chế biến (n = 200)	35 (17,5%) 0,32 – 46,8	20 (10,0%) 0,37 – 4,02	4 (2,0%) 0,34 – 1,21	-	35 (17,5%) 0,32 – 50,8	22 (11,0%)	17 (8,5%)
Nho khô (n = 400)	-	-	-	-	-	-	-

(-): Không có mẫu nào nhiễm aflatoxin, MDL = 0,1 µg/kg cho tất cả các chất; ; Khoảng Min – Max: chỉ các mẫu định lượng được chính xác có giá trị cụ thể đo được trên mức MQL



Hình 3.11: Tỷ lệ mẫu nhiễm độc tố aflatoxin trong 4 nền đậu phộng, bột ớt, nho khô, và bắp hạt trên địa bàn Tp.HCM

Theo kết quả trình bày ở Bảng 3.23 và Hình 3.11, tỷ lệ mẫu nhiễm aflatoxin trong bột ớt là cao nhất (56,41%), tiếp theo là đậu phộng (23,08%), bắp hạt (20,51%), nho khô (0,0%). Trong số các loại aflatoxin, mức độ ô nhiễm AFB1 là cao nhất, tiếp theo là AFB2, AFG1 và AFG2. Hơn nữa, nếu mẫu không bị nhiễm aflatoxin B1 thì ba loại aflatoxin còn lại cũng sẽ không có mặt.

➤ Hàm lượng aflatoxin trong mẫu nho khô

Trong tổng số 400 mẫu nho khô bao gồm các loại nho khô đen, vàng, xanh nhập khẩu đến từ các nước Mỹ, Úc, Hàn Quốc, Chi Lê và một số loại nho khô không nhãn hiệu khác. Không có mẫu nào còn lại được phát hiện có chứa AFB1, AFB2, AFG1, và AFG2. Nho khô là một trong những loại thực phẩm xuất nhập khẩu có giá trị cao nên các công nghệ như sấy khô, đóng gói, bảo quản được chú trọng nhằm giảm đáng kể việc phát sinh độc tố AF.

➤ Hàm lượng aflatoxin trong mẫu đậu phộng

Kết quả được trình bày trong Bảng 3.23, cho thấy tỷ lệ phần trăm (%) mẫu nhiễm AFB1, AFB2, AFG1, AFG2. Tỷ lệ mẫu vượt quá mức cho phép đối với AFB1 (ML = 2 µg/kg) và tổng AF (ML = 4 µg/kg) gần như tương tự ở cả đậu phộng thô và chế biến. Khi so sánh tỷ lệ ô nhiễm giữa đậu phộng thô và chế biến, tỷ lệ phần trăm như sau: AFB1 (28,9% so với 33,3%), AFB2 (16,2% so với 20,0%), AFG1 (6,2% so với 6,7%) và AFG2 (0,0% so với 0,0%). Ngoài ra, tỷ lệ mẫu vượt giới hạn cho phép đối với AFB1 là 15,4% đối với đậu phộng thô và 16,7% đối với đậu phộng đã qua chế biến, trong khi đối với tổng số lần lượt là 14,6% và 16,7%. Những kết quả này cho thấy rằng chế biến không phải là yếu tố chính làm giảm mức độ ô nhiễm aflatoxin trong đậu phộng.

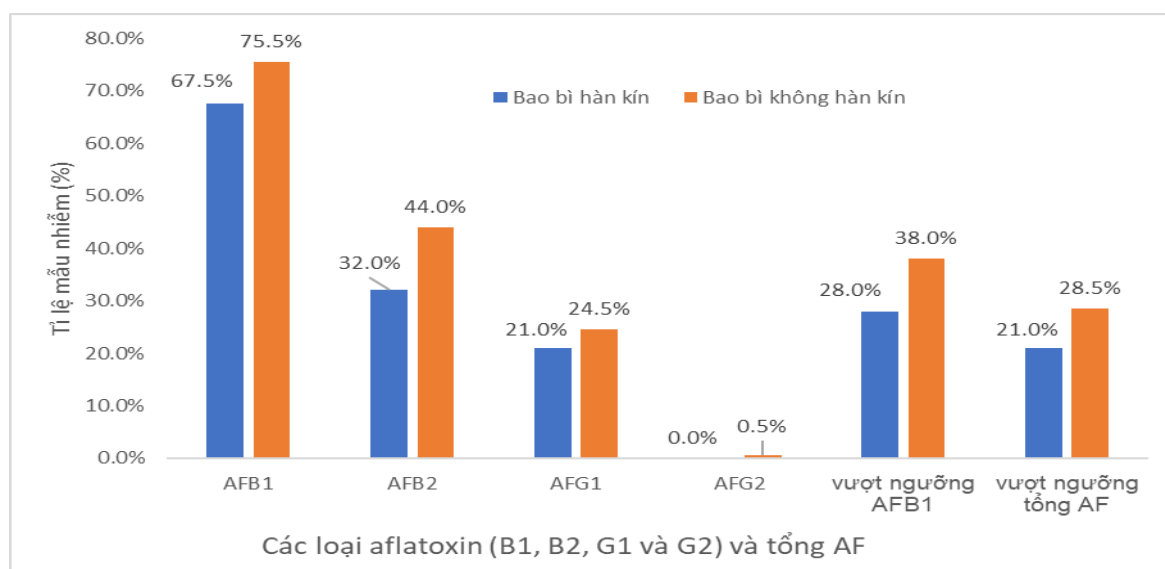
➤ *Hàm lượng aflatoxin trong mẫu bột ốt*

