

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY METHOD FOR THE QUANTIFICATION OF AFLATOXIN B1 IN HERBAL DRUGS AND CEREALS

Chu Van Men^{1*}, Pham Huy Hoang¹, Nguyen Van Chuyen¹, Nguyen Van Ba¹
Nguyen An Bao Chau², Do Quang Minh³, Ngo Dinh Nhan⁴, Ngo Hoang Yen Nhi⁴

¹Vietnam Military Medical University - 160 Phung Hung, Ha Dong district, Hanoi, Vietnam

²Vinschool Smart City Secondary and High School - Vinhomes Smart City, Tay Mo ward, Ha Dong district, Hanoi, Vietnam

³Le Loi High School - 72 Ba Trieu, Ha Dong district, Hanoi, Vietnam

⁴Drug Administration, Ministry of Health - 138A Giang Vo, Ba Dinh district, Hanoi, Vietnam

Received: 11/5/2025

Revised: 13/5/2025; Accepted: 17/5/2025

ABSTRACT

Objectives: A high-performance liquid chromatography method was developed and validated for the quantification of Aflatoxin B1 in Herbs and cereals.

Method: The proposed method was validated according to ICH guidelines for specificity, repeatability, linearity, accuracy, and precision.

Results: The method was achieved including Waters C18 column (50 mm × 2.1 mm; 1.7 μm), the mobile phase contained aqueous 0.1% phosphoric acid:acetonitrile 0.2% (33:67) in isocratic with flow rate of 0.2 ml/min, injection volume of 20 μl, and detector PDA-UV at 354 nm. The developed method showed the present of Aflatoxin B1 in 2 Herbs and cereals samples, account for about 2% of samples analyzed.

Conclusion: The study was successfully developed and validated high-performance liquid chromatography method for quantification of Aflatoxin B1 in Herbs and cereals. This is the background for further studies.

Keywords: Herbal drugs, cereals, Aflatoxin B1, high-performance liquid chromatography.

*Corresponding author

Email: chuvanmen@vmmu.edu.vn Phone: (+84) 353212500 <https://doi.org/10.52163/yhc.v66iCD8.2573>



XÂY DỰNG VÀ THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG AFLATOXIN B1 TRONG DƯỢC LIỆU, NGŨ CỐC BẰNG SẮC KÝ LỒNG HIỆU NĂNG CAO

Chữ Văn Mến^{1*}, Phạm Huy Hoàng¹, Nguyễn Văn Chuyên¹, Nguyễn Văn Ba¹
Nguyễn An Bảo Châu², Đỗ Quang Minh³, Ngô Đình Nhân⁴, Ngô Hoàng Yến Nhi⁴

¹Học viện Quân y - 160 Phùng Hưng, quận Hà Đông, Hà Nội, Việt Nam

²Trường Trung học cơ sở và Trung học phổ thông Vinschool Smart City - Vinhomes Smart City, phường Tây Mỗ, quận Hà Đông, Hà Nội, Việt Nam

³Trường Trung học phổ thông Lê Lợi - 72 Bà Triệu, quận Hà Đông, Hà Nội, Việt Nam

⁴Cục Quản lý Dược, Bộ Y tế - 138A Giảng Võ, quận Ba Đình, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài: 11/5/2025

Ngày chỉnh sửa: 13/5/2025; Ngày duyệt đăng: 17/5/2025

TÓM TẮT

Mục tiêu: Xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng Aflatoxin B1 trong dược liệu, ngũ cốc bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao.

Phương pháp: Khảo sát, lựa chọn điều kiện sắc ký, đánh giá theo hướng dẫn của ICH để thẩm định phương pháp phân tích.

Kết quả: Đã xác định được các điều kiện sắc ký gồm cột Waters C18 (50 × 2,1 mm; 1,7 μm), pha động acid phosphoric 0,1%:acetonitril (B) (33:67) chạy theo chương trình isocratic, tốc độ pha động 0,2 ml/phút, thể tích bơm mẫu là 5 μL và detector PDA-UV tại bước sóng 354 nm. Kết quả thẩm định cho thấy phương pháp có độ đặc hiệu, độ chính xác, độ đúng cao, giới hạn định lượng thấp, đáp ứng yêu cầu về độ tuyến tính. Kết quả định lượng cho thấy có 2 mẫu dược liệu có phát hiện Aflatoxin B1 chiếm khoảng 2% số mẫu phân tích.

Kết luận: Nghiên cứu đã xây dựng và thẩm định được phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao để định lượng Aflatoxin B1 trong dược liệu, ngũ cốc.

