

Research Article**Validation of an HPLC-FLD method for the determination of aflatoxins (B1, B2, G1, G2) in cereals, coffee and dried seafood and its application to the survey of Aflatoxin contamination in selected foods in Hanoi**

Vu Thi Kim Oanh^{1*}, Nguyen Thi Thanh Thuy¹, Pham Van Tiep¹, Nguyen Thi Thu Uyen¹, Dang Thanh Xuan¹, Chu Sy Thach¹, Kitamura Yasuo²

¹Reference Testing And Agrifood Quality Services Center, Hanoi, Vietnam

²ERASD Project, Reference Testing And Agrifood Quality Services Center, Hanoi, Vietnam

(Received: 30 Jun 2026, Revised: 26 Aug 2026, Accepted: 02 Sep 2026)

Abstract

This study aimed to establish the analytical parameters and validate a high-performance liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC-FLD) method for the determination of aflatoxins (AFB1, AFB2, AFG1, and AFG2) in food samples. The validated method was used to assess aflatoxin contamination in cereals, coffee products, and dried seafood collected in Hanoi. Positive samples were further confirmed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), and the quantitative results obtained by the two methods were compared. The validated method demonstrated good specificity, with limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) of 0.5 and 1.0 µg/kg, respectively, for each aflatoxin. The intermediate precision (RSD) ranged from 2.55 to 18.4%, while recoveries ranged from 70.1% to 119%. The evaluation results demonstrated that the method was reliable for the determination of aflatoxins at low concentrations in compliance with the requirements of QCVN 8-1:2011/BYT and showed good agreement with LC-MS/MS for quantitative analysis. The validated method was applied to the analysis of 100 food samples, including cereals, coffee, and dried seafood. Five samples (5.0%) were found to be contaminated with total aflatoxins at concentrations ranging from 9.04 to 726 µg/kg. These findings highlight the need to maintain and strengthen routine food safety monitoring programs for the effective control of aflatoxin contamination and the protection of public health.

Keywords: Aflatoxin, cereals, immunoaffinity, HPLC-FLD, LC-MS/MS.

* Corresponding author: Vu Thi Kim Oanh (E-mail: yukimoanh103309@gmail.com)
<https://doi.org/10.47866/2615-9252/vjfc.4759>

Copyright © 2026 The author(s). This article is licensed under [CC BY-NC 4.0](#)

Xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp xác định hàm lượng aflatoxin (B1, B2, G1, G2) trong ngũ cốc, cà phê, hải sản khô bằng phương pháp HPLC-FLD và ứng dụng để khảo sát mức độ ô nhiễm aflatoxin trong một số thực phẩm tại Hà Nội

Vũ Thị Kim Oanh¹, Nguyễn Thị Thanh Thủy¹, Phạm Văn Tiếp¹, Nguyễn Thị Thu Uyên¹,
Đặng Thanh Xuân¹, Chu Sỹ Thạch¹, Kitamura Yasuo²

¹Trung tâm Kiểm nghiệm kiểm chứng và dịch vụ chất lượng, Hà Nội, Việt Nam

²Dự án ERASD, Trung tâm Kiểm nghiệm kiểm chứng và dịch vụ chất lượng, Hà Nội, Việt Nam

Tóm tắt

Nghiên cứu được thực hiện nhằm thiết lập các điều kiện phân tích và xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp HPLC-FLD để xác định aflatoxin (B1, B2, G1, G2) trong thực phẩm. Sau đó, phương pháp được ứng dụng để phân tích các mẫu ngũ cốc, cà phê và thủy sản khô thu thập tại Hà Nội nhằm đánh giá mức độ nhiễm aflatoxin. Các mẫu dương tính được xác định lại bằng LC-MS/MS, so sánh kết quả định lượng giữa 2 phương pháp. Phương pháp được xác nhận có độ đặc hiệu cao, giới hạn phát hiện của phương pháp là 0,5 µg/kg, giới hạn định lượng của phương pháp là 1,0 µg/kg từng chất, độ lệch chuẩn tương đối tái lập trung gian của phương pháp trong khoảng 2,55 – 18,4%, độ thu hồi của phương pháp trong khoảng 70,1 – 119%. Kết quả xác nhận cho thấy phương pháp có độ tin cậy cao, đáp ứng xác định aflatoxin ở ngưỡng thấp phù hợp quy định trong QCVN 8-1:2011/BYT, đồng thời ứng dụng phương pháp phân tích mẫu cho kết quả có sự tương quan với kỹ thuật LC-MS/MS. Ứng dụng phương pháp để phân tích hàm lượng aflatoxin trong 100 mẫu thực phẩm bao gồm: ngũ cốc, cà phê và thủy sản khô. Kết quả phát hiện 5 mẫu trong tổng số 100 mẫu khảo sát chiếm tỷ lệ 5,0% có mức ô nhiễm aflatoxin tổng số từ 9,04 – 726 µg/kg.

Từ khóa: Aflatoxin, ngũ cốc, ái lực miễn dịch, HPLC-FLD, LC-MS/MS.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Aflatoxin là chất chuyển hóa thứ cấp được tạo ra bởi các chủng nấm khác nhau, như *Aspergillus flavus* và *A. parasiticus*, được tìm thấy rộng rãi dưới dạng chất gây ô nhiễm trong nhiều loại cây trồng ngũ cốc, hạt có dầu, hạt cây và gia vị. Thuật ngữ aflatoxin được ghép từ A = *Aspergillus*, fla = *flavus* và toxin = độc. Nhóm độc tố gồm khoảng 20 hợp chất chuyển hóa liên quan, tuy nhiên, chỉ có aflatoxin B1 (AFB1), B2 (AFB2), G1 (AFG1), G2 (AFG2) thường được tìm thấy trong thực phẩm [1, 2]. Trong số đó, aflatoxin B1 được đánh giá là một trong những chất có độc tính và có khả năng gây ung thư ở người cao nhất nên các quy định an toàn thực phẩm thường lấy AFB1 làm chỉ tiêu quan trọng nhất hoặc cùng với aflatoxin tổng số để đánh giá [3]. Các tổ chức quốc tế như World Health Organization (WHO) đã cảnh báo về nguy cơ phơi nhiễm aflatoxin thông qua thực phẩm, đặc biệt tại các khu vực có điều kiện khí hậu nóng ẩm thuận lợi cho sự phát triển của nấm mốc [4]. Do các tác động tiêu cực lên chất lượng hàng hóa, sản phẩm cũng như sức khỏe của con người và vật nuôi, nên hầu hết các quốc gia đều thiết lập mức giới hạn tối đa cho phép trong sản phẩm đối với các hoạt chất này. Ở Việt Nam, QCVN 8-1:2011/BYT được ban hành quy định giới hạn ô nhiễm độc tố vi nấm trong thực phẩm [5].

Nghiên cứu đánh giá ô nhiễm và nguy cơ do độc tố trên các sản phẩm ngũ cốc ở miền Bắc Việt Nam đã thực hiện trên 996 mẫu gạo, ngô, lạc và vùng cho thấy aflatoxin là nhóm độc tố bị nhiễm nhiều nhất trong các độc tố mycotoxin và chủ yếu là AFB1 và AFB2, nhóm sản phẩm có tỷ lệ phát hiện độc tố vi nấm và hàm lượng độc tố cao nhất là ngô và lạc [6]. Luận án tiến sĩ nghiên cứu mức độ nhiễm aflatoxin và đề xuất một số giải pháp công nghệ bảo quản lạc sau thu hoạch thực hiện nghiên cứu xác định tỷ lệ nhiễm aflatoxin trong lạc nhân, lạc củ và lạc rang húng liu được thu thập mẫu tại 3 tỉnh Nghệ An, Thanh Hóa và Bắc Giang. Kết quả xác định được tỷ lệ nhiễm aflatoxin trong các loại lạc trên tương ứng là 30 - 53,3% (với hàm lượng 0,34 - 1,498 µg/kg); 26,7 - 40% (với hàm lượng 0,64 - 215 µg/kg); 3,3 - 23,3% (với hàm lượng 0,65 - 2,3 µg/kg) trên các địa điểm thu thập mẫu. Tỷ lệ nhiễm aflatoxin vượt ngưỡng cho phép trong lạc nhân và lạc củ tương ứng là 10 - 16,7%; 10 - 13,3%; không phát hiện aflatoxin vượt ngưỡng cho phép trong lạc rang húng liu [1]. Fevzi Kilicel và cộng sự đã nghiên cứu phương pháp xác định hàm lượng aflatoxin trong các nguyên liệu thực phẩm tiêu thụ tại Karaman, Thổ Nhĩ Kỳ [2]. Các kết quả cho thấy tỷ lệ nhiễm độc tố cao đặc biệt là sản phẩm ớt đỏ 100% nhiễm (8/8 mẫu) và hàm lượng AFB1 đều vượt mức giới hạn cho phép của châu Âu là 8 µg/kg. Đồng thời, hàm lượng

aflatoxin tổng số trong cả 8 mẫu này vượt giới hạn tối đa cho phép là 10 µg/kg. Kết quả thu được cung cấp dữ liệu đánh giá sơ bộ nguy cơ phơi nhiễm và đề ra biện pháp phòng ngừa nhằm giảm thiểu ô nhiễm aflatoxin trong ớt đỏ và các sản phẩm khác.