Kết quả trình bày tại Bảng 3.23 cho thấy, đối với mẫu bột ốt có 286 mẫu nhiễm AFB1 với nồng độ dao động từ 0,3 đến 121 µg/kg, chiếm 71,5% số mẫu, có 152 mẫu có chứa AFB2 (0,30 đến 8,18 µg/kg), chiếm 38,0% số mẫu, có 91 mẫu nhiễm AFG1 (0,30 – 8,54 µg/kg), chiếm 22,8% số mẫu. Chỉ có một mẫu được phát hiện có AFG2 (0,37 µg/kg). Điều đáng lưu ý là tỷ lệ mẫu vượt ngưỡng cho phép về AFB1 (ML = 5 µg/kg) và AF tổng số (ML = 10 µg/kg) do Bộ Y tế quy định (QCVN 8-1:2011/ BYT), là 33,0% đối với AFB1 và 24,8% đối với AF. Điều kiện bảo quản không thích hợp có thể góp phần đáng kể vào sự phát triển của nấm mốc trong ốt và bột ốt.

• *Ảnh hưởng của việc bảo quản mẫu trong bao bì kín và không kín đến mẫu nhiễm aflatoxin*

Kết quả kiểm định Independent-Samples T Test cho thấy không có sự khác biệt trung bình (có ý nghĩa thống kê) về hàm lượng AF đối với mẫu bột ốt hàn kín (7,02 µg/kg) và không hàn kín (9,80 µg/kg).

Trong tổng số 400 mẫu bột ốt bao gồm 200 mẫu bột ốt được bảo quản bao bì hàn kín và 200 mẫu trong bao bì không hàn kín, với kết quả Hình 3.13, cho thấy tỷ lệ nhiễm AF giữa bột ốt không hàn kín và hàn kín như sau: AFB1 (75,5 so với 67,5%), AFB2 (44,0 so với 32,0%), AFG1 (24,5 so với 21,0%) và AFG2 (0,5 so với 0,0%). Điều này cho thấy tỷ lệ mẫu phát hiện AF trong bột ốt không được đóng kín cao hơn so với bột ốt hàn kín. Hơn nữa, tỷ lệ mẫu vượt quá giới hạn cho phép đối với AFB1 và tổng AF ở bột ốt không hàn kín cao hơn (lần lượt là 38,0% và 28,5%) so với hàn kín (lần lượt là 28,0% và 21,0%). Những phát hiện này chỉ ra rằng bột ốt được bảo quản trong bao bì kín đã làm giảm một phần nguy cơ phát triển của nấm *Aspergillus*, do đó ngăn chặn việc sản xuất aflatoxin. Việc giảm rủi ro này có thể là do việc hạn chế sản phẩm tiếp xúc với oxy và độ ẩm trong không khí, do đó làm giảm khả năng phát triển của nấm mốc.



Hình 3.13: Biểu đồ so sánh tỷ lệ mẫu nhiễm AFB1, vượt mức cho phép AFB1, tổng AF trong bao bì hàn kín (màu xanh) và không hàn kín (màu cam)

➤ *Hàm lượng aflatoxin trong mẫu bắp*

Kết quả khảo sát 200 bắp hạt bao gồm hạt vàng, hạt trắng tươi và 200 bắp chế biến bao gồm các loại bắp rang, các loại bánh bắp, snack bắp, các loại bắp chiên, bắp rang, các loại bột bắp và sữa bắp được trình bày trong Bảng 3.24 thể hiện tỷ lệ phần trăm (%) mẫu nhiễm AFB1, AFB2, AFG1 và AFG2. Theo khảo sát, tỷ lệ mẫu vượt tiêu chuẩn AFB1 (ML = 2 µg/kg) và AF tổng số (ML = 4 µg/kg) trong bắp hạt cao hơn từ 2,0 - 11,0 lần so với bắp chế biến. Một phân tích so sánh về tỷ lệ nhiễm AF giữa bắp hạt và bắp chế biến cho kết quả sau: AFB1 (34,5 so với 17,5%), AFB2 (31,5 so với 10,0%), AFG1 (22,5 so với 2,0%) và AFG2 (0,8 so với 0,0%). Hơn nữa, tỷ lệ mẫu vượt quá mức cho phép đối với AFB1 được tìm thấy là 32,0% trong bắp hạt và 11,0% trong bắp chế biến, trong khi đối với tổng số AF, các giá trị này lần lượt là 31,0% và 8,5%. Những phát hiện này chỉ ra rằng cả bắp hạt và bắp chế biến đều bị nhiễm aflatoxin. Tuy nhiên, bắp hạt dễ bị nhiễm aflatoxin hơn so với bắp chế biến.

