

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC DƯỢC HÀ NỘI



ĐỖ HỮU TUẤN

**ĐÁNH GIÁ Ô NHIỄM VÀ NGUY CƠ
DO ĐỘC TỔ VI NẤM TRONG
THỰC PHẨM TẠI MỘT SỐ TỈNH
PHÍA BẮC VIỆT NAM**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

HÀ NỘI, NĂM 2020

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC DƯỢC HÀ NỘI



ĐỖ HỮU TUẤN

**ĐÁNH GIÁ Ô NHIỄM VÀ NGUY CƠ
DO ĐỘC TỔ VI NẤM TRONG
THỰC PHẨM TẠI MỘT SỐ TỈNH
PHÍA BẮC VIỆT NAM**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

CHUYÊN NGÀNH: KIỂM NGHIỆM THUỐC VÀ ĐỘC CHẤT

MÃ SỐ: 62720410

Người hướng dẫn khoa học: **GS.TS. Thái Nguyễn Hùng Thu**
GS.TS. Lê Danh Tuyên

HÀ NỘI, NĂM 2020

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi dưới sự hướng dẫn của GS.TS. Thái Nguyễn Hùng Thu và GS.TS. Lê Danh Tuyên. Các số liệu, kết quả nêu trong luận án là trung thực và chưa từng được ai công bố trong bất kỳ công trình nào khác.

Tác giả luận án

Đỗ Hữu Tuấn

LỜI CẢM ƠN

Sau thời gian học tập và nghiên cứu thực hiện luận án dưới sự hướng dẫn của GS.TS. Thái Nguyễn Hùng Thu và GS.TS. Lê Danh Tuyên,

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới:

GS.TS. Thái Nguyễn Hùng Thu, giảng viên cao cấp, Nguyên Phó Hiệu trưởng Trường Đại học Dược Hà Nội, **GS.TS. Lê Danh Tuyên**, Viện trưởng Viện Dinh dưỡng, là hai người Thầy đã tận tình định hướng, hướng dẫn, giúp đỡ cho tôi những kiến thức quý báu để tôi hoàn thành luận án.

Ban Lãnh đạo Cục An toàn thực phẩm đã tạo điều kiện thuận lợi cho tôi tham gia học tập và hoàn thành luận án. **Các cán bộ Viện Kiểm nghiệm vệ sinh an toàn thực phẩm quốc gia, Viện Dinh dưỡng, Chi Cục An toàn vệ sinh thực phẩm các tỉnh/thành phố Hà Nội, Hà Giang, Bắc Giang, Thái Bình, Thanh Hóa** đã tạo điều kiện hỗ trợ tôi trong suốt quá trình thực hiện luận án.

Các Thầy, Cô Bộ môn Hoá phân tích - Độc chất và Phòng Sau đại học, Trường Đại học Dược Hà Nội đã giúp đỡ tôi trong quá trình học tập và nghiên cứu tại trường.

PGS.TS. Lê Thị Hồng Hảo, TS. Trần Cao Sơn đã hết lòng ủng hộ và giúp đỡ tôi trong quá trình nghiên cứu hoàn thành luận án.

Các anh chị em và các đồng nghiệp ở Cục An toàn thực phẩm đã đồng viên, giúp đỡ và chia sẻ với những khó khăn trong công việc.

Và cuối cùng, tôi xin chân thành cảm ơn gia đình, bạn bè đã quan tâm động viên tôi trong quá trình học tập và thực hiện luận án.

Tác giả luận án

Đỗ Hữu Tuấn

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
MỤC LỤC	iii
DANH MỤC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT	vi
DANH MỤC CÁC BẢNG, BIỂU	ix
DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ	xii
ĐẶT VẤN ĐỀ	1
Chương 1_TỔNG QUAN	3
1.1. TỔNG QUAN VỀ MỘT SỐ ĐỘC TỐ VI NẤM	3
1.1.1. Khái niệm độc tố vi nấm.....	3
1.1.2. Một số độc tố vi nấm	4
1.2. TÌNH HÌNH THỰC PHẨM BỊ NHIỄM ĐỘC TỐ VI NẤM TRÊN THẾ GIỚI VÀ TRONG NƯỚC.....	9
1.2.1. Tình hình ngộ độc độc tố vi nấm từ thực phẩm.....	9
1.2.2. Tình hình nhiễm độc tố vi nấm trong thực phẩm	12
1.3. CÁC PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH ĐỘC TỐ VI NẤM TRONG THỰC PHẨM.....	17
1.3.1. Giới thiệu chung.....	17
1.3.2. Phương pháp QuEChERS ứng dụng xác định đồng thời các độc tố vi nấm	19
1.3.3. Các kỹ thuật phân tích độc tố vi nấm.....	23
1.3.4. Yêu cầu đối với phương pháp phân tích độc tố vi nấm	26
1.4. ĐÁNH GIÁ NGUY CƠ ĐỘC TỐ VI NẤM TRONG THỰC PHẨM.....	27
1.4.1. Giới thiệu về đánh giá nguy cơ	27
1.4.2. Cách tiếp cận về đánh giá nguy cơ ĐTVN.....	31
1.4.3. Nghiên cứu đánh giá nguy cơ độc tố vi nấm trên thế giới	33
1.4.4. Nghiên cứu đánh giá nguy cơ ĐTVN ở Việt Nam	39
Chương 2 _ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	42
2.1. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG TIỆN NGHIÊN CỨU	42