Các chương trình giám sát an toàn thực phẩm tại nhiều quốc gia cho thấy aflatoxin vẫn là một trong những mối nguy hóa học cần được kiểm soát trong thực phẩm. Theo dữ liệu của Cơ quan An toàn thực phẩm châu Âu (EFSA), trong 2.183 mẫu thực phẩm có nguồn gốc từ ngũ cốc và sản phẩm ngũ cốc được thu thập tại 16 quốc gia châu Âu giai đoạn 2007 – 2012, aflatoxin tổng số (AFB1, AFB2, AFG1 và AFG2) đã được phát hiện ở nhiều nhóm thực phẩm khác nhau. Nhóm thực phẩm được khảo sát nhiều nhất là ngũ cốc dùng cho người (934 mẫu), tiếp theo là các sản phẩm xay xát từ ngũ cốc (406 mẫu) và ngũ cốc ăn sáng (346 mẫu). Mặc dù phần lớn các mẫu có hàm lượng aflatoxin thấp hoặc dưới giới hạn định lượng, tuy nhiên sự hiện diện của aflatoxin trong nhiều nhóm thực phẩm cho thấy nguy cơ phơi nhiễm của người tiêu dùng vẫn tồn tại và cần được giám sát thường xuyên. Kết quả này khẳng định tầm quan trọng của việc áp dụng các phương pháp phân tích có độ nhạy và độ tin cậy cao nhằm phát hiện và kiểm soát aflatoxin trong thực phẩm [7].

Danh pháp độc tố aflatoxin B, G này được đặt dựa trên màu huỳnh quang đặc trưng phát ra dưới ánh sáng tử ngoại, trong đó nhóm B (Blue) phát huỳnh quang màu xanh lam và nhóm G (Green) phát huỳnh quang màu xanh lục vàng, số thứ tự 1 và 2 xác định các hợp chất trong nhóm [2, 8]. Đặc tính huỳnh quang tự nhiên này là cơ sở quan trọng cho việc phát triển các phương pháp phân tích aflatoxin bằng sắc ký lỏng kết hợp đầu dò huỳnh quang (HPLC-FLD). Tuy nhiên, cường độ huỳnh quang của AFB1 và AFG1 thấp hơn đáng kể so với các chất dẫn xuất tương ứng, do đó, việc áp dụng các kỹ thuật tạo dẫn xuất trước hoặc sau cột thường được sử dụng nhằm tăng độ nhạy phát hiện. Nhờ khả năng định lượng ở hàm lượng rất thấp, kết hợp với độ chính xác và độ chọn lọc cao, HPLC-FLD hiện là một trong những kỹ thuật được sử dụng rộng rãi trong các tiêu chuẩn quốc tế và các chương trình giám sát aflatoxin trong thực phẩm [2, 9].

Mục đích của nghiên cứu này nhằm khảo sát các điều kiện phân tích trên cơ sở tham khảo nghiên cứu đã công bố từ đó xác định các điều kiện phân tích phù hợp và xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp định lượng aflatoxin (B1, B2, G1, G2) bằng kỹ thuật HPLC-FLD có độ nhạy tốt, có khả năng phát hiện được độc tố đáp ứng quy định mức giới hạn tối đa hiện hành như QCVN 8-1:2011/BYT, quy định của các nước xuất nhập khẩu thực phẩm với Việt Nam. Đồng thời ứng dụng để khảo sát mức độ nhiễm aflatoxin trong một số sản phẩm ngũ cốc, cà phê và thủy sản khô trên địa bàn Hà Nội. Ngoài ra, nghiên cứu cũng tiến hành so sánh kết quả phân tích bằng kỹ thuật HPLC-FLD có dẫn xuất trước cột và phân tích trực tiếp bằng LC-MS/MS cung cấp dẫn chứng khẳng định độ tin cậy của phương pháp xác định.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu: Các hoạt chất độc tố vi nấm aflatoxin (AFs) bao gồm aflatoxin B1 (AFB1), aflatoxin B2 (AFB2), aflatoxin G1 (AFG1) và aflatoxin G2 (AFG2).

Mẫu khảo sát bao gồm: ngũ cốc (lạc nhân cần sơ chế trước khi sử dụng, ngô, đậu tương và sản phẩm), cà phê, thủy sản khô.

Xây dựng các điều kiện phân tích và xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp thử trên 05 nền mẫu: Lạc nhân, đậu tương, ngô, cà phê và thủy sản khô.

2.2. Hóa chất, chất chuẩn

Các hóa chất, dung môi được sử dụng trong quá trình phân tích: acetonitril (ACN), methanol (MeOH), thuộc loại hóa chất tinh khiết phân tích dùng cho HPLC của Merck, nước cất khử ion của Merck được dùng để chuẩn bị dung môi hòa tan mẫu và pha động phân tích HPLC, nước cất dùng để chuẩn bị đệm PBS xử lý mẫu được cung cấp bởi hệ thống lọc nước Thermo Scientific Barnstead, thuốc thử dẫn xuất Trifluoroacetic acid (TFA) tinh khiết phân tích của Fisher – SLR, Tween 20 dùng pha loãng mẫu trước khi qua cột sử dụng của Merck, các hóa chất dùng chuẩn bị đệm PBS gồm sodium chloride (NaCl), potassium chloride (KCl), potassium dihydrogen phosphate (KH₂PO₄), disodium hydrogen phosphate (Na₂HPO₄) các hóa chất đều dạng tinh khiết phân tích, sodium hypochlorite (NaOCl), hóa chất phân tích sử dụng để xử lý, khử nhiễm chất thải và dụng cụ có nguy cơ nhiễm aflatoxin.

Cột chiết ái lực miễn dịch (IAC) của Pribolab có hiệu suất thu hồi các chất phân tích trên 85%, hiệu năng lưu giữ đến 500 ng đối với AFB1.

Các chất chuẩn rắn aflatoxin AFB1 (DRE-C10047100, lot: S21251A), AFB2 (DRE-C10047200, lot: S21251B), AFG1 (DRE-C10047400, lot: S22102G), AFG2 (DRE-C10047500, lot: S22101A) được cung cấp bởi LGC – Ehrenstorfer. Mẫu vật liệu chuẩn đối chứng (TBK009RM) được cung cấp bởi Fapas.

Các dung dịch chuẩn gốc đơn có nồng độ 500 µg/mL: Hòa tan hoàn toàn 5 mg chuẩn rắn trong lọ đựng chuẩn gốc bằng ACN và chuyển vào bình định mức 10 mL. Tráng rửa nhiều lần lọ đựng chuẩn và gộp dịch vào bình định mức 10 mL. Định mức đến vạch bằng ACN. Các dung dịch chuẩn gốc được bảo quản trong lọ đựng chuẩn tối màu ở nhiệt độ -18°C và sử dụng trong 12 tháng. Tính toán và ghi nhãn nồng độ chuẩn theo độ tinh khiết chất chuẩn trên giấy chứng nhận phân tích (Certificate of Analysis).

Các dung dịch chuẩn trung gian hỗn hợp được chuẩn bị bằng cách pha loãng nhiều lần các dung dịch chuẩn gốc đơn trong dung môi ACN, được bảo quản trong lọ đựng chuẩn tối màu ở nhiệt độ -18°C và sử dụng trong 3 tháng.

Dung dịch chuẩn hỗn hợp chuẩn làm việc được chuẩn bị trong ACN bằng cách pha loãng từ dung dịch chuẩn hỗn hợp trung gian, được bảo quản trong lọ đựng chuẩn tối màu ở nhiệt độ -18°C và sử dụng trong 1 tháng.