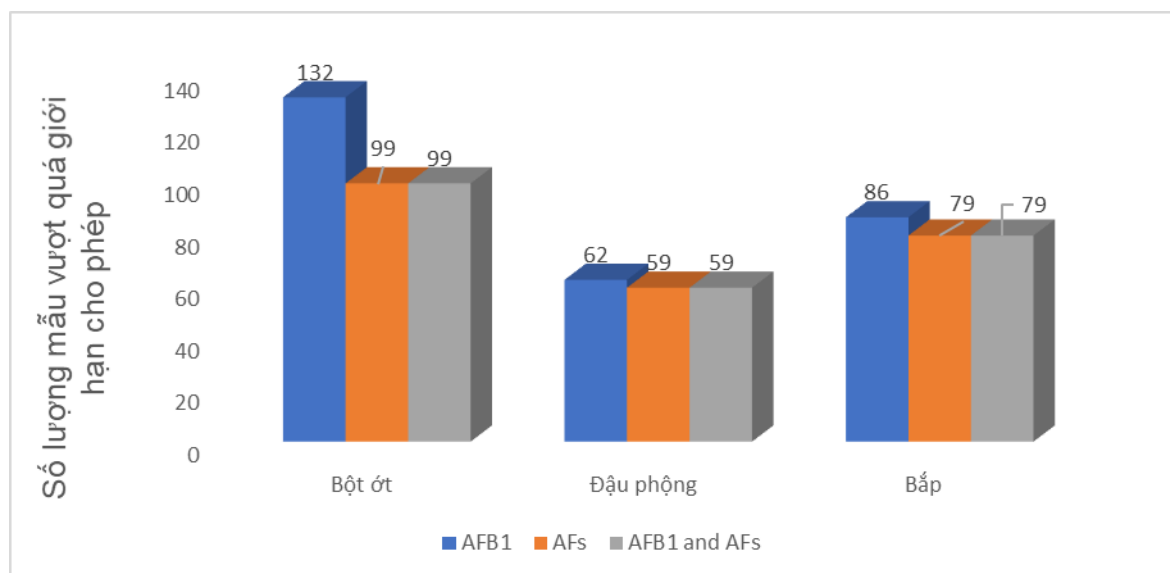
• *Sự khác biệt về hàm lượng Aflatoxin trong các loại bắp thô*

Kết quả Bảng 3.23 cho thấy 200 mẫu bắp hạt gồm 100 hạt tươi trắng và 100 hạt vàng khô. Kết quả chỉ ra rằng các giống bắp trắng có thể dễ bị nhiễm aflatoxin hơn vì chúng có tỷ lệ ô nhiễm cao hơn đáng kể (64,0%) so với hạt bắp vàng khô (5,0%). Hơn nữa, tỷ lệ mẫu vượt quá giới hạn cho phép đối với AFB1 và tổng AF ở hạt trắng cao hơn đáng kể (lần lượt là 62,0% và 60,0%) so với hạt vàng (lần lượt là 5,0% và 2,0%). Điều kiện môi trường và sự hiện diện của sâu bệnh có thể góp phần gây nhiễm nấm trong hạt. Do đó, điều quan trọng là phải thực hiện các chiến lược kết hợp các giống bắp kháng bệnh với các biện pháp canh tác nông nghiệp được khuyến nghị. Bằng cách đó, an toàn thực phẩm có thể được đảm bảo và có thể ngăn chặn sự xuất hiện của ô nhiễm aflatoxin trong cây lương thực.

3.4.2. *So sánh giữa tỷ lệ vượt ngưỡng aflatoxin B1 và tỷ lệ vượt ngưỡng aflatoxin tổng*

Hình 3.16 cho thấy khi số mẫu đậu phộng, bột ớt, bắp nhiễm tổng AF vượt mức cho phép thì số mẫu nhiễm AFB1 vượt mức quy định ít nhất cũng tương đương với số mẫu nhiễm tổng số AF vượt

mức đó. Điều này có thể kết luận rằng nếu một mẫu bị nhiễm aflatoxin vượt ngưỡng tổng AF thì mẫu đó cũng vượt ngưỡng AFB1.



