Vietnam Journal of Food Control

A Scientific Journal of National Institute for Food Control
Journal homepage: https://vjfc.nifc.gov.vn

Research Article

Research on the process of creating standard solution of Aflatoxin B1 from peanuts

Phung Cong Ly[1*], Tran Trung Thanh[1], Bui Cao Tien[1], Nguyen Thi Hong Ngoc[1]
Nguyen Phuong Anh[2], Nguyen Thi Thuy Linh[2]
[1]National Institute for Food Control, Hanoi, Vietnam
[2]Hanoi University of Pharmacy, Hanoi, Vietnam

(Received: 12 Jun 2025; Revised: 29 Jul 2025; Accepted: 18 Aug 2025)

Abstract

Aflatoxin B1 (AfB1) is a mycotoxin produced by certain species of Aspergillus such as A. flavus and A. parasiticus, which is highly toxic and classified as group IA – potentially carcinogenic to humans (according to IARC). AfB1 mainly appears in cereals, oilseeds (peanuts, sunflower seeds, corn, dried peppers...) and can be converted in the liver into a potent carcinogen, AfB1-8,9-epoxide. Due to the danger of AfB1, many countries, including Vietnam, have issued regulations limiting the amount of AfB1 in food. Common methods for creating AfB1 standards include culturing *Aspergillus flavus* in a suitable medium and chemical extraction. However, this method requires very strict biosecurity requirements because of the danger of AfB1 to human health. The development of the AfB1 standard process in Vietnam is not only scientifically significant but also brings economic benefits, reduces dependence on imported sources, and helps control the quality of food in the country. In this study, AfB1 was extracted from peanuts by solid-phase extraction (SPE) and enriched and cleaned with silica gel column chromatography. The standard solution was then purified with diethyl ether:n-hexane solution (1:1, v/v) to remove residual non-polar impurities. The analysis by thin layer chromatography showed that the standard solution met the purity requirements. The homogeneity and stability of the standard solution were evaluated, resulting in 100 mL of AfB1 standard solution with a certified value of 99.6 ng/mL with a measurement uncertainty of 3.0 ng/mL and an estimated shelf life of 587 days (until 09/12/2026) at -20°C.

Keywords: *Aflatoxin B1, peanuts, silica gel, Aspergillus.*

[*]Corresponding author: Phung Cong Ly (E-mail: phungcongly1997@gmail.com)
https://doi.org/10.47866/2615-9252/vjfc.4548
Copyright © 2025 The author(s). This article is licensed under CC BY-NC 4.0

Nghiên cứu xây dựng quy trình tạo dung dịch chuẩn Aflatoxin B1 từ lạc

Phùng Công Lý[1], Trần Trung Thành[1], Bùi Cao Tiến[1], Nguyễn Thị Hồng Ngọc[1], Nguyễn Phương Anh[2], Nguyễn Thị Thùy Linh[2]

[1]Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm Quốc gia, Hà Nội, Việt Nam

[2]Trường Đại học Dược Hà Nội, Việt Nam

Tóm tắt

Aflatoxin B1 (AfB1) là một độc tố vi nấm do một số loài *Aspergillus* như *A. flavus* và *A. parasiticus* tạo ra, có độc tính cao và được xếp vào nhóm IA - có khả năng gây ung thư cho người (theo International Agency for Research on Cancer (IARC)). AfB1 chủ yếu xuất hiện trong các loại ngũ cốc, hạt chứa dầu (lạc, hạt hướng dương, ngô, ớt khô…) và có thể chuyển hóa trong gan thành chất gây ung thư mạnh là AfB1-8,9-epoxide. Do tính nguy hiểm của AfB1, nhiều quốc gia, bao gồm Việt Nam, đã ban hành các quy định giới hạn hàm lượng AfB1 trong thực phẩm. Các phương pháp phổ biến để tạo chất chuẩn AfB1 gồm nuôi cấy *Aspergillus flavus* trên môi trường phù hợp và chiết tách hóa học. Tuy nhiên, phương pháp này đòi hỏi yêu cầu rất nghiêm ngặt về an toàn sinh học bởi sự nguy hiểm của AfB1 đối với sức khỏe con người. Việc phát triển quy trình tạo chất chuẩn AfB1 tại Việt Nam không chỉ có ý nghĩa khoa học mà còn mang lại lợi ích kinh tế, giảm phụ thuộc vào nguồn nhập khẩu và giúp kiểm soát chất lượng thực phẩm trong nước. Trong nghiên cứu này, AfB1 được chiết tách từ lạc bằng kỹ thuật chiết pha rắn (SPE) và làm giàu, làm sạch bằng sắc ký cột silica gel. Dung dịch chuẩn sau đó được tinh chế bằng dung dịch diethyl ether:n-hexan (1:1, v/v) để loại bỏ các tạp chất không phân cực còn dư. Qua phân tích bằng thiết bị sắc ký lớp mỏng, kết quả cho thấy dung dịch chuẩn đạt yêu cầu về độ tinh khiết. Tiến hành đánh giá độ đồng nhất và độ ổn định của dung dịch chuẩn, kết quả thu được 100 mL dung dịch chuẩn AfB1 có giá trị chứng nhận là 99,6 ng/mL với độ không đảm bảo đo là 3,0 ng/mL và hạn sử dụng ước tính là 587 ngày (đến 09/12/2026) ở -20°C.

Từ khóa: *Aflatoxin B1, lạc, silica gel, Aspergillus.*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Aflatoxin B1 (AfB1) là một sản phẩm chuyển hóa thứ cấp của một số nấm mốc nhóm *Aspergillus* như *A. flavus, A. parasiticus, A. nominus*. AfB1 là loại aflatoxin mạnh nhất và phổ biến nhất, gây hại cho sức khỏe của con người trên toàn cầu [1]. *Aspergillus flavus* là loài sản sinh aflatoxin phổ biến và rộng rãi nhất. Chúng có thể gây ô nhiễm aflatoxin cho nhiều loại cây trồng như lúa, ngô, khoai, lạc… Trong khi đó, *Aspergillus parasiticus* thích nghi hơn với môi trường đất nên chúng thường xuất hiện trong các loại đậu phộng. Khi xâm nhập vào thực phẩm, nấm *Aspergillus* sản xuất aflatoxin, bao gồm AfB1. Loại nấm *Aspergillus* thường phát triển thuận lợi ở nhiệt độ từ 25°C đến 33°C và độ ẩm cao (hoạt độ nước > 0,98), do đó thực phẩm tại các khu vực ở châu Phi và Đông Nam Á thường bị nhiễm aflatoxin nghiêm trọng [2].

