

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**

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ KHOA HỌC VẬT CHẤT**

NGUYỄN THÀNH DUY

HOÁ PHÂN TÍCH

2025

*Hà Nội - 2025*

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**

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ KHOA HỌC VẬT CHẤT  
NGÀNH HOÁ PHÂN TÍCH**

**Mã số: 9.44.01.18**

**Xác nhận của Học viện  
Khoa học và Công nghệ**

**Người hướng dẫn 1**  
(Ký, ghi rõ họ tên)

**Người hướng dẫn 2**  
(Ký, ghi rõ họ tên)

**Hà Nội - 2025**

**NGUYEN THANH DUY**

**MINISTRY OF EDUCATION AND TRAINING VIETNAM ACADEMY OF SCIENCE  
AND TECHNOLOGY**

**GRADUATE UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY**

---



**Nguyen Thanh Duy**

**RESEARCH ON HIGH-PERFORMANCE LIQUID  
CHROMATOGRAPHY WITH A FLUORESCENT  
DETECTOR TO ANALYZE SIMULTANEOUSLY  
AFLATOXIN B1, B2, G1, G2 IN VARIOUS FOODS**

**DOCTORAL DISSERTATION ON ANALYTICAL CHEMISTRY**

**2025**

*Hà Nội – 2025*

MINISTRY OF EDUCATION  
AND TRAINING

VIETNAM ACADEMY OF SCIENCE  
AND TECHNOLOGY

**GRADUATE UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY**

**Nguyen Thanh Duy**

**RESEARCH ON HIGH-PERFORMANCE LIQUID  
CHROMATOGRAPHY WITH A FLUORESCENT DETECTOR TO  
ANALYZE SIMULTANEOUSLY AFLATOXIN B1, B2, G1, G2 IN  
VARIOUS FOODS**

**DOCTORAL DISSERTATION ON SCIENCES OF MATTER**

**Major: Analytical chemistry**

**Code: 9.44.01.18**

**Graduation University of  
Science and Technology's  
confirmation**

**Supervisor 1**  
*(Sign, write full name)*

**Supervisor 2**  
*(Sign, write full name)*

*Ha Noi – 2025*

**LỜI CAM ĐOAN**

Tôi xin cam đoan 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*" là công trình nghiên cứu của chính mình dưới sự hướng dẫn khoa học của tập thể hướng dẫn. Luận án sử dụng thông tin trích dẫn từ nhiều nguồn tham khảo khác nhau và các thông tin trích dẫn được ghi rõ nguồn gốc. Các kết quả nghiên cứu của tôi được công bố chung với các tác giả khác đã được sự nhất trí của đồng tác giả khi đưa vào luận án. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và khách quan nhất. Đồng thời, kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào. Luận án được hoàn thành trong thời gian tôi làm nghiên cứu sinh tại Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Các số liệu, kết quả nêu trong luận án là trung thực, nếu sai tôi hoàn toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật.

Hà Nội, ngày    tháng    năm 2025

**Nghiên cứu sinh**

**Nguyễn Thành Duy**

## LỜI CẢM ƠN

Lời đầu tiên, em xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới PGS.TS. Nguyễn Quang Trung, PGS.TS. Nguyễn Tiên Đạt và TS. Nguyễn Quốc Hùng, những thầy cô đã tận tình hướng dẫn, giúp đỡ và tạo mọi điều kiện thuận lợi cũng như luôn động viên và ủng hộ để em có thể hoàn thành tốt nhất luận án của mình.

Tôi xin chân thành cảm ơn đề tài “Xây dựng qui trình phân tích đồng thời aflatoxin B1, B2, G1, G2 bằng phương pháp không dẫn xuất với kỹ thuật UPLC-FD và khảo sát hàm lượng aflatoxin trong một số loại thực phẩm trên địa bàn Thành Phố Hồ Chí Minh, mã số: 48/2020/HĐ-QPTKHCN” đã hỗ trợ kinh phí cho tôi thực hiện luận án này.

Tôi xin chân thành cảm ơn Ban Lãnh đạo, Tập thể cán bộ Phòng Phân Tích Sắc Ký – Trung Tâm Dịch Vụ Phân Tích Thí Nghiệm TpHCM, đã tạo điều kiện về cơ sở vật chất, trang thiết bị nghiên cứu và giúp đỡ tôi hết sức nhiệt tình trong suốt quá trình thực nghiệm.

Tôi xin chân thành cảm ơn Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển công nghệ cao, - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tạo điều kiện thuận lợi và giúp đỡ tôi hoàn thành mọi thủ tục cần thiết trong quá trình làm nghiên cứu.

Tôi xin chân thành cảm ơn Ban Lãnh đạo, Phòng Đào tạo, Khoa Hóa học và các Phòng chức năng của Học viện Khoa học và Công nghệ đã tạo điều kiện tốt nhất cho tôi trong quá trình học tập và nghiên cứu để luận án của tôi được hoàn thành.

Tôi xin chân thành cảm ơn các nhà khoa học đã giúp đỡ, đóng góp nhiều ý kiến quý báu liên quan đến luận án cũng như đánh giá chất lượng luận án để bản luận án được hoàn thiện hơn.

Cuối cùng, tôi xin gửi lời cảm ơn sâu sắc nhất đến những người thân yêu trong gia đình, đồng nghiệp và bạn bè đã luôn quan tâm, động viên khích lệ, ủng hộ và giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu..

**Nghiên cứu sinh**

**Nguyễn Thành Duy**

## MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN.....	i
LỜI CẢM ƠN.....	ii
MỤC LỤC.....	iii
DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT .....	v
DANH MỤC BẢNG .....	vii
MỞ ĐẦU.....	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN.....	4
1.1. Giới thiệu về độc tố nấm mốc aflatoxin.....	4
1.2. Độc tính và giới hạn cho phép của aflatoxin.....	8
1.2.1. Độc tính của aflatoxin .....	8
1.2.2. Giới hạn cho phép của aflatoxin .....	9
1.3. Phơi nhiễm và nhiễm độc của con người đối với độc tố aflatoxin .....	10
1.3.1. Nguy cơ nhiễm aflatoxin trong thực phẩm.....	11
1.3.2. Đánh giá mức độ phơi nhiễm aflatoxin và tác động đến sức khỏe con người ..	12
1.3.3. Tình hình nhiễm độc tố aflatoxin ở nước ngoài .....	15
1.3.4. Tình hình nhiễm độc tố aflatoxin trong nước.....	20
1.4. Phương pháp phân tích aflatoxin trong thực phẩm .....	23
1.4.1. Phương pháp chiết và làm sạch aflatoxin .....	23
1.4.2. Các phương pháp phát hiện và định lượng aflatoxin .....	26
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....	42
2.1. Đối tượng nghiên cứu.....	42
2.2. Hoá chất và trang thiết bị dụng cụ .....	42
2.2.1. Hóa chất.....	42
2.2.2. Thiết bị và dụng cụ.....	44
2.3. Phương pháp nghiên cứu .....	45
2.3.1. Phương pháp phân tích đồng thời aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) trên thiết bị UPLC-FD.....	46
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 .....	48
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 ớt, nho khô và bắp hạt .....	53
2.3.4. Phương pháp đánh giá mối nguy hại độc tố aflatoxin đối với sức khỏe con người theo 3 thể trạng gầy, bình thường và thừa cân .....	60

2.3.5. Phương pháp thu thập và bảo quản mẫu.....	62
2.3.6. Phương pháp xử lý số liệu .....	63
<b>CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN .....</b>	<b>64</b>
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 .....	64
3.1.1. Tối ưu hoá thành phần pha động .....	64
3.1.2. Độ ổn định của tín hiệu aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) trên UPLC-FD.....	66
3.1.3. Khoảng tuyến tính và đường chuẩn.....	68
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 .....	69
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 .....	69
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 .....	72
3.3. Xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp.....	74
3.3.1. Độ chọn lọc.....	74
3.3.2. Giới hạn phát hiện và định lượng của phương pháp.....	75
3.3.3. Độ chụm (độ lặp lại RSD <sub>r</sub> và độ tái lặp RSD <sub>R</sub> ) và độ đúng của phương pháp.....	81
3.3.4. Hệ số pha loãng mẫu .....	84
3.3.5. Độ không đảm bảo đo .....	88
3.3.6. Độ ổn định mẫu .....	88
3.3.7. Đảm bảo chất lượng kết quả thử nghiệm .....	90
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.....	101
3.4.1. Hàm lượng aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) trong mẫu đậu phộng, bột ớt, nho khô và bắp hạt.....	101
3.4.2. So sánh giữa tỷ lệ vượt ngưỡng aflatoxin B1 và tổng aflatoxin .....	113
3.4.3. Mối tương quan giữa hàm lượng nhiễm aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) với tổng aflatoxin .....	114
3.4.4. Mối tương quan giữa hàm lượng nhiễm aflatoxin B1 và tổng aflatoxin.....	121
3.4.5. Đánh giá rủi ro phơi nhiễm của aflatoxin B1 qua việc tiêu thụ đậu phộng, bột ớt, nho khô và bắp hạt.....	126



## DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

<b>Viết tắt</b>	<b>Tiếng Anh</b>	<b>Tiếng Việt</b>
ACN	Acetonitrile	Acetonitril
AOAC	Association of Official Analytical Collaboration	Hiệp hội hợp tác phân tích chính thức
FDA	Food and Drug Administration	Cục quản lý thực phẩm và dược phẩm
FD	Flourescence detector	Đầu dò huỳnh quang
HPLC	High performance liquid chromatography	Sắc ký lỏng hiệu năng cao
IARC	International Agency for Research on Cancer	Cơ quan quốc tế nghiên cứu ung thư
IAC	Immunoaffinity column	Cột ái lực miễn dịch
LC-MS/MS	Liquid chromatography – tandem mass spectrometry	Sắc ký lỏng ghép khối phổ 2 lần
MDL	Method detection limit	Giới hạn phát hiện của phương pháp
MQL	Method quantitation limit	Giới hạn định lượng của phương pháp
MeOH	Methanol	Metanol
ML	Maximum limit	Giới hạn tối đa
PBS	Phosphate Buffered Saline	Đệm Phốt phát

QCVN	Vietnamese Technical Regulations	Quy chuẩn Việt Nam
RSD	Relative standard deviation	Độ lệch chuẩn tương đối
R <sub>s</sub>	Resolution	Độ phân giải
T <sub>f</sub>	Tailing factor	Hệ số kéo đuôi
TLC	Thin layer chromatography	Sắc ký lớp mỏng
TCVN	Vietnamese Standards	Tiêu chuẩn Việt Nam
UPLC	Ultra - high performance liquid chromatography	Sắc ký lỏng siêu hiệu năng
WHO	World Health Organization	Tổ chức y tế thế giới

**DANH MỤC BẢNG**

Bảng 1.1: Tính chất hóa lý của một số loại aflatoxin [71].....	8
Bảng 1.2: Giới hạn cho phép (ML) của aflatoxin trong một số loại thực phẩm theo qui định của các nước .....	10
Bảng 1.3: Tổng hợp kết quả nhiễm aflatoxin từ 2015 - 2020 của các nước trên thế giới .....	17
Bảng 1.4: Tổng hợp kết quả phân tích aflatoxin của một số công trình nghiên cứu tại Việt Nam.....	21
Bảng 1.5: Tóm tắt một số phương pháp phân tích aflatoxin ở trong và ngoài nước .....	33
Bảng 1.6: So sánh giới hạn phát hiện thiết bị (iDL) được tính toán từ ba kỹ thuật ..	38
Bảng 2.1: Các dung dịch chuẩn làm việc của aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) .....	43
Bảng 2.2: Chuẩn bị mẫu thêm chuẩn cho quá trình chiết aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) trong mẫu đậu phộng, bột ớt, nho khô và bắp hạt .....	49
Bảng 2.3: Đường chuẩn trên nền mẫu mẫu đậu phộng, bột ớt, nho khô và bắp hạt .....	52
Bảng 3.1: Độ phân giải (Rs) và hệ số kéo đuôi ( $T_f$ ) các pic aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) ở nồng độ 10 $\mu\text{g/L}$ với các thành phần pha động khác nhau.....	65
Bảng 3.2: Điều kiện sắc ký phân tích đồng thời aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) .....	66
Bảng 3.3: Các thông số đánh giá độ ổn định pic aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) trên thiết bị UPLC-FD .....	67
Bảng 3.4: Hệ số tương quan $R^2$ và phần trăm độ lệch đường chuẩn dung dịch .....	68
Bảng 3.5: Độ thu hồi và độ lặp lại của qui trình chiết aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) trong các mẫu thực phẩm .....	71
Bảng 3.6: Kết quả độ ảnh hưởng nền mẫu (%) từ đường chuẩn trên dung dịch và nền mẫu thực phẩm (0,5 – 50 $\mu\text{g/L}$ và $\mu\text{g/kg}$ ) .....	73
Bảng 3.7: Giới hạn phát hiện của phương pháp trên nền mẫu đậu phộng, .....	76
Bảng 3.8: Hiệu suất thu hồi và độ tái lập tại nồng độ MQL trên mẫu đậu phộng, .....	80
Bảng 3.9: Độ chụm và độ đúng của 12 mẫu đậu phộng thêm chuẩn trong .....	82
Bảng 3.10: Độ chụm và độ đúng của 12 mẫu bột ớt thêm chuẩn trong.....	82
Bảng 3.11: Độ chụm và độ đúng của 12 mẫu nho khô thêm chuẩn trong .....	83
Bảng 3.12: Độ chụm và độ đúng của 12 mẫu bắp hạt thêm chuẩn trong .....	84
Bảng 3.13: Độ đúng và độ tái lập của các mẫu pha loãng với hệ số pha loãng khác nhau.....	85

Bảng 3.14: Độ không đảm bảo đo mở rộng của aflatoxin trên nền mẫu đậu phộng, bột ớt, nho khô và bắp hạt.....	88
Bảng 3.15: Độ ổn định của aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) trong các mẫu thêm chuẩn ở nồng độ 5,0 và 12,5 µg/kg với các điều kiện bảo quản khác nhau.....	89
Bảng 3.16: Độ ổn định của aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) trong các mẫu thêm chuẩn ở nồng độ 50 và 125 µg/kg với các điều kiện bảo quản khác nhau.....	90
Bảng 3.17: Kết quả thử nghiệm aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) trên nền mẫu đậu phộng giữa các phòng thí nghiệm.....	91
Bảng 3.18: Kết quả thử nghiệm aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) trên nền mẫu bột ớt giữa các phòng thí nghiệm .....	92
Bảng 3.19: Kết quả thử nghiệm aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) trên nền mẫu bắp hạt giữa các phòng thí nghiệm.....	92
Bảng 3.20: Kết quả thử nghiệm aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) trên nền mẫu nho khô giữa các phòng thí nghiệm.....	93
Bảng 3.21: Tóm tắt kết quả nghiên cứu qui trình đồng thời .....	96
Bảng 3.22: So sánh quy trình thực hiện phân tích đồng thời aflatoxin (B1, B2, G1, và G2) trong bột ớt theo quy trình nghiên cứu và tiêu chuẩn Việt Nam.....	100
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 TpHCM .....	102
Bảng 3.24: Bảng thống kê mô tả sự phân bố trung bình hàm lượng độc tố aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) trong đậu phộng .....	106
Bảng 3.25: Bảng thống kê mô tả sự phân bố trung bình hàm lượng độc tố aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) trong bột ớt.....	108
Bảng 3.26: Tỷ lệ nhiễm AF và vượt ngưỡng AFB1, tổng AF trong.....	109
Bảng 3.27: Bảng thống kê mô tả sự phân bố trung bình hàm lượng độc tố aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) trong bắp .....	111
Bảng 3.28: Phân tích hồi quy hệ số theo biến phụ thuộc tổng AF nền đậu phộng .	115
Bảng 3.29: Phân tích hồi quy hệ số theo biến phụ thuộc tổng AF nền bột ớt.....	117
Bảng 3.30: Phân tích hồi quy hệ số theo biến phụ thuộc tổng AF nền bắp hạt .....	120
Bảng 3.31: Kết quả về nồng độ AFB1 và tổng AF từ chương trình thành thạo và ngoại suy nồng độ tổng AF từ đường chuẩn nền bắp.....	122
Bảng 3.32: Kết quả về nồng độ AFB1 từ chương trình thử nghiệm thành thạo và ngoại suy nồng độ tổng AF từ đường chuẩn nền bắp.....	124

Bảng 3.33: Kết quả về nồng độ tổng AF từ chương trình thành thạo và ngoại suy nồng độ AFB1 từ đường chuẩn nền bắp.....	125
Bảng 3.34: Lượng phơi nhiễm ước tính hàng ngày của AFB1 qua khẩu phần ăn ở người nam trưởng thành theo .....	127
Bảng 3.35: Lượng phơi nhiễm ước tính hàng ngày của AFB1 qua khẩu phần ăn ở người nữ trưởng thành theo .....	128

## DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1: Cấu trúc phân tử các loại aflatoxin [63].....	7
Hình 1.2: Nguyên tắc tạo dẫn xuất AFB1 phân tích trên đầu dò huỳnh quang với các dẫn xuất bao gồm: acid trifluoroacetic (TFA, 1), Brom (Br <sub>2</sub> , 2), Iốt (I <sub>2</sub> , 3) [1].....	30
Hình 1.3: Sắc ký của dung dịch chuẩn aflatoxin (1 µg/L) được tiêm với ba phương pháp khác nhau: (A) HPLC-FD có tạo dẫn xuất trước cột; (B) UPLC-FD không tạo dẫn xuất; và (C) LC/MS/MS [97].....	37
Hình 2.1: Sơ đồ bố trí thí nghiệm phương pháp nghiên cứu aflatoxin trong thực phẩm.....	46
Hình 2.2: Lưu đồ qui trình chiết dự kiến AF trong nền mẫu đậu phộng .....	51
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) 65	
Hình 3.2: Sắc ký đồ chuẩn aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) nồng độ 12,5 µg/L .....	67
Hình 3.3: Đường chuẩn dung dịch aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) .....	69
Hình 3.4: So sánh hệ số góc của đường chuẩn dung dịch (màu đỏ) và đường chuẩn trên mẫu (màu xanh) trên 4 loại mẫu đậu phộng, bột ớt, nho khô và bắp hạt.....	74
Hình 3.5: Sắc ký đồ so sánh thời gian lưu của các aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) giữa mẫu thêm chuẩn MQL và mẫu trắng của các nền mẫu thực phẩm .....	75
Hình 3.6: Sắc ký đồ giới hạn phát hiện của phương pháp trên nền mẫu đậu phộng, bột ớt, nho khô và bắp hạt .....	78
Hình 3.7: Biểu đồ kiểm soát hiệu suất thu hồi aflatoxin B1 trong nền đậu phộng ...	94
Hình 3.8: Biểu đồ kiểm soát hiệu suất thu hồi aflatoxin B1 trong nền bột ớt .....	94
Hình 3.9: Biểu đồ kiểm soát hiệu suất thu hồi aflatoxin B1 trong nền bắp hạt .....	94
Hình 3.10: Biểu đồ kiểm soát hiệu suất thu hồi aflatoxin B1 trong nền nho khô.....	95
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 TpHCM .....	104

- Hình 3.12: So sánh tỷ lệ (%) nhiễm aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) và vượt ngưỡng AFB1, tổng AF trong đậu phộng thô và chế biến.....106
- Hình 3.13: Biểu đồ so sánh tỷ lệ mẫu nhiễm AF và vượt ngưỡng AFB1, tổng AF trong bột ớt hàn kín và không hàn kín .....110
- Hình 3.14: So sánh tỷ lệ phần trăm (%) nhiễm aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) và vượt ngưỡng AFB1, tổng AF đối với bắp hạt và bắp chế biến .....111
- Hình 3.15: So sánh tỷ lệ (%) nhiễm AFB1 và vượt ngưỡng AFB1, tổng AF đối với .....113
- Hình 3.16: Biểu đồ so sánh mẫu nhiễm aflatoxin vượt ngưỡng cho phép giữa AFB1 và tổng AF với cả hai thông số trong đậu phộng, bột ớt và bắp hạt.....114
- Hình 3.17: Mối tương quan giữa hàm lượng ô nhiễm AFB1 và tổng số AF đối với nền đậu phộng, bột ớt và bắp.....122
- 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. ....130

## 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 [118]. 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) [60]. 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 (nho 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 [49].

Trong số các thực phẩm có nguy cơ nhiễm AF cao, nho 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. Nho 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 [47; 108]. 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 [47], sắc ký lỏng hiệu năng cao với đầu dò huỳnh quang (HPLC-FD) kết hợp dẫn xuất trước cột hoặc sau cột [12; 13; 125; 126], sắc ký lỏng kết hợp khối phổ (LC-MS/MS) [25; 36; 80; 103]. 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 [24]. 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 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 ốt, nho 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

- *Điều kiện hình thành aflatoxin*

Ô nhiễm aflatoxin (AF) trong cây trồng là một mối đe dọa toàn cầu, ảnh hưởng nghiêm trọng đến an toàn thực phẩm, chất lượng thức ăn chăn nuôi, cũng như gây tác động tiêu cực đến nền kinh tế nông nghiệp và các ngành công nghiệp quy mô nhỏ phụ thuộc vào sản xuất cây trồng [70]. Nấm có thể xâm nhiễm cây trồng trong các giai đoạn thu hoạch, bảo quản và vận chuyển, dẫn đến sự hình thành một số độc tố nấm mốc. Các độc tố này được tạo ra bởi một số loại nấm dưới dạng chất chuyển hóa thứ cấp, trong đó AF là một trong những loại độc hại nhất. Aflatoxin được tổng hợp bởi nhiều loài nấm như *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* và *Alternaria*, trong đó *Aspergillus flavus* và *Aspergillus parasiticus* được xác định là hai loài tạo ra các chủng AF có độc tính cao nhất [107].

Việc sản sinh độc tố nấm mốc phụ thuộc vào nguồn thực phẩm, enzyme và các yếu tố môi trường khác nhau. Tuy nhiên, các điều kiện thuận lợi cho nấm AF không phải lúc nào cũng có lợi cho việc sản sinh AF [85]. Các yếu tố được tóm tắt như sau:

Các yếu tố vật lý như pH, ánh sáng, độ ẩm, nhiệt độ, độ ẩm tương đối và các khí trong khí quyển là nguyên nhân gây ô nhiễm AF. Nấm mốc sản sinh ra AF có thể phát triển ở phạm vi pH rộng (1,7–9,3), nhưng phạm vi pH tối ưu là (3–7) [137]. Sự hiện diện của ánh sáng cũng ảnh hưởng đáng kể đến quá trình sản sinh AF; trong điều kiện bóng tối, lượng AF được tạo ra tăng cao, trong khi ánh sáng mặt trời có tác dụng ức chế rõ rệt [111]. Độ ẩm cao là điều kiện thuận lợi cho nấm phát triển. Độ ẩm tương đối (85%) là tối ưu cho việc sản sinh AF, trong khi độ ẩm tương đối 95% làm tăng sản sinh AF lên mức đáng kể [37]. Về nhiệt độ, *Aspergillus flavus* cho thấy khả năng tồn tại và phát triển trong khoảng nhiệt độ rộng từ 12°C đến 48°C. Sản sinh AF có thể xảy ra trong phạm vi nhiệt độ rộng, nhưng khoảng 25°C đến 35°C là điều kiện tối ưu [121]. Đáng chú ý, ở nhiệt độ cao, tỷ lệ sản sinh AFB cao hơn AFG, nhưng ở nhiệt độ thấp, mức sản sinh của hai loại này có xu hướng cân bằng [91]. Thành phần khí quyển, đặc biệt là tỷ lệ của O<sub>2</sub> và CO<sub>2</sub> cũng ảnh hưởng đến việc sản sinh AF. Việc

sản sinh AF và sự phát triển của nấm bị ức chế ở mức CO<sub>2</sub> cao hơn và mức O<sub>2</sub> thấp hơn [83]

Yếu tố dinh dưỡng: Quá trình sản sinh AF chịu ảnh hưởng đáng kể bởi thành phần dinh dưỡng của chất nền bao gồm các yếu tố dinh dưỡng như carbon, acid amin, Nitơ, Lipit và một số nguyên tố vi lượng. Chất nền giàu carbohydrat được chứng minh là hỗ trợ sản sinh AF hiệu quả hơn so với chất nền giàu lipit, do carbohydrat cung cấp nguồn carbon dễ dàng cho sự phát triển của nấm [81]. Trong số các carbohydrat, glucose, ribose, saccarose, xylose và glycerol là những chất nền lý tưởng, trong khi pepton, lactose và sorbose không có khả năng thúc đẩy sự hình thành AF [79]. Nitơ đặc biệt ở dạng nitrit và nitrat, cũng đóng vai trò quan trọng trong việc gia tăng sản sinh AF bởi *Aspergillus flavus* (*A. flavus*) [132]. Lipit, một thành phần thiết yếu khác, được phát hiện có khả năng thúc đẩy sản sinh AF mạnh hơn ở chất nền giàu chất béo so với chất nền ít chất béo [114]. Ngoài ra, vitamin, acid amin và ion kim loại cũng thúc đẩy sản sinh AF khi được kết hợp phù hợp. Các acid amin như glyxin, glutamat và alanin cùng với một số kim loại hóa trị hai như kẽm và magiê thúc đẩy sản sinh AF [27]. Việc sản xuất AF tăng gấp 4, 5 và 19 lần với nồng độ kẽm lần lượt là 20, 50 và 100 (mg/L) [79]. Acid amin như tyrosin thúc đẩy sản sinh AF, trong khi nó bị ức chế bởi tryptophan. Việc sản sinh AFB<sub>1</sub> được hỗ trợ bởi arginin, glycin, acid glutamic và acid aspartic ở nồng độ 0,5% [30].

Các yếu tố sinh học bao gồm các loài nấm, cỏ dại và các tổn thương do côn trùng gây ra. Cỏ dại thường cạnh tranh nguồn dinh dưỡng, gây căng thẳng sinh học cho cây trồng, từ đó làm tăng nguy cơ sản sinh AF. Mức độ sản sinh AF chủ yếu phụ thuộc vào loại nấm, trong đó côn trùng đóng vai trò trung gian quan trọng khi tạo ra các vết thương trên cây làm gia tăng căng thẳng và cung cấp điều kiện thuận lợi cho các loài nấm aflaoxigenic phát triển và gây ô nhiễm [70].

Quá trình sản sinh AF còn chịu ảnh hưởng bởi từng chủng nấm cụ thể *Aspergillus flavus* thường sản sinh lượng AF thấp hơn so với *Aspergillus parasiticus* [84]. Sự ô nhiễm cây trồng trước thu hoạch là hiện tượng phổ biến do sự tồn tại tự nhiên của *A. flavus* trong đất. Sau thu hoạch, ô nhiễm tiếp tục diễn ra trong quá trình bảo quản, khi *A. flavus* phát triển mạnh trên các hạt thực phẩm, gây ra sự hư hỏng và

làm giảm chất lượng nông sản [76]. Những yếu tố sinh học này nhấn mạnh vai trò quan trọng của việc kiểm soát côn trùng, giảm cạnh tranh từ cỏ dại và quản lý môi trường bảo quản nhằm hạn chế tối đa nguy cơ ô nhiễm AF trong chuỗi sản xuất nông nghiệp.

- **Lịch sử nghiên cứu aflatoxin**

Aflatoxin được phát hiện vào năm 1960 khi hơn 100000 con gà tây non chết ở Anh trong một vài tháng do một căn bệnh mà khi mổ xác thấy có xuất huyết và hoại tử ở gan kèm theo tổn thương ở thận. Nguyên nhân bệnh không được biết rõ vì vậy người ta gọi là bệnh “X” của gà tây. Sau đó, những vụ tương tự cũng được quan sát thấy trên vịt con ở Áo, gà ở Tây Ban Nha, cá hồi ở Mỹ. Các nhà bác học đã nhanh chóng tìm ra mối liên hệ giữa các vụ nhiễm độc đó với việc cho ăn khô đậu phộng và họ cũng thấy rằng bệnh này không những xảy ra đối với gia cầm mà còn với cả gia súc đặc biệt là heo, bê và cừu [71].

Sau khi điều tra cẩn thận về các vụ dịch, căn bệnh này được phát hiện có liên quan đến bữa ăn của người Brazil. Một nghiên cứu chuyên sâu về bột đậu phộng đã tiết lộ bản chất độc hại của AF, do nó tạo ra các triệu chứng điển hình của bệnh “X”. Với những cố gắng phát hiện nguồn độc tố trên các thực phẩm, các nhà khoa học đã quan sát và phân lập được loài nấm *A. flavus* trên các hạt đậu phộng mốc và trên lúa mì mốc [71].

Việc khám phá ra AF đã kích thích các nhà khoa học nhiều ngành tập trung nghiên cứu về tất cả các mặt của AF và ảnh hưởng của nó tới sức khỏe của con người và động vật. Họ đã đánh giá rằng mỗi năm AF đã gây tổn thất rất nhiều triệu đô la cho lương thực và thực phẩm trên toàn thế giới [71].

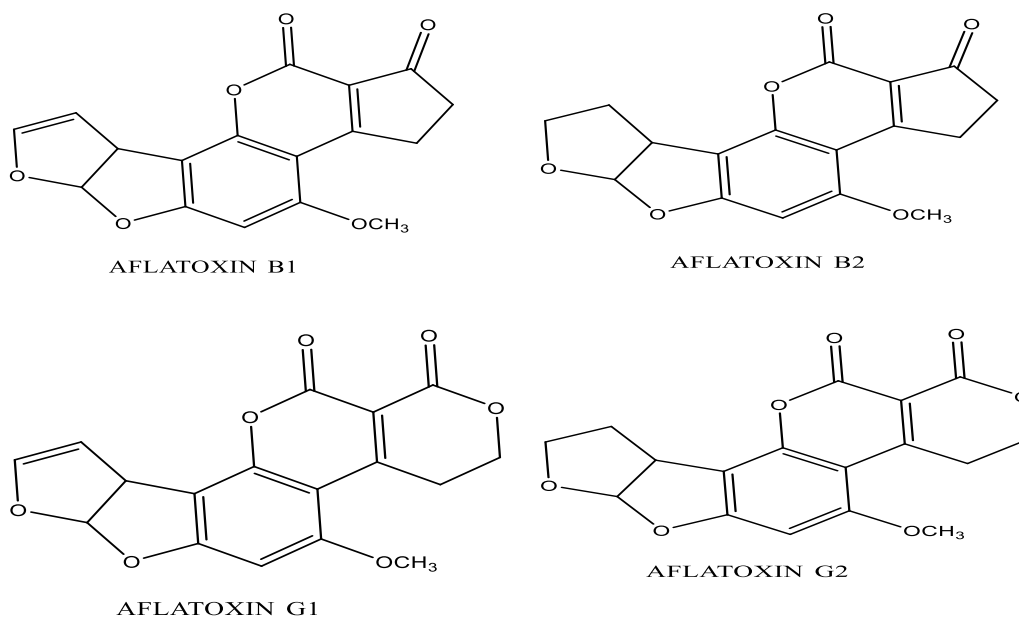
- **Tính chất của aflatoxin**

Các AF thường nhiễm trên các loại nông sản thực phẩm. Hiện nay người ta đã tìm thấy khoảng 18 loại AF 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 [118]. 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) [71; 118].

Aflatoxin G1 có cấu trúc rất gần với cấu trúc AFB1: nó có hai chức lacton, 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. Carnaghan đã tìm thấy dẫn xuất hydroxy của AFB1, AFB2 trong sữa bò và thịt bò được gọi là aflatoxin M1 và aflatoxin M2 (M là chữ viết tắt của Milk). Aflatoxin M1 và aflatoxin M2 có huỳnh quang màu xanh tím. Trong bốn loại AF thì AFB1 thường được tìm thấy ở nồng độ cao nhất, tiếp theo là AFG1, trong khi đó AFB2 và AFG2 tồn tại ở nồng độ thấp hơn [63; 71].

Các AF là tinh thể trắng, bền với nhiệt độ (Bảng 1.1) và khó bị phân hủy trong quá trình chế biến. Các AF ít tan trong nước (10 – 20 µg/ml), tan nhiều trong các dung môi phân cực như chloroform và methanol đặc biệt trong dimethylsulfoxit [63; 71].



**Hình 1.1:** Cấu trúc phân tử các loại aflatoxin [63]

**Bảng 1.1:** Tính chất hóa lý của một số loại aflatoxin [71]

Aflatoxin	Công thức phân tử	Trọng lượng phân tử (g/mol)	Nhiệt độ nóng chảy (°C)	Huỳnh quang	Bước sóng hấp thụ (nm)	Bước sóng kích thích (nm)
AFB1	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	312	268-269	Xanh lam	223-362	425
AFB2	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	314	286-289	Xanh lam	265-363	425
AFG1	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	328	244-246	Xanh lục	243-362	450
AFG2	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	330	229-231	Xanh lục	265-363	450

## 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 Nghiên cứu Ung thư Quốc tế (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 [60; 118].

Aflatoxinosis là một tình trạng ngộ độc nghiêm trọng, phát sinh từ việc tiêu thụ các loài nấm *Aspergillus*, đặc biệt là *Aspergillus flavus*, dưới dạng bào tử hoặc qua thực phẩm bị nhiễm độc. Tình trạng này có thể dẫn đến bệnh lý aflatoxicosis ở cả người và động vật, bao gồm hai dạng chính: cấp tính và mãn tính [118].

Aflatoxicosis mãn tính thường biểu hiện ở người thông qua các bệnh lý nguy hiểm như ung thư gan, ung thư biểu mô tế bào gan, suy giảm hệ miễn dịch, chậm phát triển và xơ gan, đặc biệt ở trẻ em suy dinh dưỡng. Trong khi đó, aflatoxicosis cấp tính thường có triệu chứng nghiêm trọng hơn như sốt cao, nôn mửa, cổ trướng, suy gan, phù nề chi và vàng da, kèm theo tỷ lệ tử vong cao hơn đáng kể so với dạng mãn tính [118].

Mặc dù nồng độ cụ thể của AF có khả năng gây bệnh chưa được xác định một cách chính xác, các nghiên cứu đã gợi ý rằng nồng độ khoảng 1000 µg/kg trong thực phẩm có thể gây độc cho người. Đối với động vật, mức độ an toàn thường dao động

từ 50–300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Đáng chú ý, các đợt bùng phát lớn của bệnh aflatoxicosis đã được ghi nhận tại Ấn Độ (1974) và Kenya (1981). Từ năm 2004 đến nay, toàn cầu đã báo cáo hơn 500 ca mắc và 200 ca tử vong liên quan đến căn bệnh này, cho thấy mức độ nguy hiểm và sự cần thiết của các biện pháp kiểm soát chặt chẽ [118].

Aflatoxin được phân loại là chất gây ung thư Nhóm 1 theo Cơ quan Nghiên cứu Ung thư Quốc tế (IARC), với bằng chứng rõ ràng cho thấy sự phơi nhiễm kéo dài có thể dẫn đến ung thư gan, thận, phổi hoặc ruột kết ở cả con người và động vật. Đặc biệt, tại các khu vực như châu Phi và châu Á, ung thư gan nguyên phát, thường được gọi là ung thư biểu mô tế bào gan (HCC), có mối liên hệ chặt chẽ với AFB1. Thống kê toàn cầu ước tính rằng khoảng 4,6–28,2% các trường hợp HCC là hậu quả trực tiếp của việc tiêu thụ thực phẩm nhiễm AF. Hơn nữa, AFB1 được đặc trưng là chất gây ung thư thuộc Nhóm 1, đặc biệt nguy hiểm khi tiêu thụ với liều lượng từ 20–120  $\mu\text{g}/\text{kg}$  mỗi ngày trong khoảng thời gian từ 1 đến 3 tuần. Ung thư biểu mô tế bào gan không chỉ là tác động chính của việc phơi nhiễm AF mà còn là nguyên nhân của 75–85% tổng số trường hợp ung thư gan trên toàn thế giới. Một ví dụ đáng chú ý là tại Tanzania, vào năm 2016, đã ghi nhận 1480 trường hợp mới mắc ung thư gan có liên quan trực tiếp đến AF, nhấn mạnh mức độ nghiêm trọng và ảnh hưởng rộng lớn của chất gây ung thư này [118].

### ***1.2.2. Giới hạn cho phép của aflatoxin***

Do độc tính và khả năng gây ung thư cao của AF, giới hạn tối đa cho phép (Maximum Limit, ML) của chúng được quy định rất thấp, đặc biệt là thực phẩm dành cho trẻ em (Bảng 1.2) [47; 60].



**Bảng 1.2:** Giới hạn cho phép (ML) của aflatoxin trong một số loại thực phẩm theo qui định của các nước

Sản phẩm	Aflatoxin	ML, µg/kg				
		Châu Âu	Mỹ	Trung Quốc	Nhật	Việt Nam
Ốt bột	AFB1	5	N.A	5	N.A	5
	Tổng AF	10	20	N.A	10	10
Nho khô	AFB1	5	N.A	5	N.A	5
	Tổng AF	10	20	N.A	10	10
Đậu phộng	AFB1	2	N.A	5	N.A	2
	Tổng AF	4	20	N.A	10	4
Bắp hạt	AFB1	2	N.A	5	N.A	2
	Tổng AF	4	20	N.A	10	4

Chú thích: N.A.: không áp dụng

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

Aflatoxin là mối đe dọa nghiêm trọng đối với an toàn thực phẩm toàn cầu, ảnh hưởng đến nhiều loại nông sản như ngũ cốc, các loại hạt có dầu, gia vị, sữa và sản phẩm từ sữa. Ô nhiễm AF có thể xảy ra ở mọi giai đoạn, từ trước thu hoạch đến sau thu hoạch và khó bị loại bỏ hoàn toàn ngay cả khi chế biến thực phẩm do hàm lượng cao và tính ổn định nhiệt. Tiếp xúc với AF gây ra các hội chứng sức khỏe nghiêm trọng, bao gồm ngộ độc cấp tính và mãn tính. Do đó, đánh giá rủi ro đóng vai trò thiết yếu trong việc quản lý và giảm thiểu nguy cơ, góp phần đảm bảo an toàn thực phẩm và sức khỏe người tiêu dùng [51].

Theo yêu cầu của Ủy ban Châu Âu, Ủy ban về Chất gây ô nhiễm trong chuỗi thực phẩm đã đưa ra quan điểm khoa học về nguy cơ sức khỏe con người liên quan đến sự hiện diện của AF trong thực phẩm. Đánh giá độc tính của AF đối với con người, ước tính chế độ ăn uống mức độ phơi nhiễm của người dân Liên minh Châu

Âu (EU) với AF và đánh giá rủi ro sức khỏe con người đối với dân số EU do phơi nhiễm ước tính qua chế độ ăn uống aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) được coi là có nguy cơ đánh giá. Được tìm thấy thường xuyên nhất AF trong các mẫu thực phẩm bị ô nhiễm là AFB1 và ba loại khác thường không được tìm thấy nếu không có sự hiện diện AFB1 [116].

### ***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 [99].

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 [49]. Trong nghiên cứu này, bốn loại thực phẩm phổ biến có nguy cơ nhiễm AF bao gồm:

#### **➤ Đậu phộng và bắp hạt**

Hai loại thực phẩm này đặc biệt dễ bị nhiễm *Aspergillus flavus* ngay từ giai đoạn thu hoạch, đặc biệt trong mùa mưa khi độ ẩm môi trường cao. Phương pháp phơi sấy truyền thống có thể không đảm bảo độ khô cần thiết (<10% độ ẩm), tạo điều kiện thuận lợi cho nấm mốc phát triển. Ngoài ra, quá trình bảo quản hoặc kho chứa không đạt tiêu chuẩn, có độ ẩm cao, sẽ làm gia tăng nguy cơ hình thành AF, đe dọa an toàn thực phẩm và sức khỏe người tiêu dùng [19; 73].

#### **➤ Bột ót**

Là sản phẩm chế biến từ ót khô, bột ót có nguy cơ nhiễm aflatoxin nếu nguyên liệu đầu vào đã bị nhiễm *Aspergillus spp.*. Do quá trình nghiền không tiêu diệt được

độc tố, aflatoxin có thể tồn tại trong sản phẩm cuối cùng. Hơn nữa, nếu điều kiện bảo quản không được kiểm soát chặt chẽ, đặc biệt khi độ ẩm và nhiệt độ không ổn định, nấm mốc có thể tiếp tục phát triển và sản sinh độc tố, làm tăng mức độ ô nhiễm theo thời gian [53].

#### ➤ **Nho khô**

Nho khô có hàm lượng đường cao, tạo nguồn dinh dưỡng dồi dào cho vi nấm phát triển. Khi được bảo quản trong điều kiện không phù hợp, chẳng hạn như môi trường có độ ẩm cao hoặc tiếp xúc với nguồn nhiễm *Aspergillus parasiticus*, nguy cơ nhiễm AF có thể xảy ra. Do đặc tính hút ẩm của nho khô, việc kiểm soát độ ẩm trong quá trình bảo quản là yếu tố then chốt để ngăn chặn sự hình thành và tích lũy aflatoxin [95].

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

Đánh giá mức độ phơi nhiễm trong chế độ ăn uống là một trong những yếu tố thiết yếu của quá trình đánh giá rủi ro cung cấp bằng chứng khoa học về lượng chất gây ô nhiễm ăn vào ước tính (EDI) dựa trên lượng chất gây ô nhiễm có trong một mặt hàng thực phẩm cụ thể và mức tiêu thụ đối với mặt hàng thực phẩm đó. Những nguy cơ tiềm ẩn đối với sức khỏe con người do sử dụng thực phẩm bị nhiễm AF trong chế độ ăn uống đã được đánh giá bởi một số cơ quan khoa học bao gồm Tổ chức Lương thực và Nông nghiệp/Tổ chức Y tế Thế giới (FAO/WHO), Ủy ban Chuyên gia về Phụ gia Thực phẩm (JECFA) và Hội đồng EFSA về các chất gây ô nhiễm trong chuỗi thực phẩm [116].

Kết quả đánh giá này cũng giúp các nhà quản lý đưa ra chiến lược truyền thông hiệu quả mà họ cần biết điều gì đang gây ra rủi ro cao nhất và tất cả những ai có nguy cơ cao. Đối với các AF gây ung thư và nhiễm độc gen, các nghiên cứu đã được thực hiện bằng cách sử dụng hai phương pháp mô tả đặc điểm rủi ro chính bao gồm (1) ước tính nguy cơ ung thư gan, dựa trên Viêm gan B (HBsAg+) và khả năng gây ung thư của AF (FAO/WHO, 1999) và (2) ước tính Biên độ phơi nhiễm (MOE). Đối với AF, MOE từ 10.000 trở lên sẽ không được người dân quan tâm. Một phương pháp khác dựa trên chỉ số nguy hiểm (HI) cũng đã được sử dụng để nghiên cứu các chất

gây ung thư. Giá trị HI lớn hơn 1 cho thấy nguy cơ sức khỏe tiềm ẩn của bệnh ung thư gan [116].

#### *1.3.2.1. Mức tiêu thụ trung bình hàng ngày của đậu phộng, bột ốt, nho khô và bắp hạt tại Việt Nam*

Cuộc khảo sát dựa vào mức tiêu thụ trung bình đậu phộng, bột ốt, nho khô và bắp hạt hàng ngày tính trên đầu người (kg/người/ngày). Theo báo cáo của tổ chức lương thực và nông nghiệp liên hiệp quốc trong khoảng thời gian 2019 - 2021, mức tiêu thụ bắp dùng cho thực phẩm của Việt Nam là 8,1 kg/ người/năm tương ứng mức tiêu thụ là 0,02219 kg/người/ngày [100].

Theo niên giám thống kê của hội đồng quốc tế về hạt và trái cây sấy [58], mức tiêu thụ đậu phộng trung bình ở Việt Nam là 536995000 kg/năm từ năm 2019 – 2021, tương ứng mức tiêu thụ bình quân là 0,01493 kg/người/ngày ứng với dân số năm 2021 là 98510000 người [128].

Đối với nho khô, do chưa tìm được số liệu thống kê, nên lựa chọn hạt dẻ cười thay thế, mức tiêu thụ hạt dẻ cười trung bình ở Việt Nam là 10930667 kg/năm từ năm 2019 – 2021, tương ứng mức tiêu thụ bình quân là 0,000030 kg/người/ngày ứng với dân số năm 2021 là 98510000 người [128].

Ẩm thực Việt Nam là một trong những nền ẩm thực phong phú và đa dạng nhất thế giới, được tạo nên từ sự kết hợp hài hòa giữa các nguyên liệu tươi ngon và các loại gia vị đặc trưng, bao gồm 10 loại gia vị truyền thống như muối, tiêu, ớt, chanh, nước mắm, tương ốt, gừng, tỏi và các loại rau thơm. Vì vậy, bột ốt được cho là chiếm 10% tổng mức tiêu thụ gia vị. Theo báo cáo từ thư viện Helgi năm 2021 [57], mức tiêu thụ gia vị của người Việt Nam là 1,05 kg/người/năm tương ứng 0,002876712 kg/người/ngày và tương ứng mức tiêu thụ bột ốt là 0,00029 kg/người/ngày.

Tất cả dữ liệu tiêu thụ thực phẩm được ước tính cho cả nam và nữ ở các nhóm theo thể trạng dinh dưỡng cho người gầy, bình thường và thừa cân.

### 1.3.2.2. Phân loại thể trạng dinh dưỡng của người Việt Nam dựa trên chỉ số thể trọng Body Mass Index (BMI)

Theo viện dinh dưỡng TP HCM, chỉ số thể trọng BMI được dùng phổ biến nhất để phát hiện người gầy ốm, suy dinh dưỡng hay thừa cân, béo phì với các mức độ nặng nhẹ khác nhau trên lâm sàng và trong cộng đồng. Đối với người trưởng thành ( $\geq 18$  tuổi), chỉ số BMI được áp dụng cho cả nam và nữ, không áp dụng cho phụ nữ mang thai, vận động viên, người già và một số trường hợp bệnh lý. Chỉ số BMI của một người tính bằng trọng lượng (kg) chia cho bình phương chiều cao tính bằng mét (m) như sau:  $BMI = \text{cân nặng (kg)}/\text{chiều cao (m)}^2$  [130].

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 [26], 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.

### 1.3.2.3. Các chỉ số đánh giá mối nguy hại độc tố aflatoxin đối với sức khỏe con người

Các chỉ số đánh giá mối nguy hại độc tố AF bao gồm:

-Liều phơi nhiễm hàng ngày (Estimated Daily Intake - EDI) là chỉ số ước tính lượng AF mà một người tiêu thụ hàng ngày thông qua thực phẩm bị nhiễm AF hoặc ăn phải thực phẩm được sản xuất bởi động vật đã tiếp xúc với AF, là một bước quan trọng trong việc xác định nguy cơ sức khỏe đối với con người [63].

-Biên độ phơi nhiễm (Margin of Exposure – MOE) là chỉ số đánh giá mức độ an toàn của phơi nhiễm AF dựa trên khả năng gây đột biến gen và ung thư của nó. Biên độ phơi nhiễm là tỷ lệ của liều chuẩn thấp nhất (BMDL) có thể gây ảnh hưởng nghiêm trọng và liều phơi nhiễm [39; 43]. Giá trị BMDL10 cho AFB1 là  $0,170 \mu\text{g kg}^{-1} \text{bw d}^{-1}$  [4; 133].

-Chỉ số rủi ro nguy cơ đối với sức khỏe con người: là chỉ số ước tính số ca ung thư gan do aflatoxin gây ra trên 100000 người mỗi năm, dựa trên mức độ phơi nhiễm thực tế trong cộng đồng. Để đánh giá nguy cơ ung thư gan do phơi

nhiễm AFB1, các nhà nghiên cứu tính toán dựa trên tỷ lệ người Việt Nam bị nhiễm virus viêm gan B (HBV) và mức độ nguy hiểm của AFB1. Cụ thể, đối với người không nhiễm HBV, nguy cơ ung thư gan là 0,01 trường hợp mỗi năm trên 100000 người nếu họ tiêu thụ 1 ng AFB1 trên mỗi kg thể trọng mỗi ngày, trong khi đối với người nhiễm HBV, nguy cơ này cao hơn, lên đến 0,3 trường hợp mỗi năm trên 100000 người với cùng mức phơi nhiễm AFB1 [39]. Tại Việt Nam, tỷ lệ nhiễm HBV có thể lên đến 20% dân số. Do đó, tỷ lệ này được dùng để tính nguy cơ trung bình gây ung thư gan trong cộng đồng như sau: Người nhiễm HBV (20% dân số) có nguy cơ ung thư là 0,3 trường hợp mỗi năm trên 100.000 người với mỗi 1 ng AFB1 trên mỗi kg thể trọng mỗi ngày và người không nhiễm HBV (80% dân số) có nguy cơ thấp hơn, chỉ 0,01 trường hợp mỗi năm trên 100.000 người. Vì thế, khả năng gây ung thư là  $0,068 = 0,3 \times 0,2 + 0,01 \times 0,8$  [39]. Điều này có nghĩa là với mức phơi nhiễm 1 ng AFB1 trên mỗi kg thể trọng mỗi ngày, nguy cơ gây ung thư gan trung bình trong cộng đồng là 0,068 trường hợp mỗi năm trên 100000 người.

-Chỉ số nguy hiểm (Hazard Index – HI) là chỉ số đánh giá mức độ rủi ro của AF đối với sức khỏe con người.