Dãy dung dịch chuẩn làm việc được chuẩn bị hàng ngày trong quá trình phân tích, được thổi khô đuổi loại dung môi, dẫn xuất và hòa tan trong hỗn hợp dung môi ACN:H₂O (1: 9, v/v).

2.3. Thiết bị, dụng cụ

Thiết bị chính là hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao kết nối detector huỳnh quang (HPLC-FLD) hệ 20Ax của Shimadzu, cột sắc ký pha đảo C18 (150 mm x 4,6 mm ID x 5 µm).

Các thiết bị khác sử dụng trong phòng thí nghiệm: Cân phân tích có độ chính xác 0,001 g (Shimadzu), máy đồng nhất mẫu (Philips), máy lắc tốc độ cao (Eyela-MMV), hệ thống chiết pha rắn (Biotage), thổi khô bằng nitơ (TurboVap – Biotage), máy lắc xoay (IKA).

Các dụng cụ thí nghiệm bao gồm: ống ly tâm các loại (15, 50, 100 mL), các bình định mức, micropipet, giấy lọc, phễu lọc thủy tinh đường kính 50 mm, đầu lọc mẫu PTFE 0,22 µm, xilanh 1 mL.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Phương pháp lấy mẫu và xử lý mẫu sơ bộ

Phương pháp lấy mẫu ngẫu nhiên tại các chợ, siêu thị bán lẻ trên địa bàn Hà Nội, mẫu được bảo quản ở nhiệt độ phòng nơi khô thoáng, tránh ánh sáng.

Đối với các mẫu ngũ cốc (lạc nhân, đậu tương, ngô), cà phê dạng hạt, xay mẫu đến đồng nhất bằng máy xay. Đối với mẫu cà phê dạng bột mịn không cần thực hiện bước nghiền mịn mẫu, chuyển mẫu vào bao bì chứa đựng thích hợp và ghi nhãn mã nhận diện. Đối với mẫu hải sản, dùng dao kéo cắt nhỏ dạng hạt rồi chuyển vào máy xay đến đồng nhất mẫu.

2.4.2. Phương pháp phân tích và xác nhận giá trị sử dụng phương pháp

Dựa trên các tài liệu tham khảo [2, 3, 9 – 15], aflatoxin B1, B2, G1 và G2 là các hợp chất có khả năng phát huỳnh quang, tuy nhiên cường độ huỳnh quang của một số aflatoxin, đặc biệt là AFB1 và AFG1, được tăng cường đáng kể sau dẫn xuất. Vì vậy, các phương pháp áp dụng bước làm sạch bằng cột ái lực miễn dịch để loại bỏ các chất gây nhiễu, sau đó phân tích bằng HPLC kết hợp detector huỳnh quang sau dẫn xuất nhằm đạt độ nhạy và độ chọn lọc cao trong xác định tổng aflatoxin. Trên cơ sở các nguyên lý này, quy trình phân tích áp dụng trong nghiên cứu được trình bày cụ thể như sau:

-Xử lý chiết mẫu: Mẫu đã được đồng nhất, cân chính xác 10 g mẫu ($\pm 0,04$ g) vào ống ly tâm 100 mL. Thêm chính xác 40 mL hỗn hợp dung môi chiết ACN:H₂O (9:1, v/v), lắc xoay để đồng nhất mẫu. Tiếp đó thêm 1 g NaCl vào hỗn hợp mẫu và dung môi chiết, đậy chặt nắp. Lắc trên máy lắc tốc độ 300 vòng/phút trong 30 phút. Sau khi lắc, lọc hỗn hợp mẫu qua giấy lọc, thu dịch chiết vào ống ly tâm 50 mL. Lấy chính xác 2 mL dịch chiết vào ống ly tâm 50 mL khác, thêm hỗn hợp dung dịch PBS chứa 0,1% Tween 20 đến 40 mL để đảm bảo nồng độ dung môi ACN trong dung dịch nhỏ hơn 5%.

-Làm sạch mẫu qua cột ái lực miễn dịch (IAC) theo hướng dẫn của hãng sản xuất: Lắp cột làm sạch lên bộ chiết pha rắn manifold, loại bỏ chất lỏng bảo vệ trong cột, không cần hoạt hóa cột. Chuyển dung dịch mẫu đã được pha loãng qua cột, điều chỉnh tốc độ 1 – 2 mL/phút. Cột làm sạch sau đó được rửa tạp 2 lần, mỗi lần sử dụng 10 mL nước cất tinh khiết, lần 1 dùng để tráng rửa ống ly tâm chứa mẫu, lần 2 cho thẳng lên cột. Dùng áp lực đẩy hết nước khỏi cột đến khô. Các AFs liên kết với kháng thể trong cột được rửa giải 2 lần, mỗi lần 1 mL MeOH vào ống ly tâm 15 mL. Thổi khô loại bỏ dung môi dưới dòng khí nitơ ở nhiệt độ $\leq 40^{\circ}\text{C}$.

-Dẫn xuất hóa mẫu trước cột: Thêm lần lượt 50 μL TFA vào các ống nghiệm chứa mẫu và dãy dung dịch chuẩn làm việc đã được thổi khô loại bỏ dung môi, lắc xoay mẫu khoảng 30 giây. Để phản ứng tránh ánh sáng trong 15 phút. Sau 15 phút, hòa tan lại bằng 950 μL hỗn hợp dung môi ACN: H_2O (1: 9, v/v), lọc qua màng lọc 0,22 μm vào lọ đựng mẫu phân tích HPLC.

-Điều kiện phân tích trên thiết bị: Các chất phân tích được tách sắc ký trên cột pha đảo C18 (150 mm x 4,6 ID x 5 μm). Thành phần pha động gồm nước khử ion, ACN, MeOH được cài đặt tốc độ dòng 1,2 mL/phút. Quá trình tách sắc ký trên cột được thực hiện theo chế độ gradient tỷ lệ pha động: ban đầu tỷ lệ pha động nước khử ion: ACN:MeOH được ổn định ở tỷ lệ 60:10:30 (v/v/v), sau đó thay đổi đạt đến 45:10:45 (v/v/v) tại thời điểm 3,50 phút và được giữ ổn định đến 7,00 phút, tại thời gian 7,10 phút tỷ lệ pha động được đưa trở về 60:10:30 (v/v/v) và duy trì ổn định đến hết thời gian phân tích là 15 phút. Nhiệt độ buồng cột được duy trì ở 35°C trong quá trình phân tích. Thể tích mẫu tiêm là 10 μL . Đầu dò huỳnh quang được cài đặt bước sóng kích thích và bước sóng phát xạ tương ứng lần lượt là 365 và 450 nm.

2.4.3. Xác nhận giá trị sử dụng phương pháp

Phương pháp được xác nhận giá trị sử dụng và đánh giá theo hướng dẫn của AOAC – Yêu cầu về hiệu năng phương pháp chuẩn [16]. Các thông số xác nhận gồm độ đặc hiệu, khoảng tuyến tính, khoảng làm việc, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng, độ chụm (đánh giá qua độ lặp lại và độ tái lập, biểu thị qua độ lệch chuẩn tương đối – RSD%), độ đúng (đánh giá thông qua độ thu hồi, sử dụng mẫu thêm chuẩn). Các chất phân tích được định lượng bằng phương pháp ngoại chuẩn. Phương pháp được xác nhận giá trị sử dụng trên 5 nền mẫu: ngũ cốc (lạc nhân, đậu tương, ngô), cà phê và hải sản khô.

2.4.4. Ứng dụng phương pháp và phân tích bằng kỹ thuật LC-MS/MS

Phương pháp sau khi xác nhận giá trị sử dụng được ứng dụng để phân tích xác định mức ô nhiễm các độc tố AFs trong 100 mẫu thực phẩm. Các mẫu gồm ngũ cốc, cà phê, thủy sản khô được lấy ngẫu nhiên trên địa bàn Hà Nội. Đối với mỗi đơn vị lấy mẫu, khối lượng là 1 kg mẫu (ngũ cốc, cà phê) và 500 g mẫu (hải sản khô) được thu thập. Mẫu sau khi lấy về phòng thí nghiệm được đồng nhất và chia mẫu phục vụ phân tích.