Trong nhóm aflatoxin, AfB1 là hợp chất có tính gây ung thư mạnh nhất, được ghi nhận là tác nhân chính gây ung thư biểu mô tế bào gan (HCC), đồng thời còn gây ức chế tăng trưởng, suy giảm hệ miễn dịch và suy dinh dưỡng (IARC, 2012) [3]. AfB1 có thể gây đột biến mạnh và liên kết với acid nucleic, cũng như protein trong gan, gây đột biến từ guanine (G) thành thymine (T). Cơ chế độc tính của AfB1 ở gan là tạo ra các gốc oxy phản ứng, dẫn đến tổn thương tế bào và oxy hóa, gây độc cho gan. AfB1 còn có khả năng gây chết tế bào theo chương trình (apoptosis) qua con đường tín hiệu ty thể, làm suy giảm chức năng gan [1]. Ngộ độc AfB1 chủ yếu xảy ra do con người ăn thực phẩm bị ô nhiễm, điều này rất khó kiểm soát vì nấm mốc trong thực phẩm rất phổ biến. Các nghiên cứu cho thấy việc tiêu thụ thực phẩm có nồng độ AfB1 thấp trong thời gian dài là nguyên nhân chính gây ung thư gan, ung thư dạ dày và các bệnh khác.

Do tính nguy hiểm của aflatoxin trong thực phẩm, việc kiểm soát hàm lượng aflatoxin trong thực phẩm là một việc hết sức quan trọng. Tại Việt Nam và nhiều nước trên thế giới đã đưa ra các quy định về giới hạn cho phép đối với AfB1 và các độc tố vi nấm khác. Ở Châu Âu, Quy định của Ủy ban Châu Âu (EC) số 1881/2006 và 401/2006 đã đưa ra mức giới hạn đối với lạc, quả hạch và các sản phẩm chế biến của chúng là 2 µg/kg với AfB1 và aflatoxin tổng gồm (B1, B2, G1, G2) là 4 µg/kg [4, 5]. Tại Việt Nam, hàm lượng AfB1 tối đa cho phép trong lạc và các loại hạt có dầu là 8 µg/kg đối với loại sơ chế trước khi sử dụng và 2 µg/kg khi sử dụng

trực tiếp (Theo QCVN 8-1/2011 BYT) [6]. Vì vậy, việc nghiên cứu tổng hợp và phát triển chất chuẩn AfB1 rất cần thiết, góp phần đánh giá chất lượng thực phẩm và đảm bảo an toàn vệ sinh thực phẩm cho người tiêu dùng.

Hiện nay, trên thế giới số lượng các nghiên cứu về quy trình tạo chất chuẩn AfB1 được công bố còn rất hạn chế. Trên thế giới, phương pháp tạo chất chuẩn AfB1 được nghiên cứu nhiều nhất hiện nay là nuôi cấy và gia tăng nấm *Aspergillus flavus* hoặc *Aspergillus parasiticus* trên chất nền rắn hoặc môi trường trong phòng thí nghiệm. AfB1 được chiết xuất bằng dung môi phù hợp và tinh chế bằng sắc ký. Theo nghiên cứu của Danieli Cristina Schabo và các cộng sự [7], AfB1 được sản xuất từ loại nấm *Aspergillus flavus*. Phương pháp tạo chất chuẩn AfB1 từ việc phân lập và tăng sinh nấm mốc là phương pháp có nhiều ưu điểm bởi khả năng tạo ra chất chuẩn AfB1 có độ tinh khiết cao và hiệu suất lớn. Tuy nhiên, phương pháp này đòi hỏi rất nghiêm ngặt về điều kiện môi trường, trang thiết bị nghiên cứu phải đáp ứng yêu cầu sinh học cấp 3 do bào tử nấm mốc *Aspergillus* có khả năng phát tán mạnh trong không khí, rất nguy hiểm khi con người hít phải. Do hạn chế về điều kiện phòng thí nghiệm, nghiên cứu này không thực hiện tăng sinh bào tử nấm mốc *Aspergillus* mà thực hiện tăng sinh tự nhiên aflatoxin bằng cách bảo quản lạc bị nhiễm aflatoxin ở nhiệt độ phòng (khoảng 30°C) trong hộp kín. Tại Việt Nam, hiện nay chưa có quy trình sản xuất chất chuẩn AfB1 từ lạc, do đó, việc xây dựng quy trình tạo chất chuẩn AfB1 từ lạc có ý nghĩa khoa học và mang lại lợi ích kinh tế, giúp giảm phụ thuộc vào nguồn nhập khẩu và nâng cao hiệu quả kiểm soát chất lượng thực phẩm trong nước.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng và mẫu nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là aflatoxin B1. Tổng cộng 100 mẫu lạc gồm 61 mẫu lạc đỏ và 39 mẫu lạc trắng, mỗi mẫu có khối lượng 100 g, được thu thập ngẫu nhiên tại các chợ ở Hà Nội. Ưu tiên các mẫu đã có hiện tượng nấm mốc hoặc đã để lâu ngày. Các mẫu được đóng gói mang về phòng thí nghiệm và được phân tích sàng lọc bằng phương pháp QuEChERS để xác định hàm lượng AfB1. Sau đó, lựa chọn 05 mẫu có hàm lượng AfB1 cao nhất rồi tiến hành thu thập với khối lượng khoảng 2 kg/mẫu.

2.2. Hóa chất và chất chuẩn

Các chất chuẩn: aflatoxin B1 (Lot: STD#1041, độ tinh khiết 98,8%), aflatoxin B2 (Lot: STD#1051, độ tinh khiết 99,1%), aflatoxin G1 (Lot: STD#1061, độ tinh khiết 99,0%), aflatoxin G2 (Lot: STD#1071, độ tinh khiết 98,9%) của hãng Pribolab. Các dung môi, hóa chất của hãng Merck gồm: acetonitril, methanol, acid formic, acetone, chloroform, diethyl ether, natri clorid, n-hexan, silica gel 60; các dung môi, hóa chất của hãng Agilent gồm: bột hấp phụ Primary Secondary Amine (PSA) và C18; nước deion.