### ***1.3.3. Tình hình nhiễm độc tố aflatoxin ở nước ngoài***

Trong các năm gần đây, các nước đều không ngừng kiểm soát tình trạng an toàn thực phẩm nhằm bảo vệ sức khỏe người tiêu dùng, trong đó có AF. Từ năm 2005 đến năm 2017, Mahato và cộng sự đã thống kê kết quả nghiên cứu AF trong thực phẩm các nước trên thế giới cho thấy một số nền mẫu nhiễm AF với hàm lượng cao như bột ớt (0,025 – 40,9  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , Thổ Nhĩ Kỳ), gạo (0,1 – 308  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , Ấn Độ), bo bo (0,4 – 25,1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , Tunisia), hạt phỉ (0,07 – 43,6  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , Thổ Nhĩ Kỳ), bắp (48 - 383  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , Ấn Độ), đậu phộng (15 – 11900  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , Ethiopia), sản phẩm từ đậu phộng (0,2 – 513,4  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , Đài Loan) và hạt điều (0,6 – 31,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , Brazil) [82]. Từ năm 2015 đến năm 2020, Jallow và cộng sự đã thống kê có đến 53 công trình nghiên cứu về AF trong 17 loại thực phẩm khác nhau từ hơn 30 quốc gia (Bảng 1.3). Kết quả thống kê cho thấy một số nền mẫu nhiễm AF với hàm lượng cao như bắp (0 – 3760  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , Uganda); bắp (0 – 3000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , Niger và Benin); bắp (1,9 – 458,2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , Argentina);

đậu phộng (0,2 - 2177,2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , Thổ Nhĩ Kỳ); gia vị (2,2 – 1118,3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , Lebanon); trà (1,2 – 116,2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , Ma Rôc) [63].

Một số thực phẩm và thức ăn bị ảnh hưởng AF nhiều nhất bao gồm đậu phộng, các loại hạt, quả sung, bắp, gạo, gia vị và trái cây khô [88]. Từ kết quả tổng hợp của 89 bài báo với 18097 mẫu ngũ cốc, Andrade và cộng sự kết luận tỉ lệ mẫu nhiễm ít nhất một loại AF là 37,6 % [11]. Điều này cho thấy, con người đối mặt với nguy cơ ung thư rất cao do tiêu thụ trực tiếp các sản phẩm có nhiễm AF dù với liều lượng nhỏ hoặc thông qua các loại thực phẩm khác (thịt, cá) khi chúng tiêu thụ thức ăn nhiễm AF. Do đó, việc phân tích hàm lượng AF trong các loại thực phẩm, nguyên liệu thức ăn chăn nuôi luôn nằm trong kế hoạch đánh giá an toàn thực phẩm hàng năm của các nước, thể hiện qua số công trình công bố khoa học được công bố.

**Bảng 1.3:** Tổng hợp kết quả nhiễm aflatoxin từ 2015 - 2020 của các nước trên thế giới

<b>Nền mẫu</b>	<b>Aflatoxin</b>	<b>Tỉ lệ % nhiễm ( tổng số mẫu)</b>	<b>Khoảng nồng độ phát hiện thấy (<math>\mu\text{g}/\text{kg}</math>)</b>	<b>Quốc Gia</b>	<b>Năm</b>	<b>Tài liệu tham khảo</b>
Bắp	Tổng AF	37,7 (326)	LOD - 341	Ghana	2018	[5]
Bắp	AFB1; AFB2	24,6 (61)	0,02 - 0,19	Egypt	2019	[2]
Bắp	Tổng AF	25,8 (256)	0 - 3760	Uganda	2020	[122]
Bắp	Tổng AF	100 (150)	20 - 91,04	Ethiopia	2016	[31]
Bắp	Tổng AF	88,4 (112)	0 - 3000	Niger và Benin	2017	[20]
Bắp	AFB1; AFG1	26,1 (148)	0,5 - 49,9	Brazil	2017	[101]
Bắp	AFB1; AFB2; AFG1	15; 15; 5 (20)	1,9 - 458,2	Argentina	2015	[29]
Bắp	Tổng AF	4 (1055)	8,0 - 163,6	Ý	2016	[87]
Bắp	AFB1; AFB2	1 (507)	5,2	Nam Triều Tiên	2017	[66]
Bắp	AFB1	33,7 (2370)	LOD - 34,8	Vietnam	2017	[75]



<b>Nền mẫu</b>	<b>Aflatoxin</b>	<b>Tỉ lệ % nhiễm ( tổng số mẫu)</b>	<b>Khoảng nồng độ phát hiện thấy (<math>\mu\text{g}/\text{kg}</math>)</b>	<b>Quốc Gia</b>	<b>Năm</b>	<b>Tài liệu tham khảo</b>
Cao lương	AFB1 AFB2 AFG1 và AFG2	9 - 44 (45)	0,61 - 28,3 0,14 - 2,35 0,39 - 6,95	Namibia	2019	[96]
Cao lương	Tổng AF	28,6 (146)	0,96 - 21,74	Nigeria	2016	[15]
Cao lương	AFB1	25 (50)	46,3 - 254,7	Burkina Faso	2015	[64]
Lúa mì và bánh quy lúa mì	AFB1	5,6 (178)	0,03 - 0,12	Trung Quốc	2018	[139]
Lúa mì	AFB1	33,3 (36)	LOD - 49,79	Ai Cập	2020	[56]
Đậu phộng	Tổng AF	25 (1089)	LOD - 432,0	Taiwan	2019	[78]
Đậu phộng	Tổng AF	10 (119)	0,3 - 100	Brazil	2017	[89]
Hạt đậu nành	Tổng AF	24,4 (45)	0,88 - 16,17	Hàn Quốc	2019	[65]
Đậu phộng	Tổng AF	25 (8)	186,6 - 375,1	Haiti	2020	[17]
Đậu phộng	Tổng AF	84 (102)	0,2 - 2177,2	Thổ Nhĩ Kỳ	2019	[92]

<b>Nền mẫu</b>	<b>Aflatoxin</b>	<b>Tỉ lệ % nhiễm ( tổng số mẫu)</b>	<b>Khoảng nồng độ phát hiện thấy (<math>\mu\text{g}/\text{kg}</math>)</b>	<b>Quốc Gia</b>	<b>Năm</b>	<b>Tài liệu tham khảo</b>
Quả óc chó	AFB1	7,5 (40)	0 - 8,2	Iran	2016	[52]
Hạt điều	Tổng AF	42 (12)	0 - 122,35	Brazil	2019	[69]
Hạt điều rang	Tổng AF	100 (27)	0,1 - 6,8	Nigeria	2018	[3]
Hạt mè	AFB1	77,6 (30)	LOD - 14,49	Hy Lạp	2016	[68]
Gia Vị	Tổng AF	19 (94)	2,2 - 1118,3	Lebanon	2019	[94]
Gia Vị	Tổng AF	85 (34)	0,01 - 9,34	Malaysia	2015	[10]
Trà	Tổng AF	78,3 (94)	0,11 - 16,17	Pakistan	2020	[62]
Trà	Tổng AF	58,9 (1290)	1,2 - 116,2	Ma Rốc	2020	[86]
Hạt coca	Tổng AF	16,3 (123)	0,35 - 30	Brazil	2019	[105]

#### ***1.3.4. Tình hình nhiễm độc tố aflatoxin trong nước***

Năm 2016, Bùi Thị Mai Hương và cộng sự đã công bố kết quả khảo sát hàm lượng AFB1, ochartoxin A và fumonisin với 1134 mẫu (đại diện cho 42 loại thực phẩm tiêu thụ hàng ngày) tại tỉnh Lào Cai bằng phương pháp đo mật độ quang. Kết quả cho thấy có tới 87,5% loại thực phẩm nhiễm AFB1, với hàm lượng cao nhất được phát hiện trong trứng và sữa (5,326  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), thịt (4,077  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Tuy nhiên, hai loại sản phẩm này lại không có qui định về ML trong QCVN 8-1:2011/BYT [28].

Năm 2019, Nguyễn Thị Thanh Xuân và cộng sự đã đánh giá thực trạng nhiễm AFB1 trong bắp ở Sơn La bằng phương pháp Kit-Elisa. Kết quả khảo sát trong 378 mẫu bắp cho thấy có 204 mẫu (54%) và 141 mẫu (37,3%) nhiễm AFB1 lần lượt ở ngưỡng bằng hoặc cao hơn 5 và 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Điều này cho thấy số lượng mẫu bắp vượt quá giới hạn cho phép ML = 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  theo QCVN 8-1:2011/BYT là hơn 90%, một con số đáng báo động [98].

Năm 2020, Đỗ Hữu Tuấn và cộng sự đã sử dụng kỹ thuật sắc ký lỏng ghép khối phổ LC/MS/MS để xác định AFB1, ocharatoxin, fumonisin B1 và zearalenone trong thực phẩm và đánh giá nguy cơ nhiễm độc tố trong 606 mẫu tại khu vực Hà Nội, Thanh Hóa và Hà Giang, gồm 144 mẫu gạo, 189 mẫu bắp, 144 mẫu lạc và 129 mẫu mè. Kết quả cho thấy AFB1 được phát hiện nhiều nhất với 116/606 mẫu (chiếm 19,1%), trong đó bắp nhiễm nhiều nhất với 57/189 mẫu (30,2%), tiếp theo là lạc với 34/144 mẫu (chiếm 23,6%). Trong bắp, hàm lượng AFB1 dao động trong khoảng 66,0 – 66,1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Hà Giang); 2,56 – 2,62  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Hà Nội) và 5,31 – 5,39  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Thanh Hóa). Tương tự, hàm lượng AFB1 trung bình trong mẫu lạc tại Hà Giang, Hà Nội và Thanh Hóa lần lượt là 16,5; 9,2 và 4,9  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Các kết quả AFB1 trung bình trong bắp và lạc đều cao hơn giới hạn tối đa cho phép của Việt Nam. Ngược lại, hàm lượng AFB1 trung bình trong gạo và mè đều tương đối thấp, đáp ứng ML trong qui chuẩn Việt Nam của Bộ Y tế, lần lượt là 0,4 – 2,0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  và 0,37 – 1,7  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Có một điểm đáng lưu ý là hàm lượng AFB1 (cũng như các loại mycotoxins khác) trong hầu hết các mẫu tại Hà Giang luôn cao hơn các khu vực còn lại. Các kết quả điều tra cho thấy, nguyên nhân có thể đến từ việc tích trữ mẫu trong thời gian dài ở điều kiện bình thường của đồng bào H'Mông trước khi nông sản được đưa đi tiêu thụ [39].

Kết quả tổng hợp của 3 công trình trên được trình bày trong Bảng 1.4 cho thấy tình hình nhiễm AFB1 là đáng báo động.

**Bảng 1.4:** Tổng hợp kết quả phân tích aflatoxin của một số công trình nghiên cứu tại Việt Nam

<i>Khu vực</i>	<i>Đối tượng mẫu (số lượng)</i>	<i>Số mẫu nhiễm aflatoxin (tỷ lệ %)</i>	<i>Khoảng nồng độ, <math>\mu\text{g}/\text{kg}</math></i>	<i>ML, <math>\mu\text{g}/\text{kg}</math></i>	<i>Tài liệu tham khảo</i>
Lào Cai	Gạo và sản phẩm (81)	54 (67%)	2,4 – 3,02	5	[28]
	Lúa mì và sản phẩm (27)	0 (0%)	0 – 2 (< MDL)	2	
	Ngũ cốc khác (27)	27 (100%)	3,206 (TB)	2	
	Các loại củ (54)	27 (50%)	1,67 – 2,67	N.A.	
	Hạt đậu và sản phẩm (108)	81 (75%)	2,61 – 3,11	N.A.	
	Đậu hũ (27)	0 (0%)	0 – 2 (< MDL)	N.A.	
	Hạt có dầu (27)	27 (100%)	4,086 (TB)	2	
	Rau (27)	27 (100%)	2,47 (TB)	N.A.	
	Đường hoặc kẹo (135)	135 (100%)	4,033 (TB)	N.A.	
	Gia vị (27)	27 (100%)	3,847 (TB)	5	
	Dầu, mỡ động vật (54)	54 (100%)	3,382 (TB)	N.A.	
	Thịt và sản phẩm thịt (297)	270 (90.9%)	3,99 – 4,17	N.A.	
	Trứng và sữa (108)	108 (100%)	5,325 (TB)	N.A.	
Cá (54)	27 (50%)	1,8 – 2,8	N.A.		
Sản phẩm thủy sản khác (81)	81 (100%)	1,85 – 3,18	N.A.		
Hà Nội Thanh Hóa	Bắp (189)	57 (30,2%)	2,56 – 66,1	5	[39]
	Lạc (144)	34 (23,6%)	4,9 – 16,5	2	
	Gạo (144)	13 (9,0%)	0,4 – 2,0	5	
	Mè (129)	12 (9,3%)	0,37 – 1,7	N.A.	

<i>Khu vực</i>	<i>Đối tượng mẫu (số lượng)</i>	<i>Số mẫu nhiễm aflatoxin (tỷ lệ %)</i>	<i>Khoảng nồng độ, <math>\mu\text{g/kg}</math></i>	<i>ML, <math>\mu\text{g/kg}</math></i>	<i>Tài liệu tham khảo</i>
Hà Giang					
Sơn La	Bắp (378)	204 (54,0%) 141 (37,3%)	> 5,0 > 20,0	5	[98]

*N.A. Không có qui định, TB: Trung bình*

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. Để đánh giá mức độ xuất hiện của AFB1 trong thực tế, Viện Y tế công cộng tại TP.HCM đã xem xét mẫu thực phẩm lưu hành trên thị trường hoặc do các công ty và cơ sở chế biến mang tới đăng ký kiểm nghiệm. Kết quả cho thấy trong 115 mẫu (gồm sản phẩm chế biến từ đậu phộng như đậu phộng da cá, kẹo đậu phộng v.v...; nước tương làm từ đậu nành; đồ hộp chay làm từ các loại đậu và bột mì; cà phê; thức ăn gia súc) thì AFB1 có trong 30% mẫu cà phê; 42,9% mẫu nước tương; 66,7% mẫu đồ hộp chay; 68,2% mẫu đậu phộng và sản phẩm từ đậu phộng. Đặc biệt, AFB1 có với tỉ lệ cao trong 94,6% mẫu thức ăn gia súc. Như vậy, cứ trung bình 3 mẫu thử nghiệm chung cho các loại thì có một mẫu có độc tố AFB1. Nếu căn cứ theo tiêu chuẩn cho phép thì chỉ riêng các mẫu nước tương tuy tới 42,9% có AFB1 nhưng đều chỉ ở mức 1,87 – 5,90  $\mu\text{g/kg}$  (tiêu chuẩn cho phép là 10  $\mu\text{g/kg}$ ), còn trong các mẫu khác hầu hết đều có AFB1 với hàm lượng rất cao. Cá biệt có những mẫu chứa từ 140 - 300  $\mu\text{g/kg}$  [22].

Tại Hội nghị khoa học của Viện Pasteur TPHCM lần thứ 19, một báo cáo nghiên cứu công bố trong Tạp chí Y học dự phòng, cho biết từ tháng 5 – 6/2017, các nhà nghiên cứu Viện Pasteur TPHCM thu thập ngẫu nhiên 48 mẫu ớt khô tại các chợ và tiệm tạp hóa trên địa bàn 5 tỉnh phía Nam gồm Vũng Tàu, Bình Phước, Bình Dương, Đồng Nai và TPHCM. Kết quả kiểm nghiệm cho thấy 48 mẫu ớt khô đều có sự hiện diện của vi nấm aflatoxin. Trong đó cả 48 mẫu đều nhiễm AFB1, 35 mẫu nhiễm AFB2, 11 mẫu nhiễm AFG1. Hàm lượng AFB1 trong 48 mẫu là 0,13 – 46,57

$\mu\text{g}/\text{kg}$ . Trong đó có 16 mẫu nhiễm vượt mức tối đa cho phép  $5 \mu\text{g}/\text{kg}$  và trong 16 mẫu đó có 6 mẫu vượt  $10 \mu\text{g}/\text{kg}$  [21].

Năm 2018, Thanh tra Bộ NN-PTNT đã thành lập 2 đoàn kiểm tra đột xuất tại một số cơ sở sản xuất, kinh doanh ớt bột tại 10 tỉnh, thành, gồm: Hà Nội, Thừa Thiên - Huế, Đà Nẵng, Quảng Nam, Quảng Ngãi, TP.HCM, Đồng Tháp, Đồng Nai, Bà Rịa - Vũng Tàu và Bình Phước. Tổng cộng 262 mẫu ớt bột, ớt khô nguyên liệu tại các cơ sở sản xuất, hộ kinh doanh trong chợ dân sinh và siêu thị được niêm phong để tiến hành phân tích. Kết quả kiểm nghiệm AF phát hiện 95/262 mẫu phân tích vượt ngưỡng dư lượng aflatoxin cho phép, chiếm 36,25%. Trong số mẫu phát hiện tồn dư aflatoxin, tỷ lệ chiếm nhiều nhất là ở hộ kinh doanh trong chợ với 48,6%, siêu thị 21,62%, tại cơ sở sản xuất và kho bảo quản là 30,7% [23].

Các dữ liệu trên nói lên một 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**

Các kỹ thuật chiết và làm sạch thường được sử dụng để phân tích AF là chiết lỏng-lỏng (LLE), chiết lỏng-rắn (LSE), chiết siêu âm, chiết lỏng siêu tới hạn (SFE), chiết pha rắn (SPE) và các phương pháp “Nhanh, Dễ, Rẻ, Hiệu quả, chắc chắn và An toàn” (QuEChERS) [1].

#### **1.4.1.1. Chiết lỏng-lỏng (LLE)**

Quy trình chiết lỏng-lỏng là phương pháp đơn giản, dễ thực hiện và chi phí thấp để tách AF. Nó dựa trên hệ số phân bố và các đặc tính hòa tan khác nhau của độc tố nấm mốc trong pha hữu cơ hoặc pha nước hoặc trong hỗn hợp kết hợp của chúng. Tuy nhiên, nhược điểm của các kỹ thuật chiết này là nó không cung cấp chất phân tích sạch phù hợp trong mọi trường hợp [1].

Cần có một phương pháp chiết hiệu quả để phát hiện và định lượng, định tính AF trong các mẫu thực phẩm và thức ăn chăn nuôi. Aflatoxin thường hòa tan trong các dung môi phân cực như aceton, acetonitril, chloroform và methanol. Do đó, aflatoxin có thể được chiết xuất bằng cách sử dụng bất kỳ dung môi nguyên chất nào được đề cập hoặc kết hợp các dung môi này cũng như với một lượng nhỏ nước [1].

#### 1.4.1.2. Chiết lỏng-rắn (LSE)

Kỹ thuật chiết lỏng-rắn là một phương pháp chiết đơn giản và dễ dàng khác để tách AF bằng cách sử dụng các chất nền rắn có độ phân tán khác nhau. Ban đầu, việc lựa chọn dung môi chiết phù hợp và hiệu quả nhất là bước quan trọng để chiết thành phần cần chiết. Dung môi chiết được sử dụng thường xuyên nhất là hỗn hợp methanol/nước hoặc acetonitril/nước ở các tỷ lệ khác nhau. Ví dụ, hỗn hợp 80% methanol/nước được chứng minh là tối ưu nhất để chiết xuất AF trong trường hợp mẫu hạt nhục đậu khấu [1].

Việc lựa chọn methanol để sử dụng tiếp theo cũng được ưu tiên hơn vì kháng thể dung nạp nồng độ methanol cao hơn acetonitril. Methanol cũng thích hợp để phân tách bằng sắc ký vì AF có thể đo được mà không bị nhiễu. Hiệu suất chiết bị ảnh hưởng đáng kể bởi thành phần của chất chiết, tỷ lệ mẫu/dung môi và thời gian chiết. Quá trình chiết bao gồm các bước khác nhau như việc cân mẫu đã đồng nhất, bổ sung dung môi chiết phù hợp. Sau khi chiết, mẫu được lọc và làm sạch trước khi phân tích [1].

#### 1.4.1.3. Chiết siêu âm

Hiệu suất chiết lỏng-rắn có thể được cải thiện đáng kể khi sử dụng sóng siêu âm. Trong quá trình chiết siêu âm, vật chứa (ví dụ: bình, ống ly tâm hoặc lọ) chứa mẫu cần chiết và dung môi chiết thường được ngâm vào bể siêu âm có chứa nước. Sau một vài phút, dưới tác động của trường siêu âm trong chất lỏng làm tăng đáng kể sự chuyển các chất phân tích từ mẫu sang dung môi chiết, do đó làm tăng khả năng thu hồi và hiệu quả chiết [1].

#### 1.4.1.4. Chiết lỏng siêu tới hạn (SFE)

Chiết lỏng siêu tới hạn sử dụng chất lỏng siêu tới hạn để chiết hợp chất cần thiết từ nền mẫu. Quy trình SFE chủ yếu được sử dụng hiệu quả để tách các phân tử hữu cơ phân cực. Trong quá trình chiết xuất AF phân cực bằng SFE, một số vấn đề đã phát sinh, ví dụ, độ thu hồi thấp và nồng độ chất đồng chiết cao. Hơn nữa, lipid có thể gây khó khăn trong quá trình làm sạch và tách sắc ký [1].

#### 1.4.1.5. Chiết pha rắn (SPE)

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 [1].

SPE là một quá trình gồm nhiều bước, bắt đầu từ việc hoạt hoá, sau đó là nạp mẫu, rửa và cuối cùng là rửa giải chất phân tích cần thiết. Trong SPE, chất phân tích cần thiết sẽ được liên kết với thành phần nền mẫu hoặc được loại bỏ khỏi mẫu. Aflatoxin thường được phân tích bằng cột C-18 (octadecylsilane). 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].

Kỹ thuật sắc ký ái lực miễn dịch được chứng minh là có độ chính xác và đặc hiệu cao về khả năng đảo ngược liên kết giữa kháng nguyên và kháng thể để phân lập, làm sạch và tách phân tử quan tâm khỏi nền mẫu. Trong quá trình làm sạch, mẫu chất lỏng đã chiết được đưa vào IAC chứa các kháng thể cụ thể để liên kết với AF đã cố định trên bề mặt rắn như silica. Khi mẫu chiết di chuyển xuống cột IAC, aflatoxin liên kết với các kháng thể và được giữ lại trên cột. Để loại bỏ các protein không liên kết và tạp chất, bước rửa thường được yêu cầu sử dụng chất đệm cường độ ion thích hợp hoặc nước cất. Sau đó, AF được thu hồi hoặc loại bỏ khỏi IAC bằng cách sử dụng các dung môi tinh khiết như acetonitril hoặc methanol để phá vỡ liên kết giữa kháng thể và AF [1].

Cột làm sạch đa chức năng (MFC) Mycosep cũng được công nhận là phương pháp tốt nhất để làm sạch AF. Nó đơn giản, dễ sử dụng, tiện dụng và là kỹ thuật làm sạch nhanh chóng chỉ trong một bước. Các cột này được thiết kế để giữ lại một số



nhóm hợp chất cơ bản nhất định có thể gây nhiễu trong phân tích HPLC. Mặt khác, cột MFC cho phép các phân tử quan tâm đi qua cột. Trong quy trình làm sạch MFC, sau khi chiết aflatoxin bằng dung môi thích hợp, một phần dịch chiết được đưa qua cột MFC được thiết kế đặc biệt để phân tích AF. Các hợp chất có thể gây cản trở sẽ được giữ lại trong MFC, trong khi AF sẽ đi qua cột [1].

#### **1.4.2. Các phương pháp phát hiện và định lượng aflatoxin**

##### **1.4.2.1. Phương pháp hóa sinh test nhanh**

Phương pháp hoá sinh miễn dịch mang tính đặc hiệu cao, dựa trên nguyên lý kết hợp giữa kháng nguyên và kháng thể đặc hiệu. Những phương pháp phổ biến nhất là xét nghiệm miễn dịch hấp thụ liên kết enzyme (ELISA), thiết bị dòng chảy (LFD) và phương pháp hóa học. Các xét nghiệm nhanh là không thể thiếu để cung cấp kết quả phân tích trong thời gian ngắn. Các quy trình này cho phép thực hiện phân tích dễ dàng với mức giá thấp hơn, ngay cả tại địa điểm lấy mẫu. Phần lớn các phương pháp nhanh chóng được sử dụng để đo AF là các xét nghiệm miễn dịch dựa trên phản ứng của một kháng thể đặc biệt và kháng nguyên của chất phân tích [93].

Mục đích của kỹ thuật ELISA là xác định định tính hoặc định lượng độc tố nấm mốc được tìm thấy trong mẫu phân tích, dựa trên việc áp dụng các kháng thể đặc trưng cho các hợp chất cần phân tích. Phương pháp này dựa trên phản ứng màu liên kết với enzyme. Các hệ thống phân tích ELISA này là thiết bị sàng lọc tuyệt vời, cung cấp kết quả định lượng trong khoảng thời gian ngắn và như đã đề cập trước đó, chúng cũng thường có thể được sử dụng tại địa điểm lấy mẫu. Tuy nhiên, phân tích ELISA của các loại mẫu phức tạp hơn, như thức ăn hỗn hợp, có thể cho kết quả không chính xác. Một số phương pháp test nhanh khác như xét nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA), xét nghiệm miễn dịch Fluoroi (FIA), xét nghiệm miễn dịch huỳnh quang cạnh tranh (CFIA), xét nghiệm miễn dịch hóa phát quang (CLIA) [93].

Xét nghiệm miễn dịch dòng chảy bên (LFIA), (LFA) hoặc thiết bị dòng chảy bên (LFD): Cơ sở của phương pháp này là phát hiện thành phần được phân tích bằng cách liên kết với một kháng thể cụ thể trong vùng thử nghiệm, kháng thể này được đặt trên một màng cố định trên que thử. Ngoài vùng thử nghiệm còn có vùng kiểm soát trên màng để xác minh hoạt động chính xác của thử nghiệm. Khi dịch chiết mẫu

chảy trên màng, nó sẽ vượt qua vùng kiểm tra và kiểm soát và tùy thuộc vào nồng độ của chất độc, cả hai vạch (kiểm tra và kiểm soát) hoặc chỉ vạch kiểm soát sẽ hiển thị. Que thử có thể được đánh giá bằng mắt thường hoặc bằng thiết bị đọc. Khi cần kết quả định lượng, việc đánh giá được thực hiện bằng một thiết bị (quang kế phản xạ), đo cường độ của vạch kiểm tra và vạch đối chứng, đồng thời đánh giá kết quả trên cơ sở dữ liệu được xác định. Que thử sắc ký miễn dịch là một kỹ thuật nhanh chóng, dễ thực hiện, lý tưởng và tiết kiệm chi phí ngay cả khi phân tích một mẫu đơn lẻ. Tương tự như kỹ thuật ELISA, phản ứng chéo và hiệu ứng ma trận xảy ra trong quá trình phân tích một số sản phẩm nhất định sẽ hạn chế khả năng ứng dụng của que thử [93].

Tiêu chuẩn của Ủy ban an toàn thực phẩm và tiêu chuẩn của Ấn Độ (FSSAI) sử dụng hỗn hợp dung môi MeOH/H<sub>2</sub>O (8/2) để chiết mẫu mẫu bắp, hạt bông, đậu phộng và bơ đậu phộng, dịch lọc được pha loãng với hỗn hợp dung môi chiết, sau đó được xác định bằng bộ kit ELISA [47]. Ưu điểm: phương pháp test nhanh xác định tổng aflatoxin trong mẫu, không cần đầu tư thiết bị đắt tiền. Hạn chế: phương pháp gặp một số trở ngại không xác định được từng AF trong mẫu và dễ bị dương tính giả.

#### *1.4.2.2. Phương pháp sắc ký lớp mỏng TLC và lớp mỏng hiệu năng cao HPTLC*

Phương pháp sắc ký lớp mỏng (TLC) được sử dụng rộng rãi để xác định hàm lượng aflatoxin lần đầu tiên vào những năm 1960. TLC là kỹ thuật phân tách được biết đến nhiều nhất nhưng có thể nó không còn được sử dụng rộng rãi nữa. Sự phổ biến của nó có thể liên quan đến tính đơn giản và giá thành thấp, vì các yêu cầu về công cụ ở mức cơ bản là nhỏ. Trong các phòng thí nghiệm hóa học, TLC có thể được sử dụng để theo dõi tiến trình phản ứng, xác định độ tinh khiết của một chất hoặc xác định các hợp chất có trong một hỗn hợp nhất định [93].

Phương pháp sắc ký lớp mỏng hiệu năng cao (HPTLC) cho phép định lượng có chọn lọc và chính xác hơn. Sự khác biệt chính giữa các kỹ thuật (TLC và HPTLC) có thể xuất phát từ sự khác biệt về kích thước hạt của pha tĩnh, độ nhạy và phương pháp xử lý dữ liệu của chúng. Khi định lượng nồng độ AF trên các tấm TLC kết hợp với phép đo mật độ huỳnh quang, giới hạn phát hiện ở ớt bột đỏ, cá, bắp và lúa mì là 0,5 µg/kg. Mặc dù trên thực tế, TLC vẫn là phương pháp tham chiếu được chấp nhận

để phát hiện AF nhưng phân tích định lượng AF đã được thay thế bằng HPLC và UPLC trong hầu hết các trường hợp [93].

Tiêu chuẩn FSSAI đưa ra qui trình phân tích AF trên một số mẫu khác nhau:

- Nền mẫu lạc, sản phẩm từ hạt có dầu và ngũ cốc: phân tích sàng lọc AF bằng phương pháp sắc ký bản mỏng [47]. Ưu điểm: phương pháp đơn giản, rẻ tiền, áp dụng cho mọi phòng thí nghiệm. Hạn chế: dễ bị dương tính giả, sử dụng dung môi ly trích chloroform, benzen độc hại, không định lượng chính xác từng AF.
- Đậu phộng, sản phẩm đậu phộng và ngũ cốc: mẫu được chiết bằng hỗn hợp dung môi aceton/H<sub>2</sub>O (85/15), lắc 45 phút. Dịch lọc được lắc với dung môi chloroform, lấy lớp chloroform đi thổi khô, định mức lại bằng 2 mL chloroform, chuyển vào minicolumn (chứa CaSO<sub>4</sub>, florisil, silica gel), thêm 3 mL hỗn hợp dung môi chloroform-aceton, sau đó chiếu đèn UV và nhận biết bằng màu sắc phát quang màu xanh dương [47]. Ưu điểm: không cần đầu tư thiết bị phân tích, xác định được tổng AF trong từng nền mẫu. Hạn chế: không định lượng chính xác từng AF trong mẫu, sử dụng dung môi độc hại để chiết như chloroform, aceton.

#### 1.4.2.3. Phương pháp sắc ký lỏng ghép khối phổ LC-MS/MS

Kỹ thuật khối phổ LC-MS, đặc biệt là bộ ba tứ cực LC-MS (LC-MS-MS/MS), đã trở thành kỹ thuật phát triển nhanh nhất hiện có để phân tích độc tố nấm mốc. Những lợi ích của kỹ thuật LC-MS để phân tích độc tố nấm mốc đã được công nhận và khai thác từ lâu. Có thể xác định đồng thời nhiều loại độc tố nấm mốc bằng LC-MS theo tỷ lệ khối lượng trên điện tích ( $m/z$ ) của chất phân tích, một thông số đặc trưng khối phổ giúp nhận dạng cụ thể hơn dựa trên khối lượng phân tử của chất phân tích mục tiêu. Tác động của kỹ thuật LC-MS hiện đại đã được biểu thị bằng độ nhạy vượt trội trong định lượng, độ đặc hiệu trong việc xác định và số lượng độc tố nấm mốc có thể được phân tích trong một phân tích. Tuy nhiên, phương pháp này bị cản trở bởi giá thành cao và chi phí đào tạo nhân lực cho hoạt động chuyên môn và phát triển phương pháp của chúng [1; 93].

Tiêu chuẩn FSSAI đã đưa ra qui trình phân tích AF trên nền gia vị, trà, cà phê, hạt nhục đậu khấu và gạo: Mẫu được chiết bằng 100 mL hỗn hợp dung môi MeOH/H<sub>2</sub>O, thêm 5 g NaCl trộn đều, lọc mẫu, lấy 10 mL dịch lọc thêm 40 mL đệm Tween 20, qua cột ái lực miễn dịch, rửa giải và định mức bằng MeOH trước khi tiêm vào hệ thống sắc ký lỏng ghép khối phổ HPLC-MS/MS [47]. Ưu điểm: phương pháp định lượng chính xác từng AF trong mẫu, sử dụng qui trình xử lý mẫu đơn giản, dung môi chiết thân thiện môi trường. Hạn chế: chi phí đầu tư cho hệ thống sắc ký lỏng ghép khối phổ quá cao, thêm vào đó kỹ thuật vận hành thiết bị rất phức tạp.

Tác giả Ouakhssase và cộng sự đã công bố phương pháp phân tích AF trong bắp bằng phương pháp LC-MS/MS. Phương pháp sử dụng dung môi chiết ACN/MeOH (4/6) và hỗn hợp muối MgSO<sub>4</sub> và NaCl, ly tâm, tách lớp, lấy lớp trên qua siêu lọc cellulose trước khi tiêm mẫu vào hệ thống sắc ký lỏng ghép khối phổ LC-MS/MS [103]. Ưu và nhược điểm của phương pháp này giống với phương pháp tiêu chuẩn FSSAI.

Tác giả Shencong Lv và cộng sự đã sử dụng phương pháp LC-MS/MS để định lượng AF trên một số nền mẫu như đậu phộng và sản phẩm đậu phộng. Mẫu được chiết bằng hỗn hợp ACN/H<sub>2</sub>O/HCOOH (70/29/1), sau đó được ly tâm, qua siêu lọc, trước khi tiêm mẫu vào hệ thống sắc ký [80]. Ưu và nhược điểm của phương pháp này giống với phương pháp tiêu chuẩn FSSAI.

Tác giả Lê Trường Giang và các đồng nghiệp đã công bố phương pháp phân tích AF trong hạt điều bằng sắc ký lỏng ghép khối phổ độ phân giải cao UHPLC-HRMS. Mẫu được chiết hỗn hợp dung môi MeOH/H<sub>2</sub>O (6/4), làm sạch dịch lọc bằng cột chiết pha rắn, trước khi tiêm mẫu vào hệ thống UHPLC-HRMS [74]. Ưu và nhược điểm của phương pháp này giống với phương pháp tiêu chuẩn FSSAI.

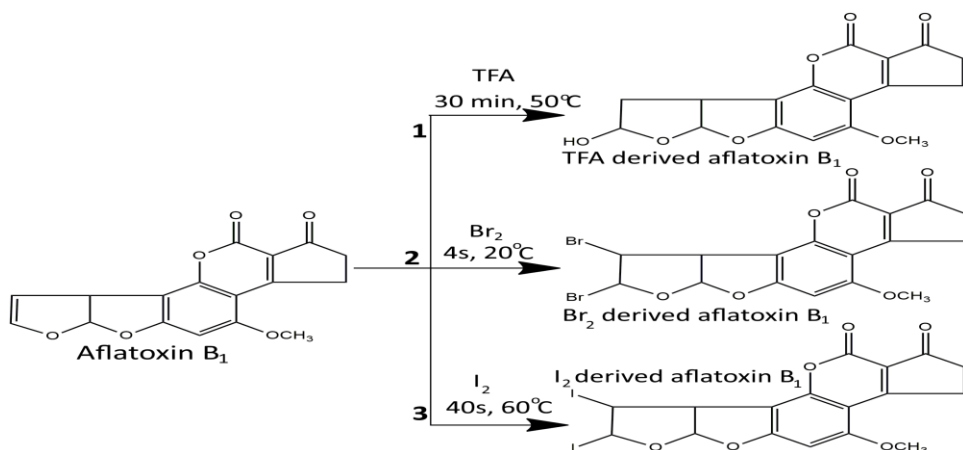
#### *1.4.2.4. Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao đầu dò huỳnh quang HPLC-FD*

Phương pháp sắc ký lỏng cao áp-đầu dò huỳnh quang (HPLC-FD): Đây là phương pháp tham chiếu để phát hiện AF dựa trên sắc ký cho kết quả chính xác cao. Các thành phần tách biệt được phát hiện bằng đầu dò huỳnh quang thì cần phải tạo dẫn xuất trước hoặc sau cột để tăng đặc tính huỳnh quang tự nhiên của AFB<sub>1</sub> và AFG<sub>1</sub>. Quá trình tạo dẫn xuất này có thể dựa trên các nguyên tắc điện hóa hoặc quang

hóa. Để tạo dẫn xuất điện hóa acid trifluoroacetic (TFA), kali bromua (KBr) hoặc iốt có thể được sử dụng làm thuốc thử [93].

Tạo dẫn xuất sau cột (PCD) bao gồm quá trình brom hóa điện hóa được coi là phương pháp được sử dụng rộng rãi để phân tích AF. Dẫn xuất sau cột có thể đạt được bằng pyridinyl hydrobromid perbromid (PBPB) hoặc bằng pin điện hóa (KobraCell) trong đó KBr được thêm vào pha động. Để tăng cường đặc tính/phản ứng huỳnh quang của AF, PCD sử dụng iốt cũng có thể được coi là phương pháp phát hiện AF. Một nhược điểm lớn của PCD sử dụng iốt là khả năng tạo dẫn xuất của iốt liên tục giảm theo thời gian và do đó, độ nhạy của kỹ thuật cũng giảm đi song song và hóa chất mạnh KBr, cũng làm giảm tuổi thọ của thiết bị [93].

Việc tạo dẫn xuất hóa học của AFB1 và AFG1 thường được yêu cầu để cải thiện độ nhạy vì huỳnh quang tự nhiên của AFB1 và AFG1 có thể không đủ để đáp ứng giới hạn phát hiện cần thiết. Hình 1.2 mô tả các phản ứng tạo dẫn xuất của AFB1 với acid và halogen. Trong phản ứng đầu tiên, acid trifluoro acetic (TFA) thủy phân vòng furan thứ hai của AFB1 để tạo ra AFB2a có độ huỳnh quang cao, trong khi brom và iốt lần lượt được sử dụng làm thuốc thử hóa học trong phản ứng tạo dẫn xuất thứ hai và thứ ba. Khi các halogen này phản ứng với AFB1, chúng tạo ra các dẫn xuất AFB1 có tính huỳnh quang cao [1].



**Hình 1.2:** Nguyên tắc tạo dẫn xuất AFB1 phân tích trên đầu dò huỳnh quang với các dẫn xuất bao gồm: acid trifluoroacetic (TFA, 1), Brom (Br<sub>2</sub>, 2), Iốt (I<sub>2</sub>, 3) [1]

Ngoài ra, HPLC với đầu dò huỳnh quang (FD) cùng với chiếu xạ bằng tia cực tím (UV) 254 nm, đặc tính huỳnh quang của các thành phần AFB1 và AFG1 sẽ tăng độ nhạy tương đương với quá trình tạo dẫn xuất điện hóa, cũng được sử dụng trong phòng thí nghiệm để thay thế việc tạo dẫn xuất trước và sau cột. Thêm nữa, kỹ thuật HPLC-LIF, với huỳnh quang do laser gây ra (LIF) dựa trên phân tích ánh sáng huỳnh quang phát ra trong quá trình chiếu xạ laser. Ứng dụng của nó không phổ biến vì HPLC-FD là một kỹ thuật rẻ hơn và phù hợp để phát hiện aflatoxin [93].

Tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 7930:2008 áp dụng cho các nền mẫu ngũ cốc, quả có vỏ và sản phẩm của chúng trong phân tích AF. Theo đó, mẫu được chiết tách với hỗn hợp methanol và nước. Sau đó dịch chiết được lọc, pha loãng với nước, và sử dụng cột ái lực chứa kháng thể đặc hiệu đối với aflatoxin (B1, B2, G1, và G2). Các AF được phân tách, tinh chế và cô đặc trên cột sau khi được tách khỏi kháng thể với methanol. Hàm lượng AF được xác định bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) pha đảo và phát hiện bằng huỳnh quang và dẫn xuất sau cột với iod [125]. Ưu điểm: phương pháp định lượng chính xác hàm lượng tổng AF và từng AF trên nền mẫu cụ thể với hàm lượng AF lớn hơn 8 µg/kg. Nhược điểm: Phạm vi áp dụng không đáp ứng yêu cầu mức giới hạn cho phép nhiễm độc tố của QCVN 8-1:2011/BYT, phương pháp dùng dẫn xuất sau cột bằng Iod, tốn kém, phức tạp và độc hại.

Tiêu chuẩn quốc gia TCVN 9522:2012 được áp dụng cho phân tích AFB1 trong thực phẩm chế biến từ ngũ cốc dành cho trẻ nhỏ và trẻ sơ sinh. Phần mẫu thử được chiết bằng hỗn hợp methanol và nước. Dịch chiết được lọc, pha loãng với nước muối trong dung dịch đệm photphat (PBS) đến nồng độ dung môi quy định và đưa lên cột ái lực miễn dịch có chứa các kháng thể đặc hiệu với AFB1. Sau khi rửa giải khỏi cột, AFB1 được định lượng bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao pha đảo có dẫn xuất sau cột với brom hóa và đầu dò huỳnh quang. Việc tạo dẫn xuất sau cột được thực hiện bằng Brom, sinh ra từ phương pháp điện hóa hoặc bằng pyridinium hydrobromua perbromua (PBPB) [126]. Ưu điểm: Giới hạn phát hiện của AFB1 là 0,05 µg/kg, đáp ứng ML trong nền ngũ cốc cho trẻ dưới 36 tháng tuổi. Hạn chế: chỉ xác định AFB1, không định lượng các AFB2, AFG1 và AFG2, phương pháp dùng thêm hệ thống dẫn xuất sau cột, tốn kém, phức tạp và độc hại.

Tác giả Marl E. Benvenuti và cộng sự đã sử dụng phương pháp UPLC-FD để định lượng AF trên nền mẫu ngũ cốc. Mẫu được chiết bằng hỗn hợp MeOH/H<sub>2</sub>O (8/2), sau đó được làm sạch bằng cột ái lực miễn dịch, trước khi mẫu được tiêm vào hệ thống sắc ký [24]. Ưu điểm: Không sử dụng dẫn xuất trước và sau cột, không sử dụng thiết bị sắc ký lỏng ghép khối phổ đắt tiền, dung môi chiết thân thiện môi trường. Hạn chế: chỉ áp dụng nền ngũ cốc, giới hạn phát hiện tổng AF dưới 20 µg/kg, không đáp ứng giới hạn cho phép ML theo QCVN 8:1/2011/BYT.

Các bước chuẩn bị mẫu, xử lý mẫu và các kỹ thuật phân tích cũng như giới hạn định lượng, giới hạn phát hiện của một số nghiên cứu được công bố trong và ngoài nước ở trên về việc xác định AF trong các nền mẫu khác nhau được tóm tắt trong Bảng 1.5.

**Bảng 1.5:** Tóm tắt một số phương pháp phân tích aflatoxin ở trong và ngoài nước

<i>Tài liệu tham khảo</i>	<i>Chiết mẫu</i>	<i>Làm sạch</i>	<i>Điều kiện sắc ký</i>	<i>Thiết bị</i>	<i>Giới hạn phát hiện (<math>\mu\text{g}/\text{kg}</math>)</i>
TCVN 7930:2008 [125]	-Ngũ cốc, quả có vỏ -Chiết bằng MeOH/ H <sub>2</sub> O (7/3)	Qua cột IAC Dẫn xuất sau cột bằng Iod	Mp: MeOH/ACN / H <sub>2</sub> O (2/2/6)	HPLC-FD ( $\lambda_{\text{ex}} = 365$ nm; $\lambda_{\text{em}} =$ 435 nm)	8 (Total)
TCVN 9522:2012 [126]	-Ngũ cốc cho trẻ sơ sinh -Chiết bằng MeOH/ H <sub>2</sub> O (8/2)	Qua cột IAC Dẫn xuất sau cột bằng Pyridinium hydrobromua perbromua	Mp: MeOH / ACN / H <sub>2</sub> O (2 / 2 / 6)	HPLC-FD ( $\lambda_{\text{ex}} = 365$ nm; $\lambda_{\text{em}} =$ 435 nm)	0,05 (AFB1)
FSSAI [47]	-Đậu phộng, sản phẩm đậu phộng và ngũ cốc. -Chiết bằng chloroform	Qua cột chiết pha rắn SPE - Silicagel	N.A.	Sắc ký bản mỏng (TLC)	-



<i>Tài liệu tham khảo</i>	<i>Chiết mẫu</i>	<i>Làm sạch</i>	<i>Điều kiện sắc ký</i>	<i>Thiết bị</i>	<i>Giới hạn phát hiện (<math>\mu\text{g}/\text{kg}</math>)</i>
	-Bấp, hạt bông, đậu phộng, và bơ đậu phộng -Chiết MeOH/H <sub>2</sub> O (8/2)	Filters- Whatman No. 4	N.A	Elisa	-
	-Đối với sản phẩm đậu phộng và đậu phộng, ngũ cốc -Chiết bằng acetone /water (85/15); chloroform	Whatman filter paper No 4	N.A	Sắc ký cột qua đèn chiếu UV (Mini column)	-
	-Bấp, bột đậu phộng và bơ -Chiết bằng MeOH/ 0.1M HCl (4/1), chloroform, benzen	Qua cột chiết pha rắn SPE – Silicagel Dẫn xuất trước cột bằng Trifluoroacetic acid	Mp: MeOH / ACN / H <sub>2</sub> O (170 / 170 / 700)	HPLC-FD ( $\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$ ; $\lambda_{\text{em}} = 440 \text{ nm}$ )	0,3 (cho từng chất)

<i>Tài liệu tham khảo</i>	<i>Chiết mẫu</i>	<i>Làm sạch</i>	<i>Điều kiện sắc ký</i>	<i>Thiết bị</i>	<i>Giới hạn phát hiện (<math>\mu\text{g}/\text{kg}</math>)</i>
	-Gia vị, trà, cà phê, hạt nhục đậu khấu và gạo -Chiết MeOH/ H <sub>2</sub> O (7/3)	Qua cột IAC	Mp A: 10mM NH <sub>4</sub> OAc trong 0,1% HCOOH Mp B: MeOH /ACN (V/V 50:50) 0,1% HCOOH	LC-MS/MS	-
Marl E.Benvenuti và cộng sự [24]	-Ngũ cốc -Chiết bằng MeOH/ H <sub>2</sub> O (8/2)	Qua cột IAC	Mp: MeOH / ACN / H <sub>2</sub> O (64/ 18/ 18)	UPLC-FD ( $\lambda_{\text{ex}} = 365 \text{ nm}$ ; $\lambda_{\text{em}} = 455 \text{ nm}$ )	20 (Total)
Ouakhssase và cộng sự [103]	-Bắp -Chiết bằng ACN/MeOH (4/6) và hỗn hợp muối MgSO <sub>4</sub> và NaCl	Ly tâm-siêu lọc cellulose	Mp A: H <sub>2</sub> O Mp B: MeOH (5mM NH <sub>4</sub> OAc)	LC-MS/MS	0,16 (AFB1) 0,11 (AFB2) 0,36 (AFG1) 0,16 (AFG2)
Shencong Lv và cộng sự [80]	Đậu phộng và sản phẩm đậu phộng	Ly tâm-siêu lọc	Mp A: 0,2% HCOOH Mp B: ACN	LC-MS/MS	0,2 (AFB1)* 0,2 (AFB2)* 0,26 (AFG1)*

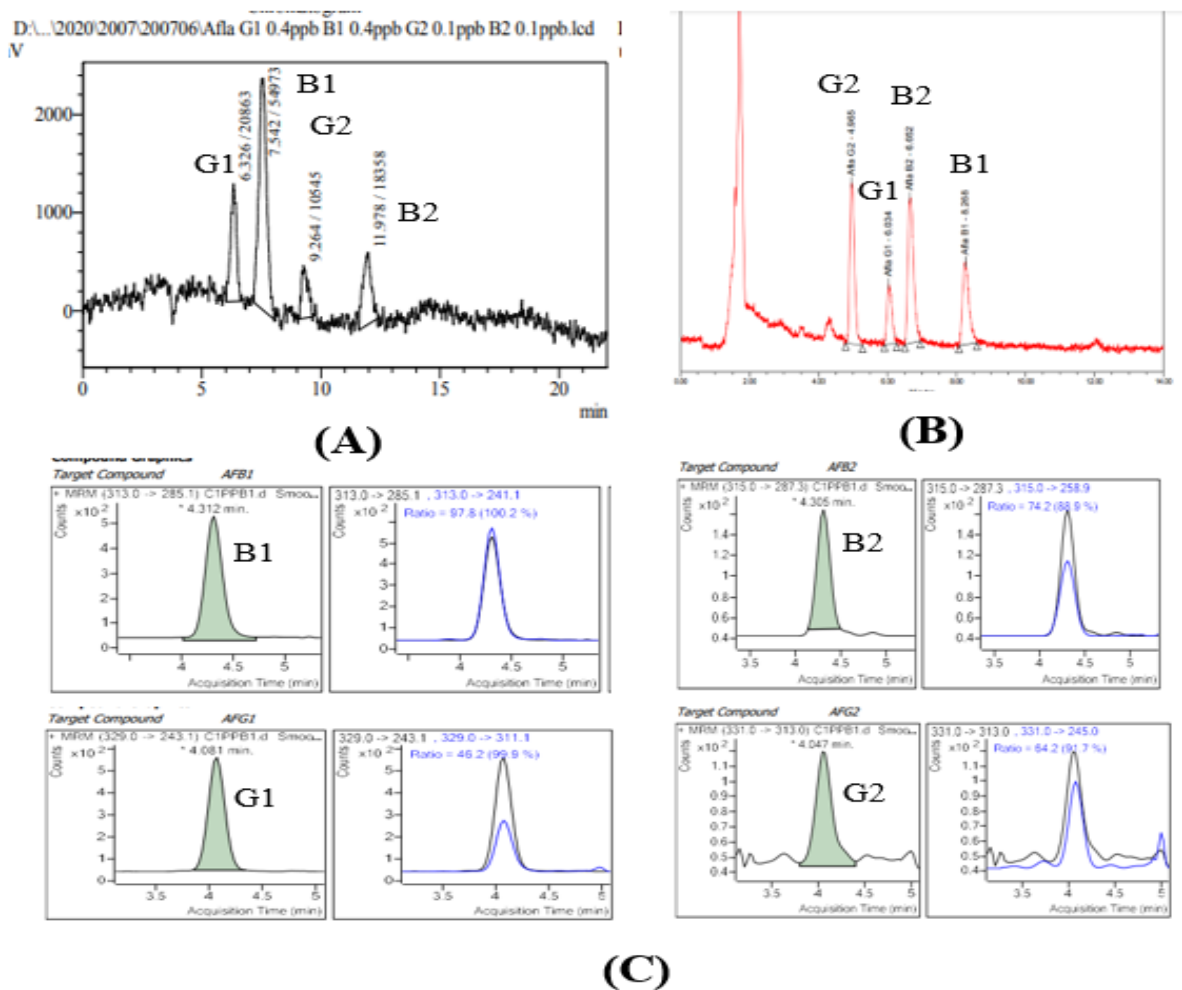
<i>Tài liệu tham khảo</i>	<i>Chiết mẫu</i>	<i>Làm sạch</i>	<i>Điều kiện sắc ký</i>	<i>Thiết bị</i>	<i>Giới hạn phát hiện (<math>\mu\text{g}/\text{kg}</math>)</i>
	Chiết bằng ACN/H <sub>2</sub> O/HCOOH (70/29/1)				0,26 (AFG2)*
Lê Trường Giang và cộng sự [74]	Hạt điều Chiết bằng MeOH/H <sub>2</sub> O (6/4)	Qua cột chiết pha rắn HLB	Mp A: H <sub>2</sub> O (10mM NH <sub>4</sub> OAc) Mp B: MeOH	UHPLC-HRMS	0,05 (AFB1) 0,05 (AFB2) 0,05 (AFG1) 0,1 (AFG2)

(\*): Giới hạn định lượng; Total: Tổng hàm lượng của 4 loại AF

Mp: Pha động; N.A: Không đề cập;  $\lambda_{\text{ex}}$ : bước sóng kích thích;  $\lambda_{\text{em}}$ : bước sóng phát xạ

❖ So sánh các kỹ thuật phân tích khác nhau

Hai kỹ thuật HPLC-FD với tạo dẫn xuất trước cột bằng acid trifluoroacetic (ISO 16050:2011) [41; 97] và LC-MS/MS (FDA) [77; 97] đã được chọn để so sánh với UPLC-FD không tạo dẫn xuất. Tiêu chí đánh giá dựa trên giới hạn phát hiện của thiết bị ở cùng nồng độ chuẩn. Chọn tổng AF nồng độ 1  $\mu\text{g/L}$  (lần lượt là 0,4; 0,1; 0,4; 0,1 đối với AFB1, AFB2, AFG1, AFG2). Hình 1.3 thể hiện sắc ký đồ của AFB1, AFB2, AFG1 và AFG2 thu được bằng ba kỹ thuật khác nhau.