Các mẫu phát hiện có hàm lượng AFs được tiến hành phân tích lặp lại với kỹ thuật LC-MS/MS. Phương pháp xác định hàm lượng AFs bằng kỹ thuật LC-MS/MS ứng dụng tại phòng thí nghiệm đã được công nhận ISO/IEC 17025, phù hợp cho phân tích các đối tượng mẫu được đánh giá. Mẫu được xử lý và chiết tách tương tự quy trình xác định bằng kỹ thuật HPLC-FLD: mẫu được chiết tách, làm sạch qua cột IAC, thổi loại bỏ dung môi, không dẫn xuất hóa và tiêm trực tiếp vào hệ thống LC-MS/MS. Các điều kiện phân tích sắc ký lỏng: Cột sắc ký pha đảo C18 (150 mm x 2,1 ID x 3 μm), dung môi pha động gồm nước cấp độ HPLC và ACN tốc độ dòng 0,2 mL/phút, buồng cột được giữ ở 35°C , thể tích tiêm 2 μL . Các điều kiện nhận diện khối phổ tham khảo từ các nghiên cứu trước đây [6, 17, 18] được trình bày trong **Bảng 1**.

Bảng 1. Các điều kiện phân tích khối phổ (chế độ MRM)

Độc tố phân tích	Chế độ ion hóa	Phổ khối ion mẹ (m/z)	Phổ khối ion con (m/z)	Điện áp đầu nón (V)	Năng lượng bắn phá (eV)
AFG1	ESI (+)	329,1	243,1	20	25
			283,1		25
AFG2	ESI (+)	331,1	245,1	50	30
			257,0		30
AFB1	ESI (+)	313,1	241,1	25	50
			285,1		30
AFB2	ESI (+)	315,1	259,1	25	40
			287,1		35

2.4.5. Thu thập và xử lý dữ liệu

Nồng độ các AFs trong dung dịch phân tích được tính toán tự động bằng phần mềm của thiết bị HPLC-FLD (LabSolution). Các kết quả đánh giá xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2010.

Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng được ước lượng dựa trên hiệu năng phân tích của phương pháp và thiết bị đồng thời đáp ứng mức giới hạn cho phép tối đa theo QCVN 8-1:2011/BYT.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

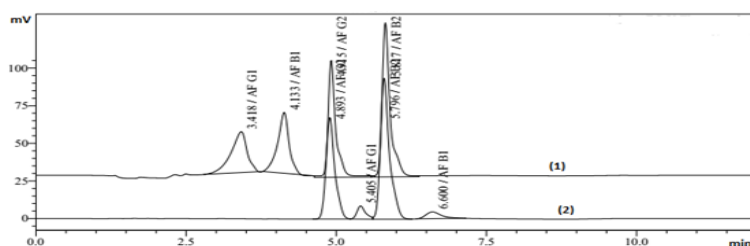
3.1. Xác định điều kiện xử lý và phân tích

Phương pháp được phát triển trên cơ sở nguyên lý của TCVN 7930:2008 [11], TCVN 12625:2019 [12] và phương pháp được ứng dụng đồng bộ tại các phòng thí nghiệm thuộc Bộ Y tế, Lao động và Phúc lợi Nhật Bản [10] với các cải tiến gồm: (i) sử dụng dung môi chiết ACN:H₂O (9:1) kết hợp NaCl để nâng cao hiệu quả chiết và giảm ảnh hưởng nền; (ii) pha loãng dịch chiết bằng PBS chứa 0,1% Tween 20 trước khi làm sạch qua cột ái lực miễn dịch giúp hỗ trợ dung dịch mẫu qua cột không bị tủa gây tắc giúp nâng cao hiệu suất thu hồi; (iii) áp dụng dẫn xuất trước cột bằng TFA thay cho dẫn xuất sau cột giúp đồng bộ áp dụng phương pháp đối với phòng thí nghiệm không được trang bị thiết bị có bộ dẫn xuất quang hóa sau cột và (iv) xác nhận giá trị sử dụng trên nhiều nền mẫu (ngũ cốc, cà phê, thủy sản khô) cung cấp bằng chứng tin cậy mở rộng phạm vi áp dụng của phương pháp đối với nền mẫu thực phẩm.

Dựa vào đặc tính của các chất phân tích, tham khảo các tài liệu [2, 8, 17], thực hiện phân tách sắc ký các hợp chất AFs trên cột sắc ký pha đảo C18 và xác định bằng detector huỳnh quang (**Hình 1**). Tiêm trực tiếp các hợp chất AFs vào hệ thống sắc ký, kết quả thu được tín hiệu chất phân tích có thời gian lưu lần lượt AFG2 < AFG1 < AFB2 < AFB1, đồng thời tín hiệu AFG2, AFB2 cao hơn rất nhiều so với AFG1, AFB1 khi được phân tách cùng một nồng độ. Tuy nhiên, khi được dẫn xuất hóa trước cột, TFA sẽ chuyển hóa cấu trúc phân tử AFB1, AFG1 thành dạng AFB2a, AFG2a còn AFG2, AFB2 không bị ảnh hưởng trong quá trình dẫn xuất. Sắc ký đồ phân tích thu được thời gian lưu các hợp chất AFG2a < AFB2a < AFG2 < AFB2, đồng thời tín hiệu đáp ứng detector, các hợp chất tương đương nhau ở cùng nồng độ được tiêm vào thiết bị.

Một trong các đặc tính của sản phẩm dẫn xuất là dễ bị phân hủy khi tiếp xúc với tia cực tím, có xu hướng hấp phụ lên bề mặt thủy tinh vì vậy trong quá trình phân tích cần sử dụng các lọ đựng mẫu tối màu, các dụng cụ vật liệu polypropylene. TFA là một hóa chất có tính phá hủy mạnh, sau mỗi lần phân tích sắc ký khuyến cáo làm sạch cột sắc ký bằng pha động có hàm lượng dung môi hữu cơ cao hơn so với quy trình phân tích sắc ký thông thường không chứa TFA nhằm duy trì hiệu năng của cột tách sắc ký.

Do aflatoxin là chất có độc tính cao và có khả năng gây ung thư, toàn bộ quá trình chuẩn bị mẫu và phân tích cần được thực hiện trong tủ hút hóa chất với đầy đủ trang bị bảo hộ cá nhân. Chất thải có chứa aflatoxin cần được thu gom riêng và khử hoạt tính bằng dung dịch natri hypochlorite (NaOCl) 5-10%, ngâm tối thiểu 30 phút nhằm oxy hóa và phân hủy độc tố trước khi xử lý theo quy định về chất thải nguy hại.

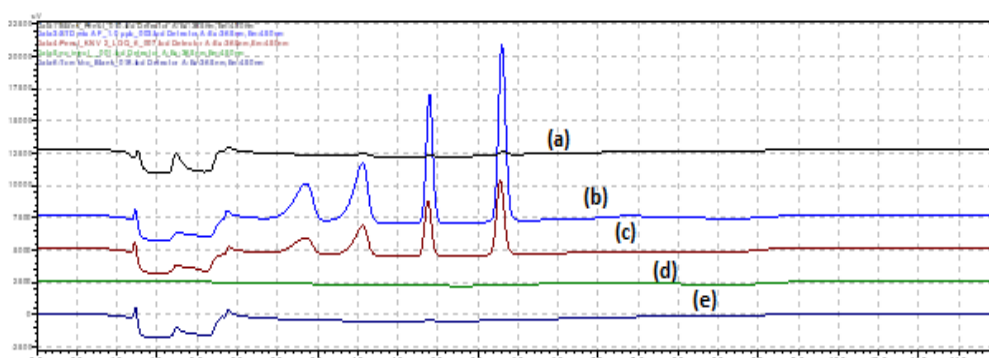


Hình 1. Sắc ký đồ phân tích hỗn hợp dung dịch chuẩn AFs có dẫn xuất (1) và không dẫn xuất (2) sử dụng TFA

3.2. Xác nhận giá trị sử dụng phương pháp

3.2.1. Độ đặc hiệu và chọn lọc của phương pháp

Độ đặc hiệu và chọn lọc của phương pháp được đánh giá bằng cách phân tích các dung dịch dung môi pha động, mẫu trắng dung môi, mẫu trắng không chứa chất phân tích, dung dịch chuẩn hỗn hợp, mẫu thêm chuẩn (**Hình 2**).