Hình 3.16: Biểu đồ so sánh số lượng mẫu nhiễm aflatoxin vượt ngưỡng quy định giữa AFB1 (màu xanh) và AF (màu cam) cho từng nền mẫu; màu xám là số lượng mẫu bị ô nhiễm vượt quá giới hạn cho cả hai thông số

3.4.3. *Mối tương quan giữa hàm lượng nhiễm aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) với tổng aflatoxin*

Kết quả phân tích tương quan Pearson, phân tích hồi quy tuyến tính, đánh giá hệ số phóng đại phương sai (VIF), giá trị Sig kiểm định t (student), bảng ANOVA, bảng Model Summary cũng đưa ra giá trị Durbin–Watson (DW) để đánh giá hiện tượng tự tương quan chuỗi bậc nhất bằng phần mềm SPSS 22.0 cho thấy mô hình dự báo mối tương quan giữa hàm lượng nhiễm AFB1; AFB2, AFG1, AFG2 với tổng AF trên các nền mẫu như sau:

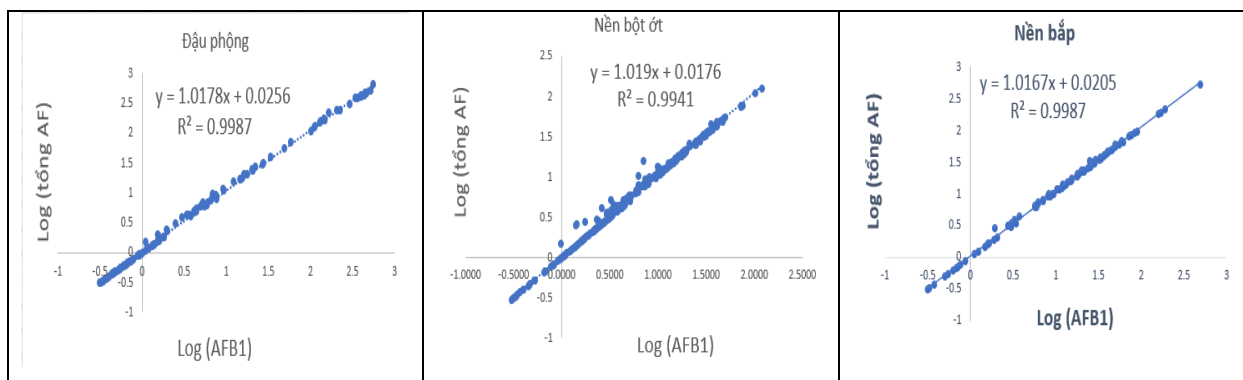
$$\text{Tổng AF (đậu phộng)} = 0,925 * \text{AFB1} + 0,096 * \text{AFB2} + 0,010 * \text{AFG1}$$

$$\text{Tổng AF (bột ột)} = 0,931 * \text{AFB1} + 0,061 * \text{AFB2} + 0,051 * \text{AFG1} + 0,001 * \text{AFG2}$$

$$\text{Tổng AF (bắp)} = 0,924 * \text{AFB1} + 0,076 * \text{AFB2} + 0,014 * \text{AFG1}$$

3.4.4. *Mối tương quan giữa hàm lượng nhiễm aflatoxin B1 và tổng aflatoxin*

Từ kết quả trình bày mối tương quan giữa các AFB1; AFB2; AFG1; AFG2 với tổng AF, cho thấy AFB1 có tác động mạnh nhất với tổng AF (hệ số $\geq 0,92$) trên cả 3 nền mẫu đậu phộng, bột ột, bắp. Mô hình hồi quy tuyến tính logarit được thực hiện theo biến y (Log(tổng AF)) và x (Log(AFB1)), cả 2 biến x, y đều được chuyển đổi bằng Logarit dựa trên các giá trị hàm lượng AFB1 và tổng AF có sẵn trong ba nền mẫu đánh giá hệ số tương quan R^2 và ngoại suy kết quả giữa AFB1 và tổng AF từ đường cong tuyến tính.



Hình 3.17: Mối tương quan giữa hàm lượng ô nhiễm AFB1 và tổng số AF đối với nền đậu phộng, bột ốt và bắp

Như được mô tả trong Hình 3.17, hệ số tương quan (R^2) giữa $\text{Log}(\text{AFB1})$ và $\text{Log}(\text{Tổng AF})$ cao đáng kể và nhất quán trên cả ba nền mẫu, với giá trị R^2 bằng hoặc lớn hơn 0,99. Cụ thể, hệ số R^2 của bột ốt, đậu phộng và bắp lần lượt là 0,9941; 0,9987 và 0,9987. Những số liệu này cho thấy mối quan hệ chặt chẽ giữa hàm lượng AFB1 đã biết trong một mẫu và tổng hàm lượng AF được ngoại suy (tổng của AFB1, AFB2, AFG1, AFG2) như được biểu thị bằng đường cong tuyến tính trong Hình 3.17. Những phát hiện này xác nhận độ tin cậy của phương trình được sử dụng để ngoại suy kết quả tổng AF từ kết quả AFB1 và ngược lại, củng cố độ tin cậy khoa học của nó.