**Hình 1.3:** Sắc ký của dung dịch chuẩn aflatoxin (1  $\mu\text{g/L}$ ) được tiêm với ba phương pháp khác nhau: (A) HPLC-FD có tạo dẫn xuất trước cột; (B) UPLC-FD không tạo dẫn xuất; và (C) LC/MS/MS [97]

Hình dạng sắc ký đồ thu được bằng HPLC-FD (Hình 1.3 A) cho thấy đường nền cao hơn so với UPLC-FD, mặc dù 20  $\mu\text{l}$  mẫu đã được tiêm. Thứ tự thời gian lưu

của Aflatoxin B1, B2, G1, G2 cũng khác nhau giữa HPLC-FD và UPLC-FD (hoặc LC/MS/MS) (Hình 1.3 B, C) do aflatoxin được dẫn xuất hoặc không dẫn xuất. Sắc ký đồ của kỹ thuật UPLC-FD cũng cho thấy các pic sắc nét và cường độ cao so với các kỹ thuật khác. Việc tách các pic trong HPLC và UPLC tốt hơn LC.

UPLC dựa trên nguyên tắc kích thước hạt của pha tĩnh nhỏ hơn 2  $\mu\text{m}$  và đôi với HPLC thường từ 3 đến 5  $\mu\text{m}$ . Kích thước hạt tác động đáng kể đến khuếch tán, các phân tử chất phân tích thực hiện dễ chuyển từ pha động sang bề mặt của hạt và xung quanh các hạt mất ít thời gian hơn khi kích thước hạt giảm. Các hạt lớn hơn khiến các phân tử chất phân tích di chuyển dài hơn, theo những con đường gián tiếp hơn [97; 123]. Trong nghiên cứu này, cột UPLC BEH C18 với các hạt 1,7  $\mu\text{m}$ ; Cột HPLC-MS C18 với các hạt 5  $\mu\text{m}$ ; và cột HPLC C18 với các hạt 5  $\mu\text{m}$ . Việc chọn UPLC với cột BEH C18 giúp giảm đáng kể thời gian phân tích cũng như mức tiêu thụ dung môi.

**Bảng 1.6:** So sánh giới hạn phát hiện thiết bị (iDL) được tính toán từ ba kỹ thuật

Nồng độ AF ( $\mu\text{g/L}$ )		HPLC-FD (dẫn xuất)			UPLC-FD (không dẫn xuất)			LC/MS/MS (không dẫn xuất)		
		RT (min)	S/N (n=3)	iDL ( $\mu\text{g/L}$ )	RT (min)	S/N (n=3)	iDL ( $\mu\text{g/L}$ )	RT (min)	S/N (n=3)	iDL ( $\mu\text{g/L}$ )
AFB1	0,4	7,41	17	0,071	8,261	16	0,075	4,312	4	0,300
AFB2	0,1	11,61	4	0,075	6,675	30	0,010	4,306	6	0,050
AFG1	0,4	6,24	10	0,120	6,055	13	0,092	4,061	5	0,240
AFG2	0,1	9,09	3	0,100	4,977	39	0,008	4,047	6	0,050

*Ghi chú:  $iDL=3*C_{min}/(S/N)$*

Giới hạn phát hiện thiết bị (iDL) của AFB1, AFB2, AFG1 và AFG2 đạt được của UPLC-FD nằm trong khoảng 0,008 – 0,092  $\mu\text{g/L}$ , thấp hơn so với LC-MS/MS (trong khoảng kỹ thuật 0,05 – 0,24  $\mu\text{g/L}$ ) và HPLC-FD (trong khoảng 0,071 – 0,12  $\mu\text{g/L}$ ) (Bảng 1.6), Dựa trên IDL, thể tích tiêm, dòng pha động và sự phân tách các

pic, kỹ thuật UPLC-FD cho thấy nhiều ưu điểm hơn so với kỹ thuật HPLC-FD và LC/MS/MS.

**❖ Tổng kết lại, các phương pháp phân tích aflatoxin của các tác giả trong và ngoài nước có những ưu điểm và hạn chế sau:**

Đối với các phương pháp sử dụng sắc ký bản mỏng TLC, cột mini column, kit Elisa thường dùng định tính tổng hàm lượng aflatoxin (B1, B2, G1 và 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 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.

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 của Bộ y tế và các nước trên thế giới. Tuy nhiên, các phương pháp trên sử dụng dung môi ly trích như chloroform, benzen và sử dụng các dẫn xuất sau cột và trước cột độc hại và gây ảnh hưởng môi trường.

**❖ 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 ốt, 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 ốt, 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 ốt, 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 ốt, nho khô và bắp hạt.

– 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 (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 ốt, nho khô và bắp hạt.

### 2.2. Hoá chất và trang thiết bị 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 phát 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 C<sub>0</sub> (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 (CTG<sub>1</sub>, 500  $\mu\text{g/L}$ ) được pha bằng cách lấy chính xác 1 mL dung dịch C<sub>0</sub> vào bình định mức 10 mL và pha loãng đến vạch bằng ACN. Tiếp theo, chuẩn trung gian 2 (CTG<sub>2</sub>, 50  $\mu\text{g/L}$ ) được chuẩn bị bằng cách lấy 1 mL CTG<sub>1</sub> vào bình định mức 10 mL, sau đó pha loãng bằng dung dịch 0,2% HCOOH/ACN (1:1) và chuẩn trung gian 3 (CTG<sub>3</sub>, 10  $\mu\text{g/L}$ ) được pha bằng cách lấy 1 mL CTG<sub>2</sub> 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 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  $\mu\text{L}$ ) được trình bày trong Bảng 2.1:

**Bảng 2.1:** Các dung dịch chuẩn làm việc của aflatoxin (B1, B2, G1 và G2)

Chuẩn	C <sub>01</sub>	C <sub>02</sub>	C <sub>03</sub>	C <sub>04</sub>	C <sub>05</sub>
Nồng độ chuẩn trung gian C <sub>TG</sub> ( $\mu\text{g/L}$ )	10,0	50,0	50,0	50,0	50,0
Thể tích V <sub>CTG</sub> thêm ( $\mu\text{L}$ )	50	100	200	400	1000
Thể tích V <sub>ACN/HCOOH 0,2%</sub> thêm ( $\mu\text{L}$ )	950	900	800	600	0
Nồng độ chuẩn làm việc ( $\mu\text{g/L}$ )	0,50	5,0	10,0	20,0	50,0
Nồng độ chuẩn AFB1/AFB2/AFG1/AFG2 ( $\mu\text{g/L}$ )	AFB1: 0,20 AFB2: 0,05 AFG1: 0,20 AFG2: 0,05	AFB1: 2,0 AFB2: 0,50 AFG1: 2,0 AFG2: 0,50	AFB1: 4,0 AFB2: 1,0 AFG1: 4,0 AFG2: 1,0	AFB1: 8,0 AFB2: 2,0 AFG1: 8,0 AFG2: 2,0	AFB1: 20,0 AFB2: 5,0 AFG1: 20,0 AFG2: 5,0

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 H<sub>2</sub>O 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 H<sub>2</sub>O 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/H<sub>2</sub>O (6/4, v/v): Lấy 600 mL ACN vào bình định mức 1000 mL, thêm H<sub>2</sub>O đến vạch, lắc đều và siêu âm trong 5 phút.
- Dung dịch MeOH/H<sub>2</sub>O (8/2, v/v): Lấy 800 mL MeOH vào bình định mức 1000 mL, thêm H<sub>2</sub>O 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.

+ Bơm 4 kênh: là một trong những thành phần quan trọng của hệ thống UPLC, có khả năng điều chỉnh tỷ lệ pha động với nhiều dung môi khác nhau. Bơm này có thể phối hợp tối đa 4 dung môi khác nhau để tạo ra các gradient pha động, giúp kiểm soát tốt hơn quá trình tách sắc ký. Bơm 4 kênh có khả năng cung cấp áp suất rất cao (lên đến 15,000 psi hoặc cao hơn) để thực hiện các phép tách sắc ký trên cột có độ phân giải rất cao [16].

+ Bơm mẫu tự động FTN (Flow Through Needle): sử dụng một kim tiêm có khả năng truyền mẫu trực tiếp vào dòng pha động sắc ký một cách chính xác và tự động. Kim tiêm này được thiết kế sao cho mẫu sẽ được hút từ lọ vào kim tiêm và sau đó được tiêm vào dòng chảy qua cột sắc ký, với thể tích tiêm từ 0,1 – 10  $\mu$ l [16]

+ Đầu dò huỳnh quang (FD - Fluorescence Detector): hoạt động dựa trên khả năng của các phân tử huỳnh quang như AF, hấp thụ ánh sáng ở bước sóng kích thích (excitation wavelength) và phát xạ ánh sáng ở bước sóng dài hơn (emission wavelength) [16]. Quá trình này diễn ra qua hai giai đoạn:

- Giai đoạn kích thích (Excitation -  $E_x$ ): là quá trình trong đó các phân tử huỳnh quang hấp thụ năng lượng từ một nguồn sáng có bước sóng xác định, làm cho chúng chuyển từ trạng thái cơ bản lên trạng thái kích thích. Nguồn sáng đèn xenon phát ra ánh sáng có bước sóng kích thích phù hợp. Bước sóng kích thích được chọn lọc thông qua các bộ lọc quang học hoặc máy đơn sắc để đảm bảo chỉ một dải hẹp của quang phổ đi qua. Khi ánh sáng kích thích chiếu vào mẫu, các phân tử huỳnh quang hấp thụ năng lượng và chuyển lên mức năng lượng cao hơn, chuẩn bị cho giai đoạn phát xạ.

- Giai đoạn phát xạ (Emission- Em): là quá trình trong đó các phân tử huỳnh quang, sau khi hấp thụ năng lượng ở giai đoạn kích thích, các phân tử huỳnh quang không thể duy trì trạng thái năng lượng cao và sẽ nhanh chóng giải phóng năng lượng dư thừa để quay về trạng thái cơ bản. Năng lượng dư thừa này được phát ra dưới dạng ánh sáng có bước sóng dài hơn. Ánh sáng phát xạ đi qua bộ lọc quang học hoặc máy đơn sắc để loại bỏ ánh sáng kích thích còn lại. Sau đó, nó được đầu dò quang điện thu nhận và chuyển đổi thành tín hiệu điện để phân tích và định lượng chất huỳnh quang có trong mẫu.

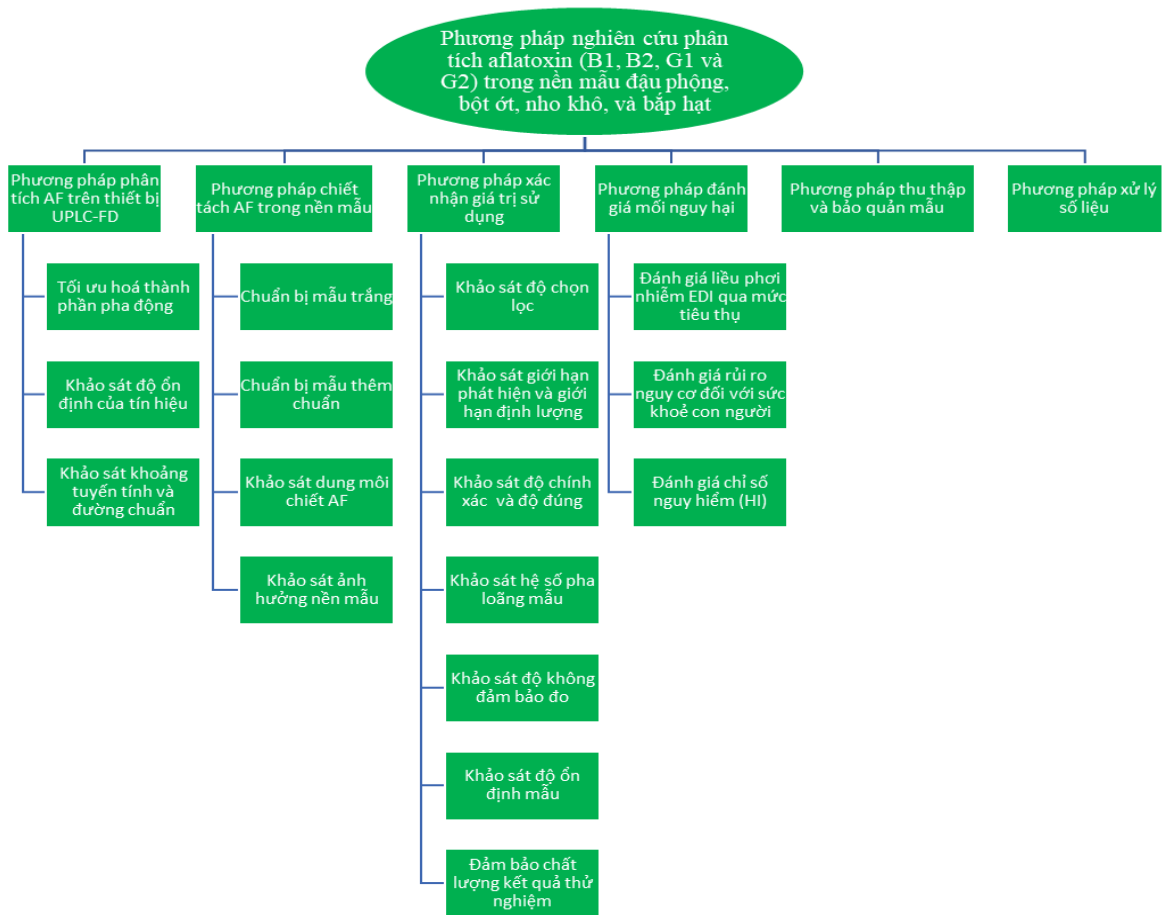
+ Cột BEH C18 (150\*2,1 mm; 1,7  $\mu$ m) tương thích hệ thống UPLC, sử dụng pha tĩnh C18 phổ biến trong sắc ký lỏng đảo pha, chiều dài cột 150 mm, đường kính trong 2,1 mm và kích thước hạt nhỏ (1,7  $\mu$ m) giúp tăng diện tích bề mặt và hiệu suất phân tách cao và thời gian phân tích nhanh hơn, thích hợp phân tích các hợp chất ít phân cực cho đến không phân cực.

- 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  $\mu$ L; 100-1000  $\mu$ 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 0,22  $\mu$ m, đường kính 13 mm.

### 2.3. Phương pháp nghiên cứu

Để đánh giá mức độ ô nhiễm aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) trong các nền mẫu thực phẩm gồm đậu phộng, bột ớt, nho khô và bắp hạt, phương pháp nghiên cứu được thiết kế theo sơ đồ Hình 2.1. Thiết kế này bao gồm các bước từ thu thập, bảo quản mẫu đến phân tích định lượng bằng thiết bị hiện đại, nhằm đảm bảo độ chính xác và tin cậy cao. Cụ thể, nghiên cứu sử dụng phương pháp phân tích AF trên thiết bị sắc ký lỏng siêu hiệu năng đầu dò huỳnh quang UPLC-FD, kết hợp với quy trình chiết tách phù hợp với từng loại nền mẫu. Đồng thời, các phương pháp xác nhận giá trị sử

dụng, đánh giá môi nguy hại, xử lý số liệu được thực hiện để đảm bảo tính khoa học và độ tin cậy của kết quả nghiên cứu.



**Hình 2.1:** Sơ đồ bố trí thí nghiệm phương pháp nghiên cứu aflatoxin trong thực phẩm

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

Trong nghiên cứu này, phương pháp sắc ký được xây dựng dựa trên tham khảo từ tài liệu của Marl E. Benvenuti và cộng sự [24]. Cụ thể, pha động được sử dụng có thành phần H<sub>2</sub>O/ACN/MeOH với tỷ lệ 64/18/18, cột sắc ký BEH C18 (150 × 2,1 mm; 1,7 μm), 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.

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.

### 2.3.1.1. Tối ưu hoá thành phần pha động

Thành phần pha động rất quan trọng vì nó ảnh hưởng đến tín hiệu pic và thời gian lưu giữ của chất phân tích [35]. Ngoài ra, HCOOH là một thành phần hỗ trợ phổ biến của pha động khi sử dụng phân tách sắc ký lỏng pha đảo. Trong một số trường hợp, nồng độ HCOOH thấp được thêm vào trong pha động giúp cải thiện hình dạng đỉnh của sự phân tách các pic tạo thành [127].

Dựa trên các nghiên cứu đã công bố [24; 47; 72; 126], nghiên cứu này khảo sát 2 điều kiện pha động bao gồm H<sub>2</sub>O/ACN/MeOH (56/22/22), H<sub>2</sub>O/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 µg/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%. Mỗi điều kiện pha động được thực hiện lặp lại 3 lần để đảm bảo tính chính xác và tái lập của kết quả.

Tiêu chí lựa chọn điều kiện pha động tối ưu dựa trên:

- Độ phân giải ( $R_s$ ): Đạt yêu cầu  $R_s \geq 1,5$  để đảm bảo khả năng tách biệt hoàn toàn giữa các pic đại diện cho aflatoxin [40; 119; 127].
- Hệ số kéo đuôi ( $T_f$ ): Nằm trong khoảng  $0,8 \leq T_f \leq 1,5$  để đảm bảo hình dạng pic sắc nét và đối xứng, hỗ trợ tăng độ chính xác trong định lượng [40; 119; 127].

### 2.3.1.2. Khảo sát độ ổn định của tín hiệu phân tích aflatoxin (B1, B2, G1 và G2)

Trong nghiên cứu này, dung dịch chuẩn AF nồng độ 12,5 µg/L được tiêm lặp lại 6 lần. Qui trình phân tích đạt tính tương thích hệ thống khi độ lặp lại ( $RSD_r$ ) thời gian lưu và diện tích pic không quá 2%, độ phân giải  $R_s \geq 1,5$  và hệ số kéo đuôi  $0,8 \leq T_f \leq 1,5$  [127].

### 2.3.1.3. *Khảo sát khoảng tuyến tính và đường chuẩn*

Khoảng tuyến tính của một phương pháp phân tích là khoảng nồng độ ở đó có sự phụ thuộc tuyến tính giữa tín hiệu đo được và nồng độ chất phân tích. Trong nghiên cứu này, khoảng tuyến tính được đánh giá dựa trên việc xây dựng đường chuẩn của từng AF.

#### Cách xác định:

Đường chuẩn được xây dựng trên dung dịch với 5 điểm chuẩn tương ứng với các nồng độ: 0,5; 5,0; 10,0; 20,0; 50,0  $\mu\text{g/L}$  chuẩn AF (xem Bảng 2.1).

Tiêu chí chấp nhận: Đường chuẩn có  $0,99 \leq R^2 \leq 1$ , trong đó  $R^2$  là hệ số tương quan bình phương [61]

Nồng độ tính toán được trên từng điểm chuẩn không lệch quá 15% so với giá trị thực, ngoại trừ nồng độ tại điểm MQL không vượt quá 20% [61].

### 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 bao gồm các bước chính: đồng nhất mẫu, chiết tách AF bằng hỗn hợp dung môi hữu cơ (methanol hoặc acetonitril) và tinh sạch bằng phương pháp sắc ký ái lực miễn dịch (immunoaffinity chromatography). Tiếp theo, các hợp chất AF được định lượng bằng kỹ thuật sắc ký lỏng siêu hiệu năng kết hợp đầu dò huỳnh quang (UPLC-FD).

Hiệu quả của phương pháp chiết tách được đánh giá dựa trên các tiêu chí như hiệu suất thu hồi và độ chính xác trong phân tích.

#### 2.3.2.1. *Chuẩn bị mẫu trắng đậu phộng, bột ớt, nho khô, và bắp hạt*

Mẫu đậu phộng, bột ớt, nho khô và bắp hạt được phân tích theo phương pháp sử dụng dẫn xuất acid trifluoroacetic và xác định trên thiết bị sắc ký lỏng đầu dò huỳnh quang (theo phương pháp HPLC – FD đã được công nhận ISO 17025). Kết quả không phát hiện với giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của phương pháp lần lượt MDL = 0,1  $\mu\text{g/kg}$  và MQL = 0,3  $\mu\text{g/kg}$ . Mẫu này được sử dụng làm mẫu trắng trong suốt quá trình chiết mẫu và xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp.

### 2.3.2.2. Chuẩn bị mẫu thêm chuẩn cho quá trình chiết aflatoxin (B1, B2, G1 và G2)

Mẫu được thêm chuẩn tại 3 mức nồng độ bằng cách lấy thể tích cần thiết của dung dịch chuẩn trung gian vào 5 g mẫu trắng theo Bảng 2.2.

**Bảng 2.2:** Chuẩn bị mẫu thêm chuẩn cho quá trình chiết aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) trong mẫu đậu phộng, bột ớt, nho khô và bắp hạt

Mức nồng độ	Nồng độ từng AF tương ứng (B1/B2/G1/G2, $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Thể tích thêm chuẩn ( $\mu\text{L}$ )	Nồng độ chuẩn AF ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Khối lượng mẫu (g)
Nền đậu phộng và bắp hạt thêm chuẩn tại nồng độ ML; 5xML và 10xML				
ML	2 / 0,5 / 2 / 0,5	50	0,5	5
5xML	10 / 2,5 / 10 / 2,5	25	5	5
10xML	20 / 5 / 20 / 5	50	5	5
Nền bột ớt và nho khô thêm chuẩn tại nồng độ ML; 5xML và 10xML				
ML	5 / 1,25 / 5 / 1,25	125	0,5	5
5xML	25 / 6,25 / 25 / 6,25	62,5	5	5
10xML	50 / 12,5 / 50 / 12,5	125	5	5

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

Giai đoạn chiết mẫu: Aflatoxin hòa tan tốt trong dung môi phân cực và nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng quá trình chiết AF hiệu quả đạt được khi sử dụng hỗn hợp dung môi ACN/H<sub>2</sub>O hoặc MeOH/H<sub>2</sub>O [6; 18; 47; 80; 131]. Trong nghiên cứu này, thực hiện khảo sát 2 hỗn hợp dung môi MeOH/H<sub>2</sub>O (8/2) và ACN/H<sub>2</sub>O (6/4) để chiết AF trong các nền mẫu đậu phộng, bột ớt, nho khô và bắp hạt.

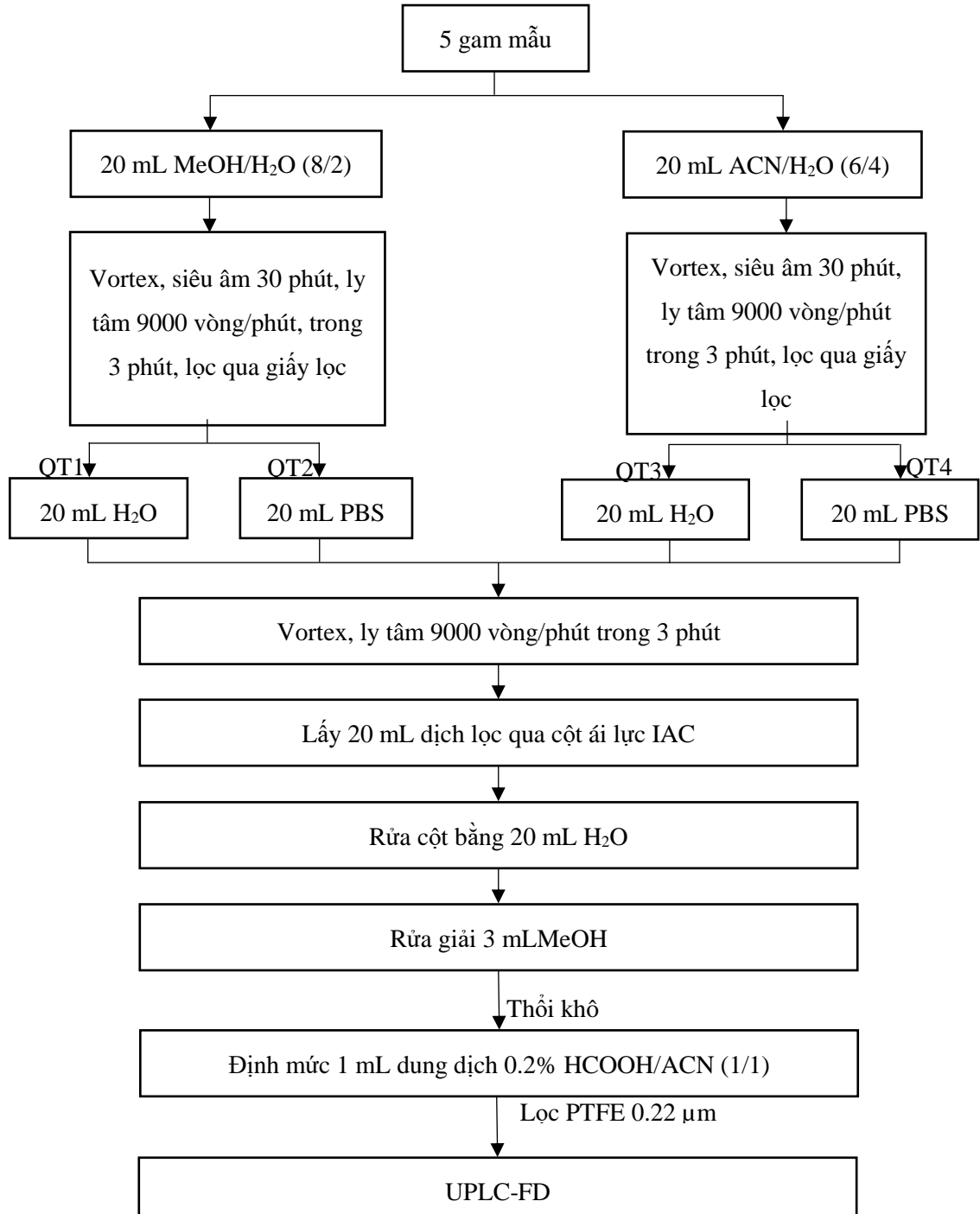
Giai đoạn làm sạch mẫu: được thực hiện bằng cách sử dụng cột ái lực miễn dịch (IAC), đây là kỹ thuật làm sạch đặc trưng và hiệu quả trong quy trình chiết tách AF [6; 18; 47; 80; 131]. Trong nghiên cứu này, cột IAC được lựa chọn với các thông số kỹ thuật như tốc độ dòng chảy 1–3 mL/phút, thể tích cột 3 mL và mức nhiễm chéo chất khác < 0,01%. Cột IAC chứa các kháng thể đơn dòng aflatoxin B1, B2, G1, G2 cố định trên bề mặt rắn, có khả năng liên kết đặc hiệu với AF.



Theo hướng dẫn sử dụng từ nhà sản xuất (Vicam), dung dịch chiết phải được pha loãng trước khi qua cột IAC để đảm bảo tỷ lệ dung môi trong dung dịch không vượt quá 5% đối với ACN và 20% đối với MeOH. Trong nghiên cứu này, hai loại dung dịch pha loãng trước khi qua cột IAC được khảo sát gồm: dung dịch đệm phot phát (PBS) và H<sub>2</sub>O.

Cách thực hiện: Mẫu trắng được thêm chuẩn AF ở 3 mức nồng độ ML, 5xML và 10xML (ML là giới hạn cho phép AFB<sub>1</sub> trong mẫu theo QCVN 8-1:2011/BYT) (xem Bảng 2.2) để khảo sát qui trình chiết AF được trình bày ở Hình 2.2. Các yếu tố khảo sát bao gồm: dung môi chiết (MeOH/H<sub>2</sub>O (8/2) và ACN/H<sub>2</sub>O (6/4) ) và dung dịch pha loãng trước khi qua cột IAC (đệm PBS và H<sub>2</sub>O). Như vậy, có tổng cộng là 4 qui trình chiết QT1, QT2, QT3 và QT4. Thực hiện 6 thí nghiệm/nền mẫu/tỉ lệ dung môi/nồng độ, tương ứng 72 thí nghiệm/nền mẫu/cách chiết/3 nồng độ.

Dựa vào các tài liệu tham khảo qui trình chiết tách AF [6; 18; 47; 80; 131], qui trình chiết mẫu dự kiến được trình bày ở Hình 2.2 bao gồm cân mẫu, thêm dung môi chiết mẫu, làm sạch mẫu bằng cột IAC, rửa giải, thổi khô, định mức mẫu, qua màng lọc trước khi mẫu được tiêm vào thiết bị UPLC-FD.



**Hình 2.2:** Lưu đồ qui trình chiết dự kiến AF trong nền mẫu đậu phộng bột ớt, nho khô và bắp hạt

Hiệu quả chiết của qui trình được đánh giá bằng hiệu suất thu hồi và độ lặp lại. Tiêu chí lựa chọn cho hiệu suất chiết phải cao nhất trong khoảng 70-120% và độ lặp lại RSDr trên nền mẫu không quá 20% theo phụ lục F- AOAC 2019 [14].

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

Độ ảnh hưởng nền mẫu (ME) là hiện tượng xảy ra khi các thành phần trong nền mẫu gây cản trở hoặc ảnh hưởng đến tín hiệu của chất phân tích, từ đó dẫn đến sai lệch trong kết quả định lượng [32]. Để đánh giá mức độ ảnh hưởng này, đường chuẩn trong dung môi và trên các nền mẫu đậu phộng, bột ớt, nho khô và bắp hạt được xây dựng.

Đường chuẩn trong dung môi được thiết lập chi tiết tại Bảng 2.1. Các đường chuẩn trên nền mẫu được xây dựng bằng cách thêm chuẩn AF vào các nền mẫu, sau đó thực hiện qui trình chiết tách và làm sạch như mô tả.

Độ ảnh hưởng nền mẫu được định lượng thông qua phần trăm giá trị tuyệt đối  $|ME (%)|$ , được tính toán dựa trên hệ số góc của phương trình đường chuẩn trong nền mẫu so với đường chuẩn trong dung môi [32].

$$|ME (%)| = \left( \frac{\text{hệ số góc của đường chuẩn trong nền mẫu}}{\text{hệ số góc của đường chuẩn trong dung môi}} - 1 \right) \times 100$$

Độ ảnh hưởng nền mẫu không ảnh hưởng:  $|ME (%)| < 20\%$

Độ ảnh hưởng nền mẫu ảnh hưởng mức trung bình:  $|ME (%)| = 20\% - 50\%$

Độ ảnh hưởng nền mẫu ảnh hưởng:  $|ME (%)| > 50\%$ .

**Bảng 2.3:** Đường chuẩn trên nền mẫu đậu phộng, bột ớt, nho khô và bắp hạt

Chuẩn	C <sub>01</sub>	C <sub>02</sub>	C <sub>03</sub>	C <sub>04</sub>	C <sub>05</sub>
Nồng độ chuẩn AF (µg/L)	50	500	500	500	5000
Thể tích thêm chuẩn (µL)	50	50	100	200	50
Khối lượng mẫu (g)	5	5	5	5	5
Nồng độ chuẩn trên mẫu (µg/kg)	0,5	5	10	20	50

### **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 ớt, 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 ớt, 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 chính xác (độ đúng và độ chụm), độ pha loãng mẫu, độ ổn định mẫu, độ không đảm bảo đo và đảm bảo kết quả phân tích để 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. Các bước nghiên cứu cụ thể để xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp phân tích như sau:

#### **2.3.3.1. Khảo sát độ chọn lọc**

Độ chọn lọc là một đặc tính quan trọng trong phân tích hóa học, thể hiện khả năng của phương pháp phân tích trong việc phân biệt và xác định chính xác chất phân tích cụ thể trong sự hiện diện của các chất khác, chẳng hạn như tạp chất, thành phần nền mẫu hoặc các chất đồng phân [61].

Để đánh giá độ chọn lọc, nghiên cứu được tiến hành chuẩn bị một mẫu trắng và một mẫu thêm chuẩn AF tại mức giới hạn định lượng. Các mẫu này được xử lý theo qui trình phân tích đã được trình bày tóm tắt mục 3.2.1. Mỗi mẫu được tiêm vào hệ thống sắc ký một lần để thu thập tín hiệu. So sánh tín hiệu diện tích pic thu được giữa mẫu trắng và mẫu thêm chuẩn.

Độ chọn lọc được đánh giá dựa trên tiêu chí chấp nhận sau: không xuất hiện các pic tương ứng trong mẫu trắng tại thời gian lưu đã được xác định của AF [45].

#### **2.3.3.2. Khảo sát giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của phương pháp**

Giới hạn phát hiện (MDL) là nồng độ thấp nhất của chất phân tích trong mẫu ( $C_{min}$ ) có thể phát hiện được nhưng chưa thể định lượng được [61].

Cách thực hiện: Mẫu trắng được thêm chuẩn AF ở nồng độ 0,25  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (nồng độ AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 tương ứng 0,1; 0,025; 0,1; 0,025  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) bằng cách

thêm 25  $\mu\text{L}$  chuẩn  $C_{\text{TG2}} = 50 \mu\text{g/L}$  vào 5 gam mẫu và được xử lý theo qui trình chiết mẫu được tóm tắt mục 3.2.1.

Mẫu được phân tích lặp lại 6 lần và xác định tỷ lệ tín hiệu chia cho nhiễu nền (signal to noise ratio), trong đó S là chiều cao tín hiệu của chất phân tích và N là nhiễu đường nền.

Cách xác định MDL theo công thức:  $\text{MDL}_{\text{tính toán}} = \frac{3 \times C_{\text{min}}}{S/N}$

Giới hạn phát hiện được chấp nhận tại nồng độ mà tại đó tín hiệu lớn gấp 2-3 lần nhiễu đường nền. Tiêu chí chấp nhận  $3 \leq S/N \leq 10$  [61]

Giới hạn định lượng (MQL) là nồng độ tối thiểu của một chất có trong mẫu thử mà phương pháp có thể định lượng đạt được độ chính xác và độ đúng chấp nhận được [61].

Cách xác định MQL: Mẫu trắng được thêm chuẩn AF ở nồng độ 0,75  $\mu\text{g/kg}$  (nồng độ AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 tương ứng 0,3; 0,075; 0,3; 0,075  $\mu\text{g/kg}$ ) bằng cách thêm 75  $\mu\text{L}$  chuẩn  $C_{\text{TG2}} = 50 \mu\text{g/L}$  vào 5 gam mẫu và được xử lý mẫu theo qui trình chiết mẫu ở mục 3.2.1.

Mẫu được phân tích lặp lại 12 lần. Tính toán hiệu suất thu hồi, độ tái lặp. Tiêu chí chấp nhận MQL phải đạt được độ chính xác (độ tái lặp đạt được  $\leq 20\%$ ) và độ đúng (hiệu suất thu hồi đạt trong khoảng 70 – 120%), theo quy định của SANTE/12682/2019 và Phụ lục F của AOAC 2019 [14; 113]

*2.3.3.3. Khảo sát độ chụm (độ lặp lại  $RSD_r$  và độ tái lặp  $RSD_R$ ) và độ đúng của phương pháp*

Độ lặp lại ( $RSD_r$ ) là mức độ gần nhau của các kết quả thu được khi cùng một mẫu được phân tích nhiều lần trong cùng điều kiện thí nghiệm, cùng thiết bị, cùng người thực hiện nhằm đánh giá tính ổn định của phương pháp phân tích trong cùng điều kiện thực hiện [61].

Cách xác định  $RSD_r$ : Mẫu trắng được thêm chuẩn AF tại 3 mức nồng độ ML, 5xML, 10xML (xem Bảng 2.2), tương ứng nồng độ AFB1 trong mẫu lần lượt:

Nền đậu phộng và nền bắp hạt: 2 µg/kg, 10 µg/kg và 20 µg/kg

Nền bột ốt và nền nho khô: 5 µg/kg, 25 µg/kg và 50 µg/kg

Mẫu được xử lý theo qui trình chiết mẫu được tóm tắt mục 3.2.1

Mỗi mức nồng độ được thực hiện 6 lần thí nghiệm. Tính độ lệch chuẩn SD và độ lệch chuẩn tương đối  $RSD_r$  tại các mức nồng độ thêm vào theo công thức

$$SD = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{k=1}^n (x_k - \bar{x})^2}$$

$$\% RSD_r = \% CV = \frac{100 \times SD}{\bar{x}}$$

$\bar{x}$  : Nồng độ trung bình các thí nghiệm

Độ tái lặp ( $RSD_R$ ) là mức độ gần nhau của các kết quả thu được khi cùng một mẫu được phân tích trong các điều kiện khác nhau, bao gồm thiết bị khác, phòng thí nghiệm khác, ngày thực hiện khác hoặc người thực hiện khác nhằm đánh giá tính ổn định của phương pháp phân tích trong điều kiện thực hiện khác nhau [61].

Cách xác định  $RSD_R$ : Mẫu trắng được thêm chuẩn AF tại 3 mức nồng độ tương tự như độ lặp lại, được thực hiện 1 ngày khác so với ngày thực hiện độ lặp lại.

Tiêu chí đánh giá độ chính xác qua 2 thông số độ lặp lại  $RSD_r$  (%) và độ tái lặp  $RSD_R$  (%) theo từng mức nồng độ ở phụ lục F – AOAC 2019 [14]

Độ đúng (hiệu suất thu hồi - recovery) biểu thị mức độ gần nhau giữa giá trị thu được từ phân tích và giá trị thực [61], bằng cách xác định mẫu trắng được thêm chuẩn AF tại 3 mức nồng độ tương tự như độ lặp lại và độ tái lặp, tính độ đúng theo công thức sau đây:

$$\text{Recovery (\%)} = C_{tt} \times 100 / C_{lt}$$

$C_{lt}$ : là nồng độ thêm chuẩn vào mẫu

$C_{tt}$ : là nồng độ thực tế thu được

Tiêu chí đánh giá độ đúng theo từng mức nồng độ ở phụ lục F – AOAC 2019 [14]

#### 2.3.3.4. Khảo sát hệ số pha loãng mẫu

Hệ số pha loãng là một tiêu chí đánh giá khả năng của phương pháp phân tích khi mẫu được pha loãng để đánh giá độ chụm và độ đúng sau khi pha loãng mẫu [61].

Cách xác định: Mẫu trắng được thêm chuẩn AF ở nồng độ cao bằng cách thêm 125  $\mu\text{L}$  chuẩn nồng độ 5000  $\mu\text{g/L}$  vào 5 gam mẫu, tương ứng nồng độ thêm vào trên mẫu là 125  $\mu\text{g/kg}$ . Mẫu được xử lý theo qui trình chiết mẫu được tóm tắt mục 3.2.1, sau đó mẫu được pha loãng bằng dung dịch 0,2%  $\text{HCOOH/ACN}$  với 5 hệ số pha loãng  $f = 5; 10; 20; 50;$  và 100 trước khi tiêm mẫu vào hệ thống UPLC-FD.

Tiêu chí chấp nhận recovery và  $\text{RSD}_R$  theo từng mức nồng độ ở phụ lục F – AOAC 2019 [14]

#### 2.3.3.5. Khảo sát độ không đảm bảo đo

Độ không đảm bảo của phép đo (uncertainty in measurement –  $U$ ) là thông số gắn với kết quả của phép đo, thông số này đại diện cho độ phân tán của kết quả.

Cách xác định độ không đảm bảo đo dựa vào kết quả phê duyệt phương pháp:

Độ không đảm bảo đo tổng hợp [46; 48]:

$$U_{th} (\%) = \sqrt{U_p^2 + U_a^2}$$

Trong đó:

$U_p$  được tính từ độ tái lập, tức là  $\% U_p = \% \text{RSD}_R$

$U_a$  được tính từ độ chệch của hiệu suất thu hồi,  $U_a = 100 - \text{recovery}$

Độ không đảm bảo đo mở rộng, với hệ số phủ  $k=2$

$$U_e (\%) = k \cdot U_{th} = 2U_{th}$$

Độ không đảm bảo đo mở phải đáp ứng tiêu chí theo hướng dẫn độ không đảm bảo đo của Ủy ban Tiêu chuẩn thực phẩm quốc tế CAC/GL 54-2004 ở mức nồng độ  $< 100 \mu\text{g/kg}$  là 44% [33].

### 2.3.3.6. Khảo sát độ ổn định mẫu

Độ ổn định là khả năng giữ nguyên hàm lượng chất phân tích trong một khoảng thời gian nhất định, dưới các điều kiện lưu trữ khác nhau [61].

Trong nghiên cứu này, mẫu trắng được thêm chuẩn AF tại 2 mức nồng độ ML và 10xML (theo Bảng 2.2), với mỗi mức nồng độ thực hiện 3 thí nghiệm, tương ứng với nồng độ AFB1 trong mẫu như sau:

+ Nền đậu phộng và nền bắp hạt: 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$

+ Nền bột ớt và nền nho khô: 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$

Mẫu được lưu trữ và xử lý theo các điều kiện sau đây:

+ Điều kiện 1:

- Mẫu thêm chuẩn được xử lý theo quy trình chiết mẫu được tóm tắt mục 3.2.1 và tiêm vào hệ thống UPLC-FD ngay sau khi chuẩn bị.
- Mẫu được tiêm lặp lại mẫu sau 24 giờ, với mẫu được lưu trữ trong buồng tiêm mẫu ở nhiệt độ 20°C và trong tủ lạnh ở 4°C.

+ Điều kiện 2:

- Mẫu thêm chuẩn được lưu trữ ở nhiệt độ -20°C trong 10 ngày.
- Sau thời gian lưu trữ, mẫu được lấy ra và để ổn định ở nhiệt độ phòng, sau đó xử lý theo quy trình chiết mẫu được tóm tắt mục 3.2.1 và tiêm vào hệ thống UPLC-FD.

+ Điều kiện 3:

- Mẫu thêm chuẩn được lưu trữ ở nhiệt độ -20°C trong 21 ngày.
- Sau thời gian lưu trữ, mẫu được lấy ra và để ổn định ở nhiệt độ phòng, sau đó xử lý theo quy trình chiết mẫu được tóm tắt mục 3.2.1 và tiêm vào hệ thống UPLC-FD.



Tiêu chí chấp nhận: độ sai biệt (%) giữa nồng độ ban đầu và nồng độ thu được không vượt quá 20% và hệ số biến thiên (%CV) tính toán cho mỗi nồng độ không lớn hơn 15% cho ít nhất 67% số mẫu thực hiện mẫu lặp [61].

Cách xác định % độ sai biệt (D) theo công thức sau:

$$D (\%) = |\text{Nồng độ thu được} - \text{Nồng độ ban đầu}| \times 100 / \text{Nồng độ ban đầu}$$

### 2.3.3.7. Đảm bảo chất lượng kết quả thử nghiệm

Để đảm bảo kết quả phân tích aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) đạt được độ tin cậy và phù hợp với phương pháp nghiên cứu, việc kiểm soát và đánh giá chất lượng thông qua các phương pháp như so sánh liên phòng, tham gia chương trình thành thạo, và xây dựng biểu đồ kiểm soát (control chart) là rất cần thiết. Những công cụ này không chỉ giúp xác định độ chính xác và độ lặp lại của phương pháp mà còn đảm bảo kết quả thử nghiệm nhất quán khi áp dụng trong các điều kiện phân tích khác nhau.

#### ➤ So sánh liên phòng

Liên phòng là so sánh kết quả thử nghiệm giữa các phòng thí nghiệm (PTN) nhằm đánh giá tính nhất quán và độ chính xác của kết quả cũng như xác định sự chênh lệch giữa các PTN [42; 124]. Trong nghiên cứu này, các mẫu được chuẩn bị và phân tích tại 3 PTN đạt chứng nhận ISO/IEC 17025 với các phương pháp cụ thể như sau:

- PTN 1: Áp dụng phương pháp UPLC-FD, không sử dụng dẫn xuất.
- PTN 2: Áp dụng phương pháp UPLC-FD, có sử dụng dẫn xuất.
- PTN 3: Áp dụng phương pháp LC-MS/MS, không sử dụng dẫn xuất.

Phương pháp thực hiện cho nền mẫu đậu phộng và bột ốt

Trong quá trình phân tích mẫu thực tế theo phương pháp của PTN 1, các mẫu ngẫu nhiên được lựa chọn có hàm lượng aflatoxin (B1, B2, G1, và G2). Các mẫu này được sử dụng làm cơ sở để so sánh liên phòng. Cụ thể:

- Mẫu đậu phộng (MM12101\_02084): Không phát hiện AFG1 và AFG2; phát hiện AFB1 (4,14 µg/kg) và AFB2 (0,54 µg/kg).

- Mẫu bột ớt (MM12101\_02027): Không phát hiện AFG2; phát hiện AFB1 (10,3 µg/kg), AFB2 (0,54 µg/kg), và AFG1 (2,26 µg/kg).

Mỗi mẫu được chia thành các ống ly tâm nhựa (25 g/ống), sau đó gửi đến PTN 2 và PTN 3, mỗi phòng nhận hai ống ly tâm cho từng loại nền mẫu.

Phương pháp thực hiện cho nền mẫu nho khô và bắp hạt

Mẫu ngẫu nhiên được lựa chọn không phát hiện hàm lượng aflatoxin (B1, B2, G1, và G2) và mẫu này được thêm chuẩn AF để kiểm tra khả năng phát hiện và độ chính xác.

- Mẫu bắp hạt vàng (MM12205\_03023): Mỗi ống ly tâm chứa 5 g mẫu được thêm 50 µL chuẩn nồng độ 500 µg/L (AFB1: 200 µg/L, AFG1: 200 µg/L, AFB2: 50 µg/L, AFG2: 50 µg/L), tương ứng nồng độ trên mẫu là 5 µg/kg (AFB1: 2 µg/kg, AFG1: 2 µg/kg, AFB2: 0,5 µg/kg, AFG2: 0,5 µg/kg).
- Mẫu nho khô (MM12205\_02854): Mỗi ống ly tâm chứa 5 g mẫu được thêm 125 µL chuẩn nồng độ 500 µg/L, tương ứng nồng độ cuối là 12,5 µg/kg (AFB1: 5 µg/kg, AFG1: 5 µg/kg, AFB2: 1,25 µg/kg, AFG2: 1,25 µg/kg).

Mẫu bắp hạt và nho khô được gửi độc lập đến cả ba PTN 1, PTN 2, và PTN 3, mỗi phòng nhận 5 ống ly tâm cho mỗi loại nền mẫu.