Từ khóa: Dược liệu, ngũ cốc, Aflatoxin B1, sắc ký lỏng hiệu năng cao.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong đời sống hàng ngày, việc nhiễm độc tố tự nhiên của thực phẩm, dược liệu với độc tố nấm mốc là khó có thể tránh khỏi và dự đoán trước, vì vậy đặt ra rất nhiều khó khăn trong an toàn sức khỏe đối với mọi người khi sử dụng các sản phẩm thực phẩm, dược liệu [1]. Độc tố nấm mốc được tạo ra dưới dạng chuyển hóa thứ cấp của nấm, bởi các chủng nấm khác nhau như *Aspergillus flavus*, *A. parvius*, *P. expansum*, *A. ochraceus*... [2]. Những độc tố phổ biến nhất và được tìm thấy nhiều là các Aflatoxin chủ yếu do nấm *A. flavus* và *A. parvius* tạo ra, ít nhất đã có 13 loại Aflatoxin khác nhau được tạo ra trong thiên nhiên và phần lớn trong số đó được biết đến có độc tính cao và gây ung thư, trong đó Aflatoxin B1 được xác định là chất độc nhất [3]. Tiếp xúc với lượng lớn Aflatoxin B1 có thể gây ra các nhiễm độc cấp tính, gây độc tế bào, hoại tử các tế bào. Ngoài ra, việc tiếp xúc với Aflatoxin B1 liều thấp trong thời gian dài sẽ gây ra các bệnh mạn tính, phổ biến và nghiêm trọng nhất là ung thư biểu mô tế bào gan [4]. Bệnh cạnh đó, khi tiếp xúc lâu dài với các Aflatoxin

cũng gây ra các bệnh nghiêm trọng khác như nhiễm độc gan, ức chế miễn dịch, gây quái thai [5].

Việt Nam là quốc gia khí hậu nhiệt đới gió mùa nóng ẩm, tài nguyên thực vật đa dạng và phong phú với hàng trăm loại dược liệu quý, tốt cho sức khỏe, rất nhiều các bài thuốc cổ truyền được sử dụng từ nghìn đời nay. Bên cạnh đó, với việc phát triển khoa học công nghệ, rất nhiều cây thuốc đã được nghiên cứu chứng minh tác dụng. Vì vậy, việc sử dụng các sản phẩm từ dược liệu đang được sử dụng ngày càng nhiều. Bên cạnh đó, với nguồn thực phẩm phong phú, dồi dào, nhất là các loại gạo, các loại hạt thì ngũ cốc cũng là nguồn thực phẩm được sử dụng phổ biến và rộng rãi tại Việt Nam, nhiều nghiên cứu đã chỉ ra các tác dụng về sức khỏe và dinh dưỡng ở ngũ cốc. Vì khí hậu ở Việt Nam là nước nhiệt đới ẩm, dược liệu và ngũ cốc rất dễ nhiễm nấm mốc, nên nguy cơ có Aflatoxin B1 là rất cao, cần phải được kiểm soát để tránh các vấn đề về sức khỏe do Aflatoxin B1 gây ra khi sử dụng dược liệu và ngũ cốc có thể nhiễm Aflatoxin B1.

Hàm lượng Aflatoxin B1 rất thấp trong dược liệu, vì

*Tác giả liên hệ

Email: chuvanmen@vmmu.edu.vn Điện thoại: (+84) 353212500 <https://doi.org/10.52163/yhc.v66iCD8.2573>

vậy để xác định chính xác cần các phương pháp phân tích hiện đại như sắc ký lỏng hiệu năng cao (high-performance liquid chromatography - HPLC), sắc ký lỏng khối phổ (LC-MS/MS)... HPLC với khả năng định lượng hàm lượng vết trong dược liệu, tính chính xác cao, thiết bị hóa chất ít phức tạp hơn phương pháp LC-MS/MS. Tại Việt Nam, chưa có nghiên cứu nào xác định hàm lượng Aflatoxin B1 trong dược liệu và ngũ cốc bằng HPLC, chính vì vậy, trong nghiên cứu này chúng tôi xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng Aflatoxin B1 trong một số dược liệu và ngũ cốc bằng phương pháp HPLC, đồng thời áp dụng phương pháp xây dựng được để phân tích 100 mẫu dược liệu và ngũ cốc thu được trong thời gian từ năm 2023 tại Việt Nam.

2. ĐỐI TƯỢNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng, vật liệu nghiên cứu

- Dược liệu, ngũ cốc được thu ở các chợ và khu vực khác nhau tại Hà Giang và Hà Nội vào tháng 4/2023, được nghiền nhỏ qua cỡ rây 1400/355, cho vào túi zipper để ở điều kiện phòng thí nghiệm ký hiệu từ DL01-DL50 và NC01-NC50.