2.3. Thiết bị và dụng cụ

Hệ thống sắc ký lỏng khối phổ ba tứ cực Triple Quad 5500 của AB Sciex, hệ thống sắc ký lỏng khối phổ phân giải cao LC-HR/MS Dionex Ultimate UHPLC + Q-Exactive Orbitrap MS của hãng Thermo Scientific, hệ thống sắc ký bản mỏng bán tự động HPTLC của hãng CAMAG (Thụy Sĩ), cột sắc ký Symmetry C18 (150 mm x 3,0 mm x 3,5 µm). Một số thiết bị phụ trợ khác bao gồm cân phân tích (có độ chính xác 0,1 mg) XS105 (Metter Toledo); máy ly tâm lạnh Mikro 200R (Hettich); bản mỏng TLC Silica gel 60 F254, buret 25 mL, máy lắc ngang HS260 (IKA), thiết bị chiết pha rắn SPE và các thiết bị, dụng cụ thông thường khác trong phòng thí nghiệm.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Điều kiện sắc ký lỏng khối phổ LC-MS/MS để phân tích AfB1

Qua tham khảo tài liệu [8, 9], điều kiện xác định phân tích AfB1 trong các mẫu lạc được lựa chọn như sau: sử dụng nguồn ion hóa phun điện tử ở chế độ ion dương (ESI+), chế độ quét lựa chọn đa phản ứng (MRM), 1 ion mẹ và 2 ion con (313 → 241*, 269), pha động gồm acid formic 0,1% trong nước (A) và acetonitrile (B) theo chế độ gradient (0 → 2 phút: 95% B; 2 → 4 phút: 95% → 10% B; 4 → 6 phút: 10% B; 6 → 10 phút: 95% B) được đặt ở tốc độ dòng 0,5 mL/phút, thể tích tiêm 10 µL, nhiệt độ cột ở nhiệt độ phòng.

2.4.2. Khảo sát hàm lượng AfB1 trong các mẫu lạc

Các mẫu lạc được phân tích bằng phương pháp QuEChERS [8]: Cân chính xác 5,0 g mẫu lạc đã đồng nhất bằng cách xay nhỏ vào ống ly tâm 50 mL. Thêm 10 mL nước deion và 5 mL acetonitrile chứa 1% acid formic. Mẫu được vortex kỹ trong 1 phút rồi lắc ngang 30 phút với tốc độ 180 vòng/phút. Sau đó, thêm 2,0 g $MgSO_4$ và 0,5 g NaCl, vortex trong 1 phút và ly tâm 5 phút ở 6000 vòng/phút. Hút 1 mL lớp dịch phía trên vào ống

chiết pha rắn d-SPE chứa 0,15 g magie sulfat, 0,05 g C18 và 0,05 g PSA, vortex 1 phút. Ly tâm 2 phút ở 13000 vòng/phút. Hút lớp dịch vào lọ đựng mẫu và phân tích trên thiết bị LC-MS/MS để xác định hàm lượng AfB1 trong từng mẫu lạc.

2.4.3. Quy trình xử lý chiết xuất AfB1 từ lạc

Trên cơ sở tham khảo tài liệu [9-13], quy trình xử lý mẫu được lựa chọn để chiết xuất AfB1 từ lạc như sau: Cân khoảng 500,0 g mẫu lạc đã đồng nhất bằng cách xay nhỏ vào bình 2,5 L. Thêm 25 g NaCl và 1,5 L dung môi chiết methanol:nước (70:30, v/v). Lắc ngang trong 60 phút, sau đó để lắng và lọc dịch bằng giấy lọc thu dịch lọc lần 1. Thêm 1,5 L dung môi chiết, lắc tiếp trong 60 phút, để lắng, lọc thu dịch lọc lần 2. Gộp dịch lọc 2 lần chiết, cô quay dịch chiết ở 65°C để loại methanol trước. Thu lại phần methanol để sử dụng cho lần chiết tiếp theo. Tăng nhiệt độ cô quay lên khoảng 90°C và cô đến còn khoảng 10 mL. Sau đó, thêm khoảng 2 g silica gel, lắc đều và để yên trong 10 phút, rồi cô quay đến khô.

2.4.4. Khảo sát điều kiện làm sạch bằng sắc ký cột silica gel

Trên cơ sở tham khảo tài liệu [14], thực hiện khảo sát điều kiện làm sạch bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng để lựa chọn dung môi rửa giải trên cột silica gel. Các điều kiện khảo sát gồm:

+ Khảo sát hệ dung môi rửa giải: chloroform:aceton tỷ lệ 9:1 (v/v), diethyl ether:methanol:nước tỷ lệ 96:3:1 (v/v/v) và toluen:ethyl acetat:chloroform:acid formic tỷ lệ 7:5:5:2 (v/v/v/v).

+ Khảo sát tỷ lệ dung môi: chloroform:aceton tỷ lệ 9,5:0,5; 9:1; 8:2 (v/v).

2.4.5 Tinh chế dịch chiết AfB1 từ lạc và xác định độ tinh khiết của dung dịch thu được

Phần dịch thu được từ các mẫu sau quá trình chiết tiếp tục được tinh chế trên cột silica gel. Kiểm tra các phân đoạn AfB1 được rửa giải từ cột bằng sắc ký lớp mỏng. Gộp các phân đoạn chứa AfB1, sau đó tiến hành làm giàu bằng cách thổi khô dưới dòng khí nitơ, cô đặc dịch đến thể tích khoảng 5 mL. Phần dịch cô này được tiếp tục tinh chế lần 2 và loại bỏ các tạp chất không phân cực còn sót lại bằng dung dịch diethyl ether:n-hexan (1:1, v/v) [14].

Khai triển dung dịch chuẩn AfB1 thu được sau khi đã tinh chế lần 2 và loại bỏ các tạp chất không phân cực trên sắc ký lớp mỏng và xác định độ tinh khiết dựa trên phần mềm winCATS của thiết bị HPTLC.

2.4.6. Xác định nồng độ của dung dịch chuẩn và tạo dung dịch chuẩn AfB1 100 ng/mL

Dung dịch chuẩn sau khi tinh chế bằng sắc ký cột silica gel được xác định hàm lượng AfB1 bằng thiết bị LC-MS/MS. Sau đó pha loãng dung dịch bằng methanol về nồng độ 100 ng/mL. Chia đều dung dịch vào các lọ đựng mẫu tối màu, mỗi lọ 1 mL và bảo quản ở -20°C.