3.4.5. Đánh giá rủi ro phơi nhiễm của AFB1 qua việc tiêu thụ đậu phộng, bột ốt, nho khô và bắp hạt

3.4.5.1. Đánh giá mức tiêu thụ hàng ngày

Trung bình mức tiêu thụ đậu phộng là 0,01493 kg/ngày/người, và bắp hạt dùng trong thực phẩm là 0,02219 kg/ngày/người cao gấp hơn 50 lần so với mức tiêu thụ của bột ốt và nho khô (0,00029 và 0,00030 kg/người/ngày). Giá trị này cho thấy hai sản phẩm bột ốt và nho khô chỉ là thực phẩm phụ trong thực đơn hàng ngày của người dân Việt Nam.

3.4.5.2. Đánh giá rủi ro gây ung thư qua liều phơi nhiễm hàng ngày EDI

Dựa vào kết quả hàm lượng độc tố nấm mốc trong thực phẩm và lượng tiêu thụ thực phẩm hàng ngày, liều lượng tiếp xúc độc tố nấm mốc AFB1, được tính toán cho từng thể trạng gây, bình thường và thừa cân đối với nam và nữ trưởng thành.

Trong nghiên cứu này, giá trị LB trung bình được sử dụng đối với các loại mẫu có tỉ lệ phát hiện trên LOQ, cụ thể LB trung bình đậu phộng, bắp hạt, bột ốt lần lượt là 18,5; 7,60; 7,73 $\mu\text{g}/\text{kg}$ và UB cho các mẫu không phát hiện độc tố AFB1 trong mẫu, trong trường hợp này là nho khô với UB trung bình là 0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Bảng 3.34: Lượng phơi nhiễm ước tính hàng ngày của AFB1 qua khẩu phần ăn ở người nam trưởng thành theo thể trạng gầy, bình thường và thừa cân

	AFB1 tb (µg/kg)	Mức tiêu thụ trung bình (kg/người/ngày)	Thể trạng	Trọng lượng trung bình (kg b,m/người)	Phơi nhiễm (EDI) (µg/kg/ngày)	Khả năng gây ung thư	Rủi ro dân số (tính trên 100,000 người/năm)	BMDL ₁₀ (µg/kg, bw/ngày)	Biên độ phơi nhiễm MOE	TD50 của AFB1 (µg/kg,bw/ngày)	Hệ số không chắc chắn	Chỉ số nguy hiểm HI
Đậu phộng (n=400)	18,5	0,01493	Gầy	48,6	0,00568	0,068	38,6	0,17	29,9	3,2	50000	103
	18,5	0,01493	Bình thường	61,3	0,00450	0,068	30,6	0,17	37,8	3,2	50000	70,3
	18,5	0,01493	Béo	91,8	0,00301	0,068	20,4	0,17	56,6	3,2	50000	47,0
Bắp (n=400)	7,60	0,02219	Gầy	48,6	0,00347	0,068	23,6	0,17	49,0	3,2	50000	54,2
	7,60	0,02219	Bình thường	61,3	0,00275	0,068	18,7	0,17	61,8	3,2	50000	43,0
	7,60	0,02219	Béo	91,8	0,00184	0,068	12,5	0,17	92,6	3,2	50000	28,7
Bột ốt (n=400)	7,73	0,00029	Gầy	48,6	0,00005	0,068	0,31	0,17	3715	3,2	50000	0,71
	7,73	0,00029	Bình thường	61,3	0,00004	0,068	0,25	0,17	4688	3,2	50000	0,57
	7,73	0,00029	Béo	91,8	0,00002	0,068	0,17	0,17	7021	3,2	50000	0,38
Nho khô (n=400)	0,10	0,00030	Gầy	48,6	0,00000	0,068	0,004	0,17	271777	3,2	50000	0,01
	0,10	0,00030	Bình thường	61,3	0,00000	0,068	0,003	0,17	342908	3,2	50000	0,01
	0,10	0,00030	Béo	91,8	0,00000	0,068	0,002	0,17	513579	3,2	50000	0,01