- Aflatoxin B1 chuẩn 98% do Công ty Sigma của Mỹ cung cấp.

- Methanol, acid formic, ethanol và các hóa chất khác đạt tiêu chuẩn phân tích HPLC.

- Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao Waters Acquity (Mỹ), cột Waters C18 ($50 \times 2,1$ mm; $1,7 \mu\text{m}$), cột chiết pha rắn Alltech (thể tích 4 ml) chứa hạt hấp phụ pha đảo C18; cân phân tích, máy lắc siêu âm.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Khảo sát, xây dựng điều kiện sắc ký

- Chuẩn bị dung dịch chuẩn và thử:

+ Mẫu chuẩn: hòa tan 1 mg Aflatoxin B1 chuẩn trong 50 ml ACN để được dung dịch có nồng độ 20 $\mu\text{g/ml}$.

+ Mẫu thử: cân chính xác khoảng 10,0g bột dược liệu; chiết siêu âm với 100 ml ethanol 30% ($\times 3$ lần) trong 90 phút. Lọc dịch chiết qua giấy lọc, cho hấp phụ qua cột chiết pha rắn. Tiếp đó cột được rửa giải 2 lần với nước cất. Sau đó được rửa giải với 4 ml acetonitril với tốc độ 20 giọt/phút. Dịch rửa giải được bốc hơi trong dòng khí nitơ tới khô ở nhiệt độ 40°C , cần được hòa vào pha động, đưa vào máy ly tâm để ly tâm với tốc độ 10.000 vòng trong 2 phút, sau đó gạn lấy lớp trên, cuối cùng lọc qua màng lọc $0,45 \mu\text{m}$ và tiêm vào hệ thống sắc ký.

+ Mẫu trắng: dung môi pha động.

- Lựa chọn điều kiện sắc ký: cột Waters C18 ($50 \times 2,1$ mm; $1,7 \mu\text{m}$); pha động: acid phosphoric 0,1%:acetonitril (B) (33:67) chạy theo chương trình isocratic, tốc độ pha động 0,2 ml/phút, thể tích bơm mẫu là 5 μL , và detector PDA-UV tại bước sóng 354 nm.

- Thẩm định phương pháp phân tích [6]: thực hiện yêu

cầu chung của ICH (International Conference on Harmonization), phương pháp phân tích được thẩm định về độ đặc hiệu, tính tương thích của hệ thống sắc ký, độ đúng và độ lặp lại, giới hạn phát hiện (LOD), khoảng tuyến tính và giới hạn định lượng (LOQ).

- Áp dụng phương pháp xây dựng được định lượng Aflatoxin B1 trong mẫu dược liệu, ngũ cốc: sử dụng phương pháp đã được thẩm định tiến hành định lượng một số mẫu dược liệu, ngũ cốc thu tại Hà Giang và Hà Nội vào tháng 4/2023.

2.3. Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý phân tích thống kê trên các phần mềm chuẩn Excel.

2.4. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu tuân thủ đầy đủ các quy định về đạo đức trong lĩnh vực nghiên cứu y sinh học và cam kết không có xung đột lợi ích trong nghiên cứu.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả khảo sát tối ưu hóa điều kiện chiết và điều kiện sắc ký

- Kết quả lựa chọn phương pháp chiết: cân khoảng 10,0g dược liệu cho vào bình chiết, dung môi chiết xuất là MeOH 40%, chiết 3 lần (50-30-20 ml), thời gian chiết là 90 phút. Tiến hành khảo sát 2 phương pháp là phương pháp chiết siêu âm và phương pháp chiết hồi lưu. Kết quả ở cho thấy phương pháp chiết siêu âm cho diện tích pic cao hơn, tiến hành đơn giản hơn so với phương pháp hồi lưu. Do vậy, phương pháp chiết siêu âm được lựa chọn cho các khảo sát tiếp theo.

- Kết quả khảo sát dung môi chiết: kết quả khảo sát dung môi chiết giữa methanol và ethanol ở các nồng độ 90%, 70%, 50% và 30% cho thấy, trong 90 phút bằng phương pháp siêu âm ở các nồng độ thì chiết bằng ethanol 30% cho diện tích pic là cao nhất. Từ các kết quả trên, chúng tôi đưa ra điều kiện xử lý mẫu tối ưu như sau: cân chính xác khoảng 10,0g bột dược liệu chiết siêu âm với 100 ml EtOH 30% trong 90 phút. Lọc dịch chiết qua giấy lọc, cho hấp phụ qua cột chiết pha rắn. Tiếp đó cột được rửa giải 2 lần với nước cất. Sau đó được rửa giải với 4 ml acetonitril với tốc độ 20 giọt/phút. Dịch rửa giải được bốc hơi trong dòng khí nitơ tới khô ở nhiệt độ 40°C , cần được hòa vào pha động, đưa vào máy ly tâm để ly tâm với tốc độ 10.000 vòng trong 2 phút, sau đó gạn lấy lớp trên, cuối cùng lọc qua màng lọc $0,45 \mu\text{m}$ và tiêm vào hệ thống sắc ký.