Hình 2. Sắc ký đồ phổ phân tích mẫu trắng (a), dung dịch chuẩn (b), mẫu trắng thêm chuẩn (c), dung môi pha động (d), mẫu trắng dung môi (e)

Kết quả cho thấy mẫu trắng không xuất hiện peak tại thời gian lưu của các aflatoxin, chứng tỏ nền mẫu không chứa các chất gây nhiễu đến quá trình phân tích. Trong khi đó, các peak của AFB1, AFB2, AFG1 và AFG2 trong mẫu thêm chuẩn được tách hoàn toàn, có thời gian lưu tương ứng với dung dịch chuẩn và không bị chồng lấp bởi các thành phần nền. Điều này chứng tỏ phương pháp HPLC-FLD có độ đặc hiệu, chọn lọc, đáp ứng yêu cầu định tính và định lượng đồng thời các aflatoxin trong nền mẫu nghiên cứu.

3.2.2. Khoảng tuyến tính và đường chuẩn làm việc

Khoảng tuyến tính là khoảng nồng độ mà đáp ứng tín hiệu của detector tỷ lệ tuyến tính với nồng độ chất phân tích. Khoảng tuyến tính của các chất phân tích được xây dựng từ dãy nồng độ 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 20,0; 50,0 và 100 ng/mL, hệ số hồi quy tuyến tính (R^2) đều $> 0,99$. Thực hiện quy trình xử lý mẫu và hệ số pha loãng $K = 2$, khoảng tuyến tính này tương ứng với khoảng làm việc của phương pháp trên mẫu từ 0,5 đến 200 $\mu\text{g/kg}$.

Bảng 2. Phương trình đường chuẩn đánh giá khoảng tuyến tính của các aflatoxin

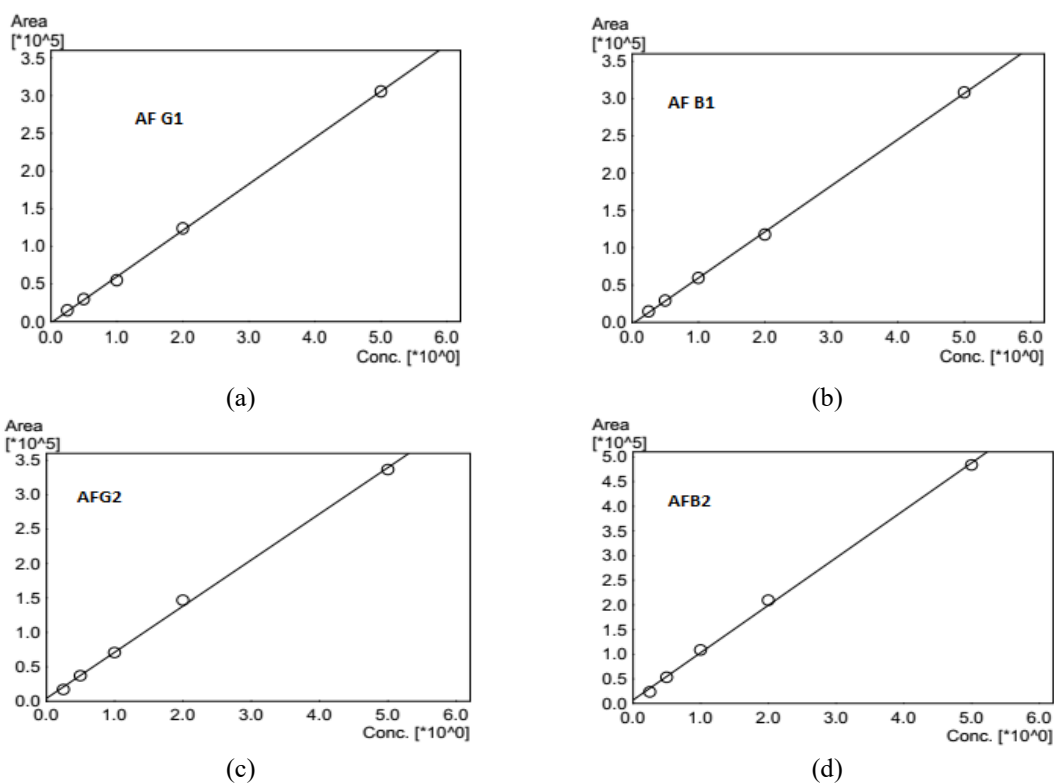
Chất phân tích	Đường chuẩn	Hệ số tương quan R^2
AFG1	$Y = 60105,1X - 37842,7$	0,998
AFB1	$Y = 64122,0X - 21560,3$	0,999
AFG2	$Y = 64753,2X - 8896,97$	0,998
AFB2	$Y = 92565,2X - 12226,4$	0,998

Đường chuẩn là yếu tố quyết định độ chính xác của kết quả phân tích do thiết bị không đo hay đọc được trực tiếp nồng độ chất phân tích trong dung dịch đo mà chỉ cho tín hiệu đáp ứng. Đường chuẩn dùng để quy đổi nồng độ chất phân tích từ tín hiệu đo được. Đường chuẩn được xây dựng bằng cách vẽ đường phụ thuộc tuyến tính bậc nhất giữa diện tích peak chất phân tích và nồng độ tương ứng, với các tiêu chí chấp nhận là $R^2 > 0,99$ và độ chệch tính lại của các điểm chuẩn $< 15\%$. Dãy nồng độ xây dựng đường chuẩn nằm trong dải nồng độ của khoảng tuyến tính.

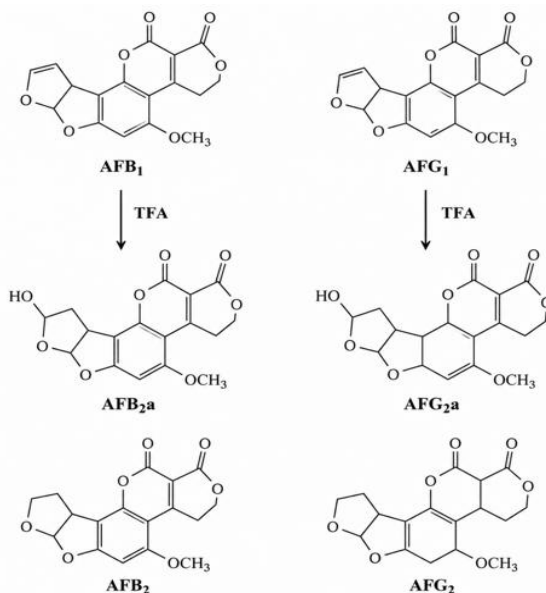
Dãy nồng độ chuẩn làm việc được sử dụng là 0,25; 0,5; 1,0; 2,0 và 5,0 ng/mL tương ứng với từng chất phân tích. Kết quả hệ số $R^2 > 0,99$ và độ chệch tính lại của các điểm $< 15\%$.

AFB1 và AFG1 có cường độ phát huỳnh quang tự nhiên thấp hơn so với AFB2 và AFG2 do sự hiện diện của liên kết đôi C8=C9 trong cấu trúc phân tử. Quá trình dẫn xuất trước cột bằng TFA chuyển AFB1 và AFG1 thành các dẫn xuất AFB2a và AFG2a có cường độ huỳnh quang cao hơn, trong khi AFB2 và AFG2 hầu như không bị ảnh hưởng [8, 17]. Nhờ đó, tín hiệu huỳnh quang của các aflatoxin được tăng cường và trở nên tương đối đồng đều, góp phần cải thiện độ nhạy của phương pháp, đặc biệt đối với AFB1 và AFG1, đồng thời đảm bảo xây dựng đường chuẩn có tính tuyến tính tốt trong khoảng nồng độ khảo sát.

Việc sử dụng TFA để dẫn xuất trước cột không chỉ cải thiện độ nhạy của phép phân tích mà còn mở rộng khoảng làm việc của phương pháp ở vùng nồng độ thấp, đáp ứng yêu cầu định lượng aflatoxin theo các giới hạn tối đa cho phép trong thực phẩm.