2.1.1. Đối tượng nghiên cứu	42
2.1.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu.....	42
2.1.3. Phương tiện nghiên cứu	42
2.2. NỘI DUNG NGHIÊN CỨU	44
2.2.1. Xây dựng phương pháp xác định đồng thời các độc tố vi nấm bằng LC-MS/MS.....	44
2.2.2. Xác định tỷ lệ nhiễm và hàm lượng các độc tố vi nấm trong các mẫu lấy tại một số địa phương phía Bắc Việt Nam	45
2.2.3. Đánh giá nguy cơ ĐTVN.....	45
2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	45
2.3.1. Xây dựng phương pháp xác định các độc tố vi nấm trong ngũ cốc và hạt có dầu.....	45
2.3.2. Phương pháp lấy mẫu để đánh giá mức độ nhiễm độc tố vi nấm.....	50
2.3.3. Phương pháp điều tra tiêu thụ thực phẩm.....	51
2.3.4. Phương pháp đánh giá nguy cơ.....	53
2.3.5. Phương pháp xử lý số liệu	54
Chương 3_KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	56
3.1. KẾT QUẢ XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH ĐỒNG THỜI MỘT SỐ ĐỘC TỐ VI NẤM TRONG THỰC PHẨM.....	56
3.1.1. Khảo sát điều kiện tách và xác định độc tố vi nấm trên LC-MS/MS	56
3.1.2. Khảo sát điều kiện xử lý mẫu	59
3.1.3. Thẩm định phương pháp.....	63
3.2. KẾT QUẢ PHÂN TÍCH CÁC ĐỘC TỐ VI NẤM TRONG CÁC MẪU THU THẬP ĐƯỢC Ở MỘT SỐ TỈNH PHÍA BẮC VIỆT NAM	71
3.2.1. Thu thập mẫu phân tích	71
3.2.2. Kết quả phân tích các độc tố vi nấm nhiễm trong các mẫu.....	72
3.3. ĐÁNH GIÁ NGUY CƠ	82
3.3.1. Kết quả khảo sát lượng tiêu thụ thực phẩm và cân nặng theo tuổi.....	82
3.3.2. Kết quả xác định liều phơi nhiễm các độc tố.....	84
3.3.3. Kết quả đánh giá nguy cơ phơi nhiễm độc tố vi nấm	96
Chương 4_BÀN LUẬN	105

4.1. VỀ KẾT QUẢ XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH ĐỒNG THỜI MỘT SỐ ĐỘC TỐ VI NẤM TRONG THỰC PHẨM	105
4.1.1. Về quy trình xử lý mẫu và xác định đồng thời độc tố vi nấm bằng LC-MS/MS.....	105
4.1.2. Về kết quả thẩm định phương pháp	109
4.2. VỀ KẾT QUẢ PHÂN TÍCH ĐỘC TỐ VI NẤM TRONG CÁC MẪU NGÔ, GẠO, LẠC, VÙNG TẠI MỘT SỐ TỈNH PHÍA BẮC VIỆT NAM.....	114
4.2.1. Về việc lấy mẫu phân tích độc tố	114
4.2.2. Về hàm lượng độc tố vi nấm và tỷ lệ bị nhiễm các độc tố.....	115
4.3. VỀ KẾT QUẢ ĐÁNH GIÁ NGUY CƠ	120
4.3.1. Về lượng tiêu thụ thực phẩm	120
4.3.2. Về tính toán liều phơi nhiễm các độc tố vi nấm	122
4.3.3. Về kết quả đánh giá nguy cơ phơi nhiễm aflatoxin B1	124
4.3.4. Về kết quả đánh giá nguy cơ phơi nhiễm fumonisin B1	127
4.3.5. Về kết quả đánh giá nguy cơ phơi nhiễm ochratoxin A.....	129
4.3.6. Về kết quả đánh giá nguy cơ phơi nhiễm zearalenon	131
4.4. CÁC ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN	134
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	136
KẾT LUẬN.....	136
KIẾN NGHỊ	137
TÀI LIỆU THAM KHẢO	140
PHỤ LỤC	

DANH MỤC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT

TT	Chữ viết tắt	Giải thích
1.	AF	Aflatoxin
2.	AFB1	Aflatoxin B1
3.	AFB2	Aflatoxin B2
4.	AFG1	Aflatoxin G1
5.	AFG2	Aflatoxin G2
6.	AOAC	Hiệp hội các cộng đồng phân tích chính thức (Association of Official Analytical Communities)
7.	BMDL	Giá trị cận dưới của liều chuẩn (Lower confidence limit of benchmark dose)
8.	bw	Cân nặng cơ thể (Body weight)
9.	CE	Năng lượng va chạm (Collision energy)
10.	d-SPE	Chiết phân tán pha rắn (Dispersive Solid phase extraction)
11.	DON	Deoxynivalenol
12.	ĐTVN	Độc tố vi nấm (Mycotoxin)
13.	EC	Ủy ban châu Âu (European Commission)
14.	ECD	Detector bắt điện tử (Electron Capture Detector)
15.	FU	Fumonisin
16.	FUB1	Fumonisin B1
17.	ESI	Ion hóa phun điện tử (Electrospray Ionization)
18.	FAO	Tổ chức Nông nghiệp và Lương thực (Food and Agriculture Organization)
19.	FLD	Detector huỳnh quang (Fluorescence detector)
20.	GC	Sắc ký khí (Gas chromatography)
21.	GCB	Than hoạt tính (Graphite carbon black)
22.	GC-MS	Sắc ký khí khối phổ (Gas chromatography mass spectrometry)
23.	HRMS	Khối phổ phân giải cao (High resolution mass spectrometry)
24.	HBV	Viêm gan siêu virus B (Hepatitis B virus)
25.	HCC	Ung thư tế bào gan nguyên phát (hepatocellular carcinoma)

TT	Chữ viết tắt	Giải thích
26.	HPLC	Sắc ký lỏng hiệu năng cao (High Performance Liquid Chromatography)
27.	HT2	Độc tố HT2 (HT2 toxin)
28.	IAC	Sắc ký ái lực miễn nhiễm (Immunoaffinity Chromatography)
29.	IARC	Cơ quan quốc tế nghiên cứu về ung thư (International Agency for Research on Cancer)
30.	JECFA	Ủy ban Chuyên gia Quốc tế về Phụ gia Thực phẩm (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives)
31.	LC	Sắc ký lỏng (Liquid chromatography)
32.	LC-MS/MS	Sắc ký lỏng khối phổ hai lần (Liquid chromatography tandem mass spectrometry)
33.	LB	Giới hạn dưới (Lower bound)
34.	LOAEL	Liều gây hại thấp nhất (Lowest observed adverse effect level)
35.	LOD	Giới hạn phát hiện (Limit of detection)
36.	LOQ	Giới hạn định lượng (Limit of quantification)
37.	ML	Giới hạn tối đa (Maximum limit)
38.	MOE	Khung phơi nhiễm (Margin of exposure)
39.	NIV	Nivalenol
40.	NOAEL	Liều không gây hại (No observed adverse effect level)
41.	OTA	Ochratoxin A
42.	QuEChERS	Nhanh, dễ, rẻ, hiệu quả, ổn định, an toàn (Quick, easy, cheap, effective, rugged, safe)
43.	PMTDI	Liều tối đa hàng ngày dung nạp được (Provisional maximum tolerable daily intake)
44.	PMTWI	Liều tối đa hàng tuần dung nạp được (Provisional maximum tolerable weekly intake)
45.	PSA	Amin bậc 1, bậc 2 (Primary secondary amine)
46.	SAX	Trao đổi anion mạnh (Strong anion exchange)
47.	SPE	Chiết pha rắn (Solid phase extraction)
48.	T2	Độc tố T2 (T2 toxin)