2.4.7. Đánh giá độ đồng nhất của dung dịch chuẩn AfB1 100 ng/mL

Sau khi hoàn thành quá trình tạo dung dung dịch chuẩn AfB1 100 ng/mL, 10 lọ dung dịch chuẩn được phân tích độ đồng nhất, mỗi mẫu thực hiện phân tích lặp 2 lần và đánh giá độ đồng nhất theo ISO/IEC 17034 [15] và ISO 33405:2024 [16]. Độ không đảm bảo đồng nhất u_{hom} liên quan đến tính không đồng nhất của 1 lô mẫu sản xuất theo mẻ được tính theo công thức:

$$u_{hom} = \sqrt{u_{bb}^2 + u_{wb}^2}$$

Trong đó:

u_{bb} là độ lệch chuẩn giữa các mẫu,

u_{wb} là độ lệch chuẩn trong 1 mẫu.

2.4.8. Đánh giá độ ổn định của dung dịch chuẩn AfB1 100 ng/mL

Tiến hành phân tích độ ổn định của dung dịch chuẩn ở 4 thời điểm khác nhau là: 4, 8, 14 và 34 ngày kể từ ngày sản xuất, mỗi lần sử dụng ngẫu nhiên 5 mẫu, phân tích lặp lại 2 lần. Sau đó lập mô hình tuyến tính: $y = b_1t + b_0$ (đường xu hướng) để ước tính hạn sử dụng của dung dịch chuẩn.

Độ không đảm bảo đo của độ ổn định lâu dài (u_{lts}) được tính bằng công thức [17]:

$$u_{lts} = s_{b_1} \times t_{shelf\ life}$$

$$s_{b_1} = \frac{s}{\sqrt{\sum_{i=1}^{n}(t_i - t_{tb})^2}}$$

Trong đó:

+ $t_{shelf\ life}$ là hạn sử dụng ước lượng từ đường xu hướng;

+ s được tính từ các giá trị độ đồng nhất và độ ổn định theo công thức:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(y_i - b_0 - b_1 t_i)^2}{n-2}}$$

2.4.9. Giá trị chứng nhận và độ không đảm bảo đo

Giá trị được chứng nhận của dung dịch chuẩn AfB1 100 ng/mL được tính bằng trung bình của 20 giá trị kết quả đánh giá độ đồng nhất. Độ không đảm bảo đo của mẫu chuẩn (u_{CRM}) được chứng nhận là căn bậc hai của tổng bình phương của các thành phần: độ không đảm bảo đo của tính đồng nhất (u_{hom}), độ không đảm bảo đo của độ ổn định lâu dài (u_{lts}) và độ không đảm bảo đo liên quan đến đặc tính của chất chuẩn (u_{char}), được tính từ kết quả đánh giá độ đồng nhất [16, 17].

$$U_{CRM}(95\%) = 2 \times u_{CRM}$$

$$u_{CRM} = \sqrt{u_{hom}^2 + u_{lts}^2 + u_{char}^2}$$

Trong đó: U_{CRM} (95%) là độ không đảm bảo đo mở rộng ở mức độ tin cậy 95% và u_{char} được tính theo công thức:

$$u_{char} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(y_i - y_{char})^2}{(n-1) \times n}}$$

2.4.10. Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu thống kê được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2016. Nồng độ AfB1 được tính toán bằng phần mềm Analyst 1.7 và Xcalibur trên thiết bị sắc ký lỏng khối phổ.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Kết quả khảo sát hàm lượng AfB1 trong 100 mẫu lạc thu thập

Thực hiện theo quy trình đã nêu ở mục 2.4.2, kết quả phân tích được thể hiện ở **Bảng 1**.

Bảng 1. *Hàm lượng AfB1 trong 100 mẫu lạc thu thập*

Mẫu	HL (µg/kg)	Mẫu	HL (µg/kg)	Mẫu	HL (µg/kg)
M3	1,02	M32	0,182	M55	0,495
M6	22,8	M35	3,01	M58	24,6
M15	1,10	M40	0,165	M67	6,18
M18	1,14	M41	0,526	M71	0,177
M21	1,84	M46	1,38	M73	20,8
M27	21,4	M49	0,858	M76	3,70
M30	0,325	M51	2,40	M83	15,2

**79/100 mẫu còn lại không phát hiện AfB1.*

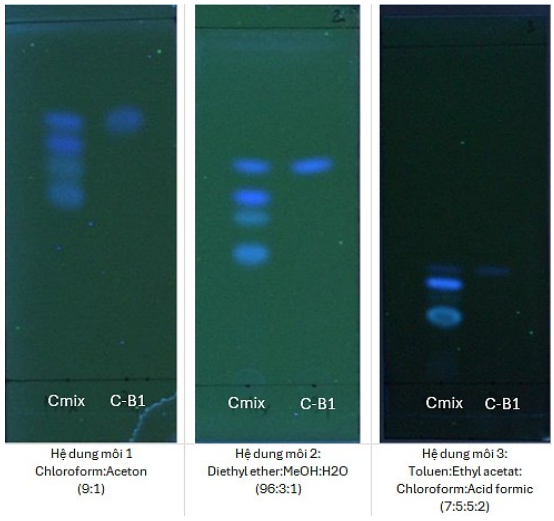
Từ kết quả ở **Bảng 1** cho thấy có 21/100 mẫu lạc có chứa AfB1 với hàm lượng từ 0,325 đến 24,6 µg/kg. Trong đó có 5 mẫu có hàm lượng cao nhất là M6, M27, M58, M73, M83 (hàm lượng trong khoảng 20,8 đến 24,6 µg/kg). Lựa chọn mẫu M73 và M83 để thực hiện khảo sát, 3 mẫu M6, M27 và M58 được dùng để tạo dung dịch chuẩn. Các mẫu này được bảo quản trong tủ hút ở điều kiện phòng (khoảng 30°C) trong 2 tháng.

3.2. Kết quả khảo sát điều kiện làm sạch bằng sắc ký cột silica gel

Sử dụng phương pháp sắc ký lớp mỏng (TLC) nhằm khảo sát và tối ưu hóa các điều kiện cần thiết cho quá trình tinh chế AfB1 từ dịch chiết thô bằng cột sắc ký silica gel. Phương pháp TLC giúp đánh giá trực quan khả năng tách biệt giữa AfB1 và các tạp chất đi kèm thông qua sự di chuyển khác nhau của các hợp chất trên bản mỏng phủ silica gel dưới tác dụng của dung môi rửa giải.