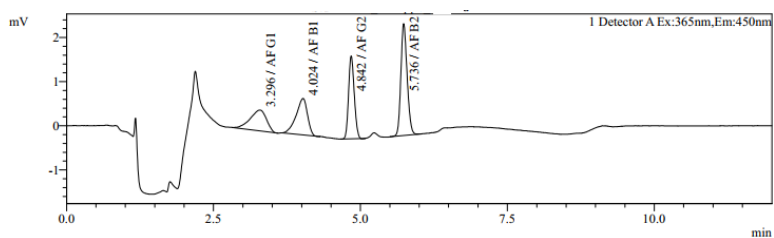
Hình 3. Đường chuẩn làm việc AFG1 (a), AFB1 (b), AFG2 (c), AFB2 (d) nồng độ 0,25 – 5,0 ng/mL



Hình 4. Cấu trúc của các AFs và sản phẩm chuyển hóa sau khi dẫn xuất bằng TFA

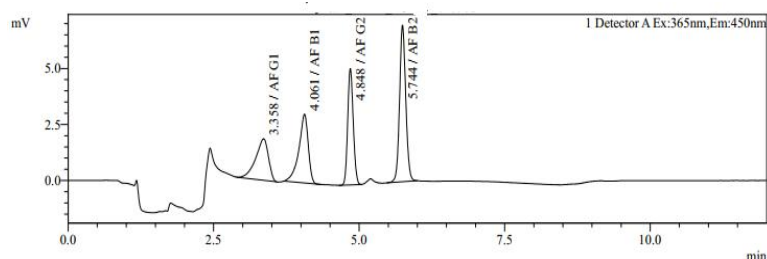
3.2.3. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng

Giới hạn phát hiện (LOD) của phương pháp là nồng độ thấp nhất mà tại ngưỡng đó có thể phát hiện và khẳng định sự có mặt của chất phân tích. Dựa trên độ nhạy tín hiệu đáp ứng của thiết bị đối với chất phân tích và ngưỡng quy định giới hạn ô nhiễm độc tố vi nấm trong thực phẩm theo QCVN 8-1:2011/BYT, ước lượng giới hạn phát hiện của phương pháp 0,5 µg/kg từng chất phân tích (2,0 µg/kg aflatoxin tổng số). Tiến hành thí nghiệm khẳng định lại giới hạn phát hiện bằng cách thêm chuẩn vào nền mẫu trắng tại nồng độ LOD ước lượng. Kết quả 12/12 lần phân tích (> 95%) cho kết quả phát hiện và khẳng định sự có mặt của các chất phân tích.



Hình 5. Sắc ký đồ phân tích tại ngưỡng giới hạn phát hiện của phương pháp

Giới hạn định lượng (LOQ) của phương pháp là nồng độ thấp nhất của chất phân tích trong mẫu mà tại đó có thể định lượng với độ tin cậy nghĩa là đáp ứng yêu cầu về độ chụm và độ đúng. Ước lượng LOQ thông qua LOD, thông thường $LOQ = 2 \div 5 LOD$. LOQ công bố của phương pháp là 1,0 $\mu\text{g/kg}$ từng chất phân tích (4,0 $\mu\text{g/kg}$ aflatoxin tổng số). Thực hiện đánh giá khẳng định giới hạn định lượng bằng cách tiến hành thêm chuẩn vào mẫu trắng lặp lại nhiều lần ($n = 6$) tại hàm lượng LOQ, thực hiện quy trình phân tích, đánh giá độ chụm (độ lặp lại và độ tái lặp) và độ thu hồi. Kết quả giới hạn định lượng công bố của phương pháp có độ chụm và độ thu hồi đạt tiêu chí chấp nhận (kết quả được trình bày trong phần 3.2.4. Độ chụm và độ đúng).



Hình 6. Sắc ký đồ phân tích tại ngưỡng giới hạn định lượng của phương pháp

3.2.4. Độ chụm và độ đúng

Độ chụm của phương pháp được đánh giá thông qua độ lặp lại ($n = 6$) và độ tái lặp ($n = 6$) (biểu thị qua độ lệch chuẩn tương đối RSD%). Độ đúng của phương pháp được đánh giá thông qua độ thu hồi (biểu thị độ thu hồi H%). Thực hiện đánh giá ở 03 mức nồng độ khác nhau cho các loại nền mẫu bao gồm lạc nhân, đậu tương, ngô, cà phê và cá khô. Kết quả đánh giá độ chụm và độ đúng được thể hiện trong **Bảng 3**.

Bảng 3. Độ chụm và độ thu hồi trên các nền mẫu xác nhận giá trị sử dụng phương pháp

Chất phân tích	Nền mẫu đánh giá	1,0 $\mu\text{g/kg}$		2,0 $\mu\text{g/kg}$		5,0 $\mu\text{g/kg}$	
		RSD _R (%)	H (%)	RSD _R (%)	H (%)	RSD _R (%)	H (%)
AFG1	Lạc nhân	17,3	76,4 - 116	18,4	70,1 - 112	4,99	72,6 - 82,8
AFB1		9,85	92,0 - 119	9,83	83,0 - 102	6,43	81,1 - 100
AFG2		7,77	87,8 - 103	17,0	84,6 - 109	6,23	92,4 - 103
AFB2		13,7	73,8 - 107	13,9	71,0 - 100	9,88	75,5 - 95,6
AFG1	Đậu tương	9,58	93,2 - 115	9,33	99,1 - 114	11,0	73,0 - 87,3
AFB1		7,50	95,2 - 116	14,3	80,6 - 112	9,41	82,0 - 106
AFG2		12,3	81,6 - 111	12,8	89,1 - 117	10,7	84,4 - 106
AFB2		15,5	75,6 - 103	8,27	84,4 - 103	8,24	81,1 - 97,2
AFG1	Ngô	6,72	98,0 - 114	5,79	98,4 - 117	7,66	84,9 - 105
AFB1		11,9	81,2 - 103	9,29	84,3 - 113	13,8	73,6 - 103
AFG2		12,9	73,6 - 98,0	12,3	79,4 - 104	13,6	76,0 - 108
AFB2		8,56	88,8 - 109	10,5	93,2 - 110	9,97	75,6 - 101
AFG1	Cà phê	13,9	82,0 - 115	5,42	82,8 - 94,3	2,93	73,4 - 79,8
AFB1		14,4	87,2 - 115	4,93	87,0 - 97,4	7,57	89,0 - 104

Chất phân tích	Nền mẫu đánh giá	1,0 µg/kg		2,0 µg/kg		5,0 µg/kg	
		RSD _R (%)	H (%)	RSD _R (%)	H (%)	RSD _R (%)	H (%)
AFG2	Thủy sản khô	13,6	74,0 - 106	2,55	93,7 - 100	10,8	89,5 - 113
AFB2		15,6	78,2 - 114	4,44	83,4 - 90,6	5,60	73,2 - 83,2
AFG1		10,7	97,6 - 115	11,8	97,6 - 116	9,13	80,3 - 113
AFB1		7,92	97,4 - 118	8,18	94,8 - 117	12,3	76,0 - 112
AFG2		10,2	74,4 - 95,2	13,6	77,9 - 118	13,9	78,6 - 118
AFB2		8,44	83,4 - 94,6	12,4	73,2 - 107	9,10	79,0 - 109

RSD_R: Độ lệch chuẩn tương đối tái lập

Kết quả trình bày ở **Bảng 3** cho thấy độ thu hồi (H%) của bốn aflatoxin (AFG1, AFB1, AFG2 và AFB2) dao động trong khoảng từ 70,1 đến 119%, trong khi độ lệch chuẩn tương đối tái lập (RSD_R%) nằm trong khoảng từ 2,55 đến 18,4% cho thấy phương pháp có độ đúng và độ chụm tốt trên các nền mẫu khảo sát. Theo hướng dẫn AOAC [16], đối với các chất phân tích ở mức hàm lượng từ 1 đến 10 µg/kg, độ thu hồi chấp nhận được nằm trong khoảng 40–120%, đồng thời giá trị RSD phải đáp ứng yêu cầu về độ lặp lại của phương pháp. Kết quả thu được cho thấy tất cả các chất phân tích đều đáp ứng các tiêu chí về độ đúng và độ chụm. Điều này chứng tỏ phương pháp phân tích có độ tin cậy cao và phù hợp để xác định đồng thời AFG1, AFB1, AFG2 và AFB2 trong các nền mẫu lạc nhân, đậu tương, ngô, cà phê và thủy sản khô.

Kết quả đánh giá độ đúng (thông qua độ thu hồi) và độ chụm (thông qua độ lệch chuẩn tương đối, RSD) của phương pháp là cơ sở để ước lượng độ không đảm bảo đo của phương pháp từ quá trình phân tích. Thực hiện xác nhận giá trị sử dụng phương pháp trên 05 nền mẫu, lựa chọn nguyên tắc lấy giá trị lớn nhất để thuận tiện cho việc áp dụng phương pháp trong phân tích thường quy và bảo đảm kết quả áp dụng phù hợp cho tất cả các nền mẫu. Độ không đảm bảo đo của phương pháp đã được đánh giá và trình bày trong **Bảng 4**.