TT	Chữ viết tắt	Giải thích
49.	TCVN	Tiêu chuẩn Việt Nam
50.	TDI	Liều hàng ngày dung nạp được (Tolerable daily intake)
51.	TMS	Trimethylsilyl
52.	TOF	Khối phổ thời gian bay (Time of flight mass spectrometry)
53.	UB	Giới hạn trên (Upper bound)
54.	UV-VIS	Tử ngoại khả kiến (Ultra violet – Visible)
55.	UPLC	Sắc ký lỏng siêu hiệu năng (Ultra Performance Liquid Chromatography)
56.	ZEA	Zearalenone
57.	WHO	Tổ chức Y tế thế giới (World Health Organization)
58.	WTO	Tổ chức Thương mại thế giới (World Trade Organization)

DANH MỤC CÁC BẢNG, BIỂU

Bảng 1.1. Thống kê các vụ ngộ độc do thực phẩm từ ngô tại Hà Giang.....	11
Bảng 1.2. Số trường hợp nông sản nhập khẩu bị nhiễm các loại ĐTVN ở Châu Âu	12
Bảng 1.3. Số trường hợp sản phẩm nhập khẩu vào Châu Âu năm 2012 bị nhiễm độc tố vi nấm	13
Bảng 1.4. Hàm lượng AF trong một số mẫu thực phẩm ở châu Âu ($\mu\text{g}/\text{kg}$).....	13
Bảng 1.5. Ô nhiễm một số ĐTVN trong ngô ở châu Âu	14
Bảng 1.6. Thực trạng ĐTVN nhiễm trong gạo tại một số quốc gia châu Á.....	15
Bảng 1.7. Một số phương pháp TCVN xác định ĐTVN trong ngũ cốc và sản phẩm từ ngũ cốc.	18
Bảng 1.8. Một số ứng dụng của QuEChERS trong phân tích độc tố vi nấm	21
Bảng 1.9. Một số ứng dụng phương pháp GC trong phân tích ĐTVN	23
Bảng 1.10. Ứng dụng phân tích đồng thời ĐTVN trong các nền mẫu thực phẩm bằng LC-MS/MS	25
Bảng 1.11. Tiêu chí thẩm định phương pháp	27
Bảng 1.12. Liều phơi nhiễm và nguy cơ ung thư theo một số nghiên cứu đánh giá nguy cơ ở các quốc gia trên thế giới.....	35
Bảng 1.13. Thông tin về độc tính được sử dụng trong đánh giá nguy cơ của 3 độc tố vi nấm FUB1, OTA và ZEA	37
Bảng 1.14. Liều phơi nhiễm của độc tố vi nấm OTA ($\text{ng}/\text{kg bw}/\text{ngày}$).....	38
Bảng 1.15. Liều phơi nhiễm của độc tố vi nấm FUB1 ($\text{ng}/\text{kg bw}/\text{ngày}$)	38
Bảng 1.16. Liều phơi nhiễm của độc tố vi nấm ZEA ($\text{ng}/\text{kg bw}/\text{ngày}$)	39
Bảng 2.1. Pha dung dịch chuẩn xây dựng đường chuẩn.....	48
Bảng 2.2. Cỡ mẫu theo lý thuyết và cỡ mẫu thực tế điều tra.....	52
Bảng 3.1. Các điều kiện phân tích độc tố vi nấm bằng ESI(\pm)-MS/MS	56
Bảng 3.2. Các thông số tối ưu của MS đối với chế độ ion dương và ion âm	57
Bảng 3.3. Chương trình gradient dùng trong phân tích các độc tố nghiên cứu..	58
Bảng 3.4. So sánh các loại dung môi chiết đến độ thu hồi các độc tố vi nấm....	60
Bảng 3.5. Ảnh hưởng của việc sử dụng PSA và C18 đến độ thu hồi các độc tố	61
Bảng 3.6. Ảnh hưởng của lượng C18 đến độ thu hồi các độc tố trên nền lọc	62