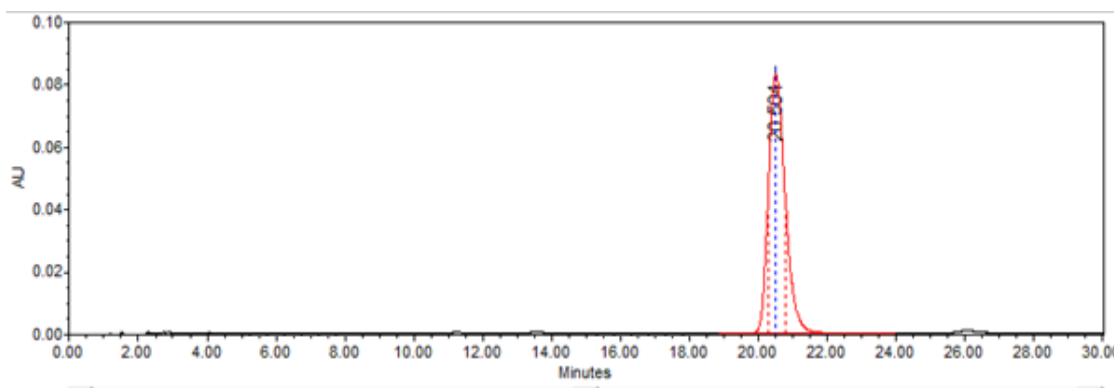
Khảo sát các điều kiện HPLC được lựa chọn theo yêu cầu để thu được sắc ký đồ với độ phân giải tốt hơn của các pic liên kế trong thời gian lưu tốt hơn. Các dung dịch rửa giải sắc ký được thêm các loại acid khác nhau (acid acetic, acid formic, acid phosphoric) ở các nồng độ khác nhau (0,01, 0,05 và 0,1 M) để tiến hành khảo sát, đánh giá khả năng tách các thành phần trong mẫu. Kết quả cho thấy: acid phosphoric 0,1%:acetonitril (B) (33:67) chạy theo chương trình isocratic cho kết quả tốt hơn các hệ còn lại, do đó hệ này được lựa chọn làm điều kiện sắc ký.

Khảo sát tín hiệu thu được ở bước sóng từ 200-400 nm cho thấy tại bước sóng 354 nm giá trị tỉ lệ tín hiệu trên nhiễu cao nhất, do đó bước sóng này được chọn để phân tích. Sắc ký đồ thu được từ các mẫu chuẩn và mẫu thử được thể hiện rõ. Các đỉnh sắc ký của chất phân tích trong mẫu được xác định bằng cách so sánh thời gian lưu của chúng với thời gian lưu của chất chuẩn đối chiếu.

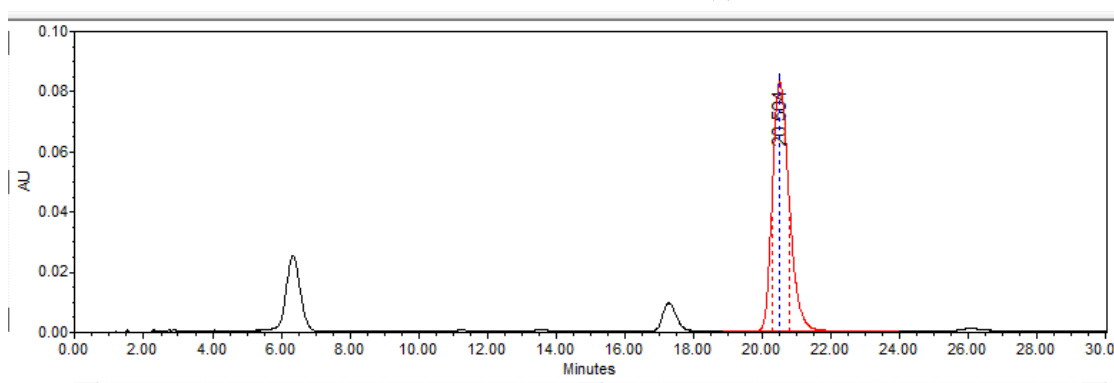
3.2. Kết quả thẩm định phương pháp

3.2.1. Kết quả thẩm định phương pháp định lượng Aflatoxin B1 trong dược liệu

- Sắc ký đồ của Aflatoxin B1 trong mẫu chuẩn (a) và mẫu thử (b) ở nồng độ EtOH 30%.