3.2.1. Khảo sát hệ dung môi rửa giải

Tiến hành khảo sát khả năng di chuyển của AfB1 trên bản mỏng trong các hệ dung môi khác nhau gồm: (1) chloroform:aceton tỷ lệ 9:1 (v/v); (2) diethyl ether:methanol:nước tỷ lệ 96:3:1 (v/v/v) và (3) toluen:ethyl acetat:chloroform:acid formic tỷ lệ 7:5:5:2 (v/v/v/v). Kết quả được trình bày trong **Hình 1.**

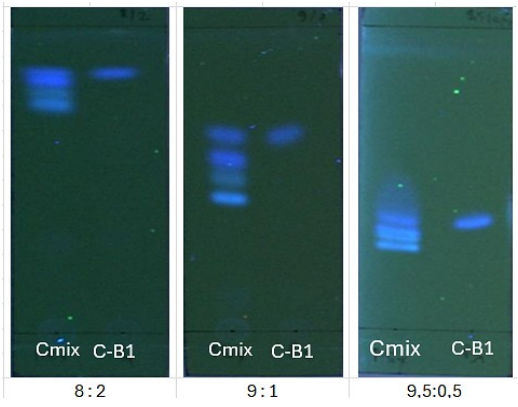


Hình 1. *Kết quả khảo sát hệ dung môi rửa giải cột silica gel*
(Cmix: chuẩn mix aflatoxin B1, B2, G1, G2 100 ng/mL; C-B1: chuẩn aflatoxin B1 100 ng/mL)

Từ kết quả ở **Hình 1** cho thấy, hệ dung môi 1 các vết phát huỳnh quang rõ ràng, phân tách tốt, di chuyển đều và không bị kéo đuôi. Với hệ dung môi 2 các vết phát huỳnh quang rõ ràng, tuy nhiên, hệ dung môi này có độ phân cực cao hơn, có thể làm giảm sự di chuyển của AfB1. Hệ dung môi 3 các vết phát huỳnh quang không rõ ràng, khó phân biệt và hệ dung môi khá phức tạp. Do đó, lựa chọn hệ dung môi 1 là chloroform/aceton (9/1, v/v) làm dung môi rửa giải cột silica gel (phù hợp với nghiên cứu của Castro và các cộng sự [14]).

3.2.2. Khảo sát tỷ lệ dung môi rửa giải

Thực hiện khảo sát ảnh hưởng của các tỷ lệ thể tích khác nhau đối với hệ dung môi chloroform:aceton tới khả năng tách AfB1 và các chất tạp khác, với các tỷ lệ là: 9,5:0,5; 9:1; 8:2 (v/v). Kết quả được thể hiện ở **Hình 2**.

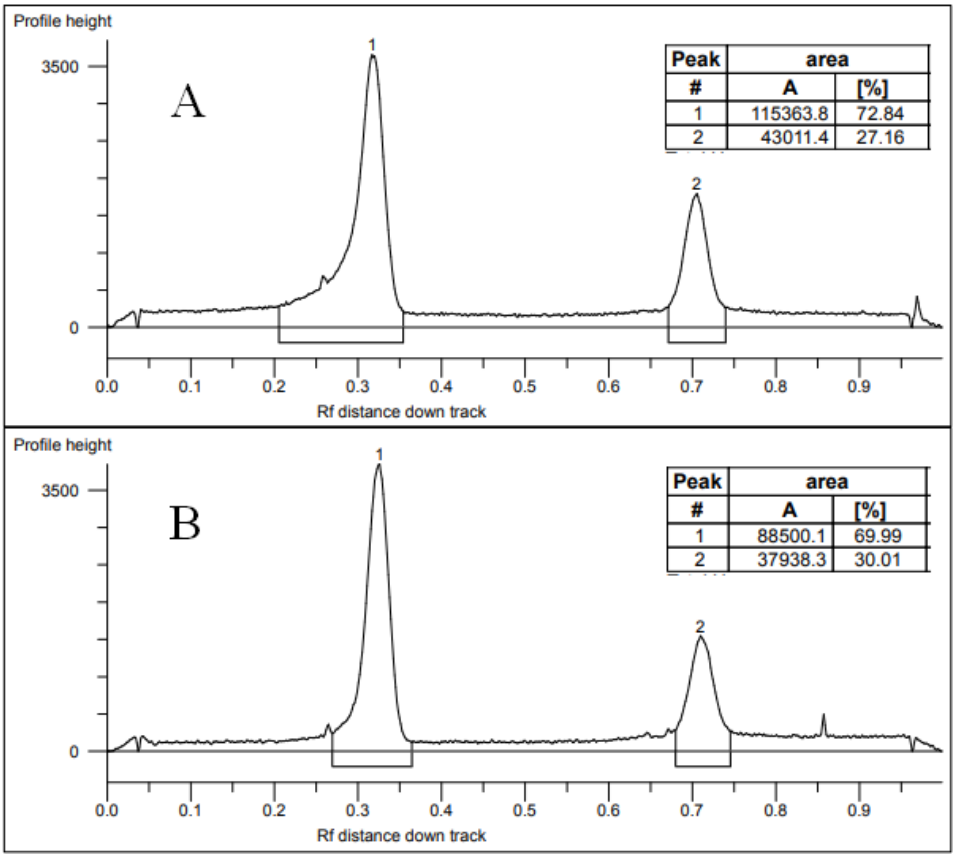


Hình 2. *Kết quả khảo sát tỷ lệ dung môi rửa giải*
(Cmix: chuẩn mix aflatoxin B1, B2, G1, G2 100 ng/mL; C-B1: chuẩn aflatoxin B1 100 ng/mL)

Kết quả cho thấy, hệ dung môi chloroform:aceton với tỷ lệ 9,5:0,5 (v/v) tách kém do có tính phân cực kém hơn, làm cho AfB1 bị lưu giữ lại lâu hơn, trong khi đó hệ dung môi tỷ lệ 8:2 (v/v) độ phân cực cao hơn khiến các chất di chuyển nhanh và khó phân tách rõ. Hệ dung môi tỷ lệ 9:1 (v/v) có các vết phát huỳnh quang rõ ràng, sắc nét, phân tách tốt nhất trong 3 tỷ lệ. Vì vậy lựa chọn tỷ lệ dung môi rửa giải chloroform:aceton là 9:1 (v/v)