Bảng 3.7. Tỷ lệ ion của các độc tố vi nấm so với tiêu chuẩn châu Âu.....	65
Bảng 3.8. Đường chuẩn của các độc tố vi nấm trên nền mẫu lạc	67
Bảng 3.9. LOD và LOQ của các độc tố vi nấm nghiên cứu	68
Bảng 3.10. Kết quả xác định độ lặp lại và độ thu hồi trên các nền ngô và lạc ...	69
Bảng 3.11. Kết quả thử nghiệm thành thạo (nền ngô).....	71
Bảng 3.12. Tổng hợp số lượng mẫu tại các tỉnh, thành phố	72
Bảng 3.13. Kết quả xác định độc tố vi nấm trong các mẫu thu thập tại Bắc Giang..	73
Bảng 3.14. Kết quả xác định độc tố vi nấm trong các mẫu thu thập tại Hà Nội	74
Bảng 3.15. Kết quả xác định độc tố vi nấm trong các mẫu thu thập tại Hà Giang ...	75
Bảng 3.16. Kết quả xác định độc tố vi nấm trong các mẫu thu thập tại Thái Bình...	76
Bảng 3.17. Kết quả xác định độc tố vi nấm trong các mẫu thu thập tại Thanh Hóa.	77
Bảng 3.18. Kết quả xác định độc tố vi nấm trong tất cả các mẫu thu thập được	78
Bảng 3.19. Số lượng và tỷ lệ mẫu vượt giới hạn cho phép.....	80
Bảng 3.20. Lượng tiêu thụ thực phẩm (g/người/ngày) và cân nặng trung bình theo nhóm tuổi.....	83
Bảng 3.21. Giá trị hàm lượng trung bình các độc tố vi nấm được sử dụng để đánh giá nguy cơ	84
Bảng 3.22. Liều phơi nhiễm của AFB1 (ng/kg bw/ngày).....	87
Bảng 3.23. Phân bố mức độ phơi nhiễm AFB1 theo loại thực phẩm trong tổng liều đối với nhóm người trưởng thành (>18 tuổi).....	88
Bảng 3.24. Liều phơi nhiễm của FUB1 (ng/kg bw/ngày).....	90
Bảng 3.25. Phân bố mức độ phơi nhiễm FUB1 theo loại thực phẩm trong tổng liều đối với nhóm người trưởng thành (>18 tuổi).....	91
Bảng 3.26. Liều phơi nhiễm của OTA (ng/kg bw/ngày)	92
Bảng 3.27. Phân bố mức độ phơi nhiễm OTA theo loại thực phẩm trong tổng liều đối với nhóm người trưởng thành (>18 tuổi).....	93
Bảng 3.28. Liều phơi nhiễm của ZEA (ng/kg bw/ngày).....	94
Bảng 3.29. Phân bố mức độ phơi nhiễm ZEA theo loại thực phẩm trong tổng liều đối với nhóm người trưởng thành (>18 tuổi).....	95
Bảng 3.30. Nguy cơ gây ung thư gan của AFB1 tại các địa phương	96
Bảng 3.31. Nguy cơ gây ung thư gan của AFB1 tại miền Bắc	99

Bảng 4.1. So sánh giới hạn phát hiện của phương pháp được xây dựng với một số nghiên cứu đã công bố	111
Bảng 4.2. So sánh độ lặp lại và độ thu hồi của phương pháp xây dựng với các nghiên cứu khác.....	112
Bảng 4.3. Thống kê số mẫu bị nhiễm các độc tố theo từng địa phương	115
Bảng 4.4. Thống kê số mẫu bị nhiễm các độc tố theo từng loại thực phẩm.....	115
Bảng 4.5. Tổng hợp số mẫu và tỷ lệ mẫu bị nhiễm các độc tố vượt giới hạn tối đa cho phép theo loại thực phẩm.....	116
Bảng 4.6. So sánh nguy cơ gây ung thư với một số quốc gia trên thế giới	125
Bảng 4.7. Đánh giá liều phơi nhiễm FUB1 của người trưởng thành so với PMTDI	127
Bảng 4.8. So sánh liều phơi nhiễm FUB1 với một số quốc gia trên thế giới ...	128
Bảng 4.9. Đánh giá liều phơi nhiễm OTA của người trưởng thành so với PMTDI..	129
Bảng 4.10. So sánh liều phơi nhiễm OTA với một số quốc gia trên thế giới...	131
Bảng 4.11. Đánh giá liều phơi nhiễm ZEA của người trưởng thành so với PMTDI	132
Bảng 4.12. So sánh liều phơi nhiễm ZEA với một số quốc gia trên thế giới ...	133

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ

Hình 1.1. Công thức cấu tạo của các aflatoxin B1, B2, G1, G2	5
Hình 1.2. Công thức cấu tạo FUB1.....	7
Hình 1.3. Công thức cấu tạo của ochratoxin A	8
Hình 1.4. Công thức cấu tạo của ZEA.	9
Hình 1.5. Sơ đồ quá trình đánh giá nguy cơ.....	28
Hình 2.1. Thiết bị sắc ký lỏng khối phổ hai lần sử dụng trong nghiên cứu.....	43
Hình 2.2. Dự kiến quy trình khảo sát chiết các độc tố vi nấm.....	46
Hình 3.1. Sắc ký đồ các ion định lượng của các độc tố vi nấm nghiên cứu.....	59
Hình 3.2. Sơ đồ xử lý mẫu phân tích đồng thời các độc tố nghiên cứu	63
Hình 3.3. Sắc đồ thẩm định độ đặc hiệu với các độc tố nghiên cứu	64
Hình 3.4. Ảnh hưởng của nền mẫu ngô và lạc đến tín hiệu đo của các độc tố vi nấm.....	66
Hình 3.5. Đường chuẩn phân tích độc tố AFB1 trên nền lạc ($R^2=1,000$)	67
Hình 3.6. Sắc đồ AFB1 tại LOD 0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$	68
Hình 3.7. Sắc đồ FUB1 tại LOD 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$	69
Hình 3.8. So sánh hàm lượng AFB1 trên một số nền mẫu tại các địa phương...	79
Hình 3.9. Tỷ lệ mẫu vượt giới hạn cho phép và tỷ lệ mẫu nhiễm độc tố AFB1 trên một số nền mẫu tại các địa phương.....	81
Hình 3.10. So sánh tỷ lệ đóng góp của các loại thực phẩm vào liều phơi nhiễm AFB1 tại các địa phương	89
Hình 3.11. So sánh nguy cơ gây ung thư trung bình do phơi nhiễm AFB1 (theo UB) tại các địa phương theo các nhóm tuổi	98
Hình 3.12. So sánh liều phơi nhiễm với PMTDI của FUB1 tại một số địa phương và miền Bắc	100
Hình 3.13. So sánh liều phơi nhiễm với PMTDI của FUB1 tại Hà Giang.....	101
Hình 3.14. So sánh liều phơi nhiễm với PMTDI của ZEA tại một số địa phương và miền Bắc	101
Hình 3.15. So sánh liều phơi nhiễm với PMTDI của ZEA tại Hà Giang.....	102
Hình 3.16. So sánh liều phơi nhiễm với PMTDI của OTA tại một số địa phương và miền Bắc	103