Mẫu Aflatoxin B1 chuẩn (a)

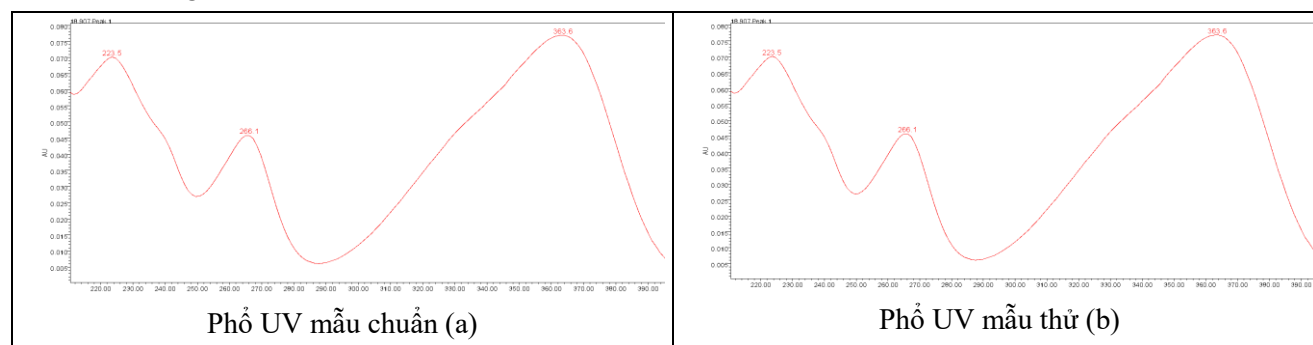


Mẫu thử (b)

Hình 1. Sắc ký đồ của Aflatoxin B1 trong mẫu chuẩn (a) và mẫu thử (b) từ dịch chiết dược liệu

Kết quả cho thấy hình ảnh pic tách rõ ràng, sắc nét, nhiễu nền thấp. Thời gian xuất hiện pic Aflatoxin B1 trong mẫu thử là 24,343 phút, tương ứng với thời gian xuất hiện pic Aflatoxin B1 mẫu chuẩn (24,330 phút) (hình 1).

So sánh về phổ hấp thụ UV của mẫu thử và mẫu chuẩn. Kết quả chồng phổ cho thấy: mẫu thử và mẫu chuẩn có độ trùng khít của phổ là 0,99 (hình 2). Chứng tỏ pic thu được trên sắc ký đồ giữa mẫu thử tinh khiết và các thành phần khác có trong mẫu thử không ảnh hưởng đến việc phân tích Aflatoxin B1, từ đó cho phép tiến hành định tính, định lượng.



Hình 2. Phổ UV của Aflatoxin B1 trong mẫu chuẩn (a) và mẫu thử (b) từ dịch chiết dược liệu

3.2.2. Tính tương thích hệ thống

Tiến hành sắc ký lặp lại 6 lần mẫu chuẩn Aflatoxin B1 nồng độ 5,0 $\mu\text{g/L}$ theo điều kiện sắc ký. Kết quả tính tương thích hệ thống được thể hiện ở bảng 1. Tính thích hợp của hệ thống sắc ký được đánh giá dựa vào độ lệch chuẩn tương đối, diện tích pic, thời gian lưu.

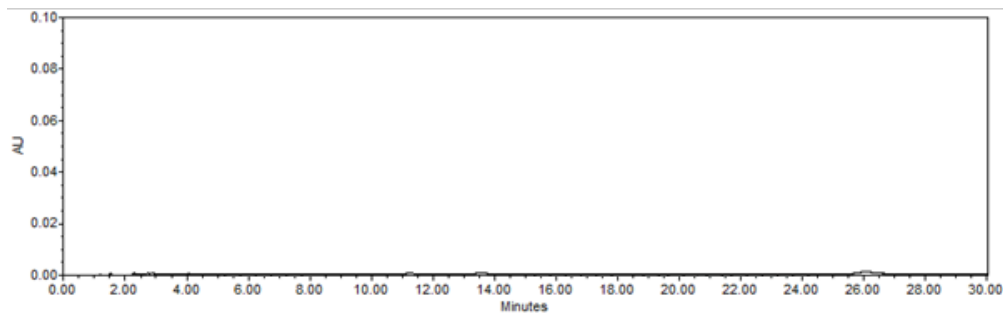
Bảng 1. Kết quả tính tương thích của hệ thống sắc ký được đánh giá