Bảng 4. Độ không đảm bảo đo mở rộng của phương pháp

Chất phân tích	Độ không đảm bảo đo mở rộng (U%, hệ số phủ K=2)
Aflatoxin G1	47,3
Aflatoxin B1	33,6
Aflatoxin G2	36,6
Aflatoxin B2	43,0

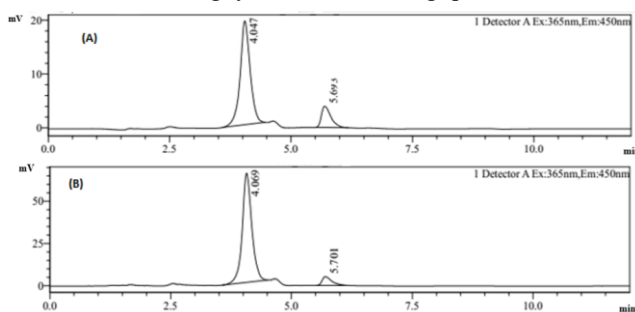
3.3. Kết quả phân tích mẫu thực tế

Phương pháp sau khi được xác nhận giá trị sử dụng cung cấp minh chứng khách quan thể hiện độ tin cậy, chính xác và phù hợp đáp ứng các yêu cầu và quy định được áp dụng để phân tích các mẫu thực tế lấy ngẫu nhiên trên địa bàn thành phố Hà Nội. Thực hiện phân tích tổng cộng 100 mẫu ngũ cốc và sản phẩm, cà phê và thủy sản khô. Kết quả được trình bày trong **Bảng 5**.

Bảng 5. Kết quả phân tích mẫu thực tế

Loại mẫu		Lạc nhân	Đậu tương	Ngô	Cà phê	Thủy sản khô
Số lượng mẫu phân tích		31	22	8	15	24
Hàm lượng độc tố (µg/kg)	AFB1	60,3 - 720	-	8,46 – 61,5	-	-
	AFB2	1,50 – 6,32	-	< 1,0 – 4,23	-	-
	AFG1	-	-	-	-	-
	AFG2	-	-	-	-	-
	AF tổng số	61,8 - 726	-	9,04 – 65,8	-	-
Số mẫu nhiễm		2	0	3	0	0
Tỷ lệ nhiễm (%)		6,45	-	37,5	-	-
Mẫu vượt mức		2/2	-	3/3	-	-

Kết quả phân tích mẫu thực tế phát hiện tỷ lệ ô nhiễm aflatoxin trong lạc nhân là 6,45%, tỷ lệ thấp hơn đáng kể so với kết quả luận án nghiên cứu tiền sử của tác giả Lê Thị Phương Thảo [1] có tỷ lệ nhiễm đến 53,3% đối với lạc nhân (**Bảng 6**). Đối với đối tượng mẫu là ngô, tỷ lệ phát hiện ô nhiễm là 37,5% và tập trung chủ yếu vào các mẫu ngô được lấy ngẫu nhiên trên thị trường, không có bao gói nhãn mác, không truy xuất được nguồn gốc xuất xứ. So sánh với kết quả nghiên cứu luận án tiền sử của tác giả Đỗ Hữu Tuấn [6] xác định tỷ lệ mẫu nhiễm độc tố cao trong mẫu ngô nghiên cứu là 60/287 (tương ứng 20,91%), với kết quả nghiên cứu khảo sát mức ô nhiễm nấm mốc và aflatoxin trong ngô, lạc [19] khi tần số mẫu nhiễm là 17/99 (tương ứng 17,2%) cho thấy kết quả phù hợp khi điều ghi nhận ngô là đối tượng có nguy cơ nhiễm aflatoxin khá cao. Ngoài ra, nghiên cứu không phát hiện aflatoxin trong các mẫu đậu tương, cà phê và thủy sản khô được khảo sát, cho thấy các đối tượng mẫu này bước đầu kiểm soát tốt nguy cơ ô nhiễm trong quá trình thu hoạch và bảo quản.



Hình 7. Sắc ký đồ phân tích mẫu phát hiện nhiễm độc tố aflatoxin: (A) nền mẫu lạc; (B) nền mẫu ngô

Đối với các mẫu phát hiện aflatoxin, chỉ phát hiện AFB1 và AFB2, không phát hiện AFG1 và AFG2 phù hợp với nghiên cứu về mức độ phổ biến xuất hiện của các hợp chất độc tố được phân loại [1, 2, 6-8]. Đặc biệt, cả 05 mẫu phát hiện aflatoxin (02 mẫu lạc, 03 mẫu ngô) đều có hàm lượng ô nhiễm độc tố cao vượt ngưỡng giới hạn cho phép theo QCVN 8-1:2011/BYT [5]: quy định đối với lạc cần sơ chế trước khi sử dụng, ngô phải sơ chế trước khi sử dụng có giới hạn tối đa cho phép đối với aflatoxin B1 và aflatoxin tổng số lần lượt 8 µg/kg và 15 µg/kg; 5 µg/kg và 10 µg/kg. Riêng 01 mẫu ngô vượt giới hạn cho phép đối với aflatoxin B1 nhưng không vượt giới hạn cho phép đối với aflatoxin tổng số. Kết quả phát hiện một số mẫu có hàm lượng aflatoxin vượt giới hạn tối đa cho phép theo quy định hiện hành cho thấy nguy cơ ô nhiễm aflatoxin trong thực phẩm. Điều này nhấn mạnh sự cần thiết phải duy trì và tăng cường các chương trình giám sát an toàn thực phẩm định kỳ nhằm kịp thời phát hiện, kiểm soát và giảm thiểu nguy cơ phơi nhiễm aflatoxin đối với người tiêu dùng.

Bảng 6. Kết quả phân tích so sánh kỹ thuật HPLC-FLD và LC-MS/MS

Nền mẫu	Kỹ thuật	Chất phân tích				Độ lệch (%)
		AFB1	AFB2	AFG1	AFG2	
Mẫu không ô nhiễm	HPLC-FLD	-	-	-	-	-
AFs	HPLC-FLD	-	-	-	-	-
Mẫu lạc nhân 1	HPLC-FLD	60,3	1,50	-	-	1,33 – 6,30
	LC-MS/MS	56,5	1,48	-	-	
Mẫu lạc nhân 2	HPLC-FLD	720	6,32	-	-	1,58 – 2,22
	LC-MS/MS	704	6,42	-	-	
Mẫu ngô 1	HPLC-FLD	61,5	4,23	-	-	8,61 – 8,74
	LC-MS/MS	56,2	4,60	-	-	
Mẫu ngô 2	HPLC-FLD	50,6	3,34	-	-	0,19 – 2,09
	LC-MS/MS	50,5	3,41	-	-	
Mẫu ngô 3	HPLC-FLD	8,46	< 1,0	-	-	0,47
	LC-MS/MS	8,50	< 1,0	-	-	
RM (nền ngũ cốc)	HPLC-FLD	5,58	2,72	3,72	1,28	0,00 – 18,2
	LC-MS/MS	4,56	2,88	3,68	1,28	
RV ± U (mẫu RM)		5,09 ± 0,55	2,59 ± 0,21	3,68 ± 0,24	1,30 ± 0,10	
(-) biểu thị không phát hiện chất phân tích;						
RV, U: Giá trị tham chiếu và độ không đảm bảo đo mở rộng được công bố của mẫu RM						

3.4. Kết quả phân tích đối chứng bằng kỹ thuật LC-MS/MS

Sau khi hoàn thiện phân tích mẫu bằng kỹ thuật HPLC-FLD, lựa chọn một số mẫu không phát hiện ô nhiễm AFs, 5 mẫu phát hiện sự có mặt của độc tố AFs và mẫu RM có hàm lượng các độc tố được công bố. Tiến hành phân tích bằng kỹ thuật LC-MS/MS để so sánh kết quả giữa 2 phương pháp. Đối với phương pháp sử dụng kỹ thuật LC-MS/MS, tiến hành xử lý mẫu sau bước làm sạch qua cột chiết ái lực miễn dịch, dung dịch rửa giải được thổi khô dưới dòng khí nitơ, hòa tan lại bằng dung môi pha động và phân tích trực tiếp trên hệ thống LC-MS/MS không có quá trình dẫn xuất hóa với TFA, định lượng bằng phương pháp ngoại chuẩn. Kết quả được trình bày trong **Bảng 6**.