Hình 3.17. So sánh liều phơi nhiễm với PMTDI của OTA tại Hà Giang	104
Hình 4.1. Sự phân mảnh của Ochratoxin A	109
Hình 4.2. Bản đồ các khu vực lấy mẫu (dấu X trên bản đồ).....	114
Hình 4.3. Ngô trên nương chờ thu hoạch.....	118
Hình 4.4. Ngô được trữ trên gác nhà lấy dùng dần	118
Hình 4.5. Ngô được dùng để trang trí các “homestay”.....	119
Hình 4.6. Hình ảnh điều tra tiêu thụ thực phẩm tại các địa phương	120
Hình 4.7. Mèn mèn – món ăn hàng ngày chế biến từ bột ngô của người H'Mong tại Hà Giang	121
Hình 4.8. So sánh liều phơi nhiễm FUB1 giữa các địa phương nghiên cứu	128
Hình 4.9. So sánh liều phơi nhiễm OTA giữa các địa phương nghiên cứu.....	130
Hình 4.10. So sánh liều phơi nhiễm ZEA giữa các địa phương nghiên cứu	132

ĐẶT VẤN ĐỀ

An toàn thực phẩm và các bệnh do thực phẩm đã và đang là vấn đề của nhiều quốc gia trong đó có Việt Nam. Sức khỏe, tính mạng của con người bị đe dọa bởi tác nhân gây ngộ độc thực phẩm và các bệnh bị nhiễm qua thực phẩm. Thực phẩm là nguồn cung cấp chất dinh dưỡng cho sự phát triển của cơ thể, đảm bảo sức khỏe con người nhưng đồng thời cũng là nguồn có thể gây bệnh nếu không đảm bảo vệ sinh, an toàn. Thực phẩm không những có tác động thường xuyên đối với sức khỏe mỗi con người mà còn ảnh hưởng lâu dài đến nòi giống của dân tộc. Sử dụng các thực phẩm không đảm bảo vệ sinh trước mắt có thể bị ngộ độc cấp tính với các triệu chứng nhanh, dễ nhận thấy. Nguy hiểm hơn nữa là sự tích lũy của các chất độc hại ở một số cơ quan gây ngộ độc mạn tính hoặc có thể gây ra các dị tật, dị dạng cho thế hệ mai sau.

Bên cạnh các tác động về sức khỏe, an toàn thực phẩm còn tác động đến kinh tế và xã hội. Đối với nước ta cũng như nhiều nước đang phát triển, lương thực thực phẩm là một loại sản phẩm chiến lược, ngoài ý nghĩa kinh tế còn có ý nghĩa chính trị, xã hội rất quan trọng. Vệ sinh an toàn thực phẩm nhằm tăng lợi thế cạnh tranh trên thị trường quốc tế. Để cạnh tranh trên thị trường quốc tế, thực phẩm không những cần được sản xuất, chế biến, bảo quản phòng tránh ô nhiễm các loại vi sinh vật mà còn không được chứa các chất độc hại vượt quá mức quy định cho phép của tiêu chuẩn quốc tế.

Khí hậu nhiệt đới nóng ẩm tại Việt Nam (đặc biệt là phía Bắc) là điều kiện thuận lợi cho sự phát triển của các loài nấm mốc. Nhiều loài nấm mốc phát triển trên cơ chất là lương thực, thực phẩm và sinh ra các độc tố vi nấm. Khi người và vật nuôi sử dụng các lương thực thực phẩm bị nhiễm độc tố vi nấm, có thể gây ra các ảnh hưởng không mong muốn đối với sức khỏe, cả cấp tính và mạn tính [110]. Một số loại độc tố vi nấm được xếp vào nhóm chất có khả năng gây ung thư trên người như aflatoxin B1 (nhóm 1A), ochratoxin A và fumonisin B1 (nhóm 2B) [77, 79]. Một số nghiên cứu đã cho thấy sự có mặt của các độc tố vi nấm này trong nhiều loại thực phẩm ở Việt Nam như ngô, gạo, lạc vừng.

Hiện nay, tại Việt Nam đã có các quy định về kiểm soát độc tố vi nấm trong thực phẩm [1]. Theo đó, các độc tố vi nấm được kiểm soát trong thực phẩm bao gồm các aflatoxin, ochratoxin A, zearalenon, fumonisin, patulin và deoxynivalenon. Trong số này, patulin thường chỉ xuất hiện trong một số loại mốc từ quả, chủ yếu là táo trong khi deoxynivalenon ít được phát hiện trong các loại thực phẩm ở Việt Nam. Các quy định đều dựa trên các tiêu chuẩn quốc tế. Vẫn còn thiếu các nghiên cứu đánh giá sự phù hợp của các quy định này với điều kiện tại Việt Nam, cũng như thực trạng mối nguy đối với sức khỏe do phơi nhiễm độc tố vi nấm từ thực phẩm, chủ yếu là ngũ cốc và hạt có dầu.

Trước thực trạng đó, cần thiết phải có các nghiên cứu đánh giá nguy cơ đối với sức khỏe con người do thực phẩm bị nhiễm độc tố vi nấm để làm cơ sở khoa học cho các nhà quản lý trong hoạch định các chính sách phù hợp với mục tiêu đảm bảo quyền lợi, sức khỏe người tiêu dùng và tăng tính cạnh tranh cho sản phẩm nông sản Việt trên thị trường quốc tế đồng thời cũng là hàng rào kỹ thuật ngăn chặn các thực phẩm độc hại, giá rẻ xâm nhập vào thị trường nước ta.

Do đó, đề tài “***Đánh giá ô nhiễm và nguy cơ do độc tố vi nấm trong thực phẩm tại một số tỉnh phía Bắc Việt Nam***” đã được thực hiện với các mục tiêu sau:

- 1. Xây dựng được phương pháp phân tích đồng thời các độc tố aflatoxin, fumonisin B1, ochratoxin A và zearalenon có trong gạo, ngô và các hạt có dầu.*
- 2. Xác định tỷ lệ nhiễm và hàm lượng các độc tố vi nấm trên trong các mẫu thu thập được tại một số địa phương ở phía Bắc Việt Nam.*
- 3. Đánh giá nguy cơ phơi nhiễm các độc tố vi nấm nghiên cứu đối với dân cư ở các địa phương đã khảo sát.*

Chương 1

TỔNG QUAN

1.1. TỔNG QUAN VỀ MỘT SỐ ĐỘC TỔ VI NẤM

1.1.1. Khái niệm độc tố vi nấm

Độc tố vi nấm (ĐTVN) là các chất hóa học có độc tính được sinh ra trong tự nhiên bởi một số chủng vi nấm có khả năng sinh độc tố. Thuật ngữ độc tố vi nấm (mycotoxin) bắt nguồn từ thuật ngữ “*mykes*” trong tiếng Hy Lạp có nghĩa là vi nấm và thuật ngữ “*toxicum*” trong tiếng La tinh có nghĩa là chất độc [75].