STT	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (mAU*s)	Số đĩa lý thuyết	Hệ số bất đối xứng
1	20,505	119010,35	77833	1,04
2	20,501	110534,71	79957	1,07
3	20,504	118272,46	77225	1,03
4	20,502	119179,91	78318	1,05
5	20,503	114448,06	77448	1,04
6	20,505	115393,37	79886	1,07
$\bar{X} \pm SD$	$20,503 \pm 0,001$	$116139,8 \pm 3372,44$	78444 ± 1203	$1,05 \pm 0,016$
RSD (%)	0,08	2,93	1,53	1,59

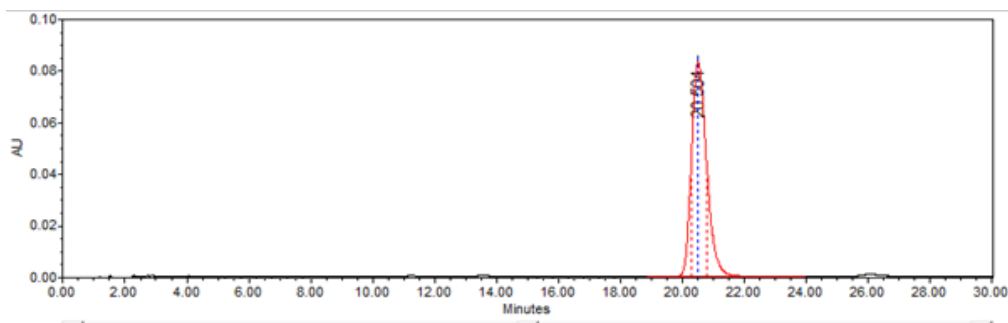
Kết quả ở bảng 1 cho thấy độ lệch chuẩn tương đối RSD (%) về diện tích pic 1,53 và thời gian lưu 0,08 đều nhỏ hơn 2%. Như vậy, phương pháp phù hợp với hệ thống phân tích.

3.2.3. Tính đặc hiệu

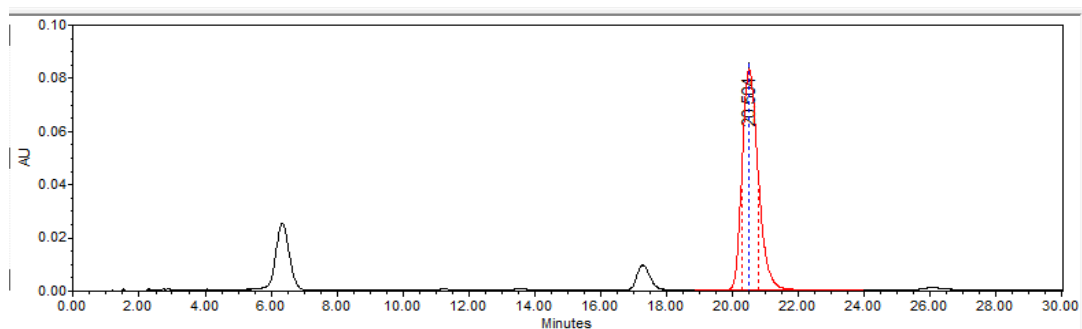
Tiến hành phân tích đồng thời mẫu chuẩn Aflatoxin B1, mẫu trắng và mẫu thử trong cùng điều kiện sắc ký (kết quả thể hiện ở hình 3). Kết quả cho thấy: thời gian xuất hiện pic của Aflatoxin B1 trên sắc ký đồ mẫu thử và mẫu chuẩn như nhau. Pic không xuất hiện ở mẫu trắng trong thời gian tương ứng. Pic trên mẫu chuẩn và mẫu thử sắc nét, rõ ràng, độ rộng chân pic nhỏ. Kết quả cho thấy phương pháp phân tích có tính đặc hiệu đảm bảo.



Mẫu trắng (a)



Mẫu Aflatoxin B1 chuẩn (b)



Mẫu thử (c)

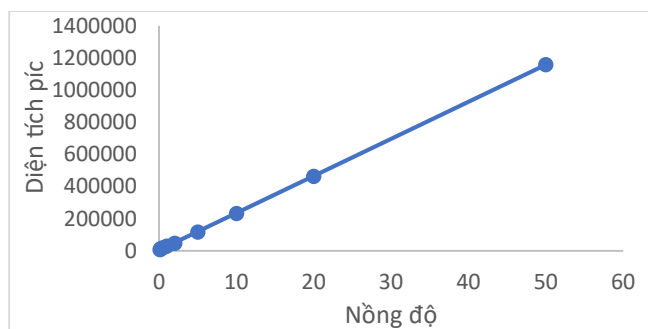
Hình 3. Sắc ký đồ của Aflatoxin B1 trong 3 mẫu: mẫu trắng (a), mẫu chuẩn (b), mẫu thử (c)

3.2.4. Khoảng nồng độ tuyến tính

Khảo sát khoảng tuyến tính của phương pháp, nghiên cứu tiến hành pha một dãy dung dịch chuẩn có nồng độ 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 20,0; 50,0 µg/L, sau đó xác định tương quan giữa diện tích pic và nồng độ các dung dịch Aflatoxin B1 chuẩn.