3.3. Kết quả tinh chế dịch chiết AfB1 từ lạc bằng sắc ký cột silica gel

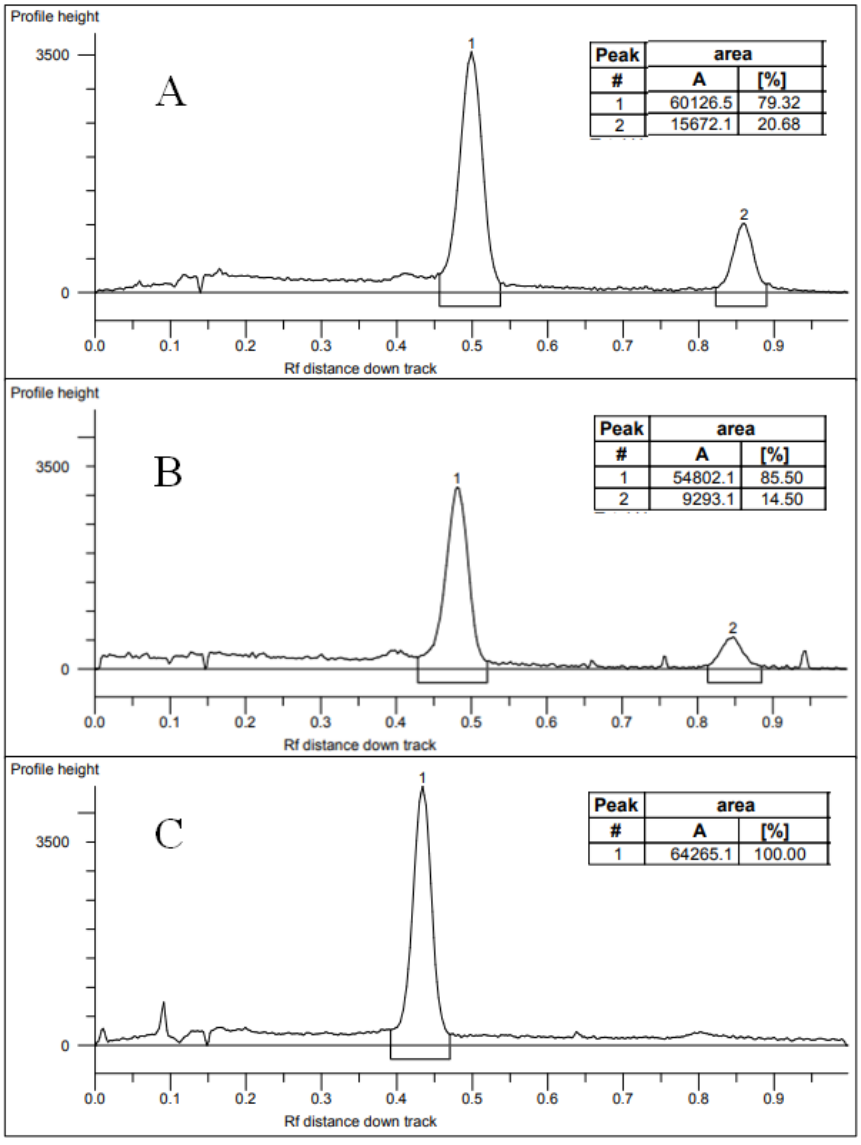
Dựa vào kết quả khảo sát điều kiện làm sạch phía trên (mục 3.2), tiến hành tinh chế dịch chiết bằng sắc ký cột silica gel sử dụng dung môi rửa giải là chloroform:aceton là 9:1 (v/v). Tiến hành qua cột 2 lần và thu các phân đoạn có chứa AfB1. Kết quả độ tinh khiết của dung dịch chuẩn AfB1 sau 2 lần qua cột được thể hiện ở **Hình 3**.



Hình 3. *Kết quả độ tinh khiết của dung dịch chuẩn AfB1 sau 2 lần qua cột*
(A) Qua cột lần 1; (B) Qua cột lần 2

Từ kết quả ở **Hình 3** cho thấy, khi qua cột 1 lần thì pic sắc ký HPTLC của AfB1 (pic số 1) tù, khoảng chân pic kéo dài hơn so với khi qua cột 2 lần. Sau khi qua cột silica gel 2 lần thì đã loại bỏ được các tạp chất phân cực, tuy nhiên vẫn còn xuất hiện tạp chất không phân cực với tỷ lệ khá lớn (khoảng 30%). Theo nghiên cứu của Castro và các cộng sự [14], dung môi diethyl ether có khả năng loại bỏ các tạp chất không phân cực như lipid còn dư khi rửa giải cột silica gel bằng dung môi chloroform:aceton. Để tăng độ tinh khiết của dung dịch chuẩn AfB1 thu được, có thể sử dụng dung dịch diethyl ether:n-hexan (1:1, v/v) để loại bỏ các tạp chất không phân cực này trong dung dịch chuẩn AfB1.

Kết quả độ tinh khiết của dung dịch chuẩn AfB1 sau khi loại tạp bằng dung môi không phân cực được thể hiện ở **Hình 4**. Từ kết quả ở **Hình 4** cho thấy, các tạp chất không phân cực (pic số 2 ở Rf = 0,85) đã giảm đáng kể từ khoảng 30% xuống còn 20% sau lần loại tạp thứ nhất, đến lần loại tạp thứ 2 thì tạp chất chỉ còn khoảng 14% và đến lần loại béo thứ ba, pic tạp hầu như không còn xuất hiện, chứng tỏ các tạp chất đã được loại bỏ gần như hoàn toàn. Do đó, có thể kết luận rằng sau ba lần xử lý loại tạp bằng dung dịch diethyl ether:n-hexan (1:1, v/v), dung dịch chuẩn AfB1 đã đạt được độ tinh khiết cao, phù hợp với yêu cầu của dung dịch chuẩn.



Hình 4. *Kết quả độ tinh khiết của dung dịch chuẩn AfB1 sau khi loại tạp bằng dung dịch diethyl ether:n-hexan (1:1, v/v).*

(A) Loại tạp lần 1; (B) Loại tạp lần 2; (C) Loại tạp lần 3

Từ các kết quả thực nghiệm trên, quy trình tạo chất chuẩn AfB1 từ lạc được tối ưu như sau:

+ Bước 1 – Chiết mẫu: Cân khoảng 500,0 g mẫu vào bình 2,5 L. Thêm 25 g NaCl và 1,5 L dung môi chiết methanol:nước (70:30, v/v). Lắc ngang trong 60 phút, sau đó để lắng và lọc dịch bằng giấy lọc thu dịch lọc lần 1. Thêm 1,5 L dung môi chiết, lắc tiếp trong 60 phút, để lắng, lọc thu dịch lọc lần 2. Gộp dịch lọc 2 lần chiết, cô quay dịch chiết ở 65°C để loại methanol trước. Thu lại phần methanol để sử dụng cho lần chiết tiếp theo. Tăng nhiệt độ cô quay lên khoảng 90°C và cô đến còn khoảng 10 mL. Sau đó, thêm khoảng 2 g silica gel, lắc đều và để yên trong 10 phút, rồi cô quay đến khô.