ĐTVN là các hợp chất chuyển hóa thứ cấp có độc tính do một số loài vi nấm tổng hợp trong quá trình trao đổi chất xảy ra ở tế bào trong các điều kiện xác định. Các độc tố này có thể gây bệnh hoặc gây tử vong cho người và động vật. Sự sinh trưởng và phát triển của nó phụ thuộc rất nhiều vào điều kiện sinh thái. Thuật ngữ *mycotoxin* thường được áp dụng hạn chế cho các độc tố nấm mốc ngoại bào có độc tính đối với động vật máu nóng [75].

ĐTVN có thể gây độc ở cấp độ khác nhau: cấp tính hay trường diễn. Nhiễm độc cấp tính gây nên rất nhiều đợt dịch bệnh kèm theo tỉ lệ tử vong rất cao. Tùy vào bản chất của từng loại, ĐTVN có thể gây độc cho các hệ thống khác nhau của cơ thể như gan, thận, hệ thần kinh, hệ tiêu hóa, hệ hô hấp, gây suy giảm hệ thống miễn dịch, suy giảm các chức năng của cơ thể và gây bệnh ung thư [2, 68].

Phần lớn các nấm mốc có khả năng sinh độc tố thuộc 3 chi *Aspegiluss*, *Penicillium* và *Fusarium*. Các nấm thuộc chi *Aspegiluss*, *Penicillium* thường có tính chất hoại sinh và tấn công, gây hại cho thực phẩm trong quá trình bảo quản, tuy vậy một số chủng *Aspegilli* cũng có thể phát triển trong quá trình canh tác nông sản. Chi *Fusarium* bao gồm các loài gây hại cho cây trồng, đồng thời có thể gây hoại sinh trên thực phẩm [75, 125].

Giai đoạn 1960-1975 là thời kỳ phát triển mạnh mẽ các đề tài, các công trình nghiên cứu về độc tố nấm mốc. Có khoảng 300-400 hợp chất được coi là độc tố nấm mốc, trong đó có khoảng 30-40 hợp chất được chú ý vì có thể đe

dọa đến sức khỏe con người và động vật.

Về mặt hóa học, độc tố vi nấm không chỉ là khó định nghĩa mà còn khó trong việc phân loại, do chúng có cấu trúc hóa học khác nhau, nguồn gốc sinh tổng hợp đa dạng và có vô số tác dụng sinh học. Bên cạnh đó, các loại độc tố còn được tạo ra bởi nhiều các loại nấm khác nhau.

Các nhóm ĐTVN được quan tâm ở nước ta bao gồm: aflatoxin (B1, B2, G1, G2, M1, M2), ochratoxin (A, B), patulin, fumonisin, deoxynivalenol (DON) và zearalenon (ZEA) [1]. Trong các loại độc tố này, một số độc tố thường gặp trên các sản phẩm ngũ cốc và thực phẩm chế biến từ ngũ cốc, bao gồm các aflatoxin (B1, B2, G1, G2), ochratoxin A, fumonisin B1 và ZEA.

1.1.2. Một số độc tố vi nấm

1.1.2.1. Aflatoxin

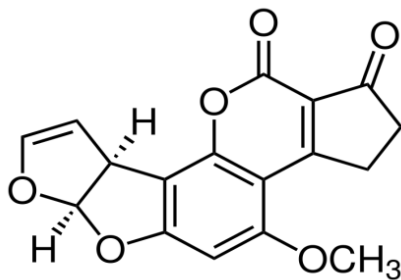
Aflatoxin (AF) là sản phẩm chuyển hóa thứ cấp của một số nấm mốc *Aspergillus* như *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*. Đây là các loài thuộc họ nấm cúc, là loài nấm khá phổ biến. Các loài nấm mốc này có thể phát triển trên nhiều loại cơ chất như các loại hạt có dầu, thậm chí trên cả bột cá và thịt giàu protein. Do vậy, các AF thường có trong các loại ngũ cốc như ngô, gạo, đậu... và các loại hạt có dầu như lạc, đậu nành, hạt điều, hạt hướng dương, vừng... cũng như trong các sản phẩm của chúng [42, 90].

Có 4 loại aflatoxin chính thường gặp trong thực phẩm là AFB1, AFB2, AFG1, AFG2. Aflatoxin M1 (AFM1) và aflatoxin M2 (AFM2) được tìm thấy trong sữa. Trong 4 loại AF trên thì AFB1 thường được tìm thấy trong thực phẩm ở nồng độ cao nhất, tiếp theo là AFG1, còn AFB2 và AFG2 thường tồn tại ở nồng độ thấp hơn. Ngoài ra, người ta còn tìm thấy chất chuyển hóa hydroxyl của AFB1 trong sữa do sự chuyển hóa ở gan của người và động vật khi bị nhiễm AFB1 [42, 90].

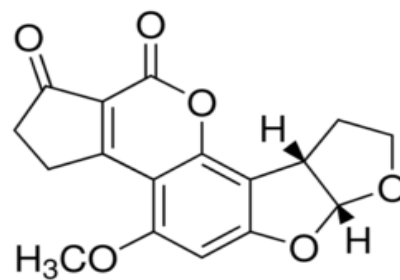
Công thức cấu tạo và khối lượng phân tử của các AF nhóm B, G được đưa ra ở hình 1.1. Các AF có dạng tinh thể không màu cho đến vàng; ít tan trong nước, tan trong methanol, aceton và cloroform; không tan trong các dung môi không phân cực. Các AF tương đối ổn định dưới ánh sáng và trong không khí, ngay cả ở trong môi trường có độ pH dưới 3 hoặc trên 10. Các AF

phân hủy tại điểm nóng chảy trong khoảng 237°C (AFG1) và 299°C (AFM1) nên không bị phá hủy trong điều kiện nấu ăn bình thường [50].