Các mẫu đậu phộng, bột ớt, nho khô và bắp hạt được bảo quản ở nhiệt độ  $\leq -20$  °C và thời gian gửi mẫu và nhận kết quả trong vòng 10 ngày.

Tiêu chí đánh giá: độ chênh lệch giữa các PTN thông qua độ tái lập (%RSD<sub>R</sub>) tại mức nồng độ  $\leq 100$  µg/kg là  $\leq 22\%$  theo phụ lục F – AOAC 2019 [14]

#### ➤ Chương trình thử nghiệm thành thạo

Thử nghiệm thành thạo là một dạng đặc biệt của so sánh liên phòng, được thực hiện bởi một tổ chức hoặc đơn vị độc lập. Trong chương trình này, các mẫu thử được phân phối đến các phòng thí nghiệm tham gia để phân tích. Kết quả phân tích được gửi lại cho đơn vị tổ chức để đánh giá và so sánh, dựa trên tiêu chí thống kê Z-score với ngưỡng chấp nhận trong khoảng  $-2 \leq Z \leq 2$  [42; 124]

Trong nghiên cứu này, phòng thí nghiệm tham gia chương trình thử nghiệm thành thạo do Romer Labs tổ chức. Nền mẫu là mẫu bắp (CSSMY021 – M21411AF), với tổng số lượng phòng thí nghiệm tham gia là 523. Phương pháp phân tích dựa vào phương pháp UPLC-FD không sử dụng dẫn xuất.

➤ Kiểm soát biểu đồ control chart

Biểu đồ kiểm soát (Control Chart) là công cụ quan trọng trong quản lý chất lượng, được áp dụng để giám sát và đánh giá sự ổn định của qui trình [42; 124]. Trong nghiên cứu này, việc xây dựng biểu đồ kiểm soát được thực hiện theo 3 bước sau:

Bước 1: Thu thập dữ liệu được thực hiện trong loạt phân tích mẫu hàng ngày, bằng cách thêm chuẩn vào mẫu trắng của từng nền mẫu ở mức MQL = 0,3 µg/kg của AFB1.

Bước 2: Tính toán các thông số kiểm soát qua các giá trị:

+ Giá trị trung bình  $\bar{X}$ : Tính toán trung bình của tất cả các lần thực hiện

+ Giới hạn kiểm soát trên  $UCL = \bar{X} + 3S$

+ Giới hạn kiểm soát dưới  $LCL = \bar{X} - 3S$

+ Giới hạn cảnh báo trên  $UWL = \bar{X} + 2S$

+ Giới hạn cảnh báo dưới  $LWL = \bar{X} - 2S$

+ Trong đó S là độ lệch chuẩn SD của dữ liệu.

Bước 3: Đánh giá biểu đồ kiểm soát bằng cách theo dõi và đánh giá xu hướng của biểu đồ để phát hiện kịp thời các dấu hiệu bất thường nhằm duy trì tính ổn định và độ tin cậy của kết quả phân tích hàng ngày [42; 124].

**2.3.4. Phương pháp đánh giá mức độ nguy hại độc tố aflatoxin đối với sức khỏe con người theo 3 thể trạng gây, 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 ớt, 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, rủi ro dân số và HI được tính toán, sau đó so sánh EDI và MOE giữa các nhóm thể trạng nhằm đánh giá nguy cơ phơi nhiễm aflatoxin đối với từng đối tượng. Các bước đánh giá cụ thể được trình bày chi tiết như sau:

#### *2.3.4.1. Đánh giá liều phơi nhiễm EDI qua mức tiêu thụ thực phẩm nhiễm aflatoxin theo thể trạng con người*

Liều phơi nhiễm hàng ngày EDI ( $\mu\text{g}/\text{kg}$  thể trọng mỗi ngày) = Mức độ độc tố nấm mốc trung bình ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )  $\times$  mức tiêu thụ lương thực trung bình ( $\text{kg}/\text{người}/\text{ngày}$ )  $\times$  trung bình trọng lượng cơ thể ( $\text{kg}$  thể trọng/ $\text{người}$ ) [39].

Khi kết quả được báo cáo (dưới mức LOD hoặc LOQ) cao hơn 50% thì hàm lượng độc tố aflatoxin trong thực phẩm được thực hiện bằng hai trường hợp dựa trên hướng dẫn của Cơ quan An Toàn Thực phẩm Châu Âu [39; 44].

(1) cách tiếp cận giới hạn dưới (LB) bằng cách thay thế phương pháp kết quả dưới LOD bằng 0 và kết quả dưới LOQ theo LOD [39; 44].

(2) cách tiếp cận giới hạn trên (UB) bằng cách thay thế các kết quả bên dưới LOD bằng LOD và kết quả dưới LOQ theo LOQ [39; 44].

#### *2.3.4.2. Đánh giá biên độ phơi nhiễm MOE*

Biên độ phơi nhiễm MOE là tỷ lệ của liều chuẩn thấp nhất (BMDL) có thể gây ảnh hưởng nghiêm trọng và liều phơi nhiễm [39; 43]. Giá trị BMDL10 cho AFB1 là  $0,170 \mu\text{g kg}^{-1} \text{bw d}^{-1}$  [4; 133].

Biên độ phơi nhiễm được tính bằng công thức:  $\text{MOE} = 0,170/\text{EDI}$

Khi giá trị MOE nhỏ hơn 10000, AFB1 gây nguy cơ tiềm ẩn cho sức khỏe cộng đồng [4; 138].

#### 2.3.4.3. *Đánh giá rủi ro nguy cơ đối với sức khỏe con người*

Rủi ro dân số (trường hợp mỗi năm trên 100.000 người) = Khả năng gây ung thư  $\times$  liều tiếp xúc [39].

Tại Việt Nam, khả năng gây ung thư là 0,068 theo ước tính người nhiễm HBV (20% dân số) và không nhiễm HBV (80% dân số) [39].

Rủi ro dân số (trường hợp mỗi năm trên 100.000 người): Đây là số ca ung thư gan do aflatoxin gây ra trên 100.000 người mỗi năm.

#### 2.3.4.4. *Đánh giá chỉ số nguy hiểm (HI)*

Chỉ số nguy hiểm HI là chỉ số đánh giá mức độ rủi ro của AF đối với sức khỏe con người bằng cách chia EDI cho TD50 của AFB1 (3,2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  thể trọng/ngày trên chuột), chia cho hệ số không chắc chắn là 50000. TD50 là liều gây ra khối u ở 50% động vật được thử nghiệm, với công thức tính  $HI = EDI / (TD50 \times 50000)$  [38].

Nếu giá trị  $HI > 1$ , sự phơi nhiễm AFB1 trong thực phẩm có khả năng gây ảnh hưởng xấu đến sức khỏe. Ngược lại, nếu giá trị  $HI < 1$ , các tác động bất lợi tiềm ẩn đối với sức khỏe con người do sự phơi nhiễm AFB1 trong thực phẩm là không đáng kể [38].

#### 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 ớt; 400 mẫu nho khô và 400 mẫu bắp hạt (100 mẫu bắp hạt trắng, 100 mẫu hạt vàng, 200 mẫu 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 Hooc Môn của Thành phố Hồ Chí Minh bằng phương pháp lấy mẫu ngẫu nhiên.

Mẫu đậu phộng và mẫu bột ớt 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. Trong quá trình lấy mẫu, các thông tin địa điểm lấy mẫu, tên mẫu, xuất xứ/thương hiệu, dạng mẫu cũng như cách bảo quản đã được ghi lại. Mẫu sau khi thu thập sẽ được chuyển đến bộ phận tiếp nhận mẫu của phòng thí nghiệm để được mã hoá và đồng

nhất mẫu. Mẫu được lưu ở nhiệt độ  $\leq -20$  °C nếu chưa được phân tích ngay trong ngày.

Mỗi mẫu được mã hóa theo cấu trúc MM12YM-XXXXX, trong đó: MM - Mã mẫu; 1 - Khu vực Thành phố Hồ Chí Minh; 2Y - Năm lấy mẫu ( ví dụ: 21 là năm 2021); MM: 2 ký tự đại diện cho tháng trong năm từ 01 đến 12; XXXXX - Số thứ tự mẫu: chuỗi 5 số đại diện cho số thứ tự của mẫu, bắt đầu 00001 đến 99999. Ví dụ: MM12101-00124: có nghĩa là mã mẫu ở Thành phố Hồ Chí Minh, được lấy mẫu vào năm 2021, tháng 01 với số thứ tự 00124.

### ***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 [39; 44]. 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 ốt, 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

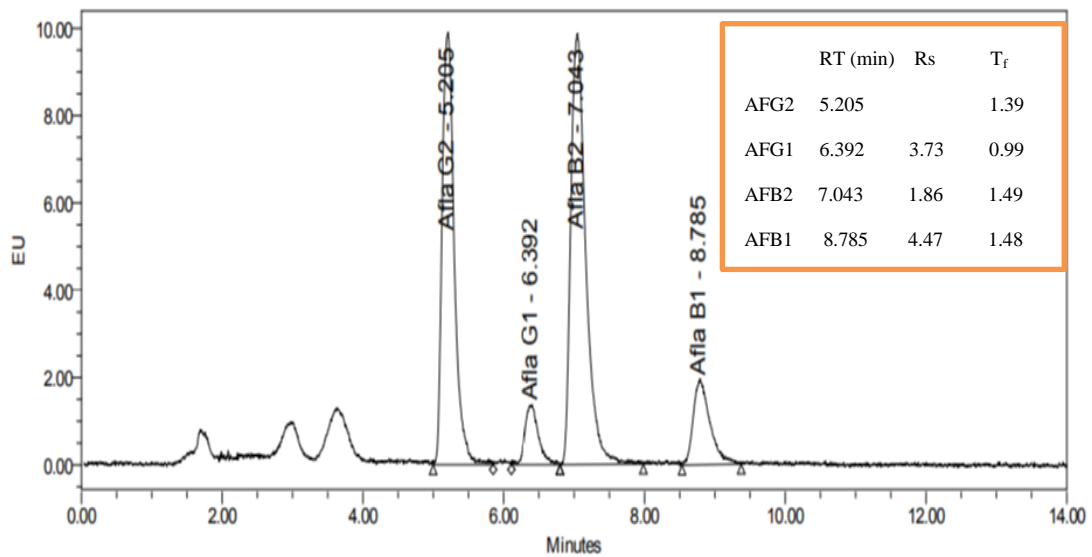
#### 3.1.1. Tối ưu hoá thành phần pha động

Trong phân tích sắc ký lỏng, việc lựa chọn thành phần pha động tối ưu đóng vai trò quan trọng trong việc đảm bảo hiệu suất tách, độ phân giải ( $R_s$ ) và hệ số kéo đuôi ( $T_f$ ), nhằm đáp ứng các tiêu chí phân tích khắt khe. Độ phân giải  $R_s$  được yêu cầu đạt tối thiểu 1,5 để đảm bảo sự tách biệt hoàn toàn giữa các pic đại diện cho AF, trong khi hệ số kéo đuôi  $T_f$  cần đạt trong khoảng  $0,8 \leq T_f \leq 1,5$  để duy trì hình dạng pic đối xứng, qua đó cải thiện độ chính xác và khả năng tái lập kết quả phân tích. Dựa trên các nghiên cứu đã công bố [24; 47; 72; 126], nghiên cứu này khảo sát 2 điều kiện pha động ban đầu: (A) H<sub>2</sub>O/ACN/MeOH (56/22/22) và (B) H<sub>2</sub>O/ACN/MeOH (64/18/18). Kết quả thu được (Bảng 3.1) cho thấy pha động B có độ phân giải  $R_s$  cao hơn và đáp ứng tiêu chí  $R_s \geq 1,5$ , trong khi hệ số kéo đuôi  $T_f$  của pha động này nằm trong khoảng yêu cầu ( $0,8 \leq T_f \leq 1,5$ ). Ngược lại, pha động A không đạt tiêu chí với  $T_f > 1,5$  [40; 119; 127].

Ngoài ra, việc bổ sung một lượng nhỏ HCOOH vào trong pha động giúp cải thiện hình dạng đỉnh các pic tạo thành [127]. Do đó, pha động B được lựa chọn để tiếp tục tối ưu hóa bằng cách điều chỉnh nồng độ HCOOH, tạo thành hai pha động bổ sung: (C) 0,1% HCOOH/ACN/MeOH (64/18/18) và (D) 0,2% HCOOH/ACN/MeOH (64/18/18). Kết quả cho thấy pha động C đạt độ phân giải  $R_s$  cao nhất và hệ số kéo đuôi  $T_f$  nhỏ nhất. Cả ba pha động B, C, D đều thỏa mãn tiêu chí điều kiện sắc ký thích hợp  $R_s \geq 1,5$  và  $0,8 \leq T_f \leq 1,5$  [40; 119; 127]. Vì vậy, thành phần pha động tối ưu được xác định là 0,1% HCOOH/ACN/MeOH (64/18/18).

**Bảng 3.1:** Độ phân giải ( $R_s$ ) và hệ số kéo đuôi ( $T_f$ ) các pic aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) ở nồng độ 10  $\mu\text{g/L}$  với các thành phần pha động khác nhau.

AF	H <sub>2</sub> O/MeOH/ ACN (56/22/22) (n=3)		H <sub>2</sub> O/MeOH/ ACN (64/18/18) (n=3)		0,1% HCOOH/ACN/ MeOH (64/18/18) (n=3)		0,2% HCOOH/ACN/ MeOH (64/18/18) (n=3)	
	$R_s$	$T_f$	$R_s$	$T_f$	$R_s$	$T_f$	$R_s$	$T_f$
AFB1	3,0	1,6	4,4	1,5	<b>4,5</b>	<b>1,5</b>	4,4	1,5
AFB2	1,7	1,6	1,8	1,5	<b>1,9</b>	<b>1,5</b>	1,9	1,5
AFG1	2,5	1,5	3,7	1,2	<b>3,8</b>	<b>0,9</b>	3,7	1,2
AFG2		1,7		1,4		<b>1,4</b>		1,4



**Hình 3.1:** Sắc ký đồ chuẩn 10  $\mu\text{g/L}$  định mức bằng ACN/HCOOH 0,2% với thành phần pha động 0,1% HCOOH/ACN/MeOH (64/18/18)

Một sắc ký đồ đại diện chuẩn 10  $\mu\text{g/L}$  định mức bằng ACN/HCOOH 0,2% được thực hiện trên cột phân tích C18 (150  $\times$  2,1 mm; 1,7  $\mu\text{m}$ ) ở nhiệt độ 40  $^{\circ}\text{C}$ , với tốc độ dòng 0,2 mL/phút và thể tích tiêm 5  $\mu\text{L}$ , bước sóng kích thích 365 nm và phát xạ 455 nm với  $R_s$  thu được giữa các pic AFG1 (3,8), AFB2 (1,9), AFB1 (4,5) được trình bày Hình 3.1. Thứ tự rửa giải các AF trong hệ sắc ký pha đảo phụ thuộc vào độ phân cực của hợp chất, khả năng tương tác giữa hợp chất cần phân tích với pha tĩnh và pha động. Độ phân cực các aflatoxin dựa vào giá trị log Kow, là hệ số phân bố



trong 2 dung môi N-octanol/nước. Chất nào có  $K_{ow}$  càng nhỏ thì càng phân cực [55; 104; 110]. Giá trị  $\log K_{ow}$  của 4 aflatoxin như sau: AFG1 (0,5), AFG2 (0,71), AFB1 (1,23), AFB2 (1,45) [59]. Kết quả phân tích cho thấy các aflatoxin trong sắc ký đồ rửa giải theo thứ tự  $AFG2 > AFG1 > AFB2 > AFB1$ .

Tóm lại, điều kiện sắc ký phân tích đồng thời các AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 trên thiết bị UPLC- FD được tóm tắt theo Bảng 3.2.

**Bảng 3.2:** Điều kiện sắc ký phân tích đồng thời aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) trên thiết bị UPLC-FD

Thông số	Điều kiện/Thông số cài đặt
Cột sắc ký	Cột phân tích C <sub>18</sub> (150 x 2,1 mm; 1,7 $\mu$ m)
Pha động	0,1% HCOOH/MeOH/ACN (64/18/18)
Chương trình pha động	Đẳng dòng (Isotactic)
Thể tích bơm mẫu	5 $\mu$ L
Nhiệt độ cột	40 °C
Tốc độ dòng	0,2 mL/phút
Đầu dò fluorescences FD	Bước sóng kích thích $\lambda_{Ex} = 365$ nm
	Bước sóng phát xạ $\lambda_{Em} = 455$ nm

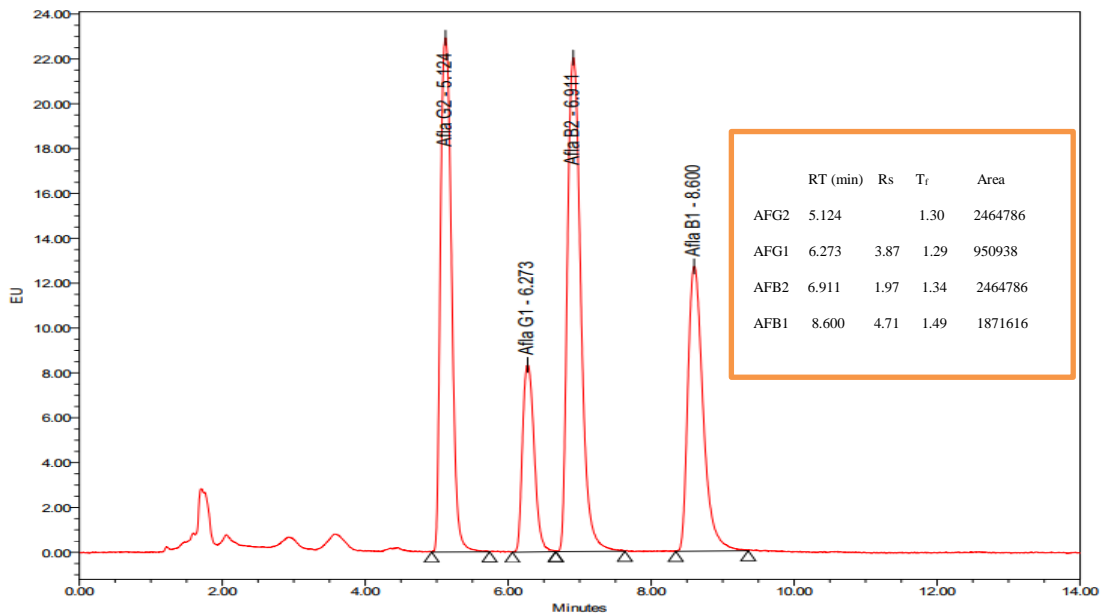
### 3.1.2. Độ ổn định của tín hiệu aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) trên UPLC-FD

Kết quả Bảng 3.3 cho thấy các thông số phân tích aflatoxin (B1, B2, G1, G2) đều đáp ứng tiêu chí chấp nhận % RSD thời gian lưu và diện tích pic không quá 2%, độ phân giải  $R_s \geq 1,5$  và hệ số kéo đuôi  $0,8 \leq T_f \leq 1,5$  [40; 119; 127]. Cụ thể, giá trị RSD (%) thời gian lưu và diện tích pic (n=6) lần lượt  $\leq 0,11\%$  và  $\leq 0,59\%$ , nằm trong giới hạn cho phép ( $\leq 2\%$ ). Hệ số kéo đuôi  $T_f$  của các chất (AFB1: 1,50; AFB2: 1,36; AFG1: 1,32; AFG2: 1,28) đều nằm trong khoảng chấp nhận ( $0,8 \leq T_f \leq 1,5$ ). Độ phân giải  $R_s$  (n=6) đối với pic liền sau đạt AFB1 (4,68), AFB2 (1,98), và AFG1 (3,85), thỏa mãn tiêu chí  $R_s \geq 1,5$ . Những kết quả này khẳng định rằng điều kiện sắc ký được thiết lập trong Bảng 3.2 là ổn định để phân tích đồng thời aflatoxin (B1, B2, G1, G2) trên hệ thống UPLC-FD.

Một sắc ký đồ minh họa dung dịch chuẩn AF nồng độ 12,5  $\mu\text{g/L}$  (trong đó nồng độ của AFB1, AFB2, AFG1 và AFG2 lần lượt là 5; 1,25; 5 và 1,25  $\mu\text{g/L}$ ), với điều kiện sắc ký phân tích theo Bảng 3.2 được trình bày ở Hình 3.2

**Bảng 3.3:** Các thông số đánh giá độ ổn định pic aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) trên thiết bị UPLC-FD

Tên chất	RSD (%) thời gian lưu (n=6)	RSD (%) diện tích pic (n=6)	Độ phân giải Rs (n=6)	Hệ số kéo đuôi $T_f$ (n=6)
AFB1	0,09	0,59	4,68	1,50
AFB2	0,07	0,58	1,98	1,36
AFG1	0,10	0,28	3,85	1,32
AFG2	0,11	0,18	-	1,28



**Hình 3.2:** Sắc ký đồ chuẩn aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) nồng độ 12,5  $\mu\text{g/L}$  minh họa tính ổn định của tín hiệu các pic.

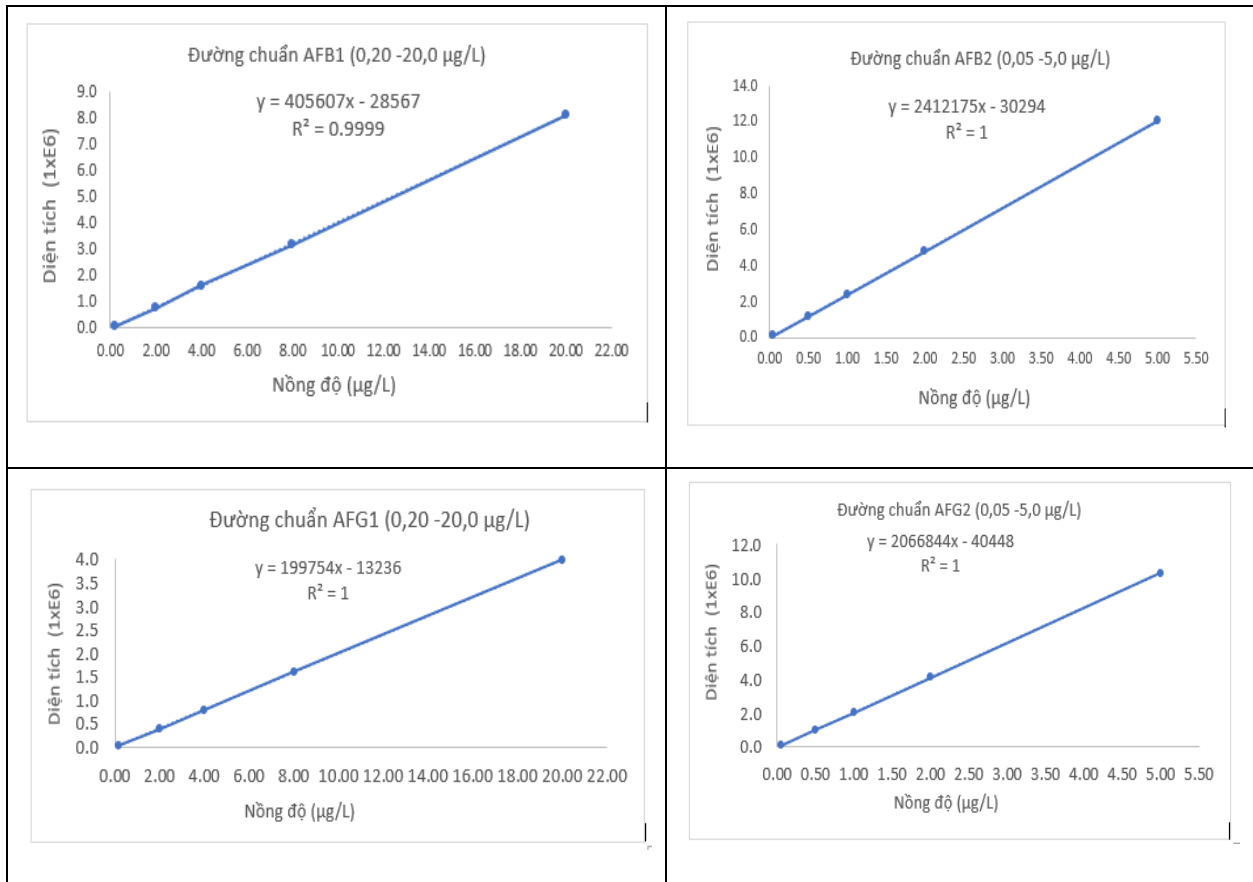
### 3.1.3. Khoảng tuyến tính và đường chuẩn

Đường chuẩn được xây dựng trên dung dịch ACN/HCOOH 0,2% với 5 điểm chuẩn AF tại các nồng độ: 0,5; 5,0; 10,0; 20,0; 50,0  $\mu\text{g/L}$ , tương ứng với các nồng độ 0,2; 2,0; 4,0; 8,0; 20,0  $\mu\text{g/L}$  cho AFB1 và AFG1 và 0,05; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0  $\mu\text{g/L}$  cho AFB2 và AFG2. Hệ số tuyến tính ( $R^2$ ) và phần trăm độ lệch của từng điểm chuẩn được trình bày trong Bảng 3.4 và Hình 3.3.

Kết quả phân tích cho thấy hệ số bình phương tương quan ( $R^2$ ) của các đường chuẩn cho từng chỉ tiêu (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2) đều đạt  $\geq 0,9999$ , khẳng định độ tuyến tính rất tốt của phương pháp. Phần trăm độ lệch giữa nồng độ tính toán và giá trị thực tại từng điểm chuẩn đều nằm trong giới hạn  $\leq 15\%$ , đáp ứng tiêu chí chấp nhận theo ICH M10 Guideline: Đường chuẩn:  $0,99 \leq R^2 \leq 1$  và nồng độ tính toán được trên từng điểm chuẩn không lệch quá 15% so với giá trị thực, ngoại trừ nồng độ tại điểm MQL không vượt quá 20% [61].

**Bảng 3.4:** Hệ số tương quan  $R^2$  và phần trăm độ lệch đường chuẩn dung dịch aflatoxin (B1, B2, G1 và G2)

#	Chỉ tiêu	Khoảng nồng độ ( $\mu\text{g/L}$ )	$R^2$	$Y=ax+b$	% độ lệch
1	AFB1	0,2; 2,0; 4,0; 8,0; 20,0	0,9999	$Y=405607 X-28567$	$\leq 15\%$
2	AFB2	0,05; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0	1,0	$Y=2412175 X-30294$	$\leq 18\%$
3	AFG1	0,2; 2,0; 4,0; 8,0; 20,0	1,0	$Y=199754 X-13236$	$\leq 15\%$
4	AFG2	0,05; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0	1,0	$Y=2066844 X-40448$	$\leq 15\%$



**Hình 3.3:** Đường chuẩn dung dịch aflatoxin (B1, B2, G1 và G2)

trong khoảng nồng độ 0,5 – 50 µg/L

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

Aflatoxin hòa tan tốt trong dung môi phân cực và nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng quá trình chiết xuất AF hiệu quả đạt được khi sử dụng hỗn hợp dung môi ACN/H<sub>2</sub>O hoặc MeOH/H<sub>2</sub>O, kết hợp cột ái lực miễn dịch (IAC) để làm sạch mẫu giúp tăng độ chọn lọc. Trước khi đưa qua cột IAC, dung dịch chiết cần được pha loãng bằng dung dịch đệm phát phát (PBS) hoặc H<sub>2</sub>O để đảm bảo điều kiện tối ưu cho quá trình làm sạch [6; 18; 47; 80; 131].

Các yếu tố khảo sát cho qui trình chiết AF (Hình 2.2) từ các mẫu đậu phộng, bột ốt, nho khô và bắp hạt bao gồm: dung môi chiết (MeOH/H<sub>2</sub>O (8/2) và ACN/H<sub>2</sub>O

(6/4)) và dung dịch pha loãng trước khi qua cột IAC (đệm PBS và H<sub>2</sub>O). Từ đó, bốn qui trình chiết khác nhau (QT1, QT2, QT3, và QT4) đã được thiết lập (Hình 2.2).

Kết quả nghiên cứu 4 qui trình chiết (QT1, QT2, QT3, QT4) sử dụng hai hỗn hợp dung môi MeOH/H<sub>2</sub>O (8/2) và ACN/H<sub>2</sub>O (6/4), cùng với hai dung dịch pha loãng (PBS và H<sub>2</sub>O) để chiết aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) trong các mẫu đậu phộng, bột ớt, nho khô và bắp hạt, tại ba mức nồng độ thấp, trung bình và cao, tương ứng với giới hạn cho phép theo QCVN 8-1:2011/BYT (ML, 5xML và 10xML), đã được trình bày chi tiết ở Bảng 3.5.

Nghiên cứu hiệu suất chiết được đánh giá qua 2 thông số độ thu hồi và độ lặp lại nhằm đánh giá các bước phân tích sau khi chiết mẫu, chủ yếu là hiệu quả của cột ái lực miễn dịch sử dụng các dung môi khác nhau và độ chính xác của phân tích bằng UPLC-FD. Tiêu chí lựa chọn cho hiệu suất chiết phải cao nhất trong khoảng 70-120% và độ lặp lại RSD<sub>r</sub> trên nền mẫu không quá 20%, đáp ứng tiêu chí chấp nhận hiệu suất thu hồi và độ lặp lại cho từng mức nồng độ theo phụ lục F – AOAC 2019. Kết quả khảo sát từ 4 qui trình ở Bảng 3.5 cho thấy.

- Qui trình sử dụng dung môi ly trích MeOH/H<sub>2</sub>O (8/2) và được pha loãng dịch lọc bằng H<sub>2</sub>O trước khi qua cột ái lực miễn dịch IAC (QT1) là qui trình xử lý tối ưu cho nền bắp (H = 90,3 – 99,8%, RSD<sub>r</sub> < 2%).

- Qui trình sử dụng dung môi ly trích MeOH/H<sub>2</sub>O (8/2) và được pha loãng dịch lọc bằng PBS trước khi qua cột ái lực miễn dịch IAC (QT2) là qui trình xử lý tối ưu cho nền nho khô (H = 72,4 – 95,4%, RSD<sub>r</sub> < 3%), nền bột ớt (H = 70,1 – 97,8%, RSD<sub>r</sub> < 6%).

- Qui trình sử dụng dung môi ly trích ACN/H<sub>2</sub>O (6/4) và được pha loãng dịch lọc bằng H<sub>2</sub>O trước khi qua cột ái lực miễn dịch IAC (QT3) là qui trình xử lý tối ưu cho nền mẫu đậu phộng (H = 85,7 – 99,2%, RSD<sub>r</sub> < 6%).

**Bảng 3.5:** Độ thu hồi và độ lặp lại của qui trình chiết aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) trong các mẫu thực phẩm

		Nồng độ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	QT1 (n=6)		QT2 (n=6)		QT3 (n=6)		QT4 (n=6)	
			H (%)	RSD <sub>r</sub> (%)	H (%)	RSD <sub>r</sub> (%)	H (%)	RSD <sub>r</sub> (%)	H (%)	RSD <sub>r</sub> (%)
Đậu phộng	AFB1	2-20	85,4-93,8	0,74-3,75	83,1-93,9	0,70-2,48	<b>97,8-99,2</b>	<b>0,44-0,62</b>	92,7-98,9	0,34-2,75
	AFB2	0,5-5	85,2-93,9	0,24-1,17	82,6-92,2	0,28-1,70	<b>92,6-98,9</b>	<b>0,42-0,50</b>	85,6-98,8	0,46-0,97
	AFG1	2-20	85,9-96,4	1,00-4,39	83,2-92,0	0,88-5,40	<b>94,5-98,9</b>	<b>0,71-5,17</b>	91,4-98,1	1,03-3,50
	AFG2	0,5-5	85,3-93,7	0,42-1,39	82,2-93,1	0,26-1,6	<b>85,7-98,3</b>	<b>0,17-2,28</b>	78,2-97,7	0,21-1,27
Bột ốt	AFB1	5-50	46,7-79,0	4,78-29,5	<b>76,4-97,8</b>	<b>0,30-3,92</b>	55,1-60,5	6,22-16,0	48,9-87,8	1,51-9,77
	AFB2	1,25-12,5	50,5-62,7	3,45-25,7	<b>70,2-74,2</b>	<b>0,13-0,42</b>	11,1-14,4	2,62-20,3	34,8-58,3	0,27-16,7
	AFG1	5-50	34,6-64,8	4,85-46,7	<b>70,1-76,6</b>	<b>0,14-5,35</b>	24,7-28,2	9,50-20,3	28,1-60,1	1,40-20,4
	AFG2	1,25-12,5	34,3-53,0	4,06-41,6	<b>71,7-73,2</b>	<b>0,30-1,08</b>	4,40-6,50	6,51-15,7	13,1-27,4	1,22-20,3
Nho khô	AFB1	5-50	65,1-78,9	0,69-9,22	<b>79,3-95,4</b>	<b>0,50-2,62</b>	23,1-33,1	2,35-8,05	79,1-94,4	0,83-1,87
	AFB2	1,25-12,5	12,1-38,7	0,85-15,2	<b>80,0-85,3</b>	<b>0,45-0,71</b>	3,10-5,90	2,48-9,35	26,1-42,7	0,98-1,09
	AFG1	5-50	36,0-67,5	2,66-4,80	<b>78,7-89,3</b>	<b>0,93-2,57</b>	7,60-11,2	13,4-20,0	1,50-5,20	1,46-5,15
	AFG2	1,25-12,5	4,10-17,1	1,70-4,55	<b>72,4-82,6</b>	<b>0,30-0,84</b>	1,1-2,6	5,25-5,43	4,10-17,1	0,68-1,80
Bắp hạt	AFB1	2-20	<b>98,3-99,6</b>	<b>0,24-1,40</b>	83,3-99,3	0,31-4,29	92,9-117	0,72-2,34	50,6-114	0,91-5,32
	AFB2	0,5-5	<b>93,5-99,8</b>	<b>0,12-1,05</b>	81,2-96,1	0,27-1,89	94,6-114	0,25-1,09	50,1-116	0,55-1,88
	AFG1	2-20	<b>94,9-99,3</b>	<b>0,27-1,63</b>	60,5-94,4	1,14-10,2	86,5-95,6	1,25-3,97	46,1-95,3	2,01-3,86
	AFG2	0,5-5	<b>90,3-97,0</b>	<b>0,36-1,79</b>	69,2-95,6	0,34-0,88	77,1-93,8	0,36-0,71	37,8-103	0,41-2,19

QT1: MeOH/H<sub>2</sub>O (8/2) - H<sub>2</sub>O; QT2: MeOH/H<sub>2</sub>O (8/2) - PBS; QT3: ACN/H<sub>2</sub>O (6/4) - H<sub>2</sub>O; QT4: ACN/H<sub>2</sub>O (6/4) - PBS

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

Mẫu bắp (QT1): Cân 5 g mẫu trên cân phân tích (hiển thị đến 0,1 mg), thêm 20,00 mL MeOH/H<sub>2</sub>O (8/2), 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 H<sub>2</sub>O, 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 H<sub>2</sub>O. 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 0,22  $\mu$ m. Mẫu được tiêm vào hệ UPLC-FD.

Mẫu bột ốt và nho khô (QT2): Cân 5 g mẫu trên cân phân tích (hiển thị đến 0,1mg), thêm 20,00 mL MeOH/H<sub>2</sub>O (8/2), 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 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 H<sub>2</sub>O. Rửa giải 3,00 mL MeOH, thổi khô, định mức 1 mL dung dịch 0,2% HCOOH/ACN (1/1), qua màng lọc PTFE 0,22  $\mu$ m. Mẫu được tiêm vào hệ UPLC-FD.

Mẫu đậu phộng (QT3): Cân 5 g mẫu trên cân phân tích (hiển thị đến 0,1 mg), thêm 20,00 mL ACN/H<sub>2</sub>O (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 mL H<sub>2</sub>O, 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 H<sub>2</sub>O. 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 0,22  $\mu$ m. Mẫu được tiêm vào hệ UPLC-FD.

### ***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 ốt, nho khô, và bắp hạt***

Đường chuẩn AF được xây dựng trong dung dịch với các nồng độ: 0,5; 5,0; 10,0; 20,0; 50,0  $\mu$ g/L (xem Bảng 2.1) và trên các nền mẫu đậu phộng, bột ốt, nho khô và bắp tại các nồng độ: 0,5; 5,0; 10,0; 20,0; 50,0  $\mu$ g/kg (xem Bảng 2.3) để đánh giá phần trăm ảnh hưởng nền mẫu dựa trên hệ số của phương trình đường chuẩn [32].

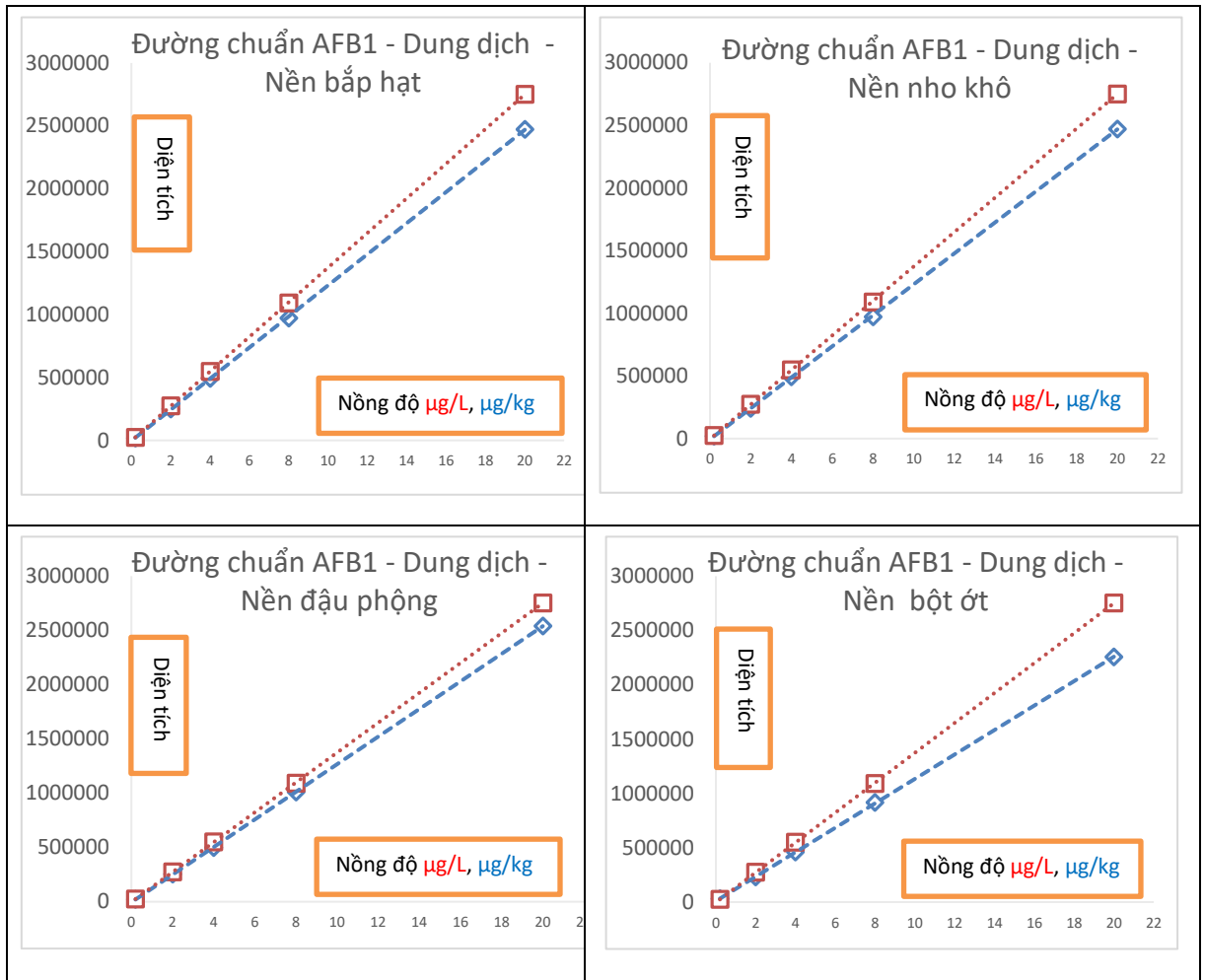
$$|\%ME| = \left( \frac{\text{hệ số góc của đường chuẩn trong nền mẫu}}{\text{hệ số góc của đường chuẩn trong dung môi}} - 1 \right) \times 100$$

Độ ảnh hưởng nền mẫu được coi là không ảnh hưởng, trung bình hoặc ảnh hưởng lớn nếu giá trị  $|\%ME|$  lần lượt là  $\leq 20\%$ ,  $20 - 50\%$ ,  $> 50\%$ . Kết quả Bảng 3.6 và Hình 3.4 cho thấy  $|\%ME|$  được tính toán với giá trị từ 2,8 đến 18,1% đối với AFB1, AFB2, AFG1 và AFG2, trong đó bột ớt bị ảnh hưởng nhiều nhất trong quá trình chiết AF, với  $|\%ME| = 13,9 - 18,1 \%$ , điều này có thể do thành phần có trong bột ớt chứa sắc tố màu đỏ (Carotenoids) và sắc tố màu xanh (Chlorophyll) gây cản trở quá trình ly trích. Tuy nhiên,  $|\%ME|$  đều thấp hơn 20% theo qui định, nên đường chuẩn trong dung dịch 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.

**Bảng 3.6:** Kết quả độ ảnh hưởng nền mẫu (%) từ đường chuẩn trên dung dịch và nền mẫu thực phẩm (0,5 – 50 µg/L và µg/kg)

Nền mẫu	AFB1		AFB2		AFG1		AFG2	
	Đường chuẩn	%ME	Đường chuẩn	%ME	Đường chuẩn	%ME	Đường chuẩn	%ME
Dung dịch	Y = 138000X - 3040		Y = 1310000X - 13400		Y = 67500X + 8320		Y = 1120000X - 4740	
Ớt	Y = 113000X + 9290	18,1	Y = 1110000X - 19900	15,3	Y = 58100X + 8720	13,9	Y = 924000X + 5080	17,5
Đậu	Y = 127000X - 5410	8,00	Y = 1240000X - 8840	5,34	Y = 65600X - 1920	2,81	Y = 1030000X - 20600	8,04
Bắp	Y = 123000X - 3660	10,9	Y = 1200000X - 4120	8,4	Y = 63400X + 537	6,10	Y = 993000X - 5040	11,3
Nho	Y = 124000X - 5560	10,1	Y = 1200000X + 3060	8,4	Y = 63700X + 7030	5,63	Y = 992000X - 3340	11,4



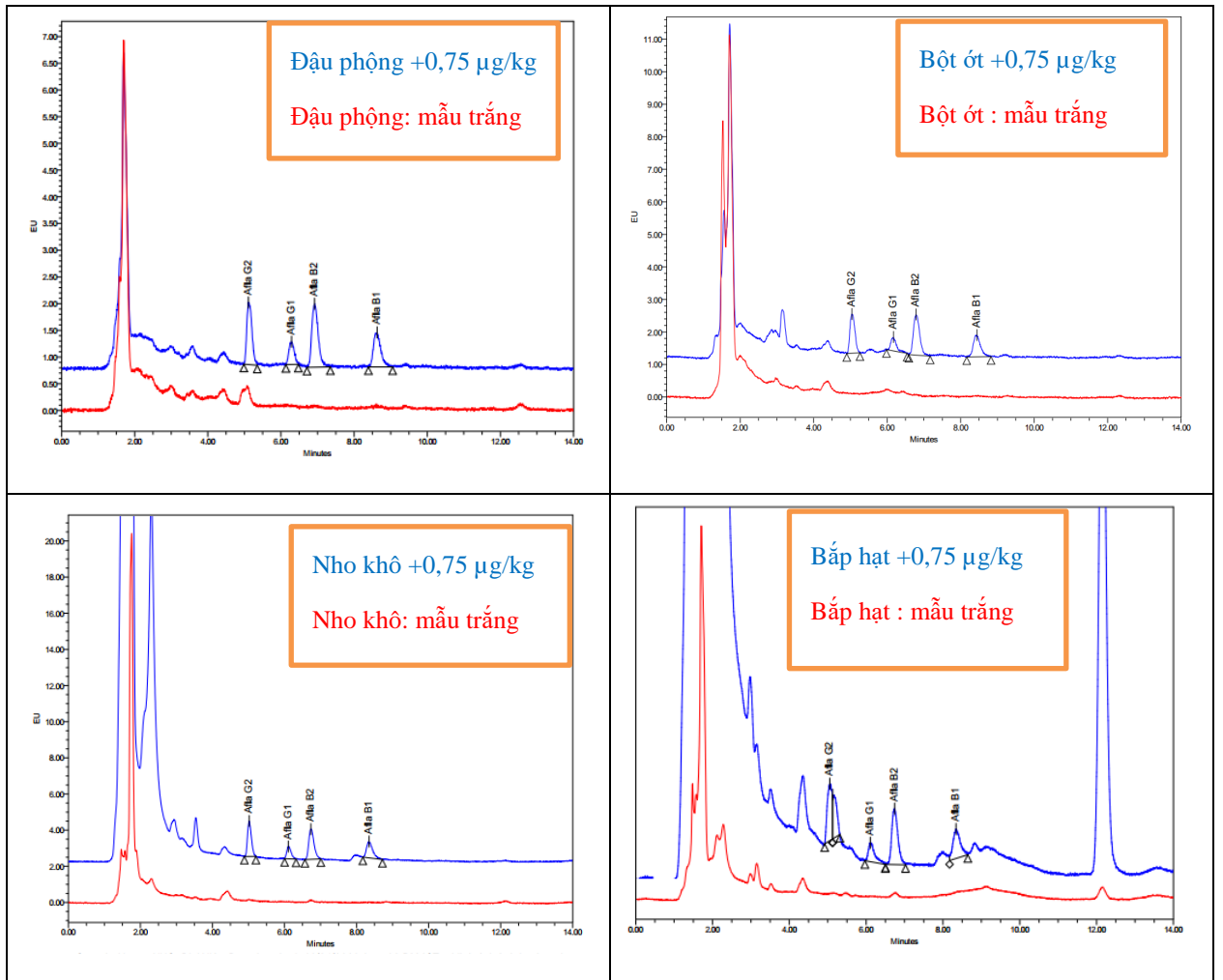


**Hình 3.4:** So sánh hệ số góc của đường chuẩn dung dịch (màu đỏ) và đường chuẩn trên mẫu (màu xanh) trên 4 loại mẫu đậu phộng, bột ớt, nhô khô và bắp hạt.

### 3.3. Xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp

#### 3.3.1. Độ chọn lọc

Phương pháp có tính chọn lọc vì khi so sánh sắc ký đồ (mẫu trắng, mẫu thêm chuẩn MQL), tại thời gian lưu của các chất AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 trong sắc ký đồ mẫu trắng không xuất hiện nhiều gây ra do thành phần nền mẫu gây ra [61]. Hình 3.5 minh họa cho độ chọn lọc 4 nền mẫu đậu phộng, bột ớt, nhô khô, và bắp hạt.



**Hình 3.5:** Sắc ký đồ so sánh thời gian lưu của các aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) giữa mẫu thêm chuẩn MQL và mẫu trắng của các nền mẫu thực phẩm

### 3.3.2. Giới hạn phát hiện và định lượng của phương pháp

- **Giới hạn phát hiện MDL**

Giới hạn phát hiện của thiết bị (iDL) đối với AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 đạt được bằng hệ thống UPLC-FD, với giá trị lần lượt là 0,075; 0,010; 0,092; 0,008 µg/L [97]. Dựa trên quy trình phân tích AF trong nền mẫu (mục 3.2.1), với tỷ lệ khối lượng mẫu và thể tích cuối cùng là 1/1, mức nồng độ thấp nhất được bổ sung để xác định MDL là 0,10 µg/kg. Cụ thể, mẫu trắng được thêm chuẩn AF ở nồng độ 0,25 µg/kg (nồng độ AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 tương ứng 0,1; 0,025; 0,1; 0,025 µg/kg). Thực hiện 6 lần và tính toán MDL dựa vào tiêu chí  $3 \leq S/N \leq 10$ .