Bảng 2. Sự tương quan giữa S pic và nồng độ Aflatoxin B1 chuẩn

STT	Nồng độ chuẩn Aflatoxin B1 (µg/L)	Diện tích pic (µV*s)
1	0,1	7199
2	0,2	12542
3	0,5	18911
4	1	29801
5	2	46391
6	5	115977
7	10	231955
8	20	463910
9	50	1159775



Hình 4. Đồ thị tương quan giữa diện tích pic và nồng độ Aflatoxin B1 chuẩn

Kết quả ở bảng 2 và hình 4 cho thấy khoảng nồng độ khảo sát có sự tương quan tuyến tính giữa diện tích pic và nồng độ Aflatoxin B1 chuẩn với phương trình đường chuẩn là $y = 4117x + 23078$, giá trị $R^2 = 0,9999$.

3.2.5. Độ đúng và độ lặp lại

Bảng 3. Kết quả đánh giá độ lặp lại

STT	Nồng độ Aflatoxin B1 (µg/L)	Diện tích pic (µV*s)	Nồng độ Aflatoxin B1 (µg/L) tính theo đường chuẩn
1	10,0	231955,00	10,02
2	10,0	228036,20	9,85
3	10,0	237931,21	10,28
4	10,0	225475,03	9,74
5	10,0	228872,50	9,89
6	10,0	239249,94	10,34
$\bar{X} \pm SD$		231919,98 $\pm$ 5095,31	10,02 $\pm$ 0,22
RSD (%)		2,20	2,20

Kết quả bảng 3 cho thấy phương pháp có độ lặp lại cao với $RSD = 2,2\%$.

Bảng 4. Kết quả đánh giá độ đúng

STT	Thêm vào	Tim lại	Độ thu hồi	$\bar{X} \pm SD$	RSD
1	3,062 µg	3,01 µg	98,40%	100,60 $\pm$ 1,91	1,90%
2	3,062 µg	3,12 µg	101,81%		
3	3,062 µg	3,11 µg	101,61%		
4	7,655 µg	6,77 µg	88,44%	89,22 $\pm$ 0,85	0,96%
5	7,655 µg	6,90 µg	90,13%		
6	7,655 µg	6,82 µg	89,09%		
7	15,31 µg	15,00 µg	97,96%	97,2 $\pm$ 1,82	1,88%
8	15,31 µg	14,56 µg	95,12%		
9	15,31 µg	15,08 µg	98,51%		

Kết quả phân tích dung dịch thử thêm chuẩn được trình bày ở bảng 4. Tỷ lệ thu hồi ở các nồng độ khác nhau từ 88,44 đến 101,81 nằm trong khoảng 80-120% so với lượng chuẩn thêm vào; RSD thu được từ 0,96 đến 1,90 nhỏ hơn 2%, chứng tỏ phương pháp được phát triển đảm bảo độ chính xác trong khoảng nồng độ 80-120% nồng độ định lượng theo yêu cầu của ICH.

3.2.6. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng

Tiến hành xác định giới hạn phát hiện (LOD) bằng cách định lượng hoạt chất có trong mẫu thử, sau đó pha loãng dung dịch thử này nhiều lần để được các dung dịch thử có nồng độ giảm dần, tiến hành sắc ký để xác định nồng độ tối thiểu mà tại đó còn phát hiện được đáp ứng của chất phân tích. Kết quả cho thấy giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của Aflatoxin B1 lần lượt là 0,1 µg/L và 0,4 µg/L.

3.2.7. Kết quả áp dụng phương pháp đã thẩm định định lượng Aflatoxin B1 trong dược liệu và ngũ cốc

Sử dụng phương pháp thẩm định được tiến hành định lượng các mẫu dược liệu, chỉ phát hiện 2 mẫu (trong 100 mẫu phân tích) có Aflatoxin B1, kết quả thể hiện ở bảng 5.

Bảng 5. Hàm lượng Aflatoxin B1 trong dược liệu

Mẫu	Khối lượng DL (g)	Hàm lượng (µg/kg)
DL15	10,042	5,08
NC18	10,012	10,40

Kết quả cho thấy tỷ lệ mẫu có hàm lượng Aflatoxin B1 trên ngưỡng phát hiện trong dược liệu và ngũ cốc lần lượt là 5,08 và 10,4 µg/kg. Phương pháp đã xây dựng cho độ chính xác và tin cậy cao.