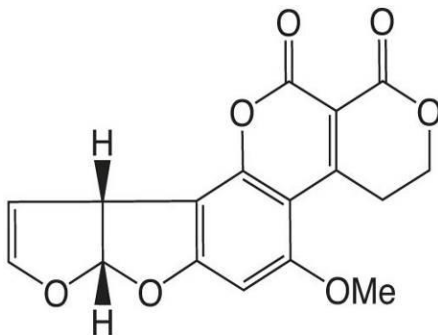
Đối với người, AF có thể gây ngộ độc cấp tính, xảy ra khi AF xâm nhập vào cơ thể qua đường ăn uống ở liều lượng cao trong thời gian ngắn. Những triệu chứng cấp tính bao gồm sự xuất huyết, hủy hoại gan cấp tính, phù, các biến đổi trong đường tiêu hóa và có thể gây tử vong. Tuy nhiên, nguy hiểm hơn là AF có thể gây ra ngộ độc mạn tính ngay ở liều lượng thấp khi tiếp xúc trong thời gian dài. Ngộ độc mạn tính có thể dẫn đến ung thư gan.



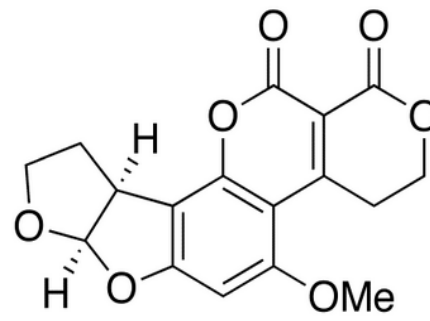
Aflatoxin B1 (M = 312,3)



Aflatoxin B2 (M = 314,3)



Aflatoxin G1 (M=328,3)



Aflatoxin G2 (M=330,3)

Hình 1.1. Công thức cấu tạo của các aflatoxin B1, B2, G1, G2

Về phân bố, AF tập trung nhiều nhất ở gan (chiếm khoảng 17% lượng AF trong cơ thể) tiếp theo là ở thận, cơ, mô mỡ, tụy, lách. Sau khoảng một tuần thì 80% lượng AF bị bài tiết ra ngoài và đáng chú ý là chúng có thể bài tiết qua tuyến sữa gây hại cho trẻ nhỏ đang bú sữa mẹ. Chu kỳ bán hủy trong huyết tương là 36,5 phút. Sản phẩm chuyển hóa của các aflatoxin bao gồm AFM1 và AFM2, chủ yếu bài tiết trong vòng 48 giờ [70]. Ngoài tác dụng lên gan AF còn được biết đến như là chất gây một số bệnh mạn tính như xơ gan,

viêm dạ dày mạn, gây suy giảm miễn dịch và gây nhiễm độc gen [93, 110]. AFB1 được IARC xếp vào nhóm IA, là nhóm gây ung thư trên người [50, 93].

Giới hạn tối đa của AF trong thực phẩm được quy định theo QCVN 8-1:2011/BYT. Trên các loại thực phẩm nói chung, các giá trị này dao động từ 2-12 $\mu\text{g}/\text{kg}$ đối với AFB1 và từ 4-15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ đối với AF tổng số. Các mức giới hạn đối với sản phẩm thực phẩm dùng cho trẻ nhỏ dưới 36 tháng tuổi được quy định thấp hơn là 0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (AFB1) [1].

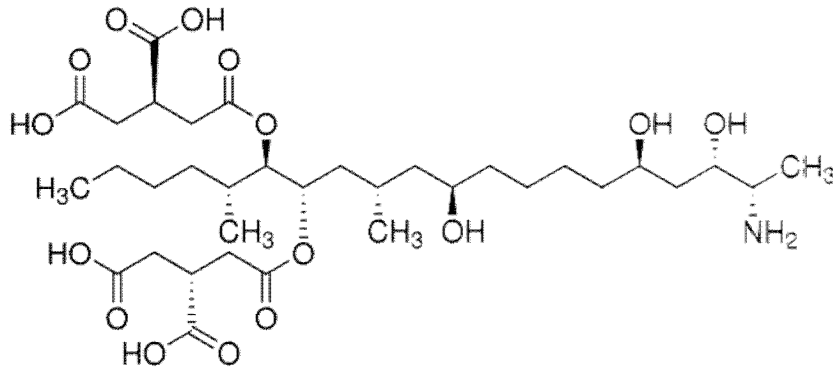
1.1.2.2. Fumonisin

Fumonisin (FU) là một nhóm độc tố nấm mốc có cấu trúc tương tự sphinganin, tiền thân của sphingolipid. Những độc tố này chủ yếu được sinh ra bởi các loài vi nấm *Fusarium* như: *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. napiforme*, *F. dlamini*, và *F. nygamai*. Ít nhất 12 độc tố fumonisin được biết đến, trong đó phổ biến nhất là các độc tố nhóm B (gồm fumonisin B1, B2, và B3). Fumonisin B1 (FUB1) là chất có độc tính cao nhất, tìm thấy trong nhiều ngũ cốc và sản phẩm ngũ cốc [90].

FUB1 có công thức phân tử là $\text{C}_{34}\text{H}_{59}\text{NO}_{15}$, khối lượng phân tử là 721,8 g/mol, với cấu tạo được trình bày ở hình 1.2. FUB1 dễ tan trong một số dung môi hữu cơ như methanol, acetonitril [90].

Fumonisin là các hợp chất tương đối ổn định, khi chế biến trong các điều kiện như nhiệt độ cao và trong môi trường kiềm FU bị loại bỏ nhóm chức acid tricarballic tạo thành một chất chuyển hoá có tính độc hại [42, 120]. Nhóm độc tố này, đặc biệt là FUB1, ức chế mạnh enzym ceramid synthase (CerS). CerS là enzym xúc tác acyl hóa sphinganin và tái tạo sphingosin. Sự ức chế CerS làm tăng sphinganin nội bào và các base sphingoid khác. Đây là hợp chất gây độc mạnh, có thể dẫn đến ung thư [120]. Fumonisin cũng được cho là có liên quan đến ung thư phổi ở người. FUB1 được phân loại thuộc nhóm có khả năng gây ung thư trong nhóm 2B. Các tác dụng gây độc khác của FUB1 thể hiện khác nhau ở các loài khác nhau bao gồm nhiễm độc gan, thận và hoạt động ức chế miễn nhiễm [50, 120]. JECFA đã thiết lập giá trị PMTDI của FUB1 là 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/ngày [79].