Kết quả phân tích cho thấy tỷ lệ tín hiệu trên nhiễu (S/N) của các chất AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 đều đạt giá trị cao hơn ngưỡng yêu cầu ( $S/N \geq 3$ ) để xác định giới hạn phát hiện (MDL). Kết quả tính toán được trình bày trong Bảng 3.7, cho thấy giới hạn phát hiện (MDL) tính toán đạt được rất thấp, tương ứng với từng nền mẫu như sau:

Đậu phộng: (AFB1:0,008; AFB2:0,01; AFG1:0,097; AFG2:0,01 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ))

Bột ớt: (AFB1:0,06; AFB2:0,009; AFG1:0,09; AFG2:0,009 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ))

Nho khô: (AFB1:0,08; AFB2:0,01; AFG1:0,09; AFG2:0,009 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ))

Bắp hạt: (AFB1:0,09; AFB2:0,01; AFG1:0,08; AFG2:0,008 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ))

Trong đó:

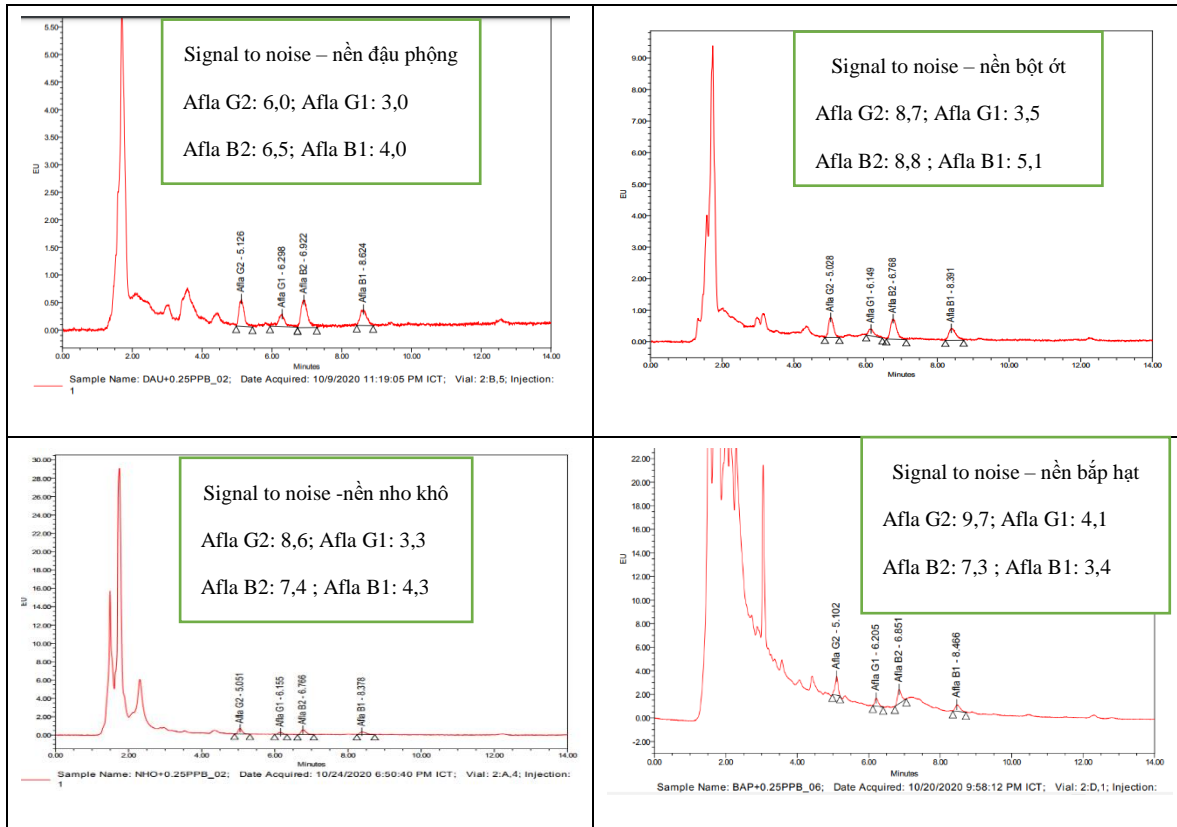
$MDL_{\text{tính toán}} = 3 \times C_{\text{min}}/(S/N_{\text{tb}})$ ,  $C_{\text{min}}$ : Nồng độ trên mẫu nhỏ nhất,  $S/N_{\text{tb}}$ : theo tín hiệu trên nhiễu nền đáp ứng tiêu chí  $3 \leq S/N \leq 10$  [61]. Hình 3.6 minh họa S/N cho từng aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) trên 4 nền mẫu.

Chọn mức  $MDL_{\text{tính toán}}$  cao nhất cho từng AF trên 4 nền mẫu để công bố mức giới hạn phát hiện chung, với tiêu chí  $MDL_{\text{công bố}} \geq MDL_{\text{tính toán}}$ , sao cho  $MDL_{\text{công bố}}$  đáp ứng tiêu chí chấp nhận mức giới hạn cho phép trên 4 nền mẫu theo QCVN 8-1:2011/BYT. Giới hạn công bố cho từng AF trên 4 nền mẫu là  $MDL = 0,1 \mu\text{g}/\text{kg}$

**Bảng 3.7:** Giới hạn phát hiện của phương pháp trên nền mẫu đậu phộng, bột ớt, nho khô và bắp hạt

Nền mẫu	Tên chất	Mẫu thêm chuẩn $C_{\text{min}}$ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	$S/N_{\text{tb}}$ (n=6)	MDL tính toán ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	MDL công bố ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
Đậu phộng	AFB1	0,100	4,0	0,075	0,1
	AFB2	0,025	6,6	0,011	0,1
	AFG1	0,100	3,1	0,097	0,1
	AFG2	0,025	6,6	0,011	0,1

<b>Nền mẫu</b>	<b>Tên chất</b>	<b>Mẫu thêm chuẩn C<sub>min</sub> (µg/kg)</b>	<b>S/N<sub>tb</sub> (n =6)</b>	<b>MDL tính toán (µg/kg)</b>	<b>MDL công bố (µg/kg)</b>
Bột ốt	AFB1	0,100	5,0	0,060	0,1
	AFB2	0,025	8,6	0,009	0,1
	AFG1	0,100	3,3	0,091	0,1
	AFG2	0,025	8,7	0,009	0,1
Nho khô	AFB1	0,100	4,0	0,075	0,1
	AFB2	0,025	6,9	0,011	0,1
	AFG1	0,100	3,2	0,094	0,1
	AFG2	0,025	8,0	0,009	0,1
Bắp hạt	AFB1	0,100	3,3	0,091	0,1
	AFB2	0,025	6,8	0,011	0,1
	AFG1	0,100	3,8	0,079	0,1
	AFG2	0,025	9,4	0,008	0,1



**Hình 3.6:** Sắc ký đồ giới hạn phát hiện của phương pháp trên nền mẫu đậu phộng, bột ột, nhỏ khô và bắp hạt

Nhận xét: Phương pháp phân tích đồng thời aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) không sử dụng dẫn xuất bằng UPLC-FD nhưng vẫn 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 (axit formic) 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 (PBS hoặc H<sub>2</sub>O) 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.

- ***Giới hạn định lượng của phương pháp MQL***

Giới hạn định lượng (MQL) thường được thiết lập tại mức  $3 \times \text{MDL}$  [61] để đảm bảo phương pháp phân tích có độ nhạy và độ chính xác cần thiết đáp ứng mức giới hạn cho phép theo QCVN 8-1:2011/BYT [108]. Mức giới hạn phát hiện MDL được xác định là  $0,1 \mu\text{g}/\text{kg}$  theo AFB1, làm cơ sở để tính toán nồng độ bổ sung phù hợp cho việc xác định MQL. Mẫu trắng được bổ sung chuẩn AF ở nồng độ  $0,75 \mu\text{g}/\text{kg}$ , trong đó các thành phần AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 có nồng độ lần lượt là  $0,3; 0,075; 0,3; 0,075 \mu\text{g}/\text{kg}$  trên mỗi nền mẫu. Mẫu được phân tích lặp lại 12 lần để đánh giá hiệu suất thu hồi và độ tái lập. Tiêu chí chấp nhận mức giới hạn định lượng (MQL) yêu cầu độ chụm ( $\% \text{RSD}_R \leq 20\%$ ) và độ đúng ( $\text{H}\% = 70 - 120\%$ ), theo tiêu chí chấp nhận của tiêu chuẩn SANTE/12682/2019 và Phụ lục F của AOAC 2019 [14; 113]

Kết quả từ Bảng 3.8 cho thấy giới hạn định lượng MQL đối với AFB1; AFG1 là  $0,3 \mu\text{g}/\text{kg}$  và AFB2; AFG2 là  $0,075 \mu\text{g}/\text{kg}$  trong 4 nền mẫu đậu phộng, bột ót, nho khô và bắp hạt. Cụ thể các thông số hiệu suất thu hồi (H%) và độ tái lập ( $\% \text{RSD}_R$ ) cho từng nền mẫu như sau:

Nền đậu phộng:  $\text{H}\% = 94,9\% - 99,4\%$ ;  $\% \text{RSD}_R: 1,21\% - 2,06\%$

Nền bột ót:  $\text{H}\% = 81,6\% - 94,3\%$ ;  $\% \text{RSD}_R: 2,01\% - 6,90\%$

Nền nho khô:  $\text{H}\% = 86,4\% - 96,9\%$ ;  $\% \text{RSD}_R: 1,07\% - 2,31\%$

Nền bắp hạt:  $\text{H}\% = 71,8\% - 85,7\%$ ;  $\% \text{RSD}_R: 1,91\% - 6,97\%$

Chọn mức giới hạn định lượng cao nhất để công bố MQL cho từng AF trên 4 nền mẫu sao cho  $\text{MQL}_{\text{công bố}}$  đáp ứng tiêu chí chấp nhận mức giới hạn cho phép trên 4 nền mẫu theo QCVN 8-1:2011/BYT.

Giới hạn định lượng công bố cho AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 trên 4 nền mẫu đậu phộng, bột ót, nho khô và bắp hạt là  $\text{MQL} = 0,3 \mu\text{g}/\text{kg}$ .

**Bảng 3.8:** Hiệu suất thu hồi và độ tái lập tại nồng độ MQL trên mẫu đậu phộng,

bột ớt, nho khô và bắp hạt

	Nồng độ thêm chuẩn ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Nồng độ thực tế ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ , n=12)	Hiệu suất thu hồi (% , n=12)	Độ tái lập RSD <sub>R</sub> (% , n=12)	MQL công bố ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
Nền đậu phộng					
AFB1	0,300	0,290	97,3	1,74	0,3
AFB2	0,075	0,071	94,9	1,68	0,3
AFG1	0,300	0,290	96,7	2,06	0,3
AFG2	0,075	0,074	99,4	1,21	0,3
Nền Bột ớt					
AFB1	0,300	0,250	84,5	2,16	0,3
AFB2	0,075	0,070	92,9	2,06	0,3
AFG1	0,300	0,240	81,6	6,90	0,3
AFG2	0,075	0,070	94,3	2,01	0,3
Nền nho khô					
AFB1	0,300	0,260	86,4	1,92	0,3
AFB2	0,075	0,073	96,9	1,07	0,3
AFG1	0,300	0,270	91,3	2,31	0,3
AFG2	0,075	0,071	95,0	1,81	0,3

	Nồng độ thêm chuẩn ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Nồng độ thực tế ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ , n=12)	Hiệu suất thu hồi (% , n=12)	Độ tái lập RSD <sub>R</sub> (% , n=12)	MQL công bố ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
Nền bắp hạt					
AFB1	0,300	0,248	82,8	6,97	0,3
AFB2	0,075	0,064	85,7	4,15	0,3
AFG1	0,300	0,220	73,5	4,24	0,3
AFG2	0,075	0,054	71,8	1,91	0,3

### 3.3.3. Độ chụm (độ lặp lại RSD<sub>r</sub> và độ tái lập RSD<sub>R</sub>) và độ đúng của phương pháp

Kết quả nghiên cứu độ chụm (độ lặp lại % RSD<sub>r</sub>, độ tái lập % RSD<sub>R</sub>) và độ đúng (hiệu suất thu hồi %H) theo Bảng 3.9 – 3.12, cho từng AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 trên 4 nền mẫu đậu phộng, bột ốt, nho khô và bắp hạt đạt theo phụ lục F – AOAC 2019 tiêu chí chấp nhận hiệu suất thu hồi %H, độ lặp lại %RSD<sub>r</sub> và độ tái lập %RSD<sub>R</sub> cho từng mức nồng độ < 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  như sau:

Nền đậu phộng (Bảng 3.9): độ lặp lại %RSD<sub>r</sub> < 4%, độ tái lập %RSD<sub>R</sub> < 4% và độ đúng (%H) đạt mức cao trong khoảng nồng độ 0,5 - 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , cụ thể: AFB1 (94,9 -98,1%), AFB2 (91,7 -98,6%), AFG1 (95,5 -99,8%), AFG2 (76,5 -96,0%).

Nền bột ốt (Bảng 3.10): độ lặp lại %RSD<sub>r</sub> < 3%, độ tái lập %RSD<sub>R</sub> < 3% và độ đúng (%H) đạt mức cao trong khoảng nồng độ 1,25 - 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , cụ thể: AFB1 (84,1-85,3%), AFB2 (83,4-85,0%), AFG1 (84,6-86,4%), AFG2 (81,8-82,9%).

Nền nho khô (Bảng 3.11): độ lặp lại %RSD<sub>r</sub> < 3%, độ tái lập %RSD<sub>R</sub> < 3% và độ đúng (%H) đạt mức cao trong khoảng nồng độ 1,25 - 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , cụ thể: AFB1 (86,4-97,3%), AFB2 (91,5-96,9%), AFG1 (86,9-97,1%), AFG2 (80,9-95,0%).



Nền bắp hạt (Bảng 3.12): độ lặp lại  $\%RSD_r < 2\%$ , độ tái lặp  $\%RSD_R < 2\%$  và độ đúng ( $\%H$ ) đạt mức cao trong khoảng nồng độ 0,5 - 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , cụ thể: AFB1 (81,1 -97,9% ), AFB2 (82,6 -99,6%), AFG1 (80,4 -99,2%), AFG2 (82,0 -99,9%).

**Bảng 3.9:** Độ chụm và độ đúng của 12 mẫu đậu phộng thêm chuẩn trong khoảng 5-50  $\mu\text{g}/\text{kg}$

Tên chất	Nồng độ thêm chuẩn 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ AFB1: 2, AFB2: 0,5 AFG1: 2, AFG2: 0,5			Nồng độ thêm chuẩn 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ AFB1: 10, AFB2: 2,5 AFG1: 10, AFG2: 2,5			Nồng độ thêm chuẩn 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ AFB1: 20, AFB2: 5 AFG1: 20, AFG2: 5		
	$\%RSD_r$ (n=6)	$\%RSD_R$ (n=12)	$\%H$ (n=12)	$\%RSD_r$ (n=6)	$\%RSD_R$ (n=12)	$\%H$ (n=12)	$\%RSD_r$ (n=6)	$\%RSD_R$ (n=12)	$\%H$ (n=12)
AFB1	1,07	1,09	98,1	0,23	0,32	94,9	0,73	1,88	97,3
AFB2	0,38	0,85	98,6	0,22	0,25	91,7	0,86	3,94	92,3
AFG1	0,39	0,90	99,8	0,16	0,31	95,5	0,57	1,48	97,0
AFG2	0,16	0,18	96,0	0,11	0,45	84,6	0,58	2,98	76,5

**Bảng 3.10:** Độ chụm và độ đúng của 12 mẫu bột Ớt thêm chuẩn trong khoảng 12,5-125  $\mu\text{g}/\text{kg}$

Tên chất	Nồng độ thêm chuẩn 12,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ AFB1: 5 , AFB2: 1,25 AFG1: 5 , AFG2: 1,25			Nồng độ thêm chuẩn 62,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ AFB1: 25 , AFB2: 6,25 AFG1: 25 , AFG2: 6,25			Nồng độ thêm chuẩn 125 $\mu\text{g}/\text{kg}$ AFB1: 50 , AFB2: 12,5 AFG1: 50 , AFG2: 12,5		
	$\%RSD_r$ (n=6)	$\%RSD_R$ (n=12)	$\%H$ (n=12)	$\%RSD_r$ (n=6)	$\%RSD_R$ (n=12)	$\%H$ (n=12)	$\%RSD_r$ (n=6)	$\%RSD_R$ (n=12)	$\%H$ (n=12)
AFB1	0,59	1,55	85,3	0,31	1,04	85,0	0,24	0,29	84,1
AFB2	0,23	0,49	84,8	0,21	0,45	85,0	0,21	0,56	83,4

Tên chất	Nồng độ thêm chuẩn 12,5 µg/kg			Nồng độ thêm chuẩn 62,5 µg/kg			Nồng độ thêm chuẩn 125 µg/kg		
	AFB1: 5 , AFB2: 1,25 AFG1: 5 , AFG2: 1,25			AFB1: 25 , AFB2: 6,25 AFG1: 25 , AFG2: 6,25			AFB1: 50 , AFB2: 12,5 AFG1: 50 , AFG2: 12,5		
	% RSD <sub>r</sub> (n=6)	% RSD <sub>R</sub> (n=12)	% H (n=12)	% RSD <sub>r</sub> (n=6)	% RSD <sub>R</sub> (n=12)	% H (n=12)	% RSD <sub>r</sub> (n=6)	% RSD <sub>R</sub> (n=12)	% H (n=12)
AFG1	0,46	0,61	86,1	0,37	0,53	86,4	0,12	0,15	84,6
AFG2	0,44	0,64	82,7	0,12	0,18	82,9	0,25	0,46	81,8

**Bảng 3.11:** Độ chụm và độ đúng của 12 mẫu nho khô thêm chuẩn trong khoảng 12,5-125 µg/kg

Tên chất	Nồng độ thêm chuẩn 12,5 µg/kg			Nồng độ thêm chuẩn 62,5 µg/kg			Nồng độ thêm chuẩn 125 µg/kg		
	AFB1: 5 , AFB2: 1,25 AFG1: 5 , AFG2: 1,25			AFB1: 25 , AFB2: 6,25 AFG1: 25 , AFG2: 6,25			AFB1: 50 , AFB2: 12,5 AFG1: 50 , AFG2: 12,5		
	% RSD <sub>r</sub> (n=6)	% RSD <sub>R</sub> (n=12)	% H (n=12)	% RSD <sub>r</sub> (n=6)	% RSD <sub>R</sub> (n=12)	% H (n=12)	% RSD <sub>r</sub> (n=6)	% RSD <sub>R</sub> (n=12)	% H (n=12)
AFB1	0,33	0,46	97,3	0,31	0,50	92,8	0,23	0,61	89,3
AFB2	0,62	1,05	94,7	0,10	0,57	92,8	0,37	0,82	91,5
AFG1	0,68	0,86	97,1	0,29	0,70	90,8	0,26	0,80	86,9
AFG2	0,28	0,61	80,9	0,16	0,90	90,7	0,43	0,74	88,9

**Bảng 3.12:** Độ chụm và độ đúng của 12 mẫu bắp hạt thêm chuẩn trong  
khoảng 5-50 µg/kg

Tên chất	Nồng độ thêm chuẩn 5 µg/kg AFB1: 2, AFB2: 0,5 AFG1: 2, AFG2: 0,5			Nồng độ thêm chuẩn 25 µg/kg AFB1: 10, AFB2: 2,5 AFG1: 10, AFG2: 2,5			Nồng độ thêm chuẩn 50 µg/kg AFB1: 20, AFB2: 5 AFG1: 20, AFG2: 5		
	% RSD <sub>r</sub> (n=6)	% RSD <sub>R</sub> (n=12)	% H (n=12)	% RSD <sub>r</sub> (n=6)	% RSD <sub>R</sub> (n=12)	% H (n=12)	% RSD <sub>r</sub> (n=6)	% RSD <sub>R</sub> (n=12)	% H (n=12)
AFB1	0,87	1,06	81,1	0,15	1,03	84,4	0,66	0,76	97,9
AFB2	0,28	0,53	82,6	0,24	1,28	88,7	0,32	0,54	99,6
AFG1	1,04	1,52	82,2	0,29	0,47	80,4	0,36	0,59	99,2
AFG2	0,24	1,50	82,0	0,18	0,27	83,6	0,09	0,44	99,9

#### **3.3.4. Hệ số pha loãng mẫu**

Kết quả Bảng 3.13 cho thấy, tất cả dung dịch pha loãng của từng nền mẫu đậu phộng, bột ớt, nho khô và bắp hạt đều cho hiệu suất thu hồi đạt từ 80,3 % – 104 % và độ tái lập < 10%. Kết quả này đáp ứng tiêu chí chấp nhận hiệu suất thu hồi và độ tái lập theo phụ lục F – AOAC 2019 ở các mức nồng độ từ 1-100 µg/kg. Như vậy việc pha loãng mẫu không ảnh hưởng đến độ chụm và độ đúng của phương pháp.

Do đó, khi xác nhận giá trị sử dụng phương pháp và phân tích mẫu thực tế, đường chuẩn dung dịch được xây dựng 5 điểm bao phủ các mức nồng độ MQL, mức giới hạn cho phép (ML) và (2xML). Trường hợp mẫu vượt ngoài đường chuẩn, mẫu phải được pha loãng bằng dung dịch ACN/HCOOH 0,2%.

**Bảng 3.13:** Độ đúng và độ tái lập của các mẫu pha loãng với hệ số pha loãng khác nhau

Tên chất	AFB1			AFB2			AFG1			AFG2		
	DT	Reco (%)	RSD <sub>R</sub> (%)	DT	Reco (%)	RSD <sub>R</sub> (%)	DT	Reco (%)	RSD <sub>R</sub> (%)	DT	Reco (%)	RSD <sub>R</sub> (%)
Nền đậu phộng												
ĐẬU+125 µg/kg_F100	75311	96,4	1,90	174826	99,2	0,59	55201	97,2	1,47	162575	96,0	7,25
ĐẬU+125 µg/kg_F50	157309	97,6		375842	98,8		94377	96,3		299002	87,2	
ĐẬU+125 µg/kg_F20	393080	95,9		992534	99,5		213404	96,6		700673	81,1	
ĐẬU+125 µg/kg_F10	823610	99,8		1987598	98,2		421154	98,9		1410458	81,4	
ĐẬU+125 µg/kg_F5	1652460	99,8		4277541	99,6		831454	99,5		3148478	90,8	
Nền Bột ốt												
ỚT+125 µg/kg_F100	72993	93,6	1,29	176136	100,0	1,63	52408	90,4	1,11	166173	97,6	2,54
ỚT+125 µg/kg_F50	149643	93,0		374128	98,4		91580	92,9		331438	96,4	
ỚT+125 µg/kg_F20	379016	92,5		1016617	101,8		202207	91,1		831236	96,2	

Tên chất	AFB1			AFB2			AFG1			AFG2		
	DT	Reco (%)	RSD <sub>R</sub> (%)	DT	Reco (%)	RSD <sub>R</sub> (%)	DT	Reco (%)	RSD <sub>R</sub> (%)	DT	Reco (%)	RSD <sub>R</sub> (%)
ÓT+125 µg/kg_F10	768037	93,1		2055892	101,5		386616	90,5		1645599	95,0	
ÓT+125 µg/kg_F5	1498012	90,5		4013531	98,4		760539	90,9		3167562	91,3	
Nền nho khô												
NHO+125 µg/kg_F100	74909	96,0	1,84	169427	96,8	1,18	54563	95,6	1,65	167823	99,2	9,22
NHO+125 µg/kg_F50	156698	97,3		374279	98,4		96106	98,4		282246	82,4	
NHO+125 µg/kg_F20	390758	95,3		986899	98,9		215883	97,8		708037	81,9	
NHO+125 µg/kg_F10	809870	98,2		2019968	99,8		420824	98,9		1391143	80,3	
NHO+125 µg/kg_F5	1652523	99,8		4654116	99,5		835341	100,0		3160891	91,1	
Nền bắp hạt												
BẮP+125 µg/kg_F100	76911	98,4	1,17	173558	98,4	1,16	53634	93,2	4,25	167236	98,4	0,94
BẮP+125 µg/kg_F50	160494	99,6		383718	100,4		100536	103,8		334868	97,6	

Tên chất	AFB1			AFB2			AFG1			AFG2		
	DT	Reco (%)	RSD <sub>R</sub> (%)	DT	Reco (%)	RSD <sub>R</sub> (%)	DT	Reco (%)	RSD <sub>R</sub> (%)	DT	Reco (%)	RSD <sub>R</sub> (%)
BẮP+125 µg/kg_F20	400779	97,7		1001956	100,3		210548	95,2		853407	98,7	
BẮP+125 µg/kg_F10	795484	96,4		1982767	98,0		409463	96,1		1690968	97,6	
BẮP+125 µg/kg_F5	1621662	98,0		4076136	99,9		829565	99,3		3463675	99,8	

DT: Diện tích các pic

### 3.3.5. Độ không đảm bảo đo

Kết quả Bảng 3.14 cho thấy độ không đảm bảo đo mở rộng của 4 nền mẫu đậu phộng, bột ớt, nho khô, và bắp hạt đều đạt theo tiêu chí chấp nhận theo CAC/GL 54-2004 với độ không đảm bảo đo mở rộng < 44 % tại nồng độ < 100 µg/kg.

**Bảng 3.14:** Độ không đảm bảo đo mở rộng của aflatoxin trên nền mẫu đậu phộng, bột ớt, nho khô và bắp hạt

Nền mẫu	Khoảng nồng độ (µg/kg)	Độ không đảm bảo đo $U_{exp}$ (%)			
		AFB1	AFB2	AFG1	AFG2
Đậu phộng	0,3 - 20	7,20	13,2	6,90	28,6
Bột ớt	0,3 - 50	30,7	28,1	31,7	30,9
Nho khô	0,3 - 50	19,1	12,8	18,6	24,6
Bắp hạt	0,3 - 20	30,8	25,6	37,8	37,4

### 3.3.6. Độ ổn định mẫu

Độ ổn định aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) của các mẫu đậu phộng, bắp hạt thêm chuẩn ở mức 2 mức nồng độ 5 µg/kg và 50 µg/kg; trong khi mẫu bột ớt và nho khô ở 2 mức nồng độ 12,5 µg/kg và 125 µg/kg với cách thức bảo quản như sau:

- Bảo quản 1: Mẫu thêm chuẩn đã xử lý mẫu lưu tự động (20 °C) trong 24 giờ
- Bảo quản 2: Mẫu thêm chuẩn đã xử lý mẫu lưu tủ lạnh (4 °C) trong 24 giờ
- Bảo quản 3: Mẫu thêm chuẩn chưa xử lý lưu tủ đông (-20 °C) trong 10 ngày
- Bảo quản 4: Mẫu thêm chuẩn chưa xử lý lưu tủ đông (-20 °C) trong 21 ngày

Kết quả thu được độ sai biệt  $D$  (%) và hệ số biến thiên  $CV$  (%) theo Bảng 3.15 – 3.16, cho từng AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 đạt theo tiêu chí chấp nhận  $D \leq 20\%$  và  $CV \leq 15\%$  cho ít nhất 67% số mẫu thực hiện mẫu lặp theo ICH M10 guideline [61].

Nhận xét: Kết quả nghiên cứu theo Bảng 3.15 và 3.16 cho thấy mẫu ổn định trong điều kiện nhiệt độ -20 °C ít nhất 21 ngày. Vì thế, đối với mẫu gửi kiểm aflatoxin

(B1, B2, G1 và G2), nếu chưa phân tích ngay lập tức, mẫu phải được bảo quản ngăn đông ở nhiệt độ -20 °C.

**Bảng 3.15:** Độ ổn định của aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) trong các mẫu thêm chuẩn ở nồng độ 5,0 và 12,5 µg/kg với các điều kiện bảo quản khác nhau

Nền mẫu	Tên chất	Nồng độ (µg/kg)	Bảo quản 1		Bảo quản 2		Bảo quản 3		Bảo quản 4	
			% CV (n=3)	% D (n=3)	% CV (n=3)	% D (n=3)	% CV (n=3)	% D (n=3)	% CV (n=3)	% D (n=3)
Đậu phộng	AFB1	2	0,67	1,16	1,18	0,78	1,24	1,24	2,30	5,68
	AFB2	0,5	0,71	0,68	0,78	1,36	1,04	7,01	1,99	4,63
	AFG1	2	0,21	0,02	1,32	0,84	0,39	2,78	1,06	4,97
	AFG2	0,5	0,21	1,46	0,37	3,75	0,65	15,6	1,04	5,69
Bột ốt	AFB1	5	0,17	0,12	0,18	0,24	0,27	1,93	0,26	6,56
	AFB2	1,25	0,29	0,79	0,56	0,28	2,80	2,26	0,26	3,68
	AFG1	5	0,36	0,04	0,52	1,46	0,19	1,63	0,22	10,9
	AFG2	1,25	0,56	1,00	0,42	0,58	0,33	4,95	0,26	3,01
Nho khô	AFB1	5	0,17	1,58	0,25	2,04	0,40	1,11	1,09	3,36
	AFB2	1,25	1,06	3,90	3,45	1,84	0,22	2,71	0,44	9,52
	AFG1	5	0,34	1,92	0,74	1,86	0,31	0,40	0,65	7,66
	AFG2	1,25	0,15	1,82	0,11	1,95	0,48	16,5	0,71	2,61
Bắp hạt	AFB1	2	1,39	0,10	0,56	0,04	3,87	9,30	1,70	8,83
	AFB2	0,5	0,28	1,87	1,12	3,09	3,89	10,4	0,38	0,81
	AFG1	2	0,55	2,13	0,26	2,62	1,86	2,56	0,94	8,41
	AFG2	0,5	0,63	1,95	0,24	2,44	1,16	3,50	0,43	1,95



**Bảng 3.16:** Độ ổn định của aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) trong các mẫu thêm chuẩn ở nồng độ 50 và 125 µg/kg với các điều kiện bảo quản khác nhau

Nền mẫu	Tên chất	Nồng độ (µg/kg)	Bảo quản 1		Bảo quản 2		Bảo quản 3		Bảo quản 4	
			% CV (n=3)	% D (n=3)	% CV (n=3)	% D (n=3)	% CV (n=3)	% D (n=3)	% CV (n=3)	% D (n=3)
Đậu phộng	AFB1	20	0,26	1,91	0,53	1,71	1,06	0,77	1,23	1,08
	AFB2	5	0,25	0,09	0,06	3,01	0,27	0,42	0,24	3,78
	AFG1	20	0,02	2,72	0,57	2,63	0,72	0,51	0,49	2,27
	AFG2	5	0,24	0,20	0,21	4,90	0,14	9,53	0,10	21,6
Bột ót	AFB1	50	0,11	0,96	0,48	1,71	0,23	4,57	0,11	6,60
	AFB2	12,5	0,76	0,46	0,45	1,72	0,26	3,38	0,25	5,00
	AFG1	50	0,36	0,69	0,62	2,20	0,39	5,51	0,42	10,6
	AFG2	12,5	0,46	0,50	0,10	1,36	0,27	3,05	0,04	4,58
Nho khô	AFB1	50	0,12	0,55	0,79	0,56	0,90	1,02	0,10	6,99
	AFB2	12,5	0,22	1,26	0,69	0,06	0,57	6,60	0,08	10,4
	AFG1	50	0,35	1,42	0,23	1,31	0,36	1,98	0,16	5,55
	AFG2	12,5	0,12	1,25	0,27	0,41	0,37	4,28	0,34	9,79
Bắp hạt	AFB1	20	0,53	0,86	0,53	1,13	0,66	5,33	0,73	9,17
	AFB2	5	0,18	0,21	0,27	0,27	1,24	8,45	0,08	19,4
	AFG1	20	0,86	0,08	0,24	0,42	1,15	9,80	1,49	16,4
	AFG2	5	0,10	0,04	0,25	0,03	0,18	15,0	0,35	19,3

### 3.3.7. Đảm bảo chất lượng kết quả thử nghiệm

#### 3.3.7.1. Kết quả so sánh liên phòng

Độ tin cậy của qui trình phân tích được đánh giá thông qua kết quả so sánh liên phòng hoặc chương trình thử nghiệm thành thạo.

Kết quả so sánh liên phòng được trình bày ở Bảng 3.17 - 3.20 cho thấy, cùng một mẫu thử nghiệm, mặc dù thực hiện phân tích trên các phương pháp khác nhau: phương pháp tiêu chuẩn DIN EN 14123:2008-03 sử dụng HPLC-FD có dẫn xuất trước cột, phương pháp nội bộ HD.PP.04/TT.SK sử dụng thiết bị LC/MS/MS, phương pháp nghiên cứu UPLC -FD không sử dụng dẫn xuất theo qui trình chiết mẫu mục 3.2.1 và điều kiện sắc ký Bảng 3.2 tuy nhiên kết quả độ tái lập  $RSD_R$  thu được từ 3 phòng thử nghiệm khác nhau tương đối tốt, đạt theo phụ lục F – AOAC 2019 tiêu chí

chấp nhận độ tái lập (%RSD<sub>R</sub>) giữa 3 phòng thí nghiệm tại mức nồng độ ≤ 100 µg/kg là ≤ 22% như sau:

Nền đậu phộng (Bảng 3.17): %RSD<sub>R</sub> đạt được đối với AFB1 và AFB2 lần lượt là 5,20 % và 2,90%.

Nền bột ớt (Bảng 3.18): %RSD<sub>R</sub> đạt được đối với AFB1, AFB2 và AFG1 lần lượt là 0,95%; 5,09% và 1,45%.

Nền bắp hạt (Bảng 3.19): %RSD<sub>R</sub> đạt được đối với AFB1, AFB2, AFG1 và AFG2 lần lượt là 11,0 %, 9,6 %, 6,3 % và 10,8 %.

Nền nho khô (Bảng 3.20): %RSD<sub>R</sub> đạt được đối với AFB1, AFB2, AFG1 và AFG2 lần lượt là 8,84%, 6,23 %, 5,11 %, và 10,2 %.

**Bảng 3.17:** Kết quả thử nghiệm aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) trên nền mẫu đậu phộng giữa các phòng thí nghiệm

Diễn giải	Phương pháp	Mẫu đậu phộng (µg/kg)			
		AFB1	AFB2	AFG1	AFG2
Phòng thí nghiệm 1	UPLC-FD, không dẫn xuất	4,14	0,54	KPH, MDL= 0,1	KPH, MDL= 0,1
Phòng thí nghiệm 2	DIN EN 14123:2008-03 mod	4,00	0,51	KPH, MDL= 0,5	KPH, MDL= 0,5
Phòng thí nghiệm 3	HD.PP.04/TT.SK	4,43	0,53	KPH, MDL= 0,1	KPH, MDL= 0,1
Giá trị trung bình		4,19	0,53	-	-
Độ tái lập RSD <sub>R</sub> (%)		5,20	2,90	-	-

KPH: Không phát hiện

**Bảng 3.18:** Kết quả thử nghiệm aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) trên nền mẫu bột ớt giữa các phòng thí nghiệm

Diễn giải	Phương pháp	Mẫu đậu phộng ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )			
		AFB1	AFB2	AFG1	AFG2
Phòng thí nghiệm 1	UPLC-FD, không dẫn xuất	10,3	0,54	2,26	KPH, MDL= 0,1
Phòng thí nghiệm 2	DIN EN 14123:2008-03 mod	10,3	0,53	2,20	KPH, MDL= 0,5
Phòng thí nghiệm 3	HD.PP.04/TT.SK	10,5	0,49	2,21	KPH, MDL= 0,1
Giá trị trung bình		10,4	0,52	2,22	-
Độ tái lập RSD <sub>R</sub> (%)		0,95	5,09	1,45	-

KPH: Không phát hiện

**Bảng 3.19:** Kết quả thử nghiệm aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) trên nền mẫu bắp hạt giữa các phòng thí nghiệm

Diễn giải	Phương pháp	Mẫu bắp hạt thêm chuẩn ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )				
		AFB1	AFB2	AFG1	AFG2	Total
Phòng thí nghiệm 1	UPLC-FD, không dẫn xuất	1,97	0,48	1,89	0,48	4,82
Phòng thí nghiệm 2	EVN-R-RD-1-TP-5060 (Ref,DIN EN 14123:2008-03)	2,12	0,58	2,13	0,59	5,42
Phòng thí nghiệm 3	HD.PP.04/TT.SK	1,70	0,52	1,95	0,51	4,68
Giá trị trung bình		1,93	0,53	1,99	0,53	4,97
Độ tái lập RSD <sub>R</sub> (%)		11,0	9,60	6,30	10,8	7,90

**Bảng 3.20:** Kết quả thử nghiệm aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) trên nền mẫu nho khô giữa các phòng thí nghiệm

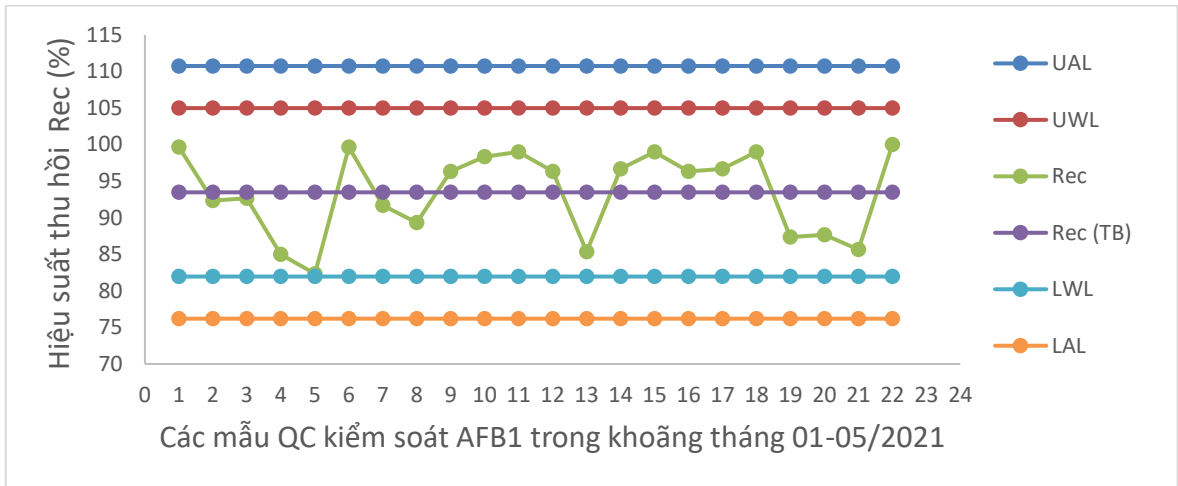
Diễn giải	Phương pháp	Mẫu nho khô thêm chuẩn (µg/kg)				
		AFB1	AFB2	AFG1	AFG2	Total
Phòng thí nghiệm 1	UPLC-FD, không dẫn xuất	4,74	1,31	4,68	1,13	11,9
Phòng thí nghiệm 2	EVN-R-RD-1-TP-5060 (Ref.DIN EN 14123:2008-03)	5,18	1,27	5,09	1,29	12,8
Phòng thí nghiệm 3	HD.PP.04/TT.SK	4,34	1,16	4,65	1,06	11,2
Giá trị trung bình		4,75	1,25	4,81	1,16	12,0
Độ tái lập RSD <sub>R</sub> (%)		8,84	6,23	5,11	10,2	6,81

### 3.3.7.2. Chương trình thử nghiệm thành thạo

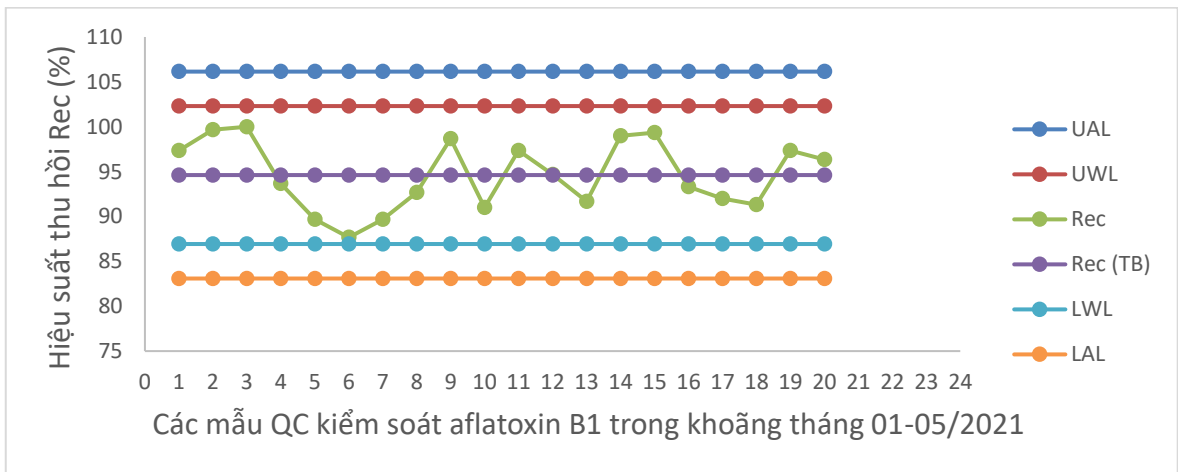
Chương trình Aflatoxin/Fumonisin trong bắp (CSSMY021 – M21411AF) vào tháng 12 năm 2021 do Romer Labs tổ chức, với sự tham gia của 523 phòng thí nghiệm. Kết quả phòng thí nghiệm theo phương pháp nghiên cứu phù hợp với kết quả của chương trình ( $-2 \leq Z\text{-score} \leq 2$ ) được xác định bằng mã 21411AF-234, bao gồm các giá trị sau: Tổng AF (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), AFG1 và AFG2 không được phát hiện [115].

### 3.3.7.3. Biểu đồ kiểm soát control chart

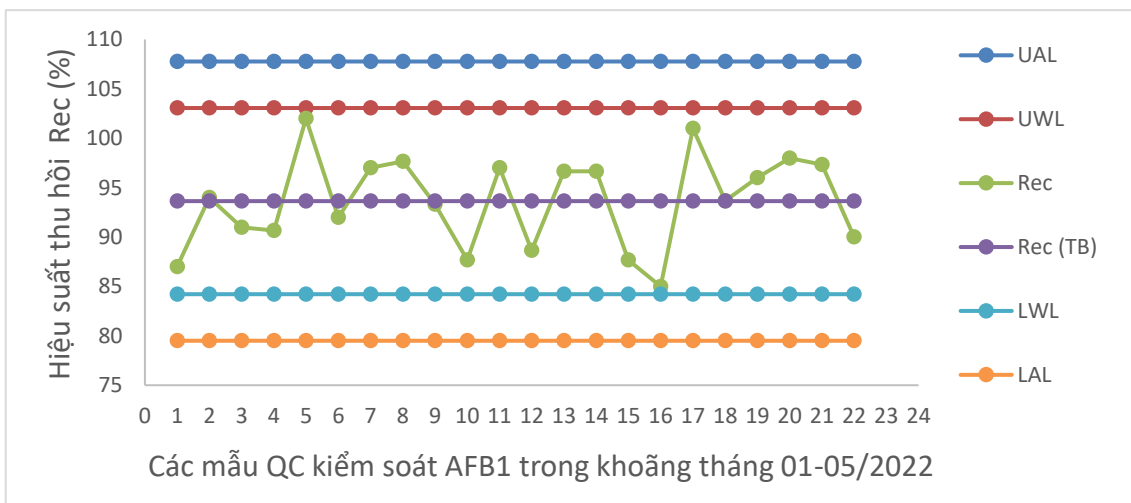
Biểu đồ control chart thu được từ tháng 01/2021 – 05/2022 đối với chỉ tiêu AFB1 tại mức nồng độ MQL (0,3 µg/kg) trong các mẫu đậu phộng, bột ớt, nho khô và bắp hạt được kiểm soát qua hiệu suất thu hồi từ các mẫu QC được trình bày ở các Hình 3.7 – Hình 3.10.



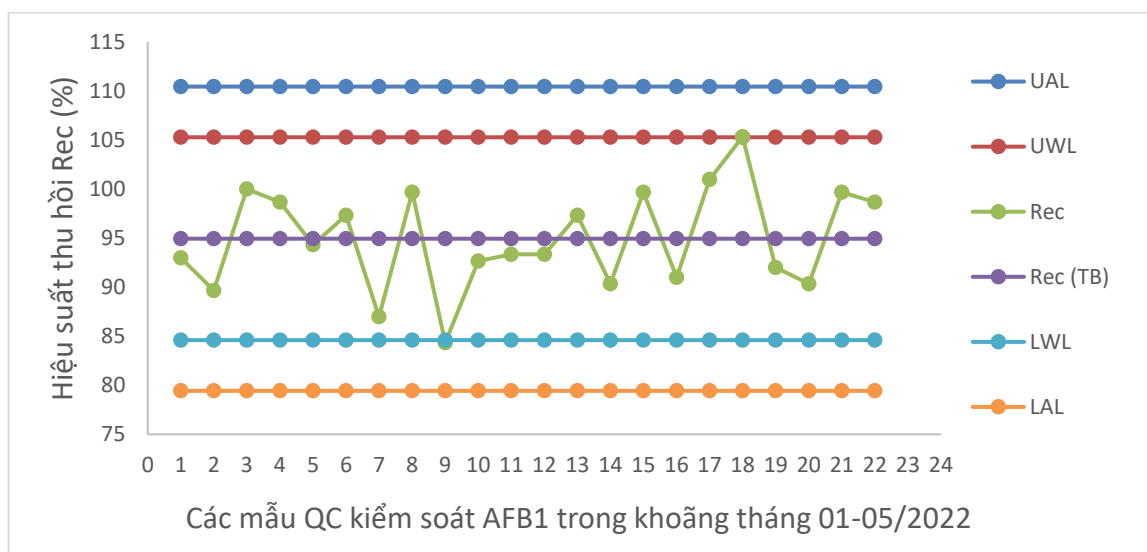
**Hình 3.7:** Biểu đồ kiểm soát hiệu suất thu hồi aflatoxin B1 trong nền đậu phộng



**Hình 3.8:** Biểu đồ kiểm soát hiệu suất thu hồi aflatoxin B1 trong nền bột ớt



**Hình 3.9:** Biểu đồ kiểm soát hiệu suất thu hồi aflatoxin B1 trong nền bắp hạt



**Hình 3.10:** Biểu đồ kiểm soát hiệu suất thu hồi aflatoxin B1 trong nền nho khô

Kết quả biểu đồ kiểm soát hiệu suất thu hồi từ 1 đến 22 điểm QC cho thấy:

- Giá trị nằm trong giới hạn kiểm soát: Tất cả các điểm dữ liệu đều nằm trong giới hạn cảnh báo (UWL và LWL), không có điểm nào vượt qua giới hạn hành động (UAL và LAL). Điều này cho thấy quá trình đang được kiểm soát.
- Xu hướng hệ thống: Không có 6 điểm liên tiếp tăng hoặc giảm, và không có 9 điểm liên tiếp nằm cùng một phía của đường trung bình.

Kết quả này nói lên quá trình kiểm soát hiệu suất thu hồi ổn định và kết quả phân tích trong khoảng thời gian này được đảm bảo.

• **Tóm tắt kết quả nghiên cứu đạt được**

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 pic (% 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 : $0,99 \leq R^2 \leq 1$ ,  Độ lệch: nồng độ tính toán được trên từng điểm chuẩn $\leq 15\%$ so với giá trị thực (trừ nồng độ tại điểm MQL $\leq 20\%$ )	Đạt với hệ số tương quan đường chuẩn: $R^2 = 0,9999$ , với khoảng 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 $RSD_r \leq 21\%$	Đạt : %H = 85,7 - 99,2% Đạt : %RSDr < 6% Lựa chọn dung môi chiết ACN/H <sub>2</sub> O (6/4) – H <sub>2</sub> O

STT	Nội dung nghiên cứu	Các tiêu chí chấp nhận	Kết quả đạt được
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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> O (8/2) - H <sub>2</sub> O
2.2	Khảo sát ảnh hưởng nền mẫu đến quy 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) không ảnh hưởng (%ME < 20), ảnh hưởng trung bình ( $20 \leq$ %ME $\leq$ 50), ảnh hưởng đáng kể (%ME > 50).	Đậu phộng: 2,81 – 8,04%
2.2.2	Nền bột ớt		Bột ớt: 13,9 – 18,1%
2.2.3	Nền nho khô		Nho khô: 5,63 – 11,4%
2.2.4	Nền bắp hạt		Bắp hạt: 6,1 – 11,3%
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
3.2	Giới hạn phát hiện MDL và định lượng MQL trên 4 nền mẫu đậu phộng, bột ớt, nho khô, và bắp hạt	MDL: Tín hiệu trên nhiễu nền đáp ứng tiêu chí $3 \leq S/N \leq 10$	MDL = 0,1 $\mu$ g/kg cho từng AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 trên 4 nền mẫu với S/N = 3,10 – 9,61
		MQL: Tiêu chí chấp nhận hiệu suất thu hồi khoảng 70-120%, độ tái lặp RSD <sub>R</sub> $\leq$ 20%	Đạt : Nền đậu phộng % H : 94,9 - 99,4% % RSD <sub>R</sub> < 3% Đạt : Nền bột ớt % H : 81,6 - 94,3%



STT	Nội dung nghiên cứu	Các tiêu chí chấp nhận	Kết quả đạt được
			<p>% RSD<sub>R</sub> &lt; 7% Đạt : Nền nho khô % H : 86,4 – 96,9%</p> <p>% RSD<sub>R</sub> &lt; 3% Đạt : Nền bắp hạt % H : 71,8 – 85,7%</p> <p>% RSD<sub>R</sub> &lt; 7% Giới hạn định lượng MQL = 0,3 µg/kg cho từng AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 trên 4 nền mẫu đậu phộng, bột ốt, nho khô, và bắp hạt</p>
3.3	Độ chụm (độ lặp lại RSD <sub>r</sub> và độ tái lặp RSD <sub>R</sub> ) và độ đúng của phương pháp	Độ chụm (độ lặp lại RSD <sub>r</sub> % và độ tái lặp RSD <sub>R</sub> %) không vượt quá 22%, độ đúng phải nằm trong khoảng 60-115% theo tiêu chí phụ lục F-AOAC 2019	<p>Đạt: Nền đậu phộng % H : 76,5-99,8% % RSD<sub>r</sub> và % RSD<sub>R</sub> &lt; 5%</p> <p>Đạt : Nền bột ốt % H : 81,2 - 87,2% % RSD<sub>r</sub> và % RSD<sub>R</sub> &lt; 3%</p> <p>Đạt: Nền nho khô % H : 80,9-97,3% % RSD<sub>r</sub> và % RSD<sub>R</sub> &lt; 2%</p> <p>Đạt: Nền bắp hạt % H : 80,4-99,2% % RSD<sub>r</sub> và % RSD<sub>R</sub> &lt; 2%</p>
3.4	Hệ số pha loãng mẫu	Hiệu suất thu hồi (%H) và độ tái lặp đạt theo tiêu chí AOAC 2019 theo tiêu chí phụ lục F-AOAC 2019	<p>% H: 80,3 – 104% % RSD<sub>R</sub> &lt; 10%</p> <p>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.</p>
3.5	Độ không đảm bảo đo	Độ không đảm bảo đo mở rộng % U <sub>exp</sub> < 44 % tại nồng độ < 100 µg/Kg	<p>Đạt: Nền đậu phộng % U<sub>exp</sub> : 7,2 - 28,6%</p> <p>Đạt: Nền bột ốt % U<sub>exp</sub>: 28,1 - 31,7%</p> <p>Đạt: Nền nho khô % U<sub>exp</sub> : 12,8 – 24,6%</p> <p>Đạt: Nền bắp hạt</p>

STT	Nội dung nghiên cứu	Các tiêu chí chấp nhận	Kết quả đạt được
			% Uexp : 25,6 – 37,8%
3.6	Độ ổn định mẫu	Độ sai biệt % D $\leq$ 15%  Hệ số biến thiên % CV $\leq$ 20%	Đạt: Nền đậu phộng % D : 0,02 – 15,6% % CV: 0,02 – 2,30% Đạt: Nền bột ốt % D : 0,04 – 10,9% % CV: 0,04 – 2,80% Đạt: Nền nho khô % D : 0,4 – 16,5% % CV: 0,1 – 3,5% Đạt: Nền bắp hạt % D : 0,04 – 19,4% % CV: 0,08 – 3,89%
3.7	Đảm bảo kết quả thử nghiệm	Kết quả so sánh liên phòng: đánh giá độ tái lập RSD <sub>R</sub> % không vượt quá 22% của 3 phòng lab tại nồng độ < 100 µg/kg	Đạt: Nền đậu phộng % RSD <sub>R</sub> < 6% Đạt :Nền bột ốt % RSD <sub>R</sub> < 6% Đạt: Nền nho khô % RSD <sub>R</sub> < 11% Đạt: Nền bắp hạt % RSD <sub>R</sub> < 12%
		Tham gia thử nghiệm thành thạo theo chương trình AF trong bắp (CSSMY021 – M21411AF), Tiêu chí (- 2 $\leq$ Z-score $\leq$ 2)	Tổng AF (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 $\leq$ Z-score $\leq$ 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 và G2) trong nền mẫu đậu phộng, bột ốt, nho khô và bắp hạt 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, ít gây ô nhiễm môi trường, bảo vệ sức khỏe người thao tác, qui trình xử lý mẫu đơn giản, ít tốn dung môi.