4. BÀN LUẬN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng Aflatoxin B1 trong ngũ cốc và dược liệu bằng phương pháp sắc ký lỏng siêu hiệu năng cao. Đặc điểm của phương pháp là sử dụng cột siêu hiệu năng với kích thước hạt rất bé, khoảng 1,7

μm , đồng thời áp suất cột rất cao và lượng dung môi sử dụng rất ít, nên tiết kiệm được dung môi, trong khi vẫn đảm bảo hiệu lực tách chất tốt, đặc biệt tách rất rõ Aflatoxin B1 khỏi các pic tạp khác. Nghiên cứu sử dụng phương pháp chiết pha rắn để cô đặc mẫu phân tích, nhằm phát hiện Aflatoxin B1 ở ngưỡng nồng độ thấp. Mẫu được xử lý với các dung môi và phương pháp khác nhau để lựa chọn phương pháp tối ưu. Kết quả thẩm định cho thấy phương pháp có độ đặc hiệu cao, khoảng tuyến tính rộng, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng thấp, cho phép định lượng các mẫu có hàm lượng thấp. Độ đúng và độ lặp lại cao đáp ứng các yêu cầu của ICH và AOAC. Kết quả phân tích các mẫu cho thấy tỷ lệ mẫu được liệu và ngũ cốc có nhiễm Aflatoxin B1 khoảng 2% số mẫu. Tỷ lệ này phù hợp với các công bố trước đây.

5. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xây dựng và thẩm định được phương pháp định lượng Aflatoxin B1 trong dược liệu, ngũ cốc bằng phương pháp HPLC sử dụng cột Waters C18 ($50 \times 2,1 \text{ mm}$; $1,7 \mu\text{m}$); pha động acid phosphoric 0,1%:acetonitril (B) (33:67) chạy theo chương trình isocratic, tốc độ pha động 0,2 ml/phút, thể tích bơm mẫu là $5 \mu\text{L}$ và detector PDA-UV tại bước sóng 354 nm. Kết quả thẩm định chỉ ra rằng phương pháp có độ tuyến tính cao, độ đúng, độ chính xác, độ đặc hiệu cao, giới hạn định lượng thấp cho phép định lượng các mẫu có hàm lượng hoạt chất thấp.

*

* *

Công trình này được hỗ trợ từ đề tài độc lập cấp nhà nước “Nghiên cứu đặc điểm nhiễm độc tố vi nấm trong một số thực phẩm tại Việt Nam và chế tạo que thử bán định lượng phát hiện nhanh, đồng thời một số độc tố vi nấm”, mã số ĐTĐL.CN-04/21.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Park D.L. Effect of processing on Aflatoxin. *Mycotoxins and food safety*, 2002, 173-179.
- [2] Sweeney M.J, Dobson A.D. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *Int J Food Microbiol*, 1998, 43 (3): 141-158.
- [3] Bộ Y tế. Dược điển Việt Nam V, tập 2, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 2017.
- [4] Fouad A.M, Ruan D, El-Senousey H.K et al. Harmful effects and control strategies of Aflatoxin B1 produced by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* strains on poultry, 2019, 11 (3): 176.
- [5] Marchese S, Polo A, Ariano A, Velotto S, Costantini S, Severino L. Aflatoxin B1 and M1: Biological Properties and Their Involvement in Cancer Development. *Toxins (Basel)*, 2018, vol.10, No.6.
- [6] International Conference on Harmonization (ICH) Q2B. Validation of Analytical Procedures: Methodology. Published in the Federal Register, 2023.
- [7] Oliveira M, Pereira C, Bessa C, Araujo R, Saraiva L. Chronological aging in conidia of pathogenic *Aspergillus*: Comparison between species. *J. Microbiol. Methods*, 2015, vol.118, pp. 57-63.
- [8] Li C, Liu X, Wu J, Ji X, Xu Q. Research progress in toxicological effects and mechanism of Aflatoxin B1 toxin. *PeerJ*, 2022, vol. 10, p. e13850.
- [9] Ramadan N.A, Al-Ameri H.A, Ramadan N.A, Al-Ameri H.A. Aflatoxins. *Aflatoxins - Occur. Detoxif. Determ. Heal. Risks*, 2022.
- [10] Marchese S, Polo A, Ariano A, Velotto S, Costantini S, Severino L. Aflatoxin B1 and M1: Biological Properties and Their Involvement in Cancer Development. *Toxins* 2018, 2018, vol.10, no.6, pp. 214.