Kết quả so sánh giữa hai kỹ thuật phân tích cho thấy sự tương đồng cao. Đối với các nền mẫu không chứa chất phân tích, cả hai kỹ thuật đều không phát hiện tín hiệu của các hợp chất aflatoxin. Đối với các mẫu được phát hiện chất phân tích, kết quả định lượng giữa hai kỹ thuật được trình bày trong **Bảng 6**, chênh lệch kết quả giữa hai kỹ thuật dao động từ 0,00 – 18,2%, mức chênh lệch này nằm trong giới hạn chấp nhận được khi xét đến độ không đảm bảo đo của phương pháp (đề cập mục 3.2.4). Đối với vật liệu chuẩn (RM), nhà sản xuất đã công bố giá trị ấn định và độ không đảm bảo đo của từng chất phân tích. Kết quả phân tích thu được bằng cả hai kỹ thuật đều nằm trong khoảng giá trị chấp nhận của mẫu RM, chứng tỏ độ đúng và độ tin cậy của phương pháp là phù hợp.

Các kết quả trên khẳng định phương pháp phân tích aflatoxin bằng HPLC-FLD có độ tin cậy tương đương với kỹ thuật đối chứng LC-MS/MS trong phạm vi nghiên cứu. Bên cạnh đó, phương pháp HPLC-FLD còn có ưu điểm về chi phí đầu tư và vận hành thấp hơn, phù hợp để triển khai phân tích định lượng thường quy trong các phòng thử nghiệm kiểm nghiệm an toàn thực phẩm.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã thực hiện xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp xác định hàm lượng các aflatoxin (B1, B2, G1, G2) sử dụng cột ái lực miễn dịch để làm sạch, kết hợp sắc ký lỏng hiệu năng cao detector huỳnh quang (HPLC-FLD). Kết quả cho thấy, phương pháp đạt độ đặc hiệu, độ chọn lọc cao; giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) đáp ứng hoàn toàn các mức giới hạn quy định tại QCVN 8-1:2011/BYT. Phương pháp có độ ổn định tốt với độ thu hồi trong khoảng 70 – 120% và độ chụm (độ lặp lại và độ tái lặp) có độ lệch chuẩn tương đối (RSD) đều < 20%. Phương pháp được ứng dụng để phân tích 100 mẫu thực tế, ghi nhận 5 mẫu nhiễm aflatoxin (chiếm tỷ lệ 5%), đáng chú ý toàn bộ các mẫu nhiễm này đều có hàm lượng aflatoxin vượt giới hạn tối đa cho phép. Đánh giá so sánh kết quả giữa hai kỹ thuật phân tích trên các mẫu phát hiện cho thấy sự sai khác nằm trong khoảng chấp nhận được. Mặc dù tỷ lệ mẫu nhiễm aflatoxin trong nghiên cứu này tương đối thấp, nhưng không thể chủ quan trước mối nguy này. Do aflatoxin có độc tính cao và khả năng tích lũy gây ung thư, việc kiểm soát chúng là bắt buộc. Vì vậy, cần tiếp tục duy trì các chương trình giám sát thường xuyên, tăng cường kiểm soát chất lượng và cải thiện điều kiện bảo quản nông sản nhằm giảm thiểu tối đa nguy cơ phơi nhiễm aflatoxin trong thực phẩm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. L. T. P. Thao, Investigation of Aflatoxin Contamination and Development of Technological Solutions for Post-Harvest Peanut Storage in the Central and Northern Regions of Vietnam, doctoral dissertation, Hanoi University of Science and Technology, Hanoi, Vietnam, 2018 [In Vietnamese].
- [2]. F. Kilicel, H. S. Karapinar, and A. Cimen, "Quantitation of aflatoxins in food materials using HPLC-FLD method," *Science Journal of Analytical Chemistry*, vol. 5, no. 6, pp. 90–97, 2017.
- [3]. E. Yohannis, M. M. Urugo, T. A. Teka, P. Getachew, Y. B. Tola, S. F. Forsido, Y. S. Kebede, and T. F. Teferra, "Aflatoxin contamination in agri-food systems: A comprehensive review of toxicity, food security, economic impacts, and sustainable mitigation across the value chain," *Food Science & Nutrition*, vol. 13, no. 10, Art. no. e71104, 2025.
- [4]. A. Jallow, H. Xie, X. Tang, Z. Qi, and P. Li, "Worldwide aflatoxin contamination of agricultural products and foods: From occurrence to control," *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, vol. 20, no. 3, pp. 2332–2381, 2021.
- [5]. Ministry of Health of Vietnam, QCVN 8-1:2011/BYT: National Technical Regulation on the Limits of Mycotoxins Contamination in Food, Hanoi, Vietnam: Ministry of Health of Vietnam, 2011.

- [6]. D. H. Tuan, Assessment of Contamination and Health Risks Associated with Mycotoxins in Foods in Selected Northern Provinces of Vietnam, doctoral dissertation, Hanoi University of Pharmacy, Hanoi, Vietnam, 2020 [In Vietnamese].
- [7]. European Food Safety Authority, Aflatoxins (Sum of B1, B2, G1, G2) in Cereals and Cereal-Derived Food Products, EFSA Supporting Publications, vol. 10, no. 3, EN-406, Parma, Italy: European Food Safety Authority, 2013.
- [8]. S. Bakirdere, S. Bora, E. G. Bakirdere, F. Aydın, Y. Arslan, O. T. Komesli, I. Aydın, and E. Yıldırım, "Aflatoxin species: Their health effects and determination methods in different foodstuffs," *Central European Journal of Chemistry*, vol. 10, no. 3, pp. 675–685, 2012.
- [9]. F. M. Trombete, T. B. Santos, G. M. Direito, M. E. Fraga, and T. Saldanha, "In-house validation of a method for determining aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in wheat and wheat by-products," *Pesquisa Agropecuária Tropical*, vol. 44, no. 3, pp. 255–262, 2014.
- [10]. Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan, Test Methods for Total Aflatoxin, Notification No. ShokuAn 0816-2, Tokyo, Japan: Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan, 2011.
- [11]. Ministry of Science and Technology of Vietnam, TCVN 12625:2019: Foodstuffs-Determination of Aflatoxins B1, B2, G1, G2, Total Aflatoxin and Ochratoxin A in Ginseng and Ginger-Liquid Chromatographic Method Using Immunoaffinity Column Cleanup, Hanoi, Vietnam: Ministry of Science and Technology of Vietnam, 2019 [In Vietnamese].
- [12]. Ministry of Science and Technology of Vietnam, TCVN 7930:2008: Foodstuffs-Determination of Aflatoxin B1 and the Sum of Aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in Cereals, Shell-Fruits and Derived Products-High Performance Liquid Chromatographic Method with Post-Column Derivatization and Immunoaffinity Column Clean-Up, Hanoi, Vietnam: Ministry of Science and Technology of Vietnam, 2008.
- [13]. AOAC International, "AOAC Official Method 991.31: Aflatoxins in corn, raw peanuts, and peanut butter: Immunoaffinity column (Aflatest) method," in *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 22nd ed., G. W. Latimer, Jr., Ed. Rockville, MD, USA: AOAC International, pp. C49-21–C49-22, 2023.
- [14]. C. M. Weaver and M. W. Trucksess, "Determination of aflatoxins in botanical roots by a modification of AOAC Official MethodSM 991.31: Single-laboratory validation," *Journal of AOAC International*, vol. 93, no. 1, pp. 184–189, 2010.
- [15]. VICAM, AflaTest Fluorometer Instruction Manual, Cat. No. 715001734, Milford, MA, USA: VICAM, a Waters Business, 2014.
- [16]. AOAC International, "Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements," in *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 22nd ed., G. W. Latimer, Jr., Ed. Rockville, MD, USA: AOAC International, 2023.
- [17]. Shimadzu Corporation, "Quantitation by HPLC and identification by LC/MS for total aflatoxins in food," *Application News*, no. L435, 2012.
- [18]. European Committee for Standardization, EN 14123:2003: Foodstuffs-Determination of Aflatoxin B1 and the Sum of Aflatoxin B1, B2, G1 and G2 in Peanuts, Pistachios, Figs and Paprika Powder-High-Performance Liquid Chromatographic Method with Post-Column Derivatization and Immunoaffinity Column Clean-Up. Brussels, Belgium: European Committee for Standardization, 2003.
- [19]. N. V. Thuan, D. Oanh, N. T. T. Mai, and D. T. Khuyen, "Surveying the levels of mold and aflatoxin in maize and peanut in some households in Ea H'Leo, Cu M'Gra, Krong Pac districts in Daklak province in 2016," *Vietnam Journal of Food Control*, vol. 5, no. 3, pp. 414–421, 2022.