Một ví dụ điển hình ở Bảng 3.22 phân tích đồng thời 10 mẫu bột ớt tương ứng 20 lần tiêm mẫu bao gồm 1 mẫu dung môi, 5 dung dịch chuẩn, 1 mẫu trắng, 1 mẫu kiểm soát (QC), 10 mẫu bột ớt, 1 mẫu trắng và 1 mẫu QC nhằm so sánh qui trình phân tích định lượng đồng thời aflatoxin B1, B2, G1, G2 trong bột ớt trên hệ thống sắc ký lỏng siêu hiệu năng đầu dò huỳnh quang (UPLC-FD), không sử dụng dẫn xuất với qui trình theo tiêu chuẩn TCVN 10638:2014 trên thiết bị HPLC- FD, có dùng dẫn xuất sau cột.

**Bảng 3.22:** So sánh qui trình thực hiện phân tích đồng thời aflatoxin (B1, B2, G1, và G2) trong bột ớt theo qui trình nghiên cứu và tiêu chuẩn Việt Nam

Các mục thực hiện	Phương pháp nghiên cứu UPLC - FD	Phương pháp tiêu chuẩn TCVN 10638:2014 (HPLC-FD)
Lượng dung môi tiêu hao	MeOH: 300-340 mL ACN: 80-120 mL	MeOH: 2900-3000 mL ACN: 80-120 mL
Làm sạch mẫu cột IAC	Có	Có
Bộ dẫn xuất sau cột	Không	Có
Hoá chất sử dụng dẫn xuất sau cột	Không	Pyridini hydrobromua perbromua
Quy trình xử lý mẫu	Ít thao tác, đơn giản	Nhiều thao tác, phức tạp
Thời gian phân tích	420-460 phút	Không cụ thể

Khi so sánh hai phương pháp phân tích đồng thời aflatoxin (B1, B2, G1, và G2) trong bột ớt, phương pháp nghiên cứu UPLC-FD cho thấy nhiều ưu điểm hơn so với phương pháp tiêu chuẩn TCVN 10638:2014 (HPLC-FD). Trước hết, về lượng dung môi tiêu hao, phương pháp UPLC-FD sử dụng ít MeOH hơn đáng kể (300-340 mL so với 2900-3000 mL), trong khi lượng ACN tiêu hao tương đương. Điều này giúp giảm chi phí hóa chất và tác động môi trường. Ngoài ra, quy trình xử lý mẫu của

UPLC-FD đơn giản và ít thao tác hơn so với phương pháp TCVN, giúp tiết kiệm thời gian và giảm nguy cơ sai sót trong quá trình thực hiện. Đặc biệt, phương pháp này không yêu cầu sử dụng bộ dẫn xuất sau cột và hóa chất pyridini hydrobromua perbromua, giúp giảm sự phức tạp trong quy trình phân tích.

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

#### ***3.4.1. Hàm lượng aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) trong mẫu đậu phộng, bột ốt, nho khô và bắp hạt***

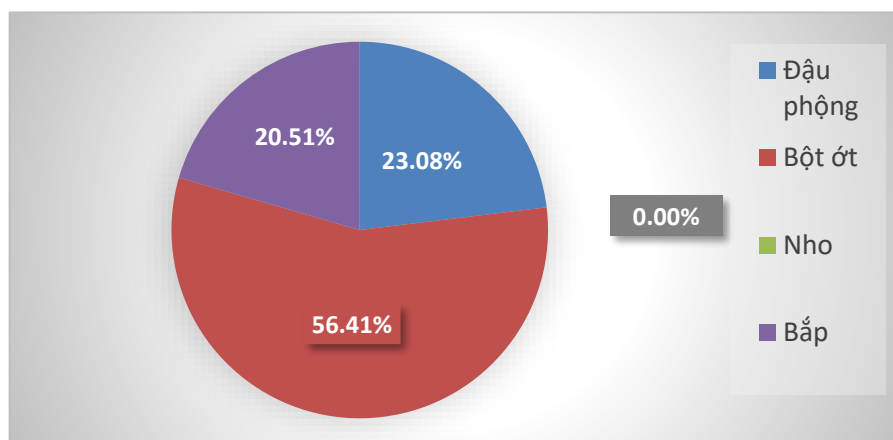
Mẫu đậu phộng, bột ốt, nho khô và bắp hạt được thu thập từ các chợ tại TP.HCM và phân tích đồng thời aflatoxin (B1, B2, G1, G2) bằng phương pháp UPLC-FD không dẫn xuất. Kết quả chi tiết về số mẫu nhiễm từng loại AF và tổng AF được trình bày trong Bảng 3.23 và Hình 3.11.

**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 TpHCM

Nền mẫu	Số mẫu nhiễm (phần trăm, %)					Số mẫu vượt ngưỡng AFB1, tỉ lệ (%)	Số mẫu vượt ngưỡng tổng AF, tỉ lệ (%)
	Min-max ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )						
	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 ốt (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 - 0,37	286 (71,5%) 0,30 - 127	132 (33,0%)	99 (24,8%)
Bắp hạt trắng, vàng và	104 (26,0%)	83 (20,8%)	49 (12,3%)	1 (0,3%)	104 (26,0%)	86 (21,5%)	79 (19,8%)

Nền mẫu	Số mẫu nhiễm (phần trăm, %)					Số mẫu vượt ngưỡng AFB1, tỉ lệ (%)	Số mẫu vượt ngưỡng tổng AF, tỉ lệ (%)
	Min-max ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )						
	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2	Tổng AF		
bắp chế biến (n=400)	0,32 - 494	0,34 - 29,7	0,32 - 4,87	0 - 0,37	0,32 - 525		
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%)
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  $\mu\text{g}/\text{kg}$  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 ốt, nho khô và bắp hạt trên địa bàn TpHCM

Ô nhiễm AF trong cây trồng là mối đe dọa toàn cầu ảnh hưởng đến an toàn thực phẩm và thức ăn chăn nuôi. Cây trồng có thể bị nhiễm nấm trong các giai đoạn khác nhau, bao gồm thu hoạch, bảo quản và vận chuyển, dẫn đến sản sinh độc tố nấm mốc [70]. Theo kết quả trình bày ở Bảng 3.23 và Hình 3.11, tỷ lệ mẫu nhiễm AF trong bột ốt là cao nhất (56,41%), tiếp theo là đậu phộng (23,08%), bắp hạt (20,51%), nho khô (0,0%). Trong số các loại AF, mức độ ô nhiễm AFB1 là cao nhất, tiếp theo là AFB2, AFG1 và AFG2. Hơn nữa, nếu mẫu không bị nhiễm AFB1 thì ba loại AF còn lại cũng sẽ không có mặt. Khảo sát này đúng với tác giả đã nghiên cứu AFB1, AFB2, AFG1 và AFG2, vì các độc tố nấm mốc này chủ yếu được tạo ra bởi các chủng nấm sản sinh độc tố, cụ thể là *Aspergillus flavus* và *Aspergillus parasiticus* [116].

- **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. Kết quả thu được phù hợp với các nghiên cứu trước đây, không tìm thấy mẫu nào vượt quá mức cho phép của tổng AF (ML = 10 µg/kg) và AFB1 (ML = 5 µg/kg), như sau: Tác giả [18] đã khảo sát 170 mẫu nho khô xuất khẩu ở Pakistan, trong đó chỉ có 5% trên tổng số mẫu nhiễm AF, dao động từ 0,15–2,58 µg/kg và

không có mẫu nào vượt ngưỡng cho phép. Tác giả [136] khảo sát 25 mẫu nho đen không hạt ở Thổ Nhĩ Kỳ, kết quả phát hiện 16/25 mẫu có tổng nồng độ AF dao động từ 0,02 - 2,07  $\mu\text{g}/\text{kg}$  và không có mẫu nào vượt ngưỡng cho phép.

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. Một trong những phương pháp xử lý bằng ozone trước khi sấy nho, được cho là khá thuận lợi về thời gian sấy và chất lượng sản phẩm cuối cùng, đồng thời có hiệu quả trong việc giảm sự phát triển của nấm mốc và nấm men, đặc biệt là trong quá trình bảo quản nho khô lâu dài. Một phương pháp khác là lưu huỳnh, trong đó sulfur dioxide ( $\text{SO}_2$ ) được sử dụng để ngăn chặn sự phát triển của vi sinh vật và bảo quản màu sắc và hương vị trong thực phẩm, đặc biệt là nho khô [8]. Ngoài ra, nho khô giàu carbohydrat có thể được phủ để ngăn nước xâm nhập và phương pháp bảo quản kín tạo ra môi trường nghèo  $\text{O}_2$ , giàu  $\text{CO}_2$ . Những điều kiện như vậy không thuận lợi cho sự phát triển và sản xuất AF [95].

- ***Hàm lượng aflatoxin trong mẫu đậu phộng***

- ***Mức độ nhiễm trung bình độc tố aflatoxin trong mẫu đậu phộng***

Sử dụng bộ dữ liệu kết quả thử nghiệm ( $n=400$ ) với 370 mẫu đậu phộng thô và 30 mẫu đậu phộng chế biến theo Bảng 3.24 cho kết quả trung bình của AFB1 là 18,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; AFB2 là 1,72  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; AFG1 là 0,11  $\mu\text{g}/\text{kg}$  và tổng AF là 20,3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Mức độ nhiễm trung bình AFB1 cao gấp hơn 9 lần mức giới hạn cho phép (ML = 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) và tổng AF gấp hơn 5 lần mức giới hạn cho phép (ML = 4  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).

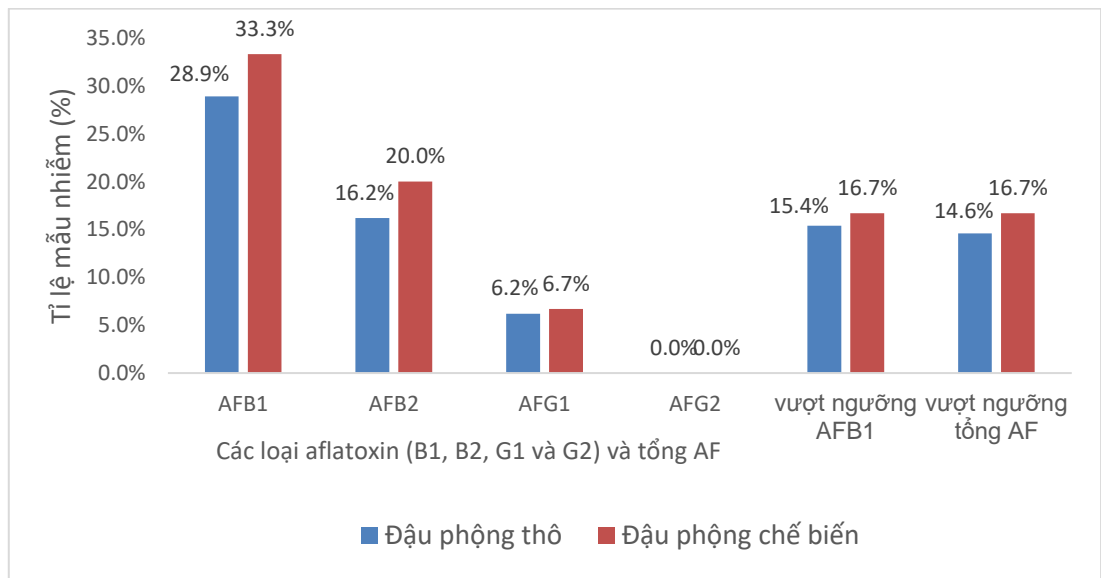


**Bảng 3.24:** Bảng thống kê mô tả sự phân bố trung bình hàm lượng độc tố aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) trong đậu phộng

Tên chất	Hàm lượng trung bình ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Độ lệch chuẩn SD ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Số mẫu
AFB1	18,5	77,1	400
AFB2	1,72	8,00	400
AFG1	0,11	0,83	400
AFG2	0,00	0,00	400
Tổng AF	20,3	83,5	400

- *Sự khác biệt về hàm lượng aflatoxin trong các loại đậu phộng thô và chế biến*

Kết quả kiểm định Independent-Samples T Test bằng phần mềm SPSS 22.0 cho thấy không có sự khác biệt trung bình có ý nghĩa thống kê về hàm lượng AF đối với mẫu đậu phộng thô và đậu phộng đã được chế biến (xem chi tiết phụ lục IV).



**Hình 3.12:** So sánh tỷ lệ (%) nhiễm aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) và vượt ngưỡng AFB1, tổng AF trong đậu phộng thô và chế biến

Kết quả được trình bày trong Bảng 3.23 và Hình 3.12 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 mức 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 AF 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 AF trong đậu phộng.

Tác giả Martins [90] đã nghiên cứu và kết luận rằng chỉ rang là không đủ để kiểm soát AF trong đậu phộng. Hàm lượng AF có thể bị phân hủy trong điều kiện trên 160°C và trong thời gian chế biến kéo dài, điều này cũng có thể ảnh hưởng đến màu sắc của đậu phộng. Mặt khác, tác giả E Ginting [50] gợi ý rằng việc phân loại đậu phộng làm nguyên liệu thô và sau đó xử lý nhiệt có thể làm giảm hàm lượng AF trong sản phẩm cuối cùng. Các phương pháp chế biến như rang, chiên và nấu áp suất đã được chứng minh là làm giảm đáng kể nồng độ AF trong đậu phộng [112]. Tuy nhiên, AF thể hiện tính ổn định nhiệt cao, ngay cả ở nhiệt độ trên 100°C, điều này ngăn chặn sự phân hủy nhiệt hoàn toàn trong quá trình sản xuất thực phẩm [102]. Một khi AF được hình thành trong đậu phộng thì không dễ dàng loại bỏ được. Nhiều chiến lược phòng ngừa và quản lý khác nhau đã được đề xuất đối với AF trong đậu phộng trong giai đoạn trước và sau thu hoạch, bao gồm phân loại, phân chia mật độ, kiểm soát độ ẩm của hạt, chần, phân loại màu sắc và sử dụng biện pháp kiểm soát sinh học trên đồng ruộng [99].

- ***Hàm lượng aflatoxin trong mẫu bột ớt***

- ***Mức độ nhiễm trung bình độc tố AF trong mẫu bột ớt***

Sử dụng bộ dữ liệu kết quả thử nghiệm (n=400) như Bảng 3.25 cho kết quả trung bình của AFB1 là 7,71 µg/kg; AFB2 là 0,46 µg/kg; AFG1 là 0,23 µg/kg và tổng

AF là 8,41  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Mức độ nhiễm trung bình của AFB1 cao hơn mức giới hạn cho phép (ML = 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), trong khi tổng AF thấp hơn mức cho phép (ML = 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).

**Bảng 3.25:** Bảng thống kê mô tả sự phân bố trung bình hàm lượng độc tố aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) trong bột ốt

Tên chất	Hàm lượng trung bình ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Độ lệch chuẩn SD ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Số mẫu
AFB1	7,71	14,1	400
AFB2	0,46	0,92	400
AFG1	0,23	0,77	400
AFG2	0,00	0,02	400
Tổng AF	8,41	15,1	400

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  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , chiếm 71,5% số mẫu, có 152 mẫu có chứa AFB2 (0,30 đến 8,18  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), chiếm 38,0% số mẫu, có 91 mẫu nhiễm AFG1 (0,30 – 8,54  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), chiếm 22,8% số mẫu. Chỉ có một mẫu được phát hiện có AFG2 (0,37  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Điều đáng lưu ý là tỷ lệ mẫu vượt ngưỡng cho phép về AFB1 (ML = 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) và AF tổng số (ML = 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) do Bộ Y tế quy định (QCVN 8-1:2011/ BYT), là 33,0% đối với AFB1 và 24,8% đối với AF.

Những phát hiện này phù hợp với một số nghiên cứu được công bố. Tác giả Seta và cộng sự [117] đã khảo sát 120 mẫu bột ốt ở Thổ Nhĩ Kỳ, trong đó 55 mẫu (62,5%) vượt quá mức cho phép của AFB1 theo Ủy ban Kiểm tra Châu Âu (ML= 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Tương tự, Rajendran và cộng sự [109] khảo sát 42 mẫu ốt bột ở miền Nam Ấn Độ và 66,7% mẫu bị nhiễm tổng số AF vượt quá ngưỡng cho phép do Ủy ban Kiểm tra Châu Âu đặt ra (ML= 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).

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. Điều cần thiết là phải xem xét khả năng các loài nấm có thể tạo ra nhiều loại aflatoxin, có thể gây nguy hiểm nghiêm trọng cho sức khỏe [7].

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

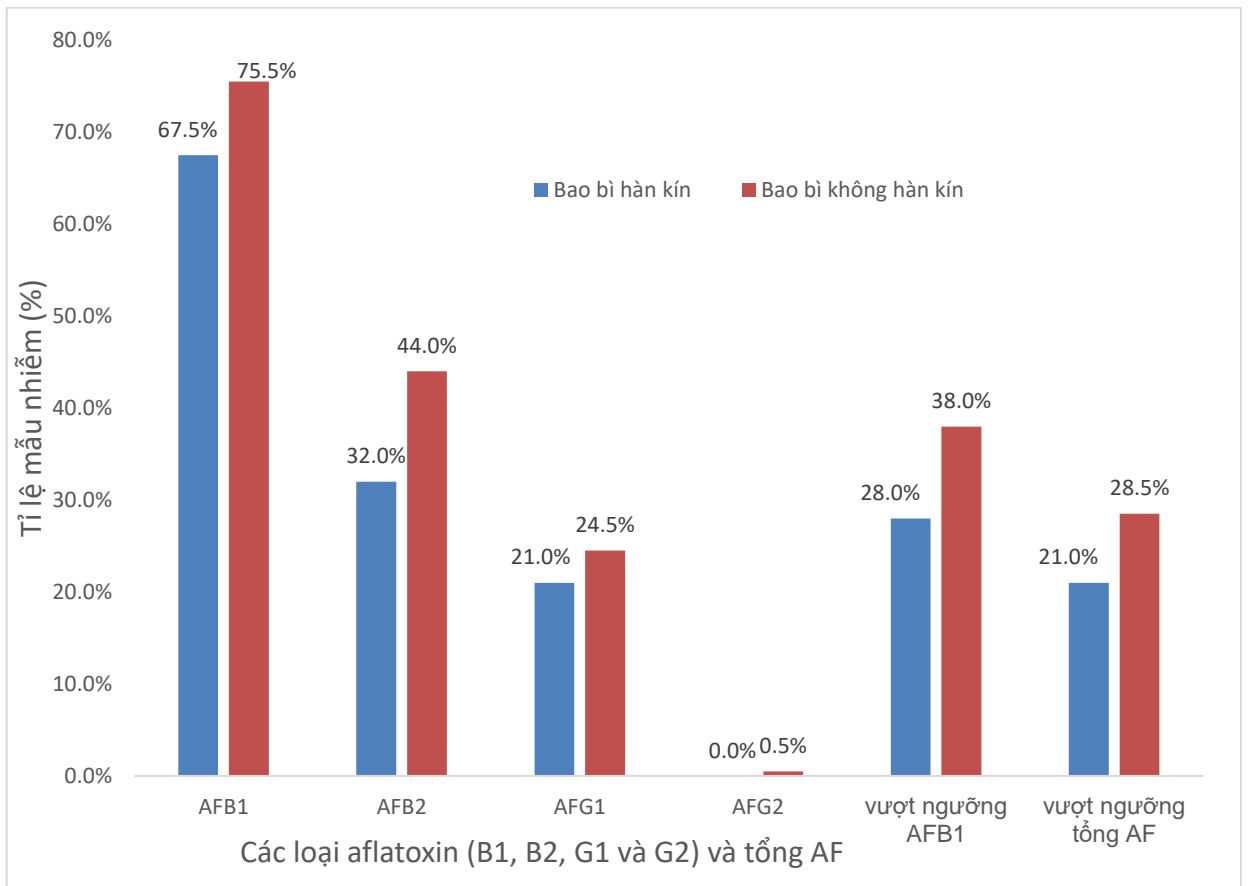
Kết quả kiểm định Independent-Samples T Test cho thấy không có sự khác biệt trung bình (có ý nghĩa thống kê) về hàm lượng AF đối với mẫu bột ớt hàn kín (7,02 µg/kg) và không hàn kín (9,80 µg/kg).

Trong tổng số 400 mẫu bột ớt bao gồm 200 mẫu bột ớt được bảo quản bao bì hàn kín và 200 mẫu trong bao bì không hàn kín, với kết quả Bảng 3.26 và Hình 3.13, cho thấy tỷ lệ nhiễm AF giữa bột ớt 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 ớt không được đóng kín cao hơn so với bột ớt hàn kín. Hơn nữa, tỷ lệ mẫu vượt quá giới hạn cho phép đối với AFB1 và tổng AF ở bột ớt 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 ớt 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 [129].

**Bảng 3.26:** Tỷ lệ nhiễm AF và vượt ngưỡng AFB1, tổng AF trong bột ớt hàn kín và không hàn kín

Nền mẫu	Số mẫu nhiễm (phần trăm, %)					Số mẫu vượt ngưỡng AFB1, tỉ lệ (%)	Số mẫu vượt ngưỡng tổng AF, tỉ lệ (%)
	Min-max (µg/kg)						
	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2	Tổng AF		
Bột ớt hàn kín (n = 200)	135 (67,5%) 0,30 - 121	64 (32,0%) 0,33 – 8,18	42 (21,0%) 0,30 – 8,54	-	135 (67,5%) 0,30 - 127	56 (28,0%)	42 (21,0%)
Bột ớt không hàn kín (n = 200)	151 (75,5%) 0,31 – 102	88 (44,0%) 0,30 – 4,59	49 (24,5%) 0,30 – 5,62	1 (0,5%) 0,0 – 0,37	151 (75,5%) 0,31 – 109	76 (38,0%)	57 (28,5%)

(-): Không phát hiện thấy với MDL = 0,1 µg/kg



**Hình 3.13:** Biểu đồ so sánh tỷ lệ mẫu nhiễm AF và vượt ngưỡng AFB1, tổng AF trong bột ốt hàn kín và không hàn kín

Vì vậy, nếu một sản phẩm trải qua quy trình khép kín và được bảo quản tốt, bắt đầu từ khâu tìm nguồn nguyên liệu thô đến khâu đóng gói, niêm phong thành phẩm tại nhà máy thì có thể giảm thiểu hiệu quả khả năng hình thành độc tố nấm mốc nói chung và ô nhiễm AF nói riêng. Do đó, các sản phẩm chế biến này sẽ mang lại mức độ an toàn cao hơn cho người tiêu dùng.

- *Hàm lượng aflatoxin trong mẫu bắp*
  - *Mức độ nhiễm trung bình độc tố AF trong mẫu bắp*

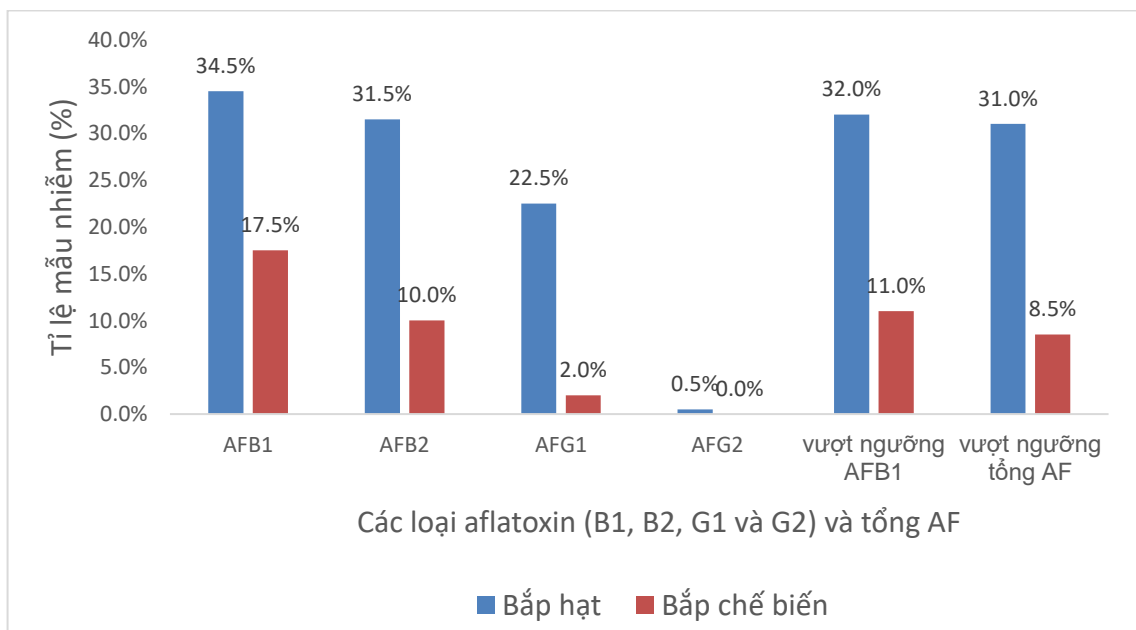
Sử dụng bộ dữ liệu kết quả thử nghiệm (n=400) như Bảng 3.27 cho kết quả trung bình của AFB1 là 7,60 µg/kg; AFB2 là 0,66 µg/kg; AFG1 là 0,12 µg/kg và tổng AF là 8,38 µg/kg. Mức độ nhiễm trung bình AFB1 cao gấp 4 lần mức giới hạn cho phép (ML = 2 µg/kg) và tổng AF cao hơn gấp 2 lần mức cho phép (ML = 4 µg/kg).

**Bảng 3.27:** Bảng thống kê mô tả sự phân bố trung bình hàm lượng độc tố aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) trong bắp

Tên chất	Hàm lượng trung bình ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Độ lệch chuẩn SD ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Số mẫu
AFB1	7,60	31,5	400
AFB2	0,66	2,58	400
AFG1	0,12	0,48	400
AFG2	0,00	0,02	400
Tổng AF	8,38	34,1	400

- *Sự khác biệt về hàm lượng aflatoxin trong các loại bắp thô và bắp chế biến*

Kết quả kiểm định Independent-Samples T Test cho thấy có sự khác biệt trung bình về hàm lượng tổng AF đối với bắp hạt thô và bắp đã được chế biến, giá trị trung bình hàm lượng tổng AF bắp thô là 14,8  $\mu\text{g}/\text{kg}$  cao hơn so với bắp chế biến là 1,96  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .



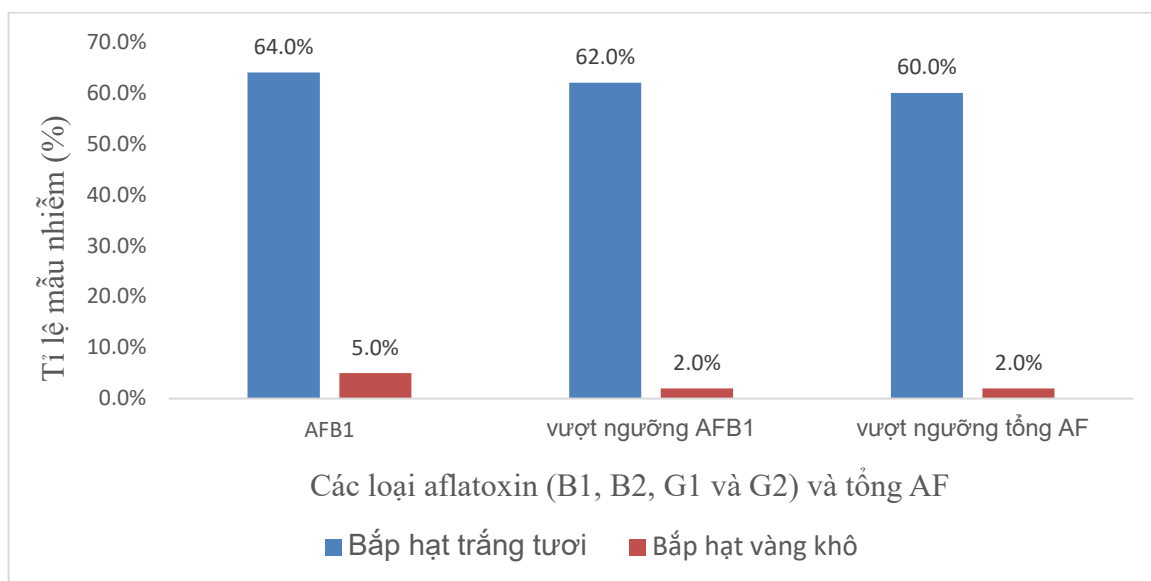
**Hình 3.14:** So sánh tỷ lệ phần trăm (%) nhiễm aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) và vượt ngưỡng AFB1, tổng AF đối với bắp hạt và bắp chế biến

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 3.23 và Hình 3.14 thể hiện tỷ lệ phần trăm (%) mẫu nhiễm AFB1, AFB2, AFG1 và AFG2. Theo khảo sát, tỷ lệ mẫu vượt mức cho phép AFB1 (ML = 2 µg/kg) và tổng AF (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 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 AF. Tuy nhiên, bắp hạt dễ bị nhiễm AF hơn so với bắp chế biến.

Điều này cũng có thể lý giải do AF là một chất độc hại được sản xuất bởi nấm, đặc biệt là *Aspergillus flavus* và *Aspergillus parasiticus*, trong cây nông nghiệp như hạt bắp. Nhiễm nấm có thể xảy ra ở hạt bắp cả trên đồng ruộng và trong quá trình bảo quản. Điều kiện nhiệt độ và hạn hán là một trong những yếu tố phổ biến nhất dẫn đến sản sinh AF trên đồng ruộng. Các phương pháp khác nhau, bao gồm phân loại, làm sạch, xay xát và nấu chín, có thể giúp giảm sự hiện diện của AF. Ngoài ra, các quy định và quy trình kiểm tra nghiêm ngặt là rất cần thiết để loại bỏ các sản phẩm bị ô nhiễm trước khi chúng trở thành sản phẩm bắp [70].

- ***Sự khác biệt về hàm lượng aflatoxin trong các loại bắp thô***

Kết quả kiểm định Independent-Samples T Test cho thấy có sự khác biệt trung bình về hàm lượng AF đối với các loại bắp thô, giá trị trung bình hàm lượng AF bắp hạt trắng là 29,4 µg/kg cao hơn so với bắp hạt vàng là 0,16 µg/kg.



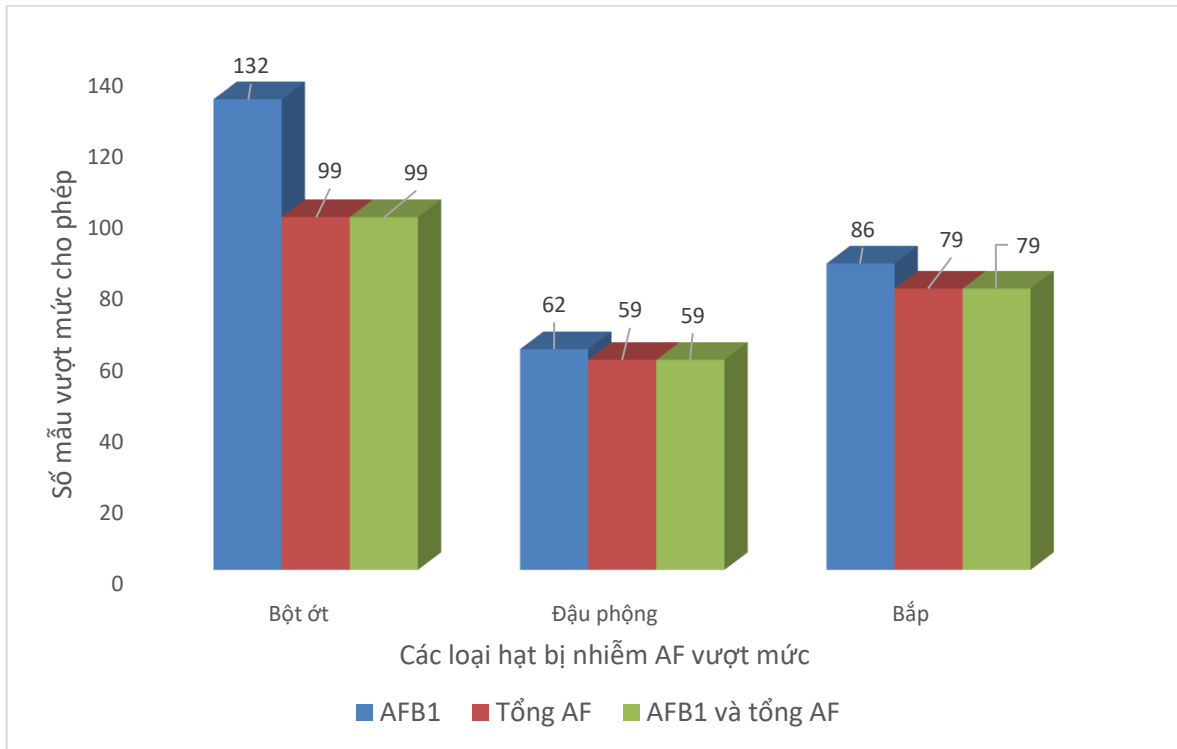
**Hình 3.15:** So sánh tỷ lệ (%) nhiễm AFB1 và vượt ngưỡng AFB1, tổng AF đối với hạt tươi trắng và vàng khô

Kết quả Bảng 3.23 và Hình 3.15 cho thấy 200 mẫu bắp hạt gồm 100 mẫu hạt trắng tươi và 100 mẫu hạt vàng khô. Kết quả chỉ ra rằng các giống bắp trắng có thể dễ bị nhiễm AF hơn vì chúng có tỷ lệ 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 AF trong cây lương thực [70; 134].

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

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 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 mẫu nhiễm aflatoxin vượt ngưỡng cho phép giữa AFB1 và tổng AF với cả hai thông số trong đậu phộng, bột ứt và bắp hạt

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

AFB1 thường là loại AF phổ biến và độc hại nhất, và sự hiện diện của nó có thể góp phần đáng kể vào tổng AF. Mối tương quan giữa ô nhiễm AFB1 và tổng AF thực tế sẽ phụ thuộc vào sự hiện diện và số lượng của các loài AF khác trong mẫu. Mặc dù AFB1 thường là trọng tâm chính nhưng điều quan trọng cần lưu ý là các AF khác như AFB2, AFG1 và AFG2 cũng có thể có mặt và đóng góp vào hàm lượng tổng AF. Do đó, cần phải kiểm tra và phân tích toàn diện để xác định chính xác tổng hàm lượng AF [70].

Quá trình đánh giá mối liên hệ giữa hàm lượng từng AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 và tổng AF được thực hiện dựa trên bộ dữ liệu gồm kết quả 400 mẫu phân tích AF từ ba nền mẫu: đậu phộng, bột ứt và bắp hạt (xem Bảng 3.23). Phương pháp phân tích tương quan được áp dụng bao gồm phân tích tương quan Pearson để đánh giá mối quan hệ giữa các AF, hồi quy tuyến tính đa biến, với kiểm tra đa cộng tuyến

thông qua hệ số phóng đại phương sai VIF và kiểm định ý nghĩa thống kê bằng giá trị Sig (p-value) từ kiểm định t. Tiếp theo, đánh giá sự phù hợp của mô hình bằng cách phân tích ANOVA với kiểm định F để đánh giá mức độ phù hợp của mô hình hồi quy và chỉ số Durbin-Watson (DW) để kiểm tra hiện tượng tự tương quan chuỗi bậc nhất. Cuối cùng, đưa ra mô hình dự báo tổng AF với từng AF, cụ thể mô hình dự báo cho từng nền mẫu như sau:

- **Nền đậu phộng:**

Phân tích tương quan Pearson cho thấy các biến độc lập AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 đều có sự tương quan tuyến tính với biến phụ thuộc tổng AF, trong đó AFB1, AFB2 có sự tương quan mạnh với hệ số tương quan Pearson là 0,998 và 0,747, còn AFG1 có sự tương quan yếu hơn với hệ số tương quan là 0,583, trong khi AFG2 không có sự tương quan với tổng AF. Do vậy, sẽ thực hiện loại biến AFG2 để phân tích hồi quy.

**Bảng 3.28:** Phân tích hồi quy hệ số theo biến phụ thuộc tổng AF nền đậu phộng

Mô hình	Hệ số không chuẩn hoá		Hệ số chuẩn hoá	t	Sig,	Thống kê đa cộng tuyến	
	B	Sai số chuẩn	Beta			Dung sai	Hệ số phóng đại phương sai (VIF)
1 (Hằng số)	-2,274E <sup>-13</sup>	0,000		0,000	0,000		
AFB1	1,000	0,000	0,925	0,000	0,000	0,434	2,305
AFB2	1,000	0,000	0,096	0,000	0,000	0,505	1,978
AFG1	1,000	0,000	0,010	0,000	0,000	0,666	1,502

Kết quả phân tích hồi quy theo Bảng 3.28 thấy hệ số phóng đại phương sai (VIF) là một chỉ số đánh giá hiện tượng cộng tuyến trong mô hình hồi quy. Hệ số VIF càng nhỏ, càng ít khả năng xảy ra đa cộng tuyến. Tác giả Hair và cộng sự [54] cho rằng, ngưỡng VIF từ 10 trở lên sẽ xảy ra đa cộng tuyến mạnh. Bảng 3.28 cho thấy hệ số VIF của các biến độc lập (1,502 – 2,305) đều nhỏ hơn 10, do vậy dữ liệu không vi phạm giả định đa cộng tuyến.

Giá trị Sig kiểm định t (student) của các biến AFB1, AFB2, AFG1 đều  $< 0.05$  có nghĩa là hệ số hồi quy của biến AFB1, AFB2, AFG1 đều khác 0 một cách có ý nghĩa thống kê, các biến AFB1, AFB2, AFG1 đều có tác động lên biến phụ thuộc tổng AF.

Kết quả phân tích hồi quy cho thấy AFB1 có tác động mạnh nhất với tổng AF (hệ số là 0,925), trong khi AFB2 và AFG1 có tác động rất yếu với hệ số lần lượt là (0,096) và (0,01). Kết quả thu được phương trình/mô hình hồi quy dự báo tổng AF từ AFB1, AFB2 và AFG1 như sau:

$$\text{Tổng AF (đậu phộng)} = 0,925 * \text{AFB1} + 0,096 * \text{AFB2} + 0,010 * \text{AFG1} \quad (3.1)$$

*Đánh giá tính phù hợp của mô hình hồi quy:* Kết quả phân tích ANOVA – Đậu phộng bên dưới cho thấy kết quả kiểm định F để đánh giá giả thuyết sự phù hợp của mô hình hồi quy. Giá trị sig kiểm định F bằng  $0.000 < 0.05$ , có ý nghĩa thống kê. Do đó, mô hình hồi quy là phù hợp.

ANOVA<sup>a</sup> – Đậu phộng

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	2779842,556	3	926614,185	0,000	0,000 <sup>b</sup>
	Residual	0,000	396	0,000		
	Total	2779842,556	399			

a, Dependent Variable: tổng AF;

b, Predictors: (Constant), AFB1, AFG1, AFB2

Kết quả tóm tắt mô hình từ bảng Model Summary<sup>b</sup> – đậu phộng cho thấy giá trị R<sup>2</sup> hiệu chỉnh (adjusted R square) bằng 1,00. Điều này khẳng định các biến độc lập (AFB1, AFB2, AFG1) giải thích được 100% sự biến thiên của biến phụ thuộc tổng AF, không có các biến ngoài mô hình.

Ngoài ra, kết quả bảng Model Summary cũng đưa ra giá trị Durbin–Watson (DW) để đánh giá hiện tượng tự tương quan chuỗi bậc nhất. Giá trị DW = 2,084 nằm trong khoảng 1,5 đến 2,5 nên kết quả không vi phạm giả định tự tương quan chuỗi bậc nhất theo Yahua Qiao (2011) [106]

**Model Summary<sup>b</sup> -đậu phộng**

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate	Durbin-Watson
1	1,000 <sup>a</sup>	1,000	1,000	0,00000	2,084

a, Predictors: (Constant), AFB1, AFG1, AFB2

b, Dependent Variable: tổng AF

Từ các đánh giá trên cho thấy phương trình hồi quy (3.1) có giá trị thống kê để dự báo tổng AF từ nồng độ của AFB1, AFB2 và AFG1 trong mẫu đậu phộng có giá trị thống kê tốt để dự đoán thực nghiệm trong vùng giá trị mà thí nghiệm nghiên cứu.

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

- **Nền bột ột**

Phân tích tương quan Pearson cho thấy các biến độc lập AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 đều có sự tương quan tuyến tính với biến phụ thuộc tổng AF, trong đó AFB1, AFB2 có sự tương quan mạnh với hệ số tương quan Pearson là 0,998 và 0,807, còn AFG1, AFG2 có sự tương quan yếu hơn với hệ số tương quan là 0,413 và 0. Do vậy, sẽ sử dụng đầy đủ các biến này để phân tích hồi quy.

**Bảng 3.29:** Phân tích hồi quy hệ số theo biến phụ thuộc tổng AF nền bột ột

Mô hình	Hệ số không chuẩn hoá		Hệ số chuẩn hoá	t	Sig,	Thống kê đa cộng tuyến	
	B	Sai số chuẩn	Beta			Dung sai	Hệ số phóng đại phương sai (VIF)
1 (Hằng số)	-2,165E <sup>-15</sup>	0,000		0,000	0,000		
AFB1	1,000	0,000	0,931	0,000	0,000	0,345	2,900
AFB2	1,000	0,000	0,061	0,000	0,000	0,369	2,712
AFG1	1,000	0,000	0,051	0,000	0,000	0,755	1,324
AFG2	1,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,848	1,179

Kết quả phân tích hồi quy theo Bảng 3.29 cho thấy hệ số phóng đại phương sai (VIF) là một chỉ số đánh giá hiện tượng cộng tuyến trong mô hình hồi quy. Hệ số

VIF càng nhỏ, càng ít khả năng xảy ra đa cộng tuyến. Tác giả Hair và cộng sự [54] cho rằng, ngưỡng VIF từ 10 trở lên sẽ xảy ra đa cộng tuyến mạnh. Bảng 3.29 cho thấy hệ số VIF của các biến độc lập (1,179 – 2,900) đều nhỏ hơn 10, do vậy dữ liệu không vi phạm giả định đa cộng tuyến.

Giá trị Sig kiểm định t (student) của các biến AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 đều lớn hơn 0,05 có nghĩa là hệ số hồi quy của biến AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 đều khác 0 một cách có ý nghĩa thống kê, các biến AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 đều có tác động lên biến phụ thuộc tổng AF.

Kết quả phân tích hồi quy cho thấy AFB1 có tác động mạnh nhất với tổng AF (hệ số là 0,931), trong khi AFB2, AFG1 và AFG2 có tác động rất yếu với hệ số lần lượt là (0,061), (0,051) và (0,001). Kết quả thu được phương trình/mô hình hồi quy dự báo tổng AF từ AFB1, AFB2, AFG1 và AFG2 như sau:

$$\text{Tổng AF}_{(\text{bột ớt})} = 0,931 * \text{AFB1} + 0,061 * \text{AFB2} + 0,051 * \text{AFG1} + 0,001 * \text{AFG2} \quad (3.2)$$

*Đánh giá tính phù hợp của mô hình hồi quy:* Kết quả phân tích ANOVA – bột ớt cho thấy kết quả kiểm định F để đánh giá giả thuyết sự phù hợp của mô hình hồi quy. Giá trị sig kiểm định F bằng  $0.000 < 0,05$ , có ý nghĩa thống kê. Do đó, mô hình hồi quy là phù hợp.

ANOVA<sup>a</sup> – Bột ớt

Model	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1 Regression	91155,414	4	22788,853	0,000	0,000 <sup>b</sup>
Residual	0,000	395	0,000		
Total	91155,414	399			

a, Dependent Variable: tổng AF;

b, Predictors: (Constant), AFG2, AFB1, AFG1, AFB2

Kết quả tóm tắt mô hình từ bảng Model Summary<sup>b</sup> – bột ớt cho thấy giá trị R<sup>2</sup> hiệu chỉnh (adjusted R square) bằng 1,00. Điều này khẳng định các biến độc lập (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2) giải thích được 100% sự biến thiên của biến phụ thuộc tổng AF, không có các biến ngoài mô hình.

Ngoài ra, kết quả bảng Model Summary cũng đưa ra giá trị Durbin–Watson (DW) để đánh giá hiện tượng tự tương quan chuỗi bậc nhất. Giá trị DW =

1,780 nằm trong khoảng 1,5 đến 2,5 nên kết quả không vi phạm giả định tự tương quan chuỗi bậc nhất theo Yahua Qiao (2011) [106].

**Model Summary<sup>b</sup> – Bột ót**

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate	Durbin-Watson
1	1,000 <sup>a</sup>	1,000	1,000	0,00000	1,780

a, Predictors: (Constant), AFG2, AFB1, AFG1, AFB2;

b, Dependent Variable: tổng AF

Từ các đánh giá trên cho thấy phương trình hồi quy (3.2) có giá trị thống kê để dự báo tổng AF từ nồng độ của AFB1, AFG1 và AFG2 trong mẫu ót bột có giá trị thống kê tốt để dự đoán thực nghiệm trong vùng giá trị mà thí nghiệm nghiên cứu.

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

- **Nền bấp**

Phân tích tương quan Pearson cho thấy các biến độc lập AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 đều có sự tương quan tuyến tính với biến phụ thuộc tổng AF, trong đó AFB1, AFB2 có sự tương quan mạnh với hệ số tương quan Pearson là 1,000 và 0,949, còn AFG1 có sự tương quan yếu hơn với hệ số tương quan là 0,360; trong khi AFG2 với hệ số tương quan 0,036 và nhưng giá trị Sig. (2-tailed) = 0,468 lớn hơn 0,05 không có ý nghĩa thống kê nên AFG2 không có sự tương quan với tổng AF. Do vậy, sẽ thực hiện loại biến AFG2 để phân tích hồi quy.

**Bảng 3.30:** Phân tích hồi quy hệ số theo biến phụ thuộc tổng AF nền bắp hạt

Mô hình	Hệ số không chuẩn hoá		Hệ số chuẩn hoá	t	Sig,	Thống kê đa cộng tuyến	
	B	Sai số chuẩn	Beta			Dung sai	Hệ số phóng đại phương sai (VIF)
(Hằng số)	-0,001	0,001		-1,000	0,318		
1 AFB1	1,000	0,000	0,924	13542,266	0,000	0,116	8,628
AFB2	0,999	0,001	0,076	1093,676	0,000	0,113	8,870
AFG1	1,022	0,002	0,014	569,658	0,000	0,857	1,167

Kết quả phân tích hồi quy theo Bảng 3.30 thấy hệ số phóng đại phương sai (VIF) là một chỉ số đánh giá hiện tượng cộng tuyến trong mô hình hồi quy. Hệ số VIF càng nhỏ, càng ít khả năng xảy ra đa cộng tuyến. Tác giả Hair và cộng sự [54] cho rằng, ngưỡng VIF từ 10 trở lên sẽ xảy ra đa cộng tuyến mạnh. Bảng 3.30 cho thấy hệ số VIF của các biến độc lập (1,167 – 8,870) đều nhỏ hơn 10, do vậy dữ liệu không vi phạm giả định đa cộng tuyến.