+ Bước 2 – Tinh chế dịch chiết bằng sắc ký cột silica gel: Lót một lớp bông dưới đáy cột. Cân khoảng 10 g silica gel vào cốc thủy tinh 100 mL, thêm 15 mL dung môi rửa giải chloroform:aceton (9 : 1, v/v). Đổ từ từ hỗn hợp silica gel và dung môi vào cột qua thành để tránh tạo bọt khí. Thêm phần silica gel trong bình cô quay lên cột. Mở khóa đáy cho dung môi thoát từ từ để silica gel nén xuống đều đến khi dung môi rút xuống sát bề mặt silica gel. Thêm từ từ dung môi rửa giải chloroform:aceton (9 : 1, v/v) lên cột, đồng thời thu phân đoạn dịch rửa giải theo thời gian 1 phút/ống rồi chấm sắc ký lớp mỏng để phát hiện AfB1, ngừng thu khi đã rửa giải hết AfB1. Gộp các ống có phát hiện AfB1, thổi khô bằng khí nitơ đến khoảng 2 mL. Tiến hành qua cột silica

gel lần 2 và nạp mẫu đã thổi khô phía trên lên cột. Tiếp tục rửa giải bằng dung môi chloroform:aceton tỷ lệ 9 : 1 (v/v) và gộp các ống có chứa AfB1. Thổi khô hoàn toàn rồi hoàn nguyên bằng 5,0 mL methanol. Sử dụng dung dịch diethyl ether:n-hexan (1 : 1, v/v) để loại bỏ các tạp chất không phân cực còn dư bằng cách thêm 10 mL dung môi diethyl ether:n-hexan (1 : 1, v/v), lắc trong 30 phút rồi loại bỏ phần dung môi phía trên. Làm lặp lại cho đến khi dung dịch đạt độ tinh khiết mong muốn.

Chuyển dịch chiết đã tinh sạch vào lọ đựng mẫu tối màu rồi phân tích trên thiết bị sắc ký lỏng khối phổ để xác định nồng độ dung dịch AfB1. Sau khi xác định được nồng độ của AfB1, tính hệ số pha loãng và thực hiện pha loãng để thu được 100 mL dung dịch chuẩn AfB1 ở nồng độ 100 ng/mL.

3.4. Kết quả tạo dung dịch chuẩn AfB1

3.4.1. Xác định nồng độ của dung dịch chuẩn AfB1 thu được và tạo dung dịch chuẩn AfB1 nồng độ 100 ng/mL

Sử dụng thiết bị LC-MS/MS để xác định nồng độ dung dịch AfB1 thu được, kết quả cho thấy nồng độ dung dịch chuẩn thu được sau khi tinh chế bằng sắc ký cột silica gel là 2100 ng/mL với thể tích là 5,0 mL. Dùng micropipet chính xác 4,762 mL dung dịch AfB1 2100 ng/mL vào bình định mức 100 mL rồi định mức vừa đủ 100 mL bằng methanol, thu được 100 mL dung dich chuẩn AfB1 100 ng/mL. Chia vào 100 lọ đựng mẫu tối màu, 1 mL/lọ, các vial được mã hóa từ C1 tới C100 và bảo quản ở nhiệt độ -20°C. Ngày sản xuất dung dịch là 01/05/2025.

3.4.2. Đánh giá độ đồng nhất

Độ đồng nhất là yếu tố quan nhất trong quá trình sản xuất chất chuẩn, yếu tố này liên quan đến sự biến đổi của giá trị đặc tính giữa các đơn vị riêng biệt và sự biến đổi trong một đơn vị. Độ đồng nhất của mỗi lô được đánh giá bằng phương pháp "ANOVA one way". Sự khác nhau giữa các lọ dung dịch chuẩn AfB1 100 ng/mL được đánh giá trong **Bảng 2**. Kết quả cho thấy rằng mẫu đạt độ đồng nhất với P-value lớn hơn 0,05.

Bảng 2. *Kết quả ANOVA-one way và độ không đảm bảo đánh giá độ đồng nhất của dung dịch chuẩn AfB1 100 ng/mL*

Giá trị trung bình (ng/mL)	$MS_{between}$	MS_{within}	u_{wb} (ng/mL)	u_{bb} (ng/mL)	P-value	u_{hom} (ng/mL)
99,6	0,34689	0,425	0,461	0,062	0,6149	0,465

3.4.3. Đánh giá độ ổn định, ước tính hạn sử dụng và độ không đảm bảo

Thu thập dữ liệu theo dõi độ ổn định hàm lượng AfB1 trong 34 ngày kể từ ngày sản xuất để thiết lập đường xu hướng. Trong trường hợp này, sự thay đổi nồng độ là nhỏ nên xu hướng tuyến tính được áp dụng. Giá trị được chứng nhận, phương trình đường xu hướng, hạn sử dụng ước tính và độ không đảm bảo của dung dịch chuẩn AfB1 100 ng/mL được trình bày trong **Bảng 3**.

Bảng 3. *Giá trị được chứng nhận, phương trình đường xu hướng, hạn sử dụng ước tính và độ không đảm bảo của dung dịch chuẩn AfB1 100 ng/mL*

Giá trị chứng nhận (ng/mL)	Phương trình đường xu hướng	Hạn sử dụng ước tính (ngày)	u_{lts} (ng/mL)	u_{char} (ng/mL)	Độ không đảm bảo đo (ng/mL)
99,6	y = 0,0055x + 99,42	587	1,427	0,132	3,0