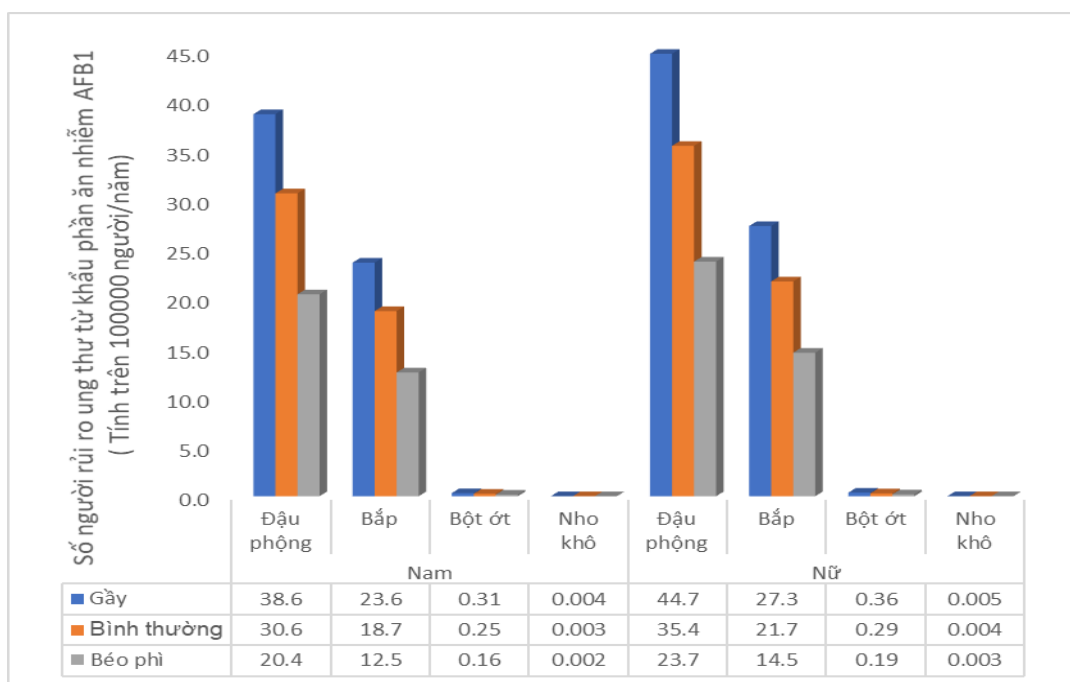
Bảng 3.35: Lượng phơi nhiễm ước tính hàng ngày của AFB1 qua khẩu phần ăn ở người nữ trưởng thành theo thể trạng gầy, bình thường và thừa cân

	AFB1 tb (µg/kg)	Mức tiêu thụ trung bình (kg/người/ngày)	Thể trạng	Trọng lượng trung bình (kg b,m/người)	Phơi nhiễm (EDI) (µg/kg/ngày)	Khả năng gây ung thư	Rủi ro dân số (tính trên 100,000 người/năm)	BMDL ₁₀ (µg/kg,bw/ngày)	Biên độ phơi nhiễm MOE	TD50 của AFB1 (µg/kg,bw/ngày)	Hệ số không chắc chắn	Chỉ số nguy hiểm HI
Đậu phộng (n=400)	18,5	0,01493	Gầy	42,0	0,00658	0,068	44,7	0,17	25,8	3,2	50000	103
	18,5	0,01493	Bình thường	52,9	0,00521	0,068	35,5	0,17	32,6	3,2	50000	81,5
	18,5	0,01493	Béo	79,3	0,00348	0,068	23,7	0,17	48,8	3,2	50000	54,4
Bắp (n=400)	7,60	0,02219	Gầy	42,0	0,00402	0,068	27,3	0,17	42,3	3,2	50000	62,8
	7,60	0,02219	Bình thường	52,9	0,00319	0,068	21,7	0,17	53,4	3,2	50000	49,8
	7,60	0,02219	Béo	79,3	0,00213	0,068	14,5	0,17	79,9	3,2	50000	33,8
Bột ốt (n=400)	7,73	0,00029	Gầy	42,0	0,00005	0,068	0,36	0,17	3208	3,2	50000	0,83
	7,73	0,00029	Bình thường	52,9	0,00004	0,068	0,29	0,17	4047	3,2	50000	0,66
	7,73	0,00029	Béo	79,3	0,00003	0,068	0,19	0,17	6062	3,2	50000	0,44
Nho khô (n=400)	0,1	0,00030	Gầy	42,0	0,00000	0,068	0,005	0,17	234644	3,2	50000	0,01
	0,1	0,00030	Bình thường	52,9	0,00000	0,068	0,004	0,17	296046	3,2	50000	0,01
	0,1	0,00030	Béo	79,3	0,00000	0,068	0,003	0,17	443398	3,2	50000	0,01