Giá trị Sig kiểm định t (student) của các biến AFB1, AFB2, AFG1 đều < 0.05 có nghĩa là hệ số hồi quy của biến AFB1, AFB2, AFG1 đều khác 0 một cách có ý nghĩa thống kê, các biến AFB1, AFB2, AFG1 đều có tác động lên biến phụ thuộc tổng AF.

Kết quả phân tích hồi quy cho thấy AFB1 có tác động mạnh nhất với tổng AF (hệ số là 0,924), trong khi AFB2 và AFG1 có tác động rất yếu với hệ số lần lượt là (0,076) và (0,014). Kết quả thu được phương trình/mô hình hồi quy dự báo tổng AF từ AFB1, AFB2 và AFG1 như sau:

$$\text{Tổng AF (bắp hạt)} = 0,924 * \text{AFB1} + 0,076 * \text{AFB2} + 0,014 * \text{AFG1} \quad (3.3)$$

*Đánh giá tính phù hợp của mô hình hồi quy:* Kết quả phân tích ANOVA – bắp hạt cho thấy kết quả kiểm định F để đánh giá giả thuyết sự phù hợp của mô hình hồi quy. Giá trị sig kiểm định F bằng 0,000 < 0,05, có ý nghĩa thống kê. Do đó, mô hình hồi quy là phù hợp.

ANOVA<sup>a</sup> – bắp hạt

Model	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1 Regression	462926,753	3	154308,918	618402809,575	0,000 <sup>b</sup>
Residual	0,099	396	0,000		
Total	462926,852	399			

a, Dependent Variable: tổng AF; b, Predictors: (Constant), AFB1, AFG1, AFB2

Kết quả tóm tắt mô hình từ bảng Model Summary<sup>b</sup> – bắp hạt cho thấy giá trị R<sup>2</sup> hiệu chỉnh (adjusted R square) bằng 1,00. Điều này khẳng định các biến độc lập (AFB1, AFB2, AFG1) giải thích được 100% sự biến thiên của biến phụ thuộc tổng AF, không có các biến ngoài mô hình.

Ngoài ra, kết quả bảng Model Summary cũng đưa ra giá trị Durbin–Watson (DW) để đánh giá hiện tượng tự tương quan chuỗi bậc nhất. Giá trị DW = 1,892 nằm trong khoảng 1,5 đến 2,5 nên kết quả không vi phạm giả định tự tương quan chuỗi bậc nhất theo Yachua Qiao (2011) [106]

Model Summary<sup>b</sup> – bắp hạt

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate	Durbin-Watson
1	1,000 <sup>a</sup>	1,000	1,000	0,01580	1,892

a, Predictors: (Constant), AFB1, AFG1, AFB2;

b, Dependent Variable: tổng AF

Từ các đánh giá trên cho thấy phương trình hồi quy (3.3) có giá trị thống kê để dự báo tổng AF từ nồng độ của AFB1, AFB2 và AFG1 trong mẫu bắp hạt có giá trị thống kê tốt để dự đoán thực nghiệm trong vùng giá trị mà thí nghiệm nghiên cứu.

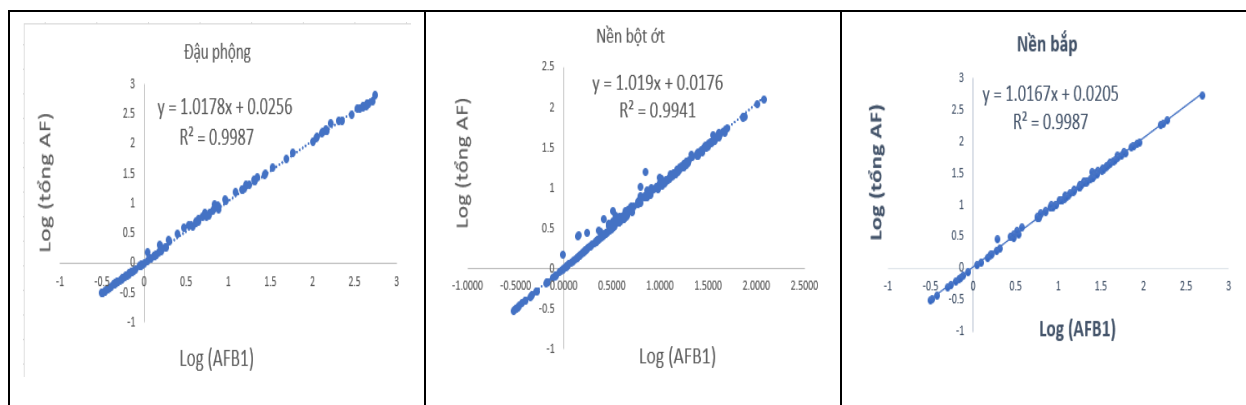
$$\text{Tổng AF (bắp hạt)} = 0,924 * \text{AFB1} + 0,076 * \text{AFB2} + 0,014 * \text{AFG1}$$

#### 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 ốt, bắp ở mục 3.4.3. 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 tuyến tính [67]



**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 Log(AFB1) và Log(tổng AF) cao đáng kể và nhất quán trên cả ba nền mẫu, với giá trị  $R^2$  bằng hoặc lớn hơn 0,99 [135]. 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 tuyến tính trong Hình 3.18. Điều này cho thấy rằng các nền mẫu khác nhau có thể biểu thị các mức khác nhau ô nhiễm từng loại độc tố (AFB1, AFB2, AFG1 và AFG2) được tạo ra bởi các chủng nấm *Aspergillus* cụ thể [9]. Mức độ ô nhiễm có thể bị ảnh hưởng bởi các yếu tố như loại sản phẩm, điều kiện môi trường và chủng *Aspergillus* cụ thể [9; 93]

**Bảng 3.31:** Kết quả về nồng độ AFB1 và tổng AF từ chương trình thành thạo và ngoại suy nồng độ tổng AF từ đường chuẩn nền bắp.

Mã phòng thí nghiệm	Nồng độ AFB1 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Nồng độ tổng AF ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Nồng độ tổng AF ngoại suy từ Log (AFB1) ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Sự khác biệt (%D)	Z-score	Phương pháp
21411AF-234	20,9	25,8	23,0	10,7	-1,30	HPLC-FD
21411AF-51	22,6	27,7	25,0	9,7	-1,03	HPLC-FD
21411AF-29	25,4	31,0	28,1	9,3	-0,59	HPLC-FD

Mã phòng thí nghiệm	Nồng độ AFB1 (µg/kg)	Nồng độ tổng AF (µg/kg)	Nồng độ tổng AF ngoại suy từ Log (AFB1) (µg/kg)	Sự khác biệt (%D)	Z-score	Phương pháp
21411AF-522	26,0	31,4	28,8	8,3	-0,49	HPLC-FD
21411AF-503	24,6	30,3	27,1	10,4	-0,72	HPLC-FD
21411AF-24	24,5	30,0	27,1	9,7	-0,74	HPLC-MS/MS
21411AF-33	23,0	28,0	25,4	9,3	-0,97	HPLC-MS/MS
21411AF-465	25,4	29,4	28,1	4,4	-0,59	HPLC-MS/MS
21411AF-482	31,9	37,3	35,4	5,0	0,44	HPLC-MS/MS
Kết quả chương trình	26,3	32,3	29,1	10,0	-0,45	

Bảng 3.31 cung cấp cái nhìn tổng quan về mối tương quan giữa AFB1 và tổng AF, trình bày kết quả thu được từ một số phòng thí nghiệm tham gia chương trình thử nghiệm thành thạo (CSSMY021 – M21411AF) vào tháng 12 năm 2021 [115]. Mã kiểm tra của chương trình này là 21411AF-234. Bảng này so sánh các kết quả trong phòng thí nghiệm về nồng độ tổng AF được ngoại suy từ nồng độ AFB1 đã biết bằng cách sử dụng hàm Trend của đường chuẩn được trình bày trong Hình 3.17. Mặc dù sử dụng các phương pháp và kỹ thuật phân tích khác nhau như HPLC-FD và HPLC-MS/MS, kết quả vẫn phù hợp, dựa vào sự khác biệt phần trăm (%D) giữa tổng AF được đo trong phòng thí nghiệm và các giá trị ngoại suy dựa trên mối tương quan giữa Log (AFB1) và Log (tổng AF) thu được từ đường tuyến tính nền bắp trong Hình 3.18. Phần trăm sai biệt dao động từ 3,8% đến 10,7%, đáp ứng các tiêu chí chấp nhận nêu trong ICH - M10 của Hội nghị Quốc tế về Hải hòa trong hóa học [61], trong đó quy định %D không được vượt quá 20%, phần trăm (%D) được xác định bằng công thức sau:

$$\% D = [(Giá\ trị\ ngoại\ suy - Giá\ trị\ thực) \times 100 / Giá\ trị\ thực]$$

- Giá trị ngoại suy: nồng độ tổng AF thu được từ phép ngoại suy đường chuẩn khi biết nồng độ AFB1 của phòng thí nghiệm.

- Giá trị thực: nồng độ tổng AF thu được từ phòng thí nghiệm.

Phương pháp này đảm bảo kết quả chính xác trong giới hạn chấp nhận được, Những phát hiện này có giá trị để dự đoán nồng độ tổng AF và AFB1 khi biết hàm lượng AFB1 hoặc tổng AF.

Ngoài ra, phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao với phát hiện huỳnh quang (HPLC-FD) hoặc sắc ký lỏng hiệu năng cao với phương pháp khối phổ (HPLC-MS/MS), xác định mỗi chất, cụ thể là AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 và tổng AF. Nồng độ của tổng AF trong Bảng 3.31 được ngoại suy từ kết quả của đường chuẩn, điểm Z-score, biểu thị độ lệch giữa kết quả và độ lệch chuẩn mục tiêu ( $\sigma_{pt}$ ), sau đó được tính toán. Tính toán này rất quan trọng trong việc đánh giá sự phù hợp của chương trình thử nghiệm thành thạo. Điểm Z-score dao động từ -1,30 đến 0,44.

Điểm Z-score được tính bằng công thức [34]:

$$\text{Điểm Z-score} = (x_i - x_{pt}) / \sigma_{pt}$$

- $x_i$  thể hiện kết quả của phòng thí nghiệm
- $x_{pt}$  là giá trị được gán từ chương trình
- $\sigma_{pt}$  là độ lệch chuẩn chương trình

**Bảng 3.32:** Kết quả về nồng độ AFB1 từ chương trình thử nghiệm thành thạo và ngoại suy nồng độ tổng AF từ đường chuẩn nền bắp

Mã phòng thí nghiệm	Nồng độ AFB1 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Nồng độ tổng AF ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Nồng độ tổng AF ngoại suy từ Log (AFB1) ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Z-score	Phương pháp
21411AF-005	19,9	-	21,9	-1,46	Elisa
21411AF-010	27,3	-	30,2	-0,29	Elisa
21411AF-013	24,9	-	27,5	-0,67	Elisa
21411AF-026	28,6	-	31,7	-0,08	Elisa
21411AF-089	23,7	-	26,2	-0,86	LFD

(-): Không cung cấp; LFD: Thiết bị dòng chảy bên, Chương trình thành thạo với AF:  $x_{pt} = 32,28$ ;  $\sigma_{pt} = 7,12$  [115]

**Bảng 3.33:** Kết quả về nồng độ tổng AF từ chương trình thành thạo và ngoại suy nồng độ AFB1 từ đường chuẩn nền bắp

Mã phòng thí nghiệm	Nồng độ tổng AF ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Nồng độ AFB1 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Nồng độ AFB1 ngoại suy từ Log (tổng AF) ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Z-score	Phương pháp
21411AF-007	28,3	-	25,5	-0,13	Elisa
21411AF-008	37,8	-	33,9	1,32	Elisa
21411AF-009	33,3	-	30,0	0,64	LFD
21411AF-016	33,0	-	29,7	0,59	Elisa

(-): Không cung cấp; LFD: Thiết bị dòng chảy bên, Chương trình thành thạo AFB1:  $x_{pt} = 26,27$ ;  $\sigma_{pt} = 5,78$  [115]

Một số kết quả của AFB1 và tổng AF thu được bằng phương pháp thử nghiệm miễn dịch hấp thụ liên kết với enzyme (ELISA) và thiết bị dòng chảy bên, như được trình bày trong Bảng 3.32 và 3.33. Các phương pháp này chỉ xác định nồng độ AFB1 hoặc tổng AF mà không định lượng đồng thời AFB1 và tổng AF. Sau đó, nồng độ của tổng AF hoặc AFB1 có thể được ngoại suy dựa trên đường chuẩn. Điểm Z-score tương ứng nằm trong khoảng từ -1,46 đến -0,08 (đối với nồng độ tổng AF được tính toán) và từ -0,13 đến 1,32 (đối với nồng độ AFB1 được tính toán).

Tất cả các kết quả điểm Z-score đều bắt nguồn từ nồng độ ngoại suy và chúng đáp ứng tiêu chí chấp nhận về sai số điểm Z trong khoảng từ +2 đến -2 [115]. 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.

Điều này cũng đúng cho 2 nền còn lại bằng cách kiểm tra kết quả so sánh liên phòng. Theo kết quả Bảng 3.18 cho thấy nền bột ót với AFB1 (10,3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ); AFB2 (0,54  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ); AFG1 (2,26  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ); AFG2 (0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), tổng AF = AFB1 + AFB2 + AFG1 + AFG2 = 13,1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Kết quả ngoại suy tổng AF từ AFB1 của đường chuẩn tuyến tính  $y = 1,019X + 0,0176$  ở Hình 3.17 với hệ số hồi qui  $R^2 = 0,9941$  là 11,2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , tương ứng độ sai biệt %D = 14,4%.

Đối với nền đậu phộng, kết quả Bảng 3.19 cho thấy AFB1 (4,14  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ); AFB2 (0,54  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ); AFG1 (0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ); AFG2 (0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), tổng AF = AFB1 + AFB2 + AFG1

+ AFG2 = 4,68 µg/kg. Kết quả ngoại suy tổng AF từ AFB1 của đường chuẩn tuyến tính  $y = 1,0178X + 0,0256$  ở Hình 3.17 với hệ số hồi qui  $R^2 = 0,9987$  là 4,50 µg/kg, tương ứng độ sai biệt %D = 3,8%.

Tóm lại, nghiên cứu đã đưa ra mô hình dự báo mối tương quan giữa AFB1 và tổng AF trong các nền mẫu đậu phộng, bột ốt, bắp hạt có tính ứng dụng cao, giúp các phòng thí nghiệm và doanh nghiệp dự đoán hàm lượng tổng AF dựa trên AFB1 và ngược lại, hỗ trợ công tác kiểm soát chất lượng và an toàn thực phẩm.

### **3.4.5. Đánh giá rủi ro phơi nhiễm của aflatoxin B1 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 gầy, 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 µg/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 µg/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 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Mức tiêu thụ trung bình ( $\text{kg}/\text{người}/\text{ngày}$ )	Thể trạng	Trọng lượng trung bình ( $\text{kg}$ $\text{b,m}/\text{người}$ )	Phơi nhiễm (EDI) ( $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{ngày}$ )	Khả năng gây ung thư	Rủi ro dân số (tính trên 100,000 người/năm)	BMDL <sub>10</sub> ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ , $\text{bw}/\text{ngày}$ )	Biên độ phơi nhiễm MOE	TD50 của AFB1 ( $\mu\text{g}/\text{kg,bw}$ /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

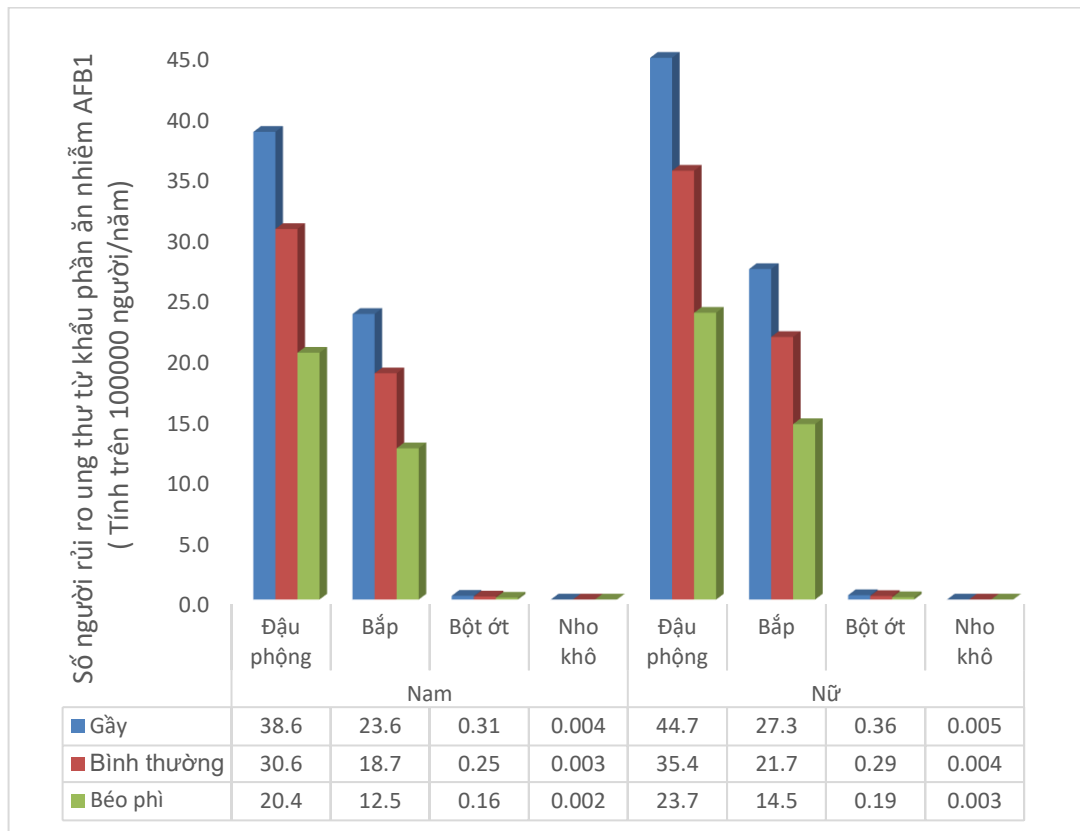
	AFB1 tb ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Mức tiêu thụ trung bình ( $\text{kg}/\text{người}/\text{ngày}$ )	Thể trạng	Trọng lượng trung bình ( $\text{kg}$ $\text{b,m}/\text{người}$ )	Phơi nhiễm (EDI) ( $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{ngày}$ )	Khả năng gây ung thư	Rủi ro dân số (tính trên 100,000 người/năm)	BMDL <sub>10</sub> ( $\mu\text{g}/\text{kg},\text{bw}$ /ngày)	Biên độ phơi nhiễm MOE	TD50 của AFB1 ( $\mu\text{g}/\text{kg},\text{bw}$ /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  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{ngày}$ ), kế đến là bắp hạt (nữ: 0,00213 – 0,00402 và nam: 0,00184 – 0,00347  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{ngày}$ ), bột ốt (nữ: 0,00003 – 0,00005 và nam: 0,00002 – 0,00005  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{ngày}$ ) 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 khoẻ cộng đồng.

Theo kết quả trình bày ở Hình 3.11, tỷ lệ mẫu nhiễm AF 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  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ( bột ốt) và 7,60  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ( 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  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) cao hơn gấp 2 lần so với bắp hạt (7,60  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). 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.

Kết quả nghiên cứu này phù hợp với các nghiên cứu khác tại miền Bắc Việt Nam, với rủi ro ghi nhận đối với người trưởng thành (từ 0,23 – 0,29 trường hợp/100,000 người/năm ở Hà Nội; 0,65 đến 1,28 ca ở Thanh Hoá, và rủi ro tại Hà Giang từ 14,3 – 21,0 trường hợp) [39], và nghiên cứu tại Indonesia với rủi ro từ 0,1 đến 35 ca 100,000 người/năm [99]. Ngoài ra, kết quả này vẫn thấp hơn nghiên cứu rủi ro dân số ở một số nước Châu Phi (từ 0,1 – 2,4 trường hợp ở Gambia; 33,1 ở Tanzania; 8,7 ở Benin; 11 – 29,2 ở Kenya; cho đến Ghana cao nhất 70,1 trường hợp) [120]. Những khác biệt này làm nổi bật mức độ phơi nhiễm aflatoxin và thói quen ăn uống khác nhau giữa các khu vực, nhấn mạnh nhu cầu đánh giá rủi ro cục bộ và can thiệp có mục tiêu để giảm thiểu tác động của phơi nhiễm AFB1 đối với sức khỏe [120].

### 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 ốt, 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: 103 – 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 ốt, 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 ốt bị nhiễm AFB1 cao nhất, nhưng tỷ lệ tiêu thụ thấp làm giảm thiểu rủi ro chung, nên bột ốt được xếp vào nhóm rủi ro thấp hơn mặc dù giá trị MOE 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 ốt, 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 ốt 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 ốt, 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 ốt 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.

**DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ**

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 TPHCM*, 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 ốt 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.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Abbas M., 2021, Chromatographic Techniques for Estimation of Aflatoxins in Food Commodities. In L. B. Bola Abdulra'Uf (Ed.), *Aflatoxins - Occurrence, Detoxification, Determination and Health Risks*, (pp. 224), Rijeka: IntechOpen.
2. Abdallah M.F., Girgin G., & Baydar T., 2019, Mycotoxin Detection in Maize, Commercial Feed, and Raw Dairy Milk Samples from Assiut City, Egypt, *Vet Sci*, 6(2).
3. Adetunji M.C., Aliko O.P., Awa N.P., Atanda O.O., & Mwanza M., 2018, Microbiological Quality and Risk Assessment for Aflatoxins in Groundnuts and Roasted Cashew Nuts Meant for Human Consumption, *J Toxicol*, 2018, 1308748.
4. Adugna E., Abebe Y., Dejen M., Alemu M., Guadie A., Mulu M., Bizualem E., Worku M., & Tefera M., 2022, Risk assessment of aflatoxin in red peppers from selected districts of Amhara region, Ethiopia, *Cogent Food & Agriculture*, 8(1), 2123769.
5. Agbetiameh D., Ortega-Beltran A., Awuah R.T., Atehnkeng J., Cotty P.J., & Bandyopadhyay R., 2018, Prevalence of Aflatoxin Contamination in Maize and Groundnut in Ghana: Population Structure, Distribution, and Toxigenicity of the Causal Agents, *Plant Dis*, 102(4), 764-772.
6. Agriopoulou S., Stamatelopoulou E., & Varzakas T., 2020, Advances in Analysis and Detection of Major Mycotoxins in Foods, *Foods*, 9(4), 518.
7. Ahmed F., & Asif Asghar M., 2021, Aflatoxins Occurrence in Spices. In *Aflatoxins - Occurrence, Detoxification, Determination and Health Risks*): IntechOpen Croatia.
8. Aktas T., 2015, Some Applications to Retain the Quality of Fruits and Vegetables during Drying and Storage in Turkey, *Japan Journal of Food Engineering*, 16(1), 29-36.
9. Alameri M.M., Kong A.S., Aljaafari M.N., Ali H.A., Eid K., Sallagi M.A., Cheng W.H., Abushelaibi A., Lim S.E., Loh J.Y., & Lai K.S., 2023, Aflatoxin Contamination: An Overview on Health Issues, Detection and Management Strategies, *Toxins (Basel)*, 15(4), 246.
10. Ali N., Hashim N.H., & Shuib N.S., 2015, Natural occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in processed spices marketed in Malaysia, *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 32(4), 518-532.

11. Andrade P., & Caldas E.D., 2015, Aflatoxins in cereals: worldwide occurrence and dietary risk assessment, *World Mycotoxin Journal*, 8(4), 415-431.
12. AOAC Official Method 2005.08, 2005, Aflatoxins in Corn, Raw Peanuts, and Peanut Butter - Liquid Chromatography with Post-Column Photochemical Derivatization.
13. AOAC Official Method 994.08, 1997, Aflatoxins in corn, Almonds, Brazil nuts, Peanuts, and Pistachio nuts. Multifunctional column (mycosep) method.
14. AOAC Official Methods of Analysis, 2019, Guidelines for Standard Method Performance Requirements, Appendix F, p. 9.
15. Apen Daneil O., Daneil Ochi O., Adejumo A., Hadiza L.M., Abubakar N.S., Atehnkeng J., Rinde H.A., Mailafiya C S., & Hussaini A.M., 2016, Mycotoxicological Concerns with Sorghum, Millet and Sesame in Northern Nigeria, *Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques*, 7(5).
16. Application Note, 2010, ACQUITY UPLC H-System Guide - Revision B, Waters Corporation, USA.
17. Aristil J., Venturini G., Maddalena G., Toffolatti S.L., & Spada A., 2020, Fungal contamination and aflatoxin content of maize, moringa and peanut foods from rural subsistence farms in South Haiti, *Journal of Stored Products Research*, 85.
18. Asghar M.A., Ahmed A., & Iqbal J., 2016, Aflatoxins and ochratoxin A in export quality raisins collected from different areas of Pakistan, *Food Addit Contam Part B Surveill*, 9(1), 51-58.
19. Astoreca A., Vaamonde G., Dalcero A., Ramos A.J., & Marin S., 2012, Modelling the effect of temperature and water activity of *Aspergillus flavus* isolates from corn, *Int J Food Microbiol*, 156(1), 60-67.
20. Bakoye O.N., Baoua I.B., Seyni H., Amadou L., Murdock L.L., & Baributsa D., 2017, Quality of maize for sale in markets in Benin and Niger, *J Stored Prod Res*, 71, 99-105.
21. Báo Khoa học và đời sống. Ót khô nhiễm Aflatoxin độc hại thế nào? ( 25-12-2017) [Available from: <https://khoahocdoisong.vn/ot-kho-nhiem-aflatoxin-doc-hai-the-nao-post15191.html>].
22. Báo người lao động. Aflatoxin B1 - Độc tố vi nấm đang tấn công chúng ta (03-04-2020) [Available from: <https://nld.com.vn/suc-khoe/aflatoxin-b1-doc-to-vi-nam-dang-tan-cong-chung-ta-52082.htm>].
23. Báo Thanh Niên. Phát hiện nhiều mẫu ót bột chứa độc tố aflatoxin có thể gây ung thư gan (27-05-2018). [Available from: <https://thanhnien.vn/thoi-su/phan-tien-nhieu-mau-ot-bot-chua-doc-to-aflatoxin-co-the-gay-ung-thu-gan-27-05-2018>].

[hien-nhieu-mau-ot-bot-chua-doc-to-aflatoxin-co-the-gay-ung-thu-gan-963788.html](http://hien-nhieu-mau-ot-bot-chua-doc-to-aflatoxin-co-the-gay-ung-thu-gan-963788.html).

24. Benvenuti M.E., & Di Gioia A.J., 2009, Rapid analysis of aflatoxins without derivatization using ultra performance liquid chromatography and fluorescence detection, *Waters Corporation, U.S.A.*
25. Bessaire T., Mujahid C., Mottier P., & Desmarchelier A., 2019, Multiple Mycotoxins Determination in Food by LC-MS/MS: An International Collaborative Study, *Toxins (Basel)*, 11(11).
26. Bộ Y Tế. Công bố kết quả tổng điều tra Dinh dưỡng năm 2019-2020 (15 -04 - 2021) [Available from: [https://moh.gov.vn/tin-noi-bat/-/asset\\_publisher/3Yst7YhbkA5j/content/bo-y-te-cong-bo-ket-qua-tong-ieu-tra-dinh-duong-nam-2019-2020](https://moh.gov.vn/tin-noi-bat/-/asset_publisher/3Yst7YhbkA5j/content/bo-y-te-cong-bo-ket-qua-tong-ieu-tra-dinh-duong-nam-2019-2020)].
27. Bolu S., Foluke S., Nusy E., Mary A., Risikat A., Daramola K., Atitebi A., Victor O., & Ahmed R.N., 2014, Effect of Vitamins, Amino Acids and Phyto-Active Biomolecules on *Aspergillus flavus* in Poultry Production. In S. J. Thatha Gowder (Ed.), *Pharmacology and Therapeutics*, Rijeka: IntechOpen.
28. Bui H.T.M., Le T.D., Do T.H., Leon B., & Anders D., 2016, Dietary exposure to aflatoxin B1, ochratoxin A and fumonisins of adults in Lao Cai province, Viet Nam: A total dietary study approach, *Food and Chemical Toxicology*, 98, 127-133.
29. Castellari C.C., Cendoya M.G., Marcos Valle F.J., Barrera V., & Pacin A.M., 2015, [Extrinsic and intrinsic factors associated with mycotoxigenic fungi populations of maize grains (*Zea mays* L.) stored in silobags in Argentina], *Rev Argent Microbiol*, 47(4), 350-359.
30. Chang P.K., Hua S.S., Sarreal S.B., & Li R.W., 2015, Suppression of Aflatoxin Biosynthesis in *Aspergillus flavus* by 2-Phenylethanol Is Associated with Stimulated Growth and Decreased Degradation of Branched-Chain Amino Acids, *Toxins (Basel)*, 7(10), 3887-3902.
31. Chauhan N.M., Washe A.P., & Minota T., 2016, Fungal infection and aflatoxin contamination in maize collected from Gedeo zone, Ethiopia, *Springerplus*, 5(1), 753.
32. Chawla S., Patel H.K., Gor H.N., VaGhela K.M., SolaNKi P.P., & Shah P.G., 2017, Evaluation of Matrix Effects in Multiresidue Analysis of Pesticide Residues in Vegetables and Spices by LC-MS/MS, *Journal of AOAC international*, 100(3), 616-623.
33. Codex Alimentarius Commission CAC/GL 54-2004, 2004, Guidelines on Measurement Uncertainty, 1-8.

34. Cordeiro F., Emons H., & Robouch P., 2022, Is the z score sufficient to assess participants' performance in proficiency testing? The hidden corrective action, *Accreditation and Quality Assurance*, 27(3), 145-153.
35. Cui X., Muhammad I., Li J., Li R., Jin H., Guo Z., Yang Y., Hamid S., Cheng P., & Zhang X., 2017, Development of a UPLC-FLD Method for Detection of Aflatoxin B1 and M1 in Animal Tissue to Study the Effect of Curcumin on Mycotoxin Clearance Rates, *Front Pharmacol*, 8, 650.
36. Deng Y., Wang Y., Deng Q., Sun L., Wang R., Wang X., Liao J., & Gooneratne R., 2020, Simultaneous Quantification of Aflatoxin B(1), T-2 Toxin, Ochratoxin A and Deoxynivalenol in Dried Seafood Products by LC-MS/MS, *Toxins (Basel)*, 12(8), 488.
37. Ding N., Xing F., Liu X., Selvaraj J.N., Wang L., Zhao Y., Wang Y., Guo W., Dai X., & Liu Y., 2015, Variation in fungal microbiome (mycobiome) and aflatoxin in stored in-shell peanuts at four different areas of China, *Front Microbiol*, 6, 1055.
38. Dini A., Esmaeili Nadimi A., & Behmaram K., 2022, The Effect of Monitoring System on Risk Assessment of Aflatoxins in Iran's Pistachio Nuts Exported to the E.U. During 2012 - 2018, *Iran J Pharm Res*, 21(1), e123951.
39. Do T.H., Tran S.C., Le C.D., Nguyen B.T.H., Le T.T.P., Le H.T.H., Le T.D., & Nguyen T.H.T., 2020, Dietary exposure and health risk characterization of aflatoxin B1, ochratoxin A, fumonisin B1, and zearalenone in food from different provinces in Northern Vietnam, *Food Control*, 112, 1-21.
40. Dolan J.W., 2002, Peak Tailing and Resolution, LC Resources Inc., Walnut Creek, California, USA.
41. EN ISO 16050:2011, 2011, Foodstuffs - Determination of aflatoxin B1, and the total content of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in cereals, nuts and derived products - High-performance liquid chromatographic method.
42. Eurachem Guide, 2014, The Fitness for Purpose of Analytical Methods - A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics.
43. European Food Safety Authority, 2005, Opinion of the scientific committee on a request from EFSA related to A harmonised approach for risk assessment of substances which are both genotoxic and carcinogenic. , *EFSA Journal*, 282, 1-31.
44. European Food Safety Authority, 2010, Management of left-censored data in dietary exposure assessment of chemical substances, *EFSA Journal*, 8(3).
45. European Medicines Agency EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2\*\*, 2012, Committee for Medicinal Products for Human Use —Guideline on



- Bioanalytical Method Validation, European Medicines Agency Amsterdam, The Netherlands.
46. Federal Agency for the safety of the food chain ( FASFC), 2012, Estimating measurement uncertainty in quantitative chemical analysis, Lab P508 Measurement uncertainty -V.01.
  47. Food Safety and Standards Authority of India (fssai), 2016, Manual for methods of analysis of mycotoxins.
  48. Frenkel R., Farrance I., & Badrick T., 2019, Bias in analytical chemistry: A review of selected procedures for incorporating uncorrected bias into the expanded uncertainty of analytical measurements and a graphical method for evaluating the concordance of reference and test procedures, *Clinica Chimica Acta*, 495, 129-138.
  49. Gallo P., Imbimbo S., Alvino S., Castellano V., Arace O., Soprano V., Esposito M., Serpe F.P., & Sansone D., 2021, Contamination by Aflatoxins B/G in Food and Commodities Imported in Southern Italy from 2017 to 2020: A Risk-Based Evaluation, *Toxins (Basel)*, 13(368), 1-13.
  50. Ginting E., Rahmianna A.A., & Yusnawan E., 2018, Aflatoxin and nutrient contents of peanut collected from local market and their processed foods, *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 102, 8.
  51. Gurikar C., Shivaprasad D.P., Sabillón L., Nanje Gowda N.A., & Siliveru K., 2023, Impact of mycotoxins and their metabolites associated with food grains, *Grain & Oil Science and Technology*, 6(1), 1-9.
  52. Habibipour R., Tamandegani P.R., & Farmany A., 2016, Monitoring of aflatoxin G1, B1, G2, and B2 occurrence in some samples of walnut, *Environ Monit Assess*, 188(12), 669.
  53. Hadil M.V., John K.Z., Paranitharan V., & Karthikeyan S., 2022, Mycotic contamination and aflatoxin potential of molds in *Capsicum annum* (chili), and chili powder commercialized in south Indian markets, *Toxicon*, 210, 109-114.
  54. Hair J.F., Black W.C., Babin B.J., & Anderson R.E., 2010, Multivariate Data Analysis. In 7th (Ed.), *Pearson*, (pp. 761), New York.
  55. Harris M.F., & Logan J.L., 2014, Determination of log Kow Values for Four Drugs, *Journal of Chemical Education*, 91(6), 915-918.
  56. Hathout A.S., Abel-Fattah S.M., Abou-Sree Y.H., & Fouzy A.S.M., 2020, Incidence and exposure assessment of aflatoxins and ochratoxin A in Egyptian wheat, *Toxicol Rep*, 7, 867-873.

57. Helgi L., 2021, Spice Consumption (Total) rose 106% to 204 kt in Vietnam in 2021, Prague 6, 160 00, Czech Republic.
58. INC, 2022-2023, Nuts & Dried fruits statistical yearbook by the International Nut and Dried Fruit Council Foundation. In, (pp. 77).
59. Information N.C.f.B. PubChem Identifier: CID 14421 (03-09-2022) [Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/14421>].
60. International Agency for Research on Cancer (IARC), 2002, *Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene* (Vol. 82).
61. International Conference on Harmonization (ICH) M10 Guideline, 2022, Bioanalytical Method Validation and Study Sample Analysis In): International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use.
62. Ismail A., Akhtar S., Riaz M., Gong Y. Y., Routledge M.N., & Naeem I., 2020, Prevalence and Exposure Assessment of Aflatoxins Through Black Tea Consumption in the Multan City of Pakistan and the Impact of Tea Making Process on Aflatoxins, *Front Microbiol*, 11, 446.
63. Jallow A., Xie H., Tang X., Qi Z., & Li P., 2021, Worldwide aflatoxin contamination of agricultural products and foods: From occurrence to control, *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 20(3), 2332-2381.
64. Jean F.B., Philippe A.N., Karim K., Mariam O., Sylvain R.B., Eloi S., & Nicolas B., 2015, Assessment of aflatoxin B1 and ochratoxin A levels in sorghum malts and beer in Ouagadougou, *African Journal of Food Science*, 9(7), 417-420.
65. Jeong S.E., Chung S.H., & Hong S.-Y., 2019, Natural occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in meju and soybean paste produced in South Korea, *Applied Biological Chemistry*, 62(1).
66. Kim D.H., Hong S.Y., Kang J.W., Cho S.M., Lee K.R., An T.K., Lee C., & Chung S.H., 2017, Simultaneous Determination of Multi-Mycotoxins in Cereal Grains Collected from South Korea by LC/MS/MS, *Toxins (Basel)*, 9(3).
67. Kissell R., & Poserina J., 2017, Chapter 2 - Regression Models. In R. Kissell & J. Poserina (Eds.), *Optimal Sports Math, Statistics, and Fantasy*, (pp. 39-67), Academic Press.
68. Kollia E., Tsourouflis K., & Markaki P., 2016, Aflatoxin B1 in sesame seeds and sesame products from the Greek market, *Food Addit Contam Part B Surveill*, 9(3), 217-222.

69. Kujbida P., Maia P.P., Araújo A.N.d., Mendes L.D., Oliveira M.L.d., Silva-Rocha W.P., Brito G.Q.d., Chaves G.M., & Martins I., 2019, Risk assessment of the occurrence of aflatoxin and fungi in peanuts and cashew nuts, *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 55.
70. Kumar A., Pathak H., Bhadauria S., & Sudan J., 2021, Aflatoxin contamination in food crops: causes, detection, and management: a review, *Food Production, Processing and Nutrition*, 3(1), 1-9.
71. Kumar V.V., 2018, Aflatoxins: Properties, Toxicity and Detoxification, *Nutrition & Food Science International Journal*, 6(5), 1-4.
72. Kunsagi Z., Breidbach A., & Stroka J., 2012, Report on the 2011 Proficiency Test of the European Union Reference Laboratory for Mycotoxins, for the Network of National Reference Laboratories - Determination of Aflatoxin B1 in Baby food, Maize powder, Animal feed and Test solution, *Reference Materials and Measurements*.
73. Lavkor I., & Var I., 2017, The Control of Aflatoxin Contamination at Harvest, Drying, Pre- Storage and Storage Periods in Peanut: The New Approach. In *Aflatoxin-Control, Analysis, Detection and Health Risks*).
74. Le T.G., & Tran L.T.T., 2020, Determination of aflatoxin B1, B2, G1, G2 in cashew nut by UHPLC-HRMS, *Vietnam Journal of Chemistry*, 58(4), 540-547.
75. Lee H.S., Nguyen-Viet H., Lindahl J., Thanh H.M., Khanh T.N., Hien L.T.T., & Grace D., 2017, A survey of aflatoxin B1 in maize and awareness of aflatoxins in Vietnam, *World Mycotoxin Journal*, 10(2), 195-202.
76. Leger R.J.S., Screen S.E., & Shams-Pirzadeh B., 2000, Lack of host specialization in *Aspergillus flavus*, *Applied and Environmental Microbiology*, 66(1), 320-324.
77. Liao C.-D., Lin H.-Y., CHIUEH L., & SHIH D., 2011, Simultaneous Quantification of Aflatoxins, Ochratoxin A and Zearalenone in Cereals by LC/-MS/MS, *Journal of Food and Drug Analysis*, 19, 259-268.
78. Lien K.-W., Wang X., Pan M.-H., & Ling M.-P., 2019, Assessing Aflatoxin Exposure Risk from Peanuts and Peanut Products Imported to Taiwan, *Toxins*, 11(2).
79. Liu J., Sun L., Zhang N., Zhang J., Guo J., Li C., Rajput S.A., & Qi D., 2016, Effects of Nutrients in Substrates of Different Grains on Aflatoxin B1 Production by *Aspergillus flavus*, *Biomed Res Int*, 2016, 7232858.
80. Lv S., Wang H., Yan Y., Ge M., & Guan J., 2020, Quantification and confirmation of four aflatoxins using a LC-MS/MS QTRAP system in

- multiple reaction monitoring, enhanced product ion scan, and MS(3) modes, *Eur J Mass Spectrom (Chichester)*, 26(1), 63-77.
81. Ma X., Wang W., Chen X., Xia Y., Wu S., Duan N., & Wang Z., 2014, Selection, identification, and application of Aflatoxin B1 aptamer, *European Food Research and Technology*, 238(6), 919-925.
  82. Mahato D.K., Lee K.E., Kamle M., Devi S., Dewangan K.N., Kumar P., & Kang S.G., 2019, Aflatoxins in Food and Feed: An Overview on Prevalence, Detection and Control Strategies, *Frontiers in microbiology*, 10, 2266.
  83. Mahbobinejhad Z., Aminian H., Ebrahimi L., & Vahdati K., 2019, Reduction of aflatoxin production by exposing *Aspergillus flavus* to CO<sub>2</sub>, *Crop Protection*, 8(4), 441-448.
  84. Mahfuz M., Gazi M.A., Hossain M., Islam M.R., Fahim S.M., & Ahmed T., 2018, General and advanced methods for the detection and measurement of aflatoxins and aflatoxin metabolites: a review, *Toxin Reviews*, 39(2), 123-137.
  85. Manna M., & Kim K.D., 2017, Influence of Temperature and Water Activity on Deleterious Fungi and Mycotoxin Production during Grain Storage, *Mycobiology*, 45(4), 240-254.
  86. Mannani N., Tabarani A., Abdennebi E.H., & Zinedine A., 2020, Assessment of aflatoxin levels in herbal green tea available on the Moroccan market, *Food Control*, 108.
  87. Marco c.L., TErEnZIo B., Amedeo P., & PaoLa B., 2015, Mycotoxin occurrence in maize produced in Northern Italy over the years 2009–2011: focus on the role of crop related factors, *Phytopathologia Mediterranea*, 54, 212-221.
  88. Martinez-Miranda M.M., Rosero-Moreano M., & Taborda-Ocampo G., 2019, Occurrence, dietary exposure and risk assessment of aflatoxins in arepa, bread and rice, *Food Control*, 98, 359-366.
  89. Martins L.M., Sant'Ana A.S., Fungaro M.H., Silva J.J., Nascimento M.D., Frisvad J.C., & Taniwaki M.H., 2017, The biodiversity of *Aspergillus* section Flavi and aflatoxins in the Brazilian peanut production chain, *Food Res Int*, 94, 101-107.
  90. Martins L.M., Sant'Ana A.S., Iamanaka B.T., Berto M.I., Pitt J.I., & Taniwaki M.H., 2017, Kinetics of aflatoxin degradation during peanut roasting, *Food Res Int*, 97, 178-183.
  91. Matumba L., Sulyok M., Njoroge S.M., Njumbe Ediage E., Van Poucke C., De Saeger S., & Krska R., 2015, Uncommon occurrence ratios of aflatoxin

- B1, B2, G1, and G2 in maize and groundnuts from Malawi, *Mycotoxin Res*, 31(1), 57-62.
92. Meena I.L., Var I., Saglam S., Uckun O., Tekin A., O., & Savas O., 2019, Presence of some mycotoxins in peanuts from harvest to storage, *Agricultural research communication centre*, 42, 862-866.
  93. Miklós G., Angeli C., Ambrus Á., Zetai A., Kerekes K., Farkas Z., zwiak Á.J., Nagy A., Kardos V., & Bartók T., 2020, Detection of Aflatoxins in Different Matrices and Food-Chain Positions, *Frontiers in microbiology*, 11, 1916.
  94. Nada E.D., Lucia G., & Michele S., 2019, Multimycotoxins occurrence in spices and herbs commercialized in Lebanon, *Food Control, JFCO 6246*, 1-26.
  95. Naeem I., Ismail A., Rehman A.U., Ismail Z., Saima S., Naz A., Faraz A., de Oliveira C.A.F., Benkerroum N., Aslam M.Z., & Aslam R., 2022, Prevalence of Aflatoxins in Selected Dry Fruits, Impact of Storage Conditions on Contamination Levels and Associated Health Risks on Pakistani Consumers, *Int J Environ Res Public Health*, 19(6), 3404.
  96. Nafuka S.N., Misihairabgwi J.M., Bock R., Ishola A., Sulyok M., & Krska R., 2019, Variation of Fungal Metabolites in Sorghum Malts Used to Prepare Namibian Traditional Fermented Beverages Omalodu and Otombo, *Toxins (Basel)*, 11(3).
  97. Nguyen T.D., Nguyen T.N.H., Dang T.K.H., Nguyen L.K.D., Ly T.K., Nguyen Q.H., Le T.T., Chu V.H., Nguyen T.D., & Le D.V., 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 Sci Nutr*, 11(10), 6509-6521.
  98. Nguyen X.T.T., Nguyen T.T.T., Nguyen H.V., Tran K.N., Johanna L., Delia G.R., Ha T.M., & Hu S.L., 2019, Assessment of aflatoxin B1 in maize and awareness of aflatoxins in Son La, Vietnam, *Infection Ecology & Epidemiology*, 8(1), 1-8.
  99. Norlia M., Jinap S., Nor-Khaizura M.A.R., Radu S., Samsudin N.I.P., & Azri F.A., 2019, Aspergillus section Flavi and Aflatoxins: Occurrence, Detection, and Identification in Raw Peanuts and Peanut-Based Products Along the Supply Chain, *Frontiers in microbiology*, 10, 2602.
  100. OECD/FAO, 2022-2031, The Agricultural Outlook of The Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) and the Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations, (In).

101. Oliveira M.S., Rocha A., Sulyok M., Krska R., & Mallmann C.A., 2017, Natural mycotoxin contamination of maize (*Zea mays* L.) in the South region of Brazil, *Food Control*, 73, 127-132.
102. Omwoma S., 2019, Aflatoxin B1: Chemistry, Environmental and Diet Sources and Potential Exposure in Human in Kenya. In *Aflatoxin B1 Occurrence, Detection and Toxicological Effects*): IntechOpen.
103. Ouakhssase A., Chahid A., Choubbane H., Aitmazirt A., & Addi E.A., 2019, Optimization and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for the determination of aflatoxins in maize, *Heliyon*, 5(5).
104. Philip Stefl. What is log Pow? The O/W partition coefficient in SDS (03-09-2022). [Available from: <https://www.gesi.de/en/blog/2017/02/06/what-is-log-pow-the-o-w-partition-coefficient-in-sdss>.
105. Pires P.N., Vargas E.A., Gomes M.B., Vieira C.B.M., Santos E.A.D., Bicalho A.A.C., Silva S.C., Rezende R.P., Oliveira I.S., Luz E., & Trovatti Uetanabaro A.P., 2019, Aflatoxins and ochratoxin A: occurrence and contamination levels in cocoa beans from Brazil, *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 36(5), 815-824.
106. Qiao Y., 2011, Interstate Fiscal Disparities in America In 2th (Ed.), *Routledge*, (pp. 218), New York and London.
107. Quadri S.H., Ms N., Kc C., Shantaram U., & Hs E., 2012, An overview of chemistry, toxicity, analysis, and control of aflatoxins, *International Journal of Chemical and Life Sciences*, 2, 1071-1078.
108. Quy chuẩn Việt Nam QCVN 8-1:2011/BYT, 2011, Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia đối với giới hạn ô nhiễm độc tố vi nấm trong thực phẩm, Bộ Y tế.
109. Rajendran S., Shunmugam G., Mallikarjunan K., Paranidharan V., & Venugopal A.P., 2021, Prevalence of aflatoxin contamination in red chilli pepper (*Capsicum annum* L.) from India, *International Journal of Food Science & Technology*, 57(4), 2185-2194.
110. Reijenga J., Van Hoof A., Van Loon A., & Teunissen B., 2013, Development of Methods for the Determination of pKa Values, *Anal Chem Insights*, 8, 53-71.
111. Rushing B.R., & Selim M.I., 2019, Aflatoxin B1: A review on metabolism, toxicity, occurrence in food, occupational exposure, and detoxification methods, *Food Chem Toxicol*, 124, 81-100.