Theo nghiên cứu của Li và các cộng sự [19], dung dịch chuẩn AfB1 ổn định trong các dung dịch benzen, methanol và acetonitril ở nhiệt độ thấp hơn 4°C, tương tự như các nghiên cứu trước đây của Diaz [20] và Garcia [21]. Đồng thời, theo công bố của CPI International [22], dung dịch chuẩn AfB1 10 µg/mL trong dung môi benzen:acetonitril (98:2, v/v) ổn định trong 730 ngày. Do đó, dung dịch chuẩn AfB1 100 ng/mL có thể ổn định trong 587 ngày. Tuy nhiên, điều này vẫn chưa có minh chứng cụ thể và cần có kế hoạch tiếp tục theo dõi độ ổn định trong khoảng thời gian này. Như vậy, giá trị được chứng nhận của dung dịch chuẩn thu được là 99,6 ng/mL với độ không đảm bảo đo là 3,0 ng/mL và hạn sử dụng ước tính là 587 ngày (đến 09/12/2026) ở điều kiện bảo quản -20°C.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã sử dụng kỹ thuật chiết pha rắn và sắc ký cột silica gel để chế tạo dung dịch chuẩn aflatoxin B1 có nồng độ 100 ng/mL từ lạc. Dung dịch chuẩn thu được có giá trị chứng nhận là 99,6 ng/mL với độ không đảm bảo đo là 3,0 ng/mL và hạn sử dụng ước tính là 587 ngày (đến 09/12/2026) ở -20°C. Tại Việt Nam, quy định đối với độc tố vi nấm aflatoxin B1 thấp nhất là 0,1 µg/kg [18] và độ nhạy của các thiết bị như LC-MS/MS và HPLC khi phân tích AfB1 là khoảng 0,1 – 1,0 ng/mL, do đó dung dịch chuẩn aflatoxin B1 có nồng độ 100 ng/mL rất thuận lợi cho quá trình sử dụng. Mặt khác, quá trình sản xuất không đòi hỏi yêu cầu nghiêm ngặt về phòng thí nghiệm an toàn sinh học cấp 3 như khi chế tạo chuẩn rắn; chi phí cho sản xuất tương đối rẻ do chỉ sử dụng các dung môi rẻ tiền như methanol, chloroform, aceton và có thể tận dụng lại dung môi. Nghiên cứu này là bước đầu để phát triển các quy trình tách chiết, phân lập và tinh chế các chất chuẩn từ nguồn nguyên liệu sẵn có trong tự nhiên, đặc biệt là các chất chuẩn có giá thành cao và khó nhập khẩu. Nghiên cứu sẽ tiếp tục được mở rộng để tạo ra các dung dịch chuẩn AfB1 có hàm lượng cao hơn và phát triển quy trình tạo chuẩn rắn khi đáp ứng được yêu cầu về phòng thí nghiệm an toàn sinh học cấp 3. Dung dịch chuẩn aflatoxin B1 đã tạo sẽ được ứng dụng để phân tích chỉ tiêu aflatoxin B1 trong các mẫu thực phẩm, góp phần đảm bảo an toàn thực phẩm trong nước.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. Joseph Owuor Lalah, Solomon Omwoma and Dora A.O. Orony, "Aflatoxin B1: Chemistry, Environmental and Diet Sources and Potential Exposure in Human in Kenya," *IntechOpen*, 2019.

[2]. Rushing, B. R., & Selim, M. I., "Aflatoxin B1: A review on metabolism, toxicity, currence in food, cupational exposure, and detoxification methods," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 124, pp. 81-100, 2018.

[3]. International Agency for Research on Cancer (IARC), Aflatoxins International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, 2012.

[4]. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs, 2006.

[5]. COMMISSION REGULATION (EC) No 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs, 2006.

[6]. QCVN 8-1:2011/BYT, National Technical Regulation on Mycotoxin Pollution Limits in Food, 2011.

[7]. Danieli Cristina Schabo, et al., "Production of aflatoxin B1 and B2 by Aspergillus flavusinino culated wheat using typical craft beer malting conditions," *Food Microbiology*, vol. 89, pp. 103456, 2020. Koesukwiwat, K. Sanguankaew, and N. Leepipatpiboon, "Evaluation of a modified QuEChERS method for analysis of mycotoxins in rice," *Food Chemistry*, vol. 153, pp. 44–51, 2014.

[8]. Y. Ren, Y. Zhang, S. Shao, Z. Cai, L. Feng, H. Pan, and Z. Wang, "Simultaneous determination of multi-component mycotoxin contaminants in foods and feeds by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry," *Journal of Chromatography A*, vol. 1143, no. 1, pp. 48–64, 2007.

[9]. F. Soleimany, S. Jinap, A. Faridah, and A. Khatib, "A UPLC–MS/MS for simultaneous determination of aflatoxins, Ochratoxin A, zearalenone, DON, fumonisins, T-2 toxin and HT-2 toxin, in cereals," *Food Control*, vol. 25, no. 2, pp. 647–653, 2012.

[10]. TCVN 7407:2004: Cereals, beans and oilseeds - Determination of aflatoxin using the immune affinity column, 2004 [in Vietnamese].

[11]. TCVN 7596:2007: Food – Determination of Aflatoxin B1, and Total Aflatoxin B1, B2, G1 and G2 Content in Cereals, Nuts and Their Products - High-Performance Liquid Chromatography Method, 2007 [in Vietnamese].

[12]. TCVN 7930:2008: Food. Determination of aflatoxin B1 and total aflatoxin B1, B2, G1, G2 in cereals, shellfish and their products. High-performance liquid chromatography with post-column derivation and immunoaffinity column cleaning, 2008 [in Vietnamese].

[13]. Castro, L. de, & Vargas, E. A., "Determining aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in maize using florisil clean up with thin layer chromatography and visual and densitometric quantification," *Journal of Food Science and Technology*, vol. 21, no. 1, pp. 115-122, 2001.

[14]. ISO/IEC 17034:2017 - General requirements for the competence of reference material producers, 2017.

[15]. ISO 33405:2024 - Reference materials - Approaches for characterization and assessment of homogeneity and stability, 2024.

[16]. Nguyen Thi Minh Hoa et al, "Overall study on imidacloprid standard sample production in tomatoes," *Journal of Food Safety and Testing*, vol. 7 , no. 1, pp. 1-11, 2024 [in Vietnamese].
[17]. QCVN 8-1:2011/BYT National Technical Regulation on Mycotoxin Pollution Limits in Food, 2011 [in Vietnamese].
[18]. Li S, Li X, Liu X, Zhang Q, Fang J, Li X, Yin X, "Stability Evaluation of Aflatoxin B1 Solution Certified Reference Material via Ultra-High Performance Liquid Chromatography Coupled with High-Resolution Mass Spectrometry," *ACS Omega*, vol. 7, no. 44, pp. 40548-40557, 2022.
[19]. Diaz GJ, Cepeda SM, Martos PA, "Stability of aflatoxins in solution," *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, vol. 95, no. 4, pp.1084-8, 2012.
[20]. Garcia M, Blanco JL, Suarez G, "Aflatoxins B1 and G 1 solubility in standard solutions and stability during cold storage," *Mycotoxin Research*, vol. 10, no. 2, pp.97-100, 1994.
[21]. CPI International, "Aflatoxin B1 Solution". [Online]. Available: https://www.cpiinternational.com/shop/z-g34-013938-25-aflatoxin-b1-solution-12264?srsltid=AfmBOopRlzT_bRT9RAh0-Mh937RnjztfLBweLpyQoFcBYTCs7I6uy-cC#attr=. [Accessed 07/07/2025].