Kết quả Bảng 3.34 và 3.35 cho thấy: Đối với người nam và nữ theo thể trạng gầy, bình thường và thừa cân, liều phơi nhiễm trung bình với AFB1 ở đậu phộng là cao nhất (nữ: 0,00348 – 0,00658 và nam: 0,00301 – 0,00568 $\mu\text{g/kg/ngày}$), kế đến là bắp hạt (nữ: 0,00213 – 0,00402 và nam: 0,00184 – 0,00347 $\mu\text{g/kg/ngày}$), bột ốt (nữ: 0,00003 – 0,00005 và nam: 0,00002 – 0,00005 $\mu\text{g/kg/ngày}$) và nho khô với liều phơi nhiễm trung bình quá nhỏ, kèm thêm chỉ số nguy hiểm HI < 1 nên không gây nguy hiểm cho sức khỏe cộng đồng.

Theo kết quả trình bày ở Hình 3.11, tỷ lệ mẫu nhiễm aflatoxin trong bột ốt là cao nhất (56,41%), tiếp theo là đậu phộng (23,08%), bắp hạt (20,51%). Tuy nhiên, liều phơi nhiễm trung bình bột ốt thấp nhất, kế đến bắp hạt và đậu phộng, điều này được lý giải như sau: So sánh bột ốt và bắp hạt, LB trung bình AFB1 gần bằng nhau 7,73 $\mu\text{g/kg}$ (bột ốt) và 7,60 $\mu\text{g/kg}$ (bắp hạt), nhưng mức tiêu thụ bột ốt thấp hơn gần 100 lần so với mức tiêu thụ bắp hạt nên liều trung bình phơi nhiễm bột ốt thấp hơn bắp hạt. Còn mức tiêu thụ đậu phộng (0,001493 kg/người/ngày) không thấp hơn nhiều so với bắp hạt (0,002219 kg/người/ngày), tuy nhiên LB của AFB1 của đậu phộng (18,5 $\mu\text{g/kg}$) cao hơn gấp 2 lần so với bắp hạt (7,60 $\mu\text{g/kg}$). Điều này dẫn đến liều phơi nhiễm AFB1 của đậu phộng cao hơn bắp hạt.

Nguy cơ ung thư của AFB1 đối với người nam và nữ trưởng thành tùy theo thể trạng theo thứ tự từ cao xuống thấp, cụ thể như sau: đậu phộng (nữ: 23,7 – 44,7 và nam: 20,4 – 38,6 trường hợp ung thư trên 100,000 người mỗi năm), kế đến là bắp hạt (nữ: 14,4 – 27,3 và nam: 12,5 – 23,6 trường hợp ung thư trên 100,000 người mỗi năm), bột ốt (nữ: 0,19 – 0,36 và nam: 0,16 – 0,31 trường hợp ung thư trên 100,000 người mỗi năm) tùy theo thể trạng. Kết quả này cho thấy nguy cơ ung thư từ khẩu phần ăn bị nhiễm AFB1 đối với người nữ cao hơn nam trong trường hợp phơi nhiễm cùng thể trạng và đồng thời kết quả cho thấy người có thể trạng gầy yếu nguy cơ ung thư gây ra do nhiễm AFB1 sẽ cao nhất, kế đến là người bình thường và cuối cùng là người thừa cân (Hình 3.18).



Hình 3.18: Biểu đồ so sánh rủi ro dân số (tính trên 100,000 người/năm) nguy cơ ung thư qua khẩu phần ăn nhiễm AFB1 giữa nam và nữ ở thể trạng gầy, bình thường và béo phì.

3.4.5.3. Đánh giá biên độ phơi nhiễm MOE và chỉ số nguy hiểm HI

Kết quả Bảng 3.34 và 3.35 cho thấy các giá trị MOE đối với phơi nhiễm AFB1 đối với nam và nữ trưởng thành qua khẩu phần ăn đậu phộng, bắp, bột ót, nho khô được chia thành 2 nhóm nhỏ theo khuyến nghị của MOE như sau:

Nhóm nguy cơ: MOE thấp hơn 10000 bao gồm đậu phộng (nữ: 25,8 – 48,8 và nam: 29,9 – 56,6 tùy theo thể trạng), tương ứng chỉ số nguy hiểm HI theo độ nguy hiểm tăng dần (nữ: 102,7 – 54,4 và nam: 88,7 – 46,9 tùy theo thể trạng) và bắp hạt (nữ: 42,3 – 79,9 và nam: 49,0 – 92,6 tùy theo thể trạng), tương ứng chỉ số nguy hiểm HI theo độ nguy hiểm tăng dần (nữ: 62,8 – 33,8 và nam: 54,2 – 28,7 tùy theo thể trạng). Những kết quả này cho thấy cả đậu phộng và bắp hạt đều gây ra rủi ro sức khỏe đáng kể do giá trị MOE thấp hơn 10000 và chỉ số HI cao hơn 1, tùy thuộc vào trọng lượng cơ thể. Điều này nhấn mạnh sự cần thiết phải có các chiến lược giám sát và quản lý rủi ro chặt chẽ đối với các mặt hàng thực phẩm này.