112. Salve A.R., LeBlanc J.G., & Arya S.S., 2021, Effect of processing on polyphenol profile, aflatoxin concentration and allergenicity of peanuts, *J Food Sci Technol*, 58(7), 2714-2724.
113. SANTE/12682/2019, 2020, Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed.
114. Scarpari M., Punelli M., Scala V., Zaccaria M., Nobili C., Ludovici M., Camera E., Fabbri A.A., Reverberi M., & Fanelli C., 2014, Lipids in *Aspergillus flavus*-maize interaction, *Frontiers in microbiology*, 5, 74.
115. Schöberl A., 2021, Romer Labs Check Sample Survey - Aflatoxins/Fumonisin in Corn (CSSMY021 – M21411AF), Austria.
116. Schrenk D., Bignami M., Bodin L., Chipman J.K., Del Mazo J., Grasl-Kraupp B., Hogstrand C., Hoogenboom L.R., Leblanc J.C., Nebbia C.S., Nielsen E., Ntzani E., Petersen A., Sand S., Schwerdtle T., Vleminckx C., Marko D., Oswald I.P., Piersma A., Routledge M., Schlatter J., Baert K., Gergelova P., & Wallace H., 2020, Risk assessment of aflatoxins in food - Efsa Panel on Contaminants in the Food Chain  
*EFSA J*, 18(3), e06040.
117. Seta E., & Erkmen O., 2014, Occurrence of Aflatoxins in Ground Red Chili Pepper and Pistachio Nut, *International Journal of Food Properties*, 17(10), 2322-2331.
118. Shabeer S., Asad S., Jamal A., & Ali A., 2022, Aflatoxin Contamination, Its Impact and Management Strategies: An Updated Review, *Toxins (Basel)*, 14(5), 307.
119. Shabir G.A., 2004, Step-by-Step Analytical Methods Validation and Protocol in the Quality System Compliance Industry, *Journal of validation technology*, 10, 314-324.
120. Shephard G.S., 2008, Risk assessment of aflatoxins in food in Africa, *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 25(10), 1246-1256.
121. Siciliano I., Berta F., Bosio P., Gullino M.L., & Garibaldi A., 2017, Effect of different temperatures and CO<sub>2</sub> levels on *Alternaria* toxins produced on cultivated rocket, cabbage and cauliflower, *World Mycotoxin Journal*, 10(1), 63-72.
122. Sserumaga J.P., Ortega-Beltran A., Wagacha J.M., Mutegi C.K., & Bandyopadhyay R., 2020, Aflatoxin-producing fungi associated with pre-harvest maize contamination in Uganda, *Int J Food Microbiol*, 313, 108376.

123. Suryavanshi R.U., Paulbudhe N.J., & Rajasekaran S., 2021, HPLC VS UPLC: The extent of the area in analytical chemistry, *International Journal of Creative Research Thoughts*, 9(9), 796-809.
124. The National standard TCVN ISO/IEC 17025:2017, 2017, General requirements for the competence of testing and calibration laboratories, (In). Ha Noi.
125. Tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 7930:2008, 2008, Thực phẩm – xác định aflatoxin B1 và tổng aflatoxin B1, B2, G1 và G2 trong ngũ cốc, quả có vỏ và sản phẩm của chúng – phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao có dẫn suất sau cột và làm sạch bằng cột ái lực miễn dịch.
126. Tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 9522:2012, 2012, Thực phẩm - xác định aflatoxin B1 trong thực phẩm chế biến từ ngũ cốc dành cho trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ - phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) có làm sạch bằng cột ái lực miễn nhiễm và detector huỳnh quang, Hà Nội.
127. Tome T., Žigart N., Asar Z.C., & Obreza A., 2019, Development and Optimization of Liquid Chromatography Analytical Methods by Using AQB D Principles: Overview and Recent Advances, *Organic Process Research & Development*, 23(9), 1784-1802.
128. Tổng cục thống kê. Dân số, lao động và việc làm năm 2021 ( 13 -01 - 2022) [Available from: <https://www.gso.gov.vn/du-lieu-va-so-lieu-thong-ke/2022/01/infographic-dan-so-lao-dong-va-viec-lam-nam-2021/>].
129. Udomkun P., Wiredu A.N., Nagle M., Müller J., Vanlauwe B., & Bandyopadhyay R., 2017, Innovative technologies to manage aflatoxins in foods and feeds and the profitability of application *Food Control*, 76, 127-138.
130. Viện Nghiên Cứu Dinh Dưỡng Thành phố Hồ Chí Minh. Theo dõi tình trạng dinh dưỡng bằng chỉ số BMI (17 - 01 -2021) [Available from: <https://viendinhduongtphcm.org/vi/dinh-duong-co-ban/theo-doi-tinh-trang-dinh-duong-bang-chi-so-bmi.html>].
131. Wacoo A.P., Wendiro D., Vuzi P.C., & Hawumba J.F., 2014, Methods for Detection of Aflatoxins in Agricultural Food Crops, *Journal of Applied Chemistry*, 2014, 1-15.
132. Wang B., Han X., Bai Y., Lin Z., Qiu M., Nie X., Wang S., Zhang F., Zhuang Z., Yuan J., & Wang S., 2017, Effects of nitrogen metabolism on growth and aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus*, *J Hazard Mater*, 324(Pt B), 691-700.



133. Wang Y.-j., Nie J.-y., Yan Z., Li Z.-x., Cheng Y., & Farooq S., 2018, Multi-mycotoxin exposure and risk assessments for Chinese consumption of nuts and dried fruits, *Journal of Integrative Agriculture*, 17(7), 1676-1690.
134. Watkins K., & Carleo J., 2021, Reducing Aflatoxin in Grain Corn, NC State University, College of Agriculture and Life Sciences.
135. Wayne W.L. Evaluating Association Between Two Continuous Variables (25-09-2023) Boston University School of Public Health2021 [
136. Yilmaz S.Ö., 2017, The contamination rate of aflatoxins in-ground red peppers, dried figs, walnuts without shell and seedless black raisins commercialized in sakarya city center, Turkey, *Italian journal of food science*, 29(4), 591.
137. Yoshinari T., Noda Y., Yoda K., Sezaki H., Nagasawa H., & Sakuda S., 2010, Inhibitory activity of blasticidin A, a strong aflatoxin production inhibitor, on protein synthesis of yeast: selective inhibition of aflatoxin production by protein synthesis inhibitors, *J Antibiot (Tokyo)*, 63(6), 309-314.
138. Zhang W., Liu Y., Liang B., Zhang Y., Zhong X., Luo X., Huang J., Wang Y., Cheng W., & Chen K., 2020, Probabilistic risk assessment of dietary exposure to aflatoxin B(1) in Guangzhou, China, *Sci Rep*, 10(1), 7973.
139. Zhao Y., Wang Q., Huang J., Ma L., Chen Z., & Wang F., 2018, Aflatoxin B(1) and sterigmatocystin in wheat and wheat products from supermarkets in China, *Food Addit Contam Part B Surveill*, 11(1), 9-14.

# PL-1

## PHỤ LỤC

### Phụ lục 1: Kết quả phân tích dữ liệu từ phần mềm SPSS 22.0

Bảng PL1.1. Bảng phân tích mối tương quan (Correlation) giữa các aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) với tổng AF trong nền đậu phộng

		AFB1	AFB2	AFG1	AFG2	Tổng AF
AFB1	Pearson Correlation	1	0,699**	0,571**	, <sup>b</sup>	0,998**
	Sig. (2-tailed)		0,000	0,000	,	0,000
	N	400	400	400	400	400
AFB2	Pearson Correlation	0,699**	1	0,464**	, <sup>b</sup>	0,747**
	Sig. (2-tailed)	0,000		0,000	,	0,000
	N	400	400	400	400	400
AFG1	Pearson Correlation	0,571**	0,464**	1	, <sup>b</sup>	0,583**
	Sig. (2-tailed)	0,000	0,000		,	0,000
	N	400	400	400	400	400
AFG2	Pearson Correlation	, <sup>b</sup>	, <sup>b</sup>	, <sup>b</sup>	, <sup>b</sup>	, <sup>b</sup>
	Sig. (2-tailed)	,	,	,	,	,
	N	400	400	400	400	400
Tổng AF	Pearson Correlation	0,998**	0,747**	0,583**	, <sup>b</sup>	1
	Sig. (2-tailed)	0,000	0,000	0,000	,	
	N	400	400	400	400	400

\*\* , Correlation is significant at the 0,01 level (2-tailed),

b, Cannot be computed because at least one of the variables is constant

Bảng PL1.2. Bảng thống kê kết quả hàm lượng trung bình đậu phộng thô và chế biến

	Loại	N	Giá trị trung bình ( $\mu\text{g/kg}$ )	Độ lệch chuẩn SD ( $\mu\text{g/kg}$ )	Sai số chuẩn so với giá trị trung bình
AF	Thô	370	21,4	86,3	4,49
	Chế biến	30	6,46	28,2	5,15

PL-2

Bảng PL1.3. Bảng kết quả kiểm định Independent Samples T-test giữa đậu phộng thô và chế biến

Đậu phộng thô và chế biến	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means							
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference		
								Lower	Upper	
AF Equal variances assumed	3,677	0,056	0,944	398	0,346	14,96656	15,84714	-16,18801	46,12113	
AF Equal variances not assumed			2,192	86,017	0,031	14,96656	6,82790	1,39318	28,53994	

Bảng PL1.4. Bảng phân tích mối tương quan Correlation giữa các aflatoxin (B1, B2, G1 và G2) và tổng AF trong nền bột ốt

		AFB1	AFB2	AFG1	AFG2	AFs
AFB1	Pearson Correlation	1	0,786**	0,371**	0,099*	0,998**
	Sig. (2-tailed)		0,000	0,000	0,047	0,000
	N	400	400	400	400	400
AFB2	Pearson Correlation	0,786**	1	0,268**	0,172**	0,807**
	Sig. (2-tailed)	,000		0,000	0,001	0,000
	N	400	400	400	400	400
AFG1	Pearson Correlation	0,371**	0,268**	1	0,351**	0,413**
	Sig. (2-tailed)	0,000	0,000		0,000	0,000
	N	400	400	400	400	400
AFG2	Pearson Correlation	0,099*	0,172**	0,351**	1	0,122*
	Sig. (2-tailed)	0,047	0,001	0,000		0,015
	N	400	400	400	400	400
Tổng AF	Pearson Correlation	0,998**	0,807**	0,413**	0,122*	1
	Sig. (2-tailed)	0,000	0,000	0,000	0,015	
	N	400	400	400	400	400

\*\* , Correlation is significant at the 0,01 level (2-tailed),

\* , Correlation is significant at the 0,05 level (2-tailed),

PL-3

Bảng PL1.5. Bảng thống kê kết quả hàm lượng trung bình bột ớt đóng gói hàn kín và không hàn kín

	Loại	N	Giá trị trung bình (µg/kg)	Độ lệch chuẩn SD (µg/kg)	Sai số chuẩn so với giá trị trung bình
AF	Hàn kín	200	7,02	13,5	0,96
	Không hàn kín	200	9,79	16,5	1,16

Bảng PL1.6. Bảng kết quả kiểm định Independent Samples T-test giữa bột ớt đóng gói hàn kín và không hàn kín

Bột ớt đóng gói hàn kín và không hàn kín	Levene's Test for Equality of Variances		T-test for Equality of Means							
	F	Sig,	t	df	Sig, (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference		
								Lower	Upper	
AF	Equal variances assumed	3,668	0,056	-1,835	398	0,067	-2,76575	1,50702	-5,72847	0,19697
	Equal variances not assumed			-1,835	383,646	0,067	-2,76575	1,50702	-5,72881	0,19731

Bảng PL1.7. Bảng phân tích mối tương quan Correlation giữa các aflatoxin ( B1, B2, G1 và G2) và tổng AF trong nền bắp hạt

		AFB1	AFB2	AFG1	AFG2	Tổng AF
AFB1	Pearson Correlation	1	0,940**	0,344**	0,028	1,000**
	Sig, (2-tailed)		0,000	0,000	0,576	0,000
	N	400	400	400	400	400
AFB2	Pearson Correlation	0,940**	1	0,377**	0,039	0,949**
	Sig, (2-tailed)	0,000		0,000	0,435	0,000
	N	400	400	400	400	400
AFG1	Pearson Correlation	0,344**	0,377**	1	0,500**	0,360**
	Sig, (2-tailed)	0,000	0,000		0,000	0,000
	N	400	400	400	400	400
AFG2	Pearson Correlation	0,028	0,039	0,500**	1	0,036
	Sig, (2-tailed)	0,576	0,435	0,000		0,468
	N	400	400	400	400	400
Tổng AF	Pearson Correlation	<b>1,000**</b>	<b>0,949**</b>	<b>0,360**</b>	<b>0,036</b>	1
	Sig, (2-tailed)	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,468</b>	
	N	400	400	400	400	400

\*\* , Correlation is significant at the 0,01 level (2-tailed).

PL-4

Bảng PL1.8. Bảng thống kê kết quả hàm lượng trung bình bắp hạt vàng và hạt trắng

	Loại	N	Giá trị trung bình ( $\mu\text{g/kg}$ )	Độ lệch chuẩn SD ( $\mu\text{g/kg}$ )	Sai số chuẩn so với giá trị trung bình
AF	Hạt vàng	100	0,16	1,02	0,10
	Hạt trắng	100	29,4	63,1	6,31

Bảng PL1.9. Bảng kết quả kiểm định Independent Samples T-test giữa bắp hạt vàng và hạt trắng

Bắp hạt vàng và hạt trắng		Levene's Test for Equality of Variances		T-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
AF	Equal variances assumed	33,955	0,000	-4,637	198	0,000	-29,25560	6,30890	-41,69687	16,81433
	Equal variances not assumed			-4,637	99,052	0,000	-29,25560	6,30890	-41,77375	16,73745

Bảng PL1.10. Bảng thống kê kết quả hàm lượng trung bình bắp hạt và bắp chế biến

	Loại	N	Giá trị trung bình ( $\mu\text{g/kg}$ )	Độ lệch chuẩn SD ( $\mu\text{g/kg}$ )	Sai số chuẩn so với giá trị trung bình
AF	Bắp hạt	200	14,8	46,9	3,31
	Bắp chế biến	200	1,96	6,96	0,49

Bảng PL1.11. Bảng kết quả kiểm định Independent Samples T-test giữa bắp hạt và bắp chế biến

Bắp hạt và bắp chế biến		Levene's Test for Equality of Variances		T-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
AF	Equal variances assumed	36,359	<b>0,000</b>	3,830	398	0,000	12,82885	3,34930	6,24432	19,41338
	Equal variances not assumed			3,830	207,771	0,000	12,82885	3,34930	6,22588	19,43182

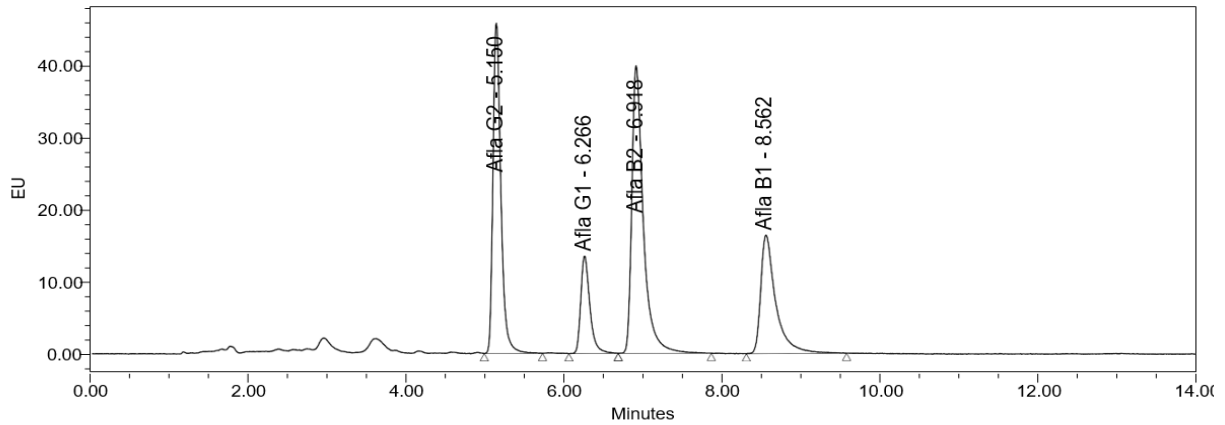
## PL-5

Phụ lục 2: Giá trị RSD lặp lại, tái lập và độ thu hồi tối đa cho phép theo AOAC

Stt	Hàm lượng %	Tỷ lệ chất	Đơn vị	Độ lặp lại RSDr (%)	Độ tái lập RSDR (%)	Độ đúng (%)
1	100	1	100%	1,3	2	98-102
2	10	$10^{-1}$	10%	1,8	3	98-102
3	1	$10^{-2}$	1%	2,7	4	97-103
4	0,1	$10^{-3}$	0,1%	3,7	6	95-105
5	0,01	$10^{-4}$	100 mg/kg	5,3	8	90-107
6	0,001	$10^{-5}$	10 mg/kg	7,3	11	80-110
7	0,0001	$10^{-6}$	1 mg/kg	11	16	80-110
8	0,00001	$10^{-7}$	100 µg/kg	15	22	80-110
9	0,000001	$10^{-8}$	10 µg/kg	21	32	60-115
10	0,0000001	$10^{-9}$	1 µg/kg	30	45	40-120

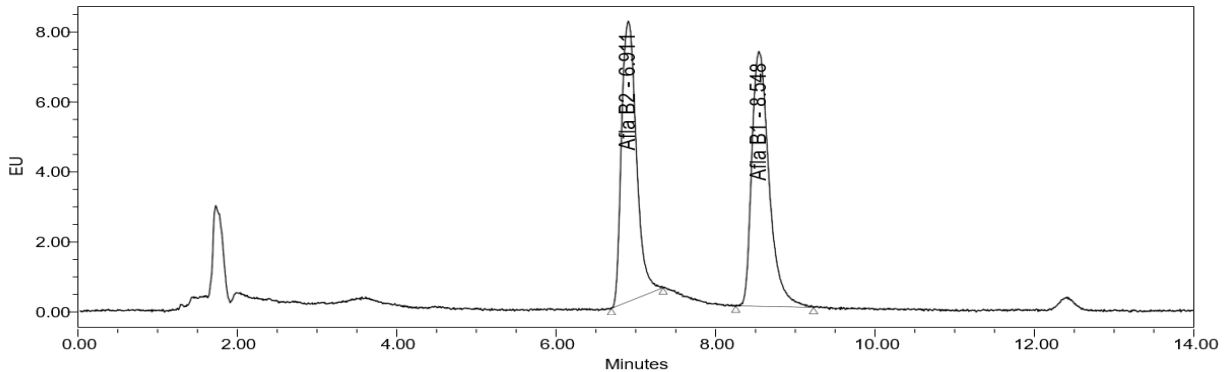
# PL-6

Phụ lục 3: Một số sắc ký đồ minh họa phân tích các mẫu thực



	Peak Name	RT	Area	Height	Amount	Cal - amount	Units
1	Afla G2	5.150	3178987	458422	2.000	1.995	µg/L
2	Afla G1	6.266	1090869	135494	8.000	8.041	µg/L
3	Afla B2	6.918	4023933	399221	2.000	2.004	µg/L
4	Afla B1	8.562	2170123	164684	8.000	8.103	µg/L

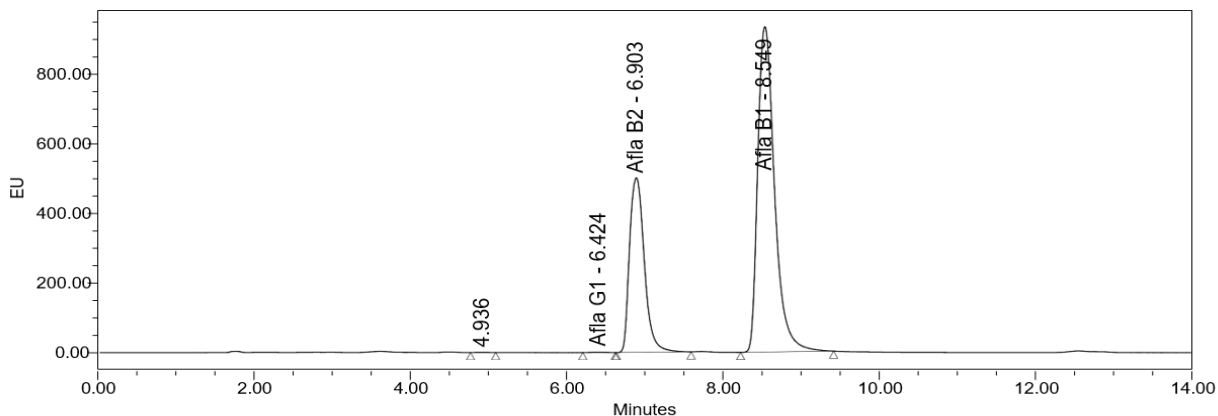
Hình PL3.1. Phổ sắc ký của dung dịch chuẩn hỗn hợp aflatoxin, nồng độ 20 µg/L (hình trên); và bảng tóm tắt thông số sắc ký của từng chất (hình dưới) bao gồm thời gian lưu (RT), diện tích (Area), chiều cao (Height), hàm lượng lý thuyết (Amount) và thực tế (Cal-amount), đơn vị (Units)



	Peak Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	Afla G2	5.216				
2	Afla G1	6.353				
3	Afla B2	6.911	1040460	80212	0.54	µg/kg
4	Afla B1	8.548	1098661	72900	4.14	µg/kg

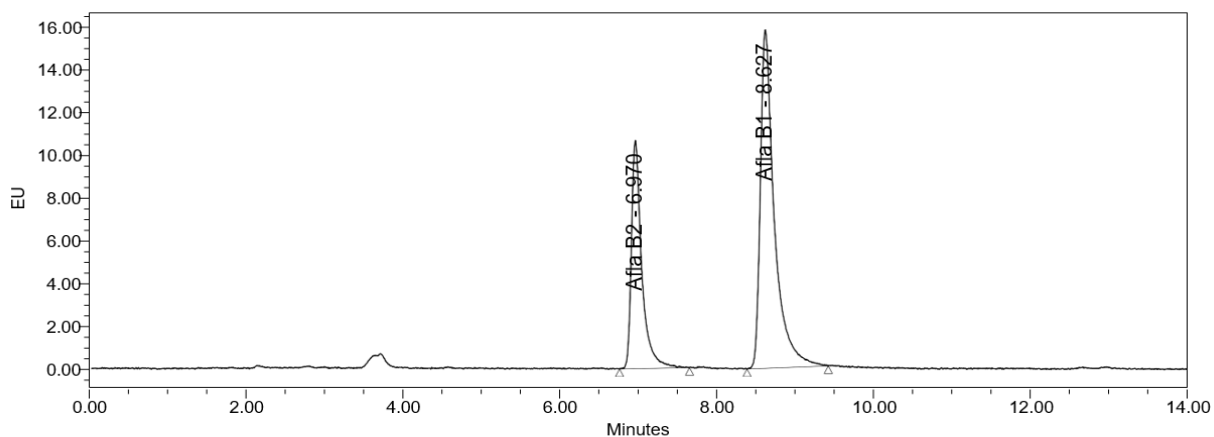
Hình PL3.2. Phổ sắc ký của mẫu đậu phộng thô (MM12101\_02084) phát hiện độc tố AFB2 và AFB1, với nồng độ tương ứng là 0,54 và 4,14 µg/kg

## PL-7



	Peak Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	Afla G2	5.216				
2	Afla G1	6.424	133525	10525	1.04	µg/kg
3	Afla B2	6.903	65721276	5006426	32.35	µg/kg
4	Afla B1	8.549	139663247	9338245	516.70	µg/kg

Hình PL3.3. Phổ sắc ký của mẫu đậu phộng thô (MM12101\_02073) phát hiện AFG1, AFB2 và AFB1; với nồng độ tương ứng là 1,04, 32,4 và 517 µg/kg

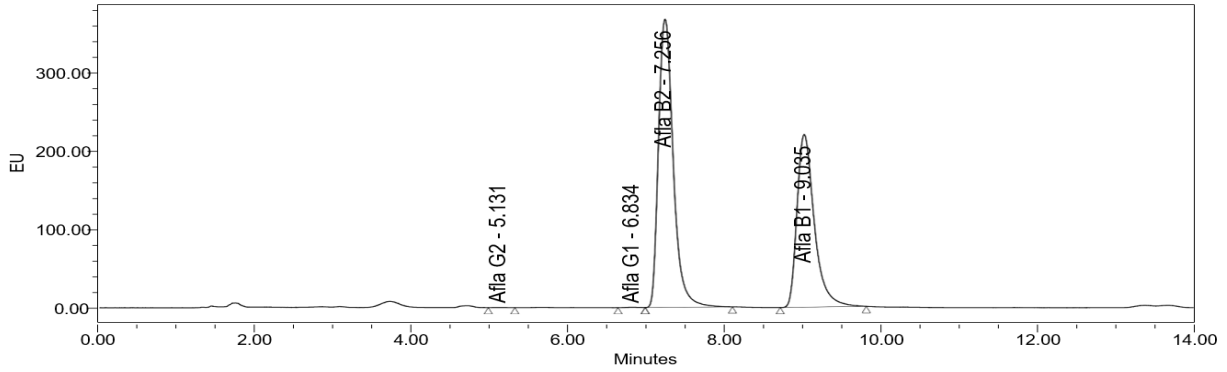


	Peak Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	Afla G2	5.216				
2	Afla G1	6.353				
3	Afla B2	6.970	977990	106946	25.3	µg/kg
4	Afla B1	8.627	1958570	158516	366	µg/kg

Hình PL3.3 – F50. Phổ sắc ký của mẫu đậu phộng thô (MM12101\_02073, pha loãng 50 lần) với nồng độ AFB2 và AFB1 tương ứng là 25,3 và 366 µg/kg

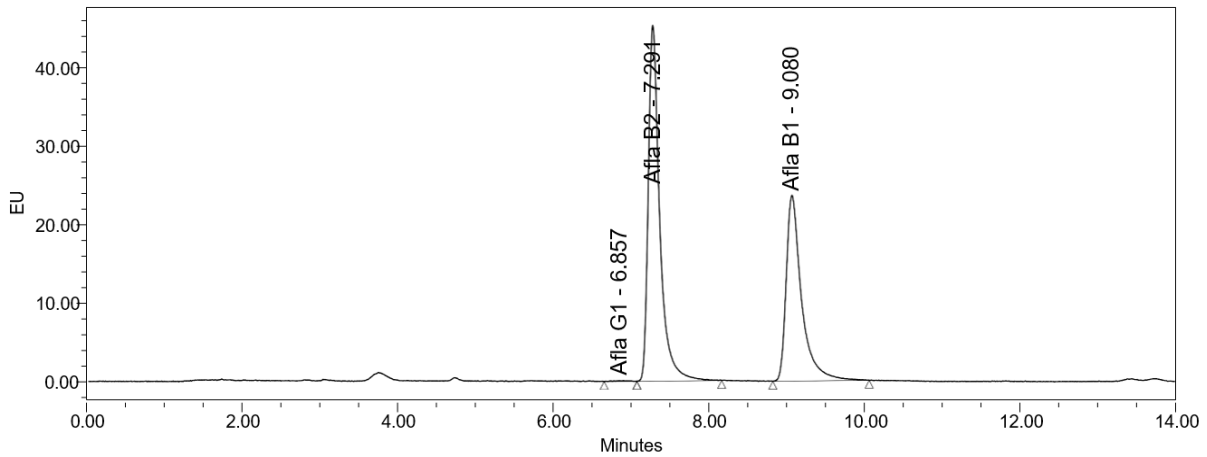


# PL-8



	Peak Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	Afla G2	5.131	27897	2618	0.021	µg/kg
2	Afla G1	6.834	50593	4797	0.35	µg/kg
3	Afla B2	7.256	48101537	3677355	25.35	µg/kg
4	Afla B1	9.035	33852579	2203224	135	µg/kg

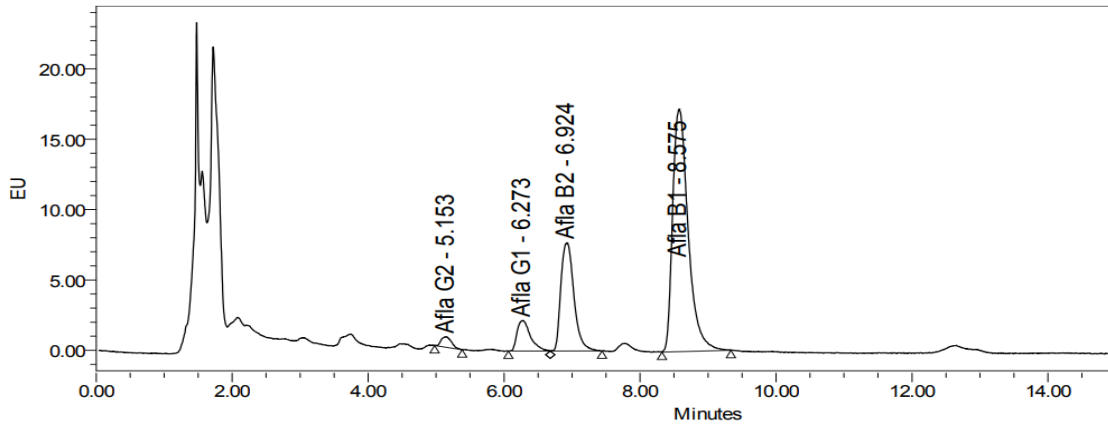
Hình PL3.4. Phổ sắc ký của mẫu đậu rang (MM12104\_01646) phát hiện độc tố AFG1, AFB2, và AFB1; với nồng độ tương ứng là 0,35; 25,4 và 135 µg/kg



	Peak Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	Afla G2	5.376				
2	Afla G1	6.857				
3	Afla B2	7.291	4636356	453787	24.5	µg/kg
4	Afla B1	9.080	3251931	236926	130	µg/kg

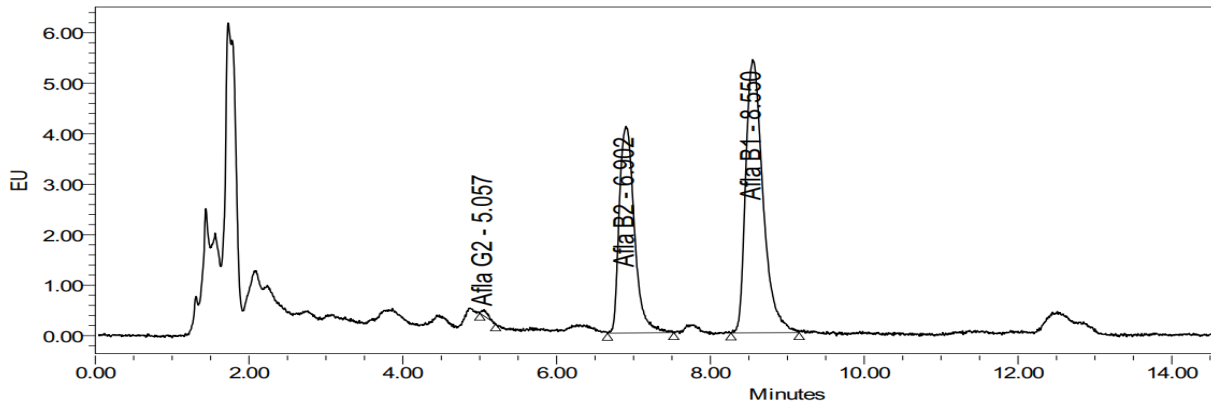
Hình PL3.4 – F10. Phổ sắc ký của mẫu đậu rang (MM12104\_01646, pha loãng 10 lần) với nồng độ AFB2 và AFB1 tương ứng là 24,5 và 130 µg/kg

PL-9



	Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Amount	Units
1	Afla G2	5.153	77525	1.88	7439	0.068	ppb
2	Afla G1	6.273	295907	7.16	21669	2.255	ppb
3	Afla B2	6.924	1025831	24.82	76841	0.538	ppb
4	Afla B1	8.575	2733537	66.14	172372	10.325	ppb

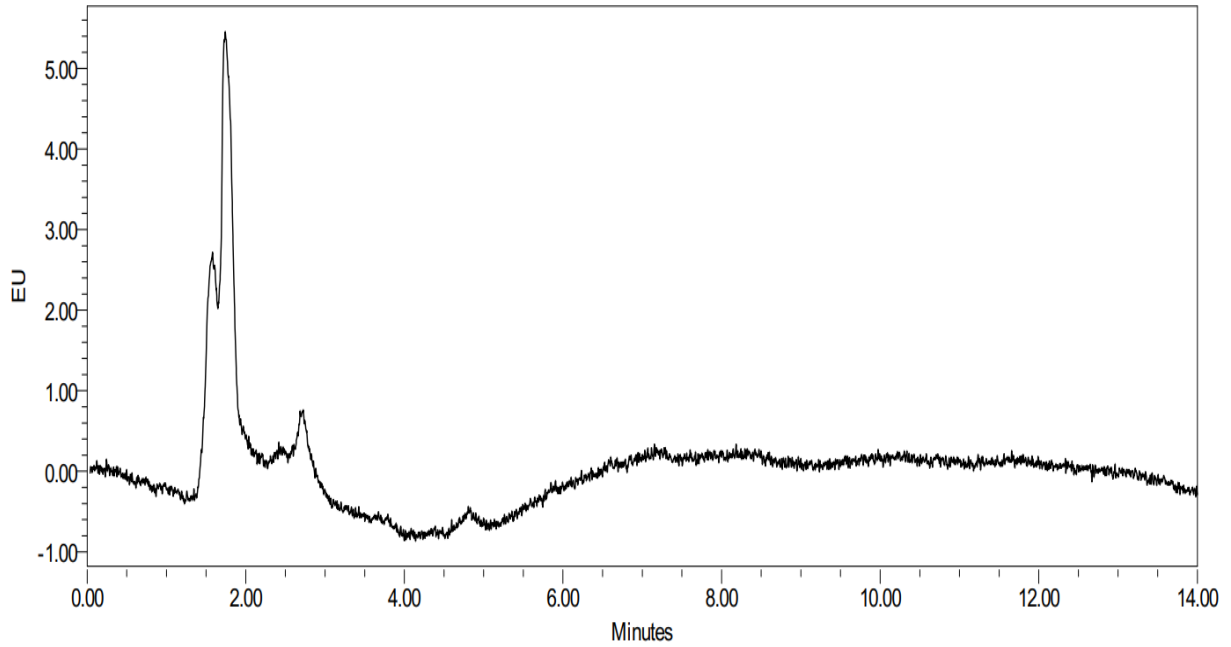
Hình PL3.5. Phổ sắc ký của mẫu bột ớt (MM12101\_02027) phát hiện độc tố AFG1, AFB2 và AFB1; với nồng độ tương ứng là 2,26; 0,54 và 10,3  $\mu\text{g}/\text{kg}$



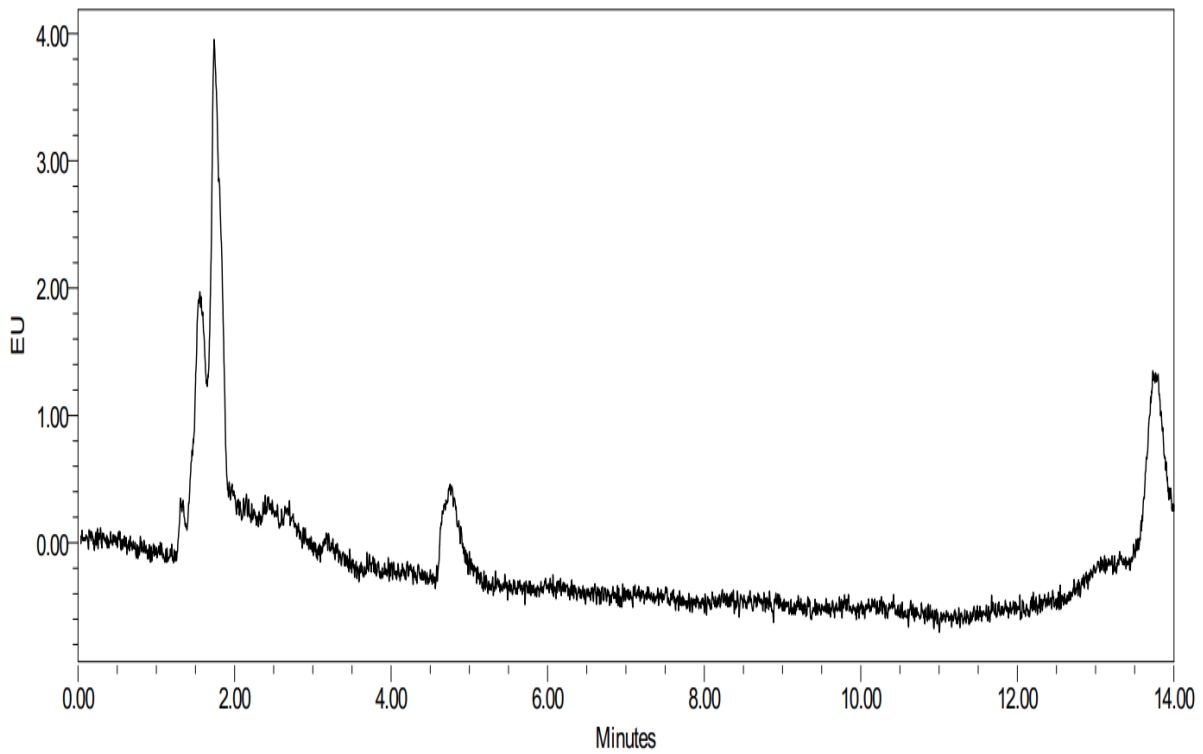
	Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Amount	Units
1	Afla G2	5.057	6706	0.48	1267	0.023	ppb
2	Afla G1	6.353					
3	Afla B2	6.902	559532	39.67	40942	0.303	ppb
4	Afla B1	8.550	844266	59.86	54122	3.261	ppb

Hình PL3.6. Phổ sắc ký của mẫu bột ớt (MM12101\_02033) phát hiện độc tố AFB2 và AFB1; với nồng độ tương ứng là 0,30 và 3,26  $\mu\text{g}/\text{kg}$

## PL-10

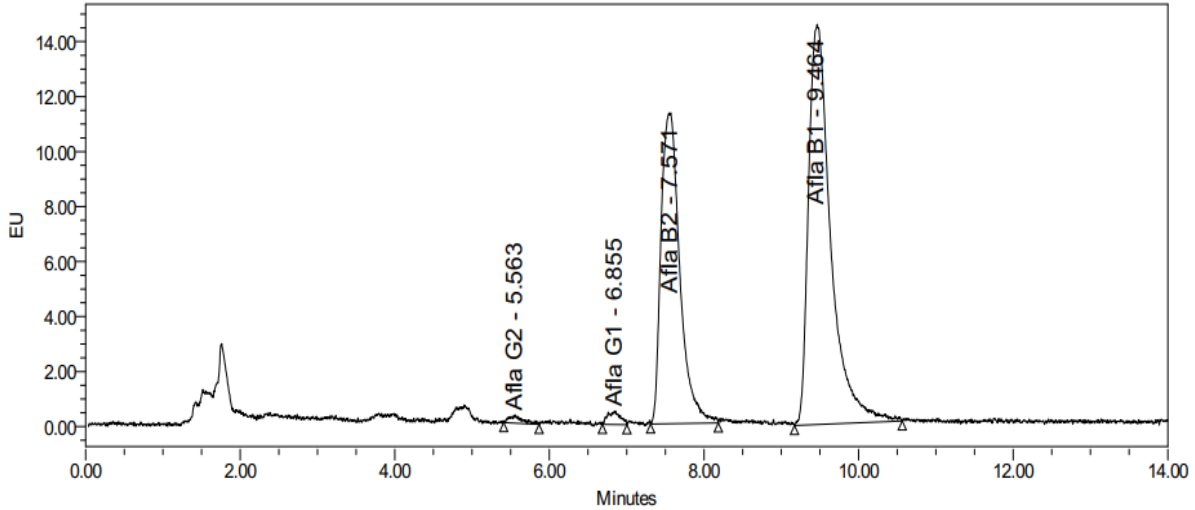


Hình PL3.7. Phổ sắc ký của mẫu nho khô (MM12204\_00247) không phát hiện aflatoxin



Hình PL3.8. Phổ sắc ký của mẫu bắp chế biến (MM12204\_00262) không phát hiện aflatoxin

PL-11



	Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Amount	Units
1	Afla G2	5.563	34746	0.71	2925	0.029	ppb
2	Afla G1	6.855	54632	1.12	4891	0.432	ppb
3	Afla B2	7.571	1901495	38.83	112994	0.816	ppb
4	Afla B1	9.464	2905554	59.34	145506	10.676	ppb

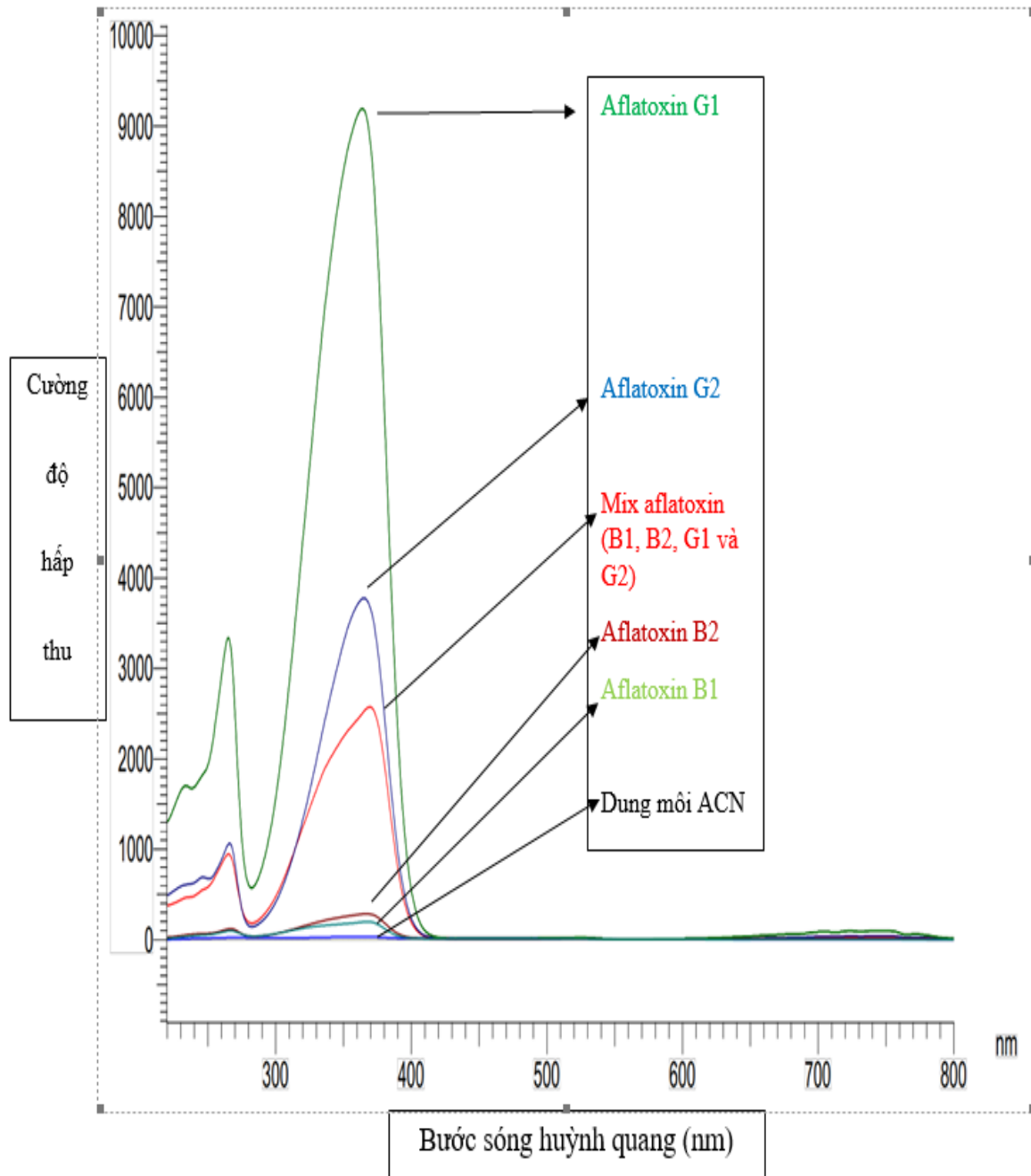
Hình PL3.9. Phổ sắc ký của mẫu bắp hạt trắng (MM12204\_01961) phát hiện độc tố AFG1, AFB2 và AFB1; với nồng độ tương ứng là 0,43; 0,82 và 10,7  $\mu\text{g}/\text{kg}$

Bảng PL3. Bảng kết quả phân tích mẫu thực qua phổ sắc ký minh họa

Mẫu	Tên mẫu	Đơn vị	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2
MM12101_02084	Đậu phộng thô	$\mu\text{g}/\text{kg}$	4,14	0,54	KPH	KPH
MM12101_02073	Đậu phộng thô	$\mu\text{g}/\text{kg}$	366	25,3	1,04	KPH
MM12104_01646	Đậu phộng rang	$\mu\text{g}/\text{kg}$	130	24,5	0,35	KPH
MM12101_02027	Bột ốt	$\mu\text{g}/\text{kg}$	10,3	0,54	2,26	KPH
MM12101_02033	Bột ốt	$\mu\text{g}/\text{kg}$	3,26	0,30	KPH	KPH
MM12204_00247	Nho khô	$\mu\text{g}/\text{kg}$	KPH	KPH	KPH	KPH
MM12204_00262	Bắp chế biến	$\mu\text{g}/\text{kg}$	KPH	KPH	KPH	KPH
MM12204_01961	Bắp hạt trắng	$\mu\text{g}/\text{kg}$	10,7	0,82	0,43	KPH

KPH: Không phát hiện, MDL = 0,1  $\mu\text{g}/\text{kg}$

Phụ lục 4: Phổ huỳnh quang khảo sát bước sóng kích thích dung dịch chuẩn aflatoxin (B1, B2, G1 và G2)



## PL-13

Phụ lục 5: Lưu đồ thu thập mẫu, phân tích, trả kết quả độc tố aflatoxin trong các nền mẫu đậu phộng, bột ợt, nho khô, bắp hạt

- Thu thập mẫu tại các địa điểm

- Mẫu được chứa trong bao bì (nhựa, hộp giấy, lon) hàn kín hoặc chứa trong bao nhựa cột kín.

- Đối tượng mẫu gồm: Đậu phộng thô và đậu phộng chế biến; Bột ợt; Bắp hạt và bắp hạt chế biến; Nho khô;

- Ghi nhận thông tin mẫu về địa điểm lấy mẫu, loại (đối tượng) mẫu

- Mẫu được bọc bên ngoài bằng bao nhựa đen cột kín để tránh nhiễm mẫu và ánh sáng trực tiếp.

- Mẫu được vận chuyển về bộ phận tiếp nhận

- Lưu mẫu nhiệt độ - 20°C nếu chưa kịp phân tích

- Cung cấp đầy đủ thông tin cần thiết vào phiếu yêu cầu thử nghiệm.

- Dán nhãn mã hoá mẫu và chuyển mẫu cho bộ phận chuẩn bị mẫu, sau đó mẫu được đồng nhất và chuyển đến phòng thí nghiệm.

- Phòng thí nghiệm tiến hành phân tích mẫu theo qui trình phân tích phù hợp,

- Lưu mẫu nhiệt độ - 20°C

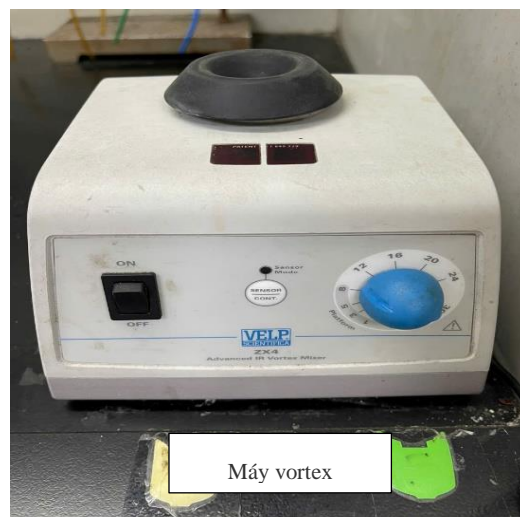
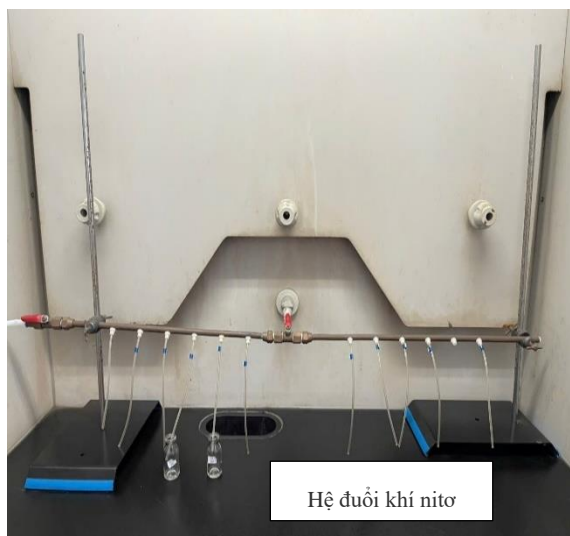
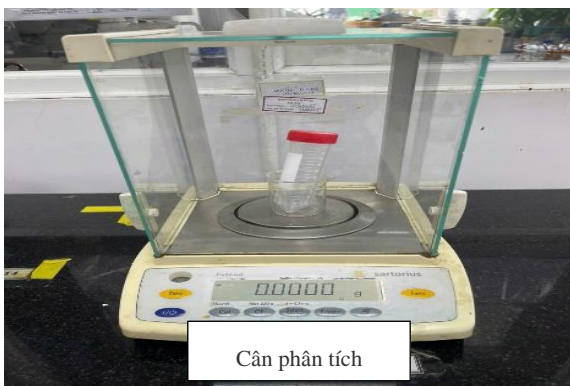
- Kiểm tra và ký duyệt kết quả

- Làm thủ tục trả kết quả

- Lưu hồ sơ theo qui định

## PL-14

### Phụ lục 6: Một số hình ảnh thiết bị phân tích và mẫu thực tế



Hình PL6.1. Một số hình ảnh các thiết bị phân tích trong thí nghiệm





Nho khô



Đậu phộng thô và đậu phộng rang



Bột ớt



Bắp hạt vàng, hạt trắng và bắp chế biến

Hình PL6.2. Một số hình ảnh mẫu thực tế