Bột ót, mặc dù được phân loại vào nhóm rủi ro cao dựa trên các giá trị MOE (nữ: 3208 – 6062 và nam: 3715 – 7021 tùy theo thể trạng), tương ứng chỉ số nguy hiểm HI theo độ nguy hiểm tăng dần (nữ: 0,83 – 0,44 và nam: 0,71 – 0,38 tùy theo thể trạng). Điều này cho thấy rằng trong khi bột ót bị nhiễm AFB1 cao nhất, nhưng tỷ lệ tiêu thụ thấp làm giảm thiểu rủi ro chung, đưa nó vào nhóm rủi ro thấp hơn mặc dù giá trị MOE của nó dưới 10000. Tuy nhiên, nếu mức tiêu thụ trung bình cao hơn 0,0038 kg/người/ngày, đặc biệt là ở những người dưới 42 kg có thể có nguy cơ ung thư cho thấy cần phải có các biện pháp tiêu thụ có ý thức.

Nhóm ít nguy cơ: Nho khô thuộc nhóm rủi ro thấp, với MOE cao hơn 10000 (nữ: 234645 – 443398 và nam: 271776 – 513579 tùy theo thể trạng), tương ứng chỉ số nguy hiểm HI theo độ nguy hiểm cho cả nam và nữ theo thể trạng là 0,01. Điều này cho thấy rủi ro không đáng kể đối với sức khỏe cộng đồng, và phù hợp với mức phơi nhiễm AFB1 tối thiểu liên quan đến việc tiêu thụ nho khô, phản ánh tính an toàn của loại thực phẩm này về mặt rủi ro ung thư liên quan đến AFB1.

KẾT LUẬN

Qua quá trình nghiên cứu, luận án đã hoàn thành mục tiêu đề ra và thu được các kết quả như sau:

- Đã nghiên cứu và phát triển quy trình phân tích đồng thời aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) trong đậu phộng, bột ót, nho khô và bắp hạt bằng thiết bị sắc ký lỏng siêu hiệu năng đầu dò huỳnh quang (UPLC-FD), không dẫn xuất. Quy trình này là một bước tiến mới so với các phương pháp trước đây nhờ các ưu điểm vượt trội: tiết kiệm thời gian, giảm dung môi, thân thiện môi trường, bảo vệ sức khỏe, quy trình xử lý mẫu đơn giản, độ nhạy cao (LOD 0,1 µg/kg, LOQ 0,3 µg/kg), đáp ứng quy định quốc tế và trong nước, dễ triển khai trong phòng thí nghiệm.

- Nghiên cứu đã xác định lần đầu tiên tỷ lệ nhiễm aflatoxin trong các mẫu thực phẩm tại Việt Nam và xây dựng mô hình dự báo tổng aflatoxin dựa trên aflatoxin B1. Kết quả khảo sát cho thấy bột ót có tỷ lệ nhiễm aflatoxin cao nhất (56,41%), tiếp theo là đậu phộng (23,08%) và bắp hạt (20,51%), trong khi nho khô không phát hiện nhiễm aflatoxin (0%). Đáng chú ý, nghiên cứu đã chứng minh mối tương quan chặt chẽ giữa aflatoxin B1 và tổng aflatoxin trong cả ba nền mẫu (đậu phộng, bột ót, bắp hạt), với các mô hình dự báo tuyến tính có hệ số tương quan R^2 cao ($\geq 0,9941$), giúp kiểm soát và dự báo nguy cơ nhiễm aflatoxin trong thực phẩm.

- Nghiên cứu đã ước tính mức độ phơi nhiễm aflatoxin B1 trong khẩu phần ăn hàng ngày cho ba thể trạng (gầy, bình thường, thừa cân) của người trưởng thành. Kết quả cho thấy mức độ phơi nhiễm aflatoxin B1 có mối liên hệ với nguy cơ ung thư, trong đó nhóm người gầy với nguy cơ cao nhất (38,6 ca/100.000 nam và 44,7 ca/100.000 nữ). Phụ nữ và người gầy đặc biệt dễ bị tổn thương, cần các biện pháp phòng ngừa phù hợp. Đậu phộng và bắp hạt có nguy cơ nhiễm aflatoxin B1 cao, ảnh hưởng đến sức khỏe cộng đồng. Ngược lại, bột ót có nguy cơ nhiễm nhưng tác động nhẹ hơn, và nho khô an toàn với nguy cơ nhiễm thấp và không gây hại sức khỏe.