Giới hạn tối đa của FUB1 trong thực phẩm dao động từ 200-4000 $\mu\text{g}/\text{kg}$, đối với ngô và các thực phẩm từ ngô là 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ [1].



Hình 1.2. Công thức cấu tạo FUB1

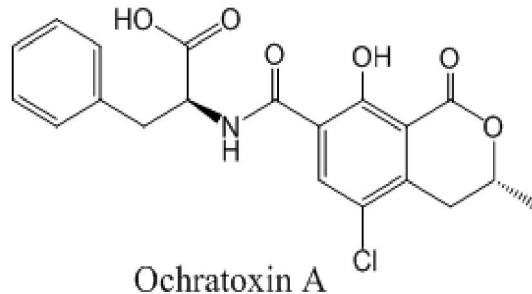
1.1.2.3. Ochratoxin

Ochratoxin là sản phẩm chuyên hóa thứ cấp của các loài nấm *Aspergillus* và *Penicillium*, thường được tìm thấy trong nhiều loại thực phẩm như ngũ cốc, các sản phẩm ngũ cốc, thảo dược, rượu vang, cà phê... Có 3 loại ochratoxin khác nhau, trong đó ochratoxin A (OTA) là loại có độc tính và tác động đến sức khỏe con người lớn nhất [42, 49, 90].

OTA có công thức phân tử là $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{ClNO}_6$, khối lượng phân tử là 403,8 g/mol, với cấu tạo được trình bày ở hình 1.3. OTA có dạng tinh thể không màu, bền với nhiệt, tan trong dung môi hữu cơ phân cực như DMSO, cloroform, ethanol, methanol, acetonitril... ít tan trong nước nhưng tan trong đệm carbonat loãng. OTA rất bền vững với các xử lý nhiệt và hóa chất nhưng dễ bị phân hủy bởi ánh sáng, trong môi trường kiềm hoặc chất tẩy rửa. Độc tố được sản sinh nhiều nhất ở nhiệt độ 20-25°C [48].

OTA gây các tác hại do tác dụng gây ức chế sự vận chuyển của acid ribonucleic dẫn đến ức chế sự tổng hợp protein trong tế bào, làm ảnh hưởng đến các protein trong vòng tuần hoàn. OTA còn gây hại đến gan và thận động vật. Với nồng độ lớn hơn 1 ppm, OTA có thể gây ảnh hưởng đến sự sinh sản, nồng độ lớn hơn 5 ppm có thể gây nên những tổn thương ở gan và ruột. Tương tự như AF, độc tố này cũng gây nên sự giảm sức đề kháng và là tác nhân gây ung thư ở người. Năm 1993, cơ quan quốc tế nghiên cứu về ung thư

(IARC) đã xếp OTA vào nhóm 2B là nhóm có thể gây ra ung thư cho người [31, 35, 66, 102]. JECFA đã thiết lập mức PMTWI của OTA là 100 ng/kg bw/tuần [77].



Hình 1.3. Công thức cấu tạo của ochratoxin A

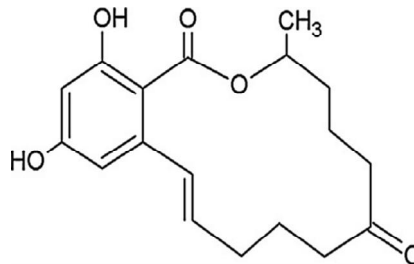
QCVN 8-1:2011/BYT quy định giới hạn tối đa của OTA trong một số loại thực phẩm như ngũ cốc (3 $\mu\text{g}/\text{kg}$), cà phê (5 $\mu\text{g}/\text{kg}$), rượu vang (2 $\mu\text{g}/\text{L}$) và gia vị (30 $\mu\text{g}/\text{kg}$); với các sản phẩm dùng cho trẻ nhỏ, quy định thấp hơn, ở mức 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ [1].

1.1.2.4. Zearalenon

Zearalenon (ZEA) là một loại độc tố được sinh ra bởi một số loài *Fusarium*, đặc biệt bởi *F. graminearum*, ngoài ra còn có *F. culmorum*, *F. cerealis*, *F. equiseti*, *F. verticillioides* và *F. incarnatum*. Sự ô nhiễm ZEA được thấy trong các loại ngũ cốc như lúa mì, ngô, lúa mạch, lúa miến, yến mạch. ZEA là hợp chất khá bền với nhiệt và không bị phân hủy trong quá trình chế biến hoặc nấu ăn [42, 71].

ZEA có công thức phân tử là $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_5$, khối lượng phân tử là 318,4 g/mol, với cấu tạo được trình bày ở hình 1.4. ZEA dễ tan trong dung môi hữu cơ như aceton, ethanol, methanol, diclormethan, acetonitril. Khi vào cơ thể, ZEA nhanh chóng được hấp thu và chuyển hóa thành α -zearalenol và β -zearalenol ở gan. ZEA và các chất chuyển hoá cạnh tranh liên kết với receptor của estrogen trong hệ thống cơ thể. Các nghiên cứu trên động vật chỉ ra rằng ZEA gây ra sự thay đổi ở bộ máy sinh sản và có thể dẫn đến rối loạn sinh sản mạnh, thoái hóa và làm thay đổi nồng độ progesteron trong huyết tương. ZEA cũng liên quan đến việc dậy thì sớm ở trẻ nhỏ. ZEA được cho là có liên quan đến ung thư thực quản ở người, ung thư đốt sống cổ và tăng sản nội mạc tử

cung. Khả năng gây ung thư của ZEA đã được đánh giá bởi Ủy ban quốc tế về nghiên cứu ung thư và người ta thấy rằng nó ít có khả năng gây ung thư trên người, được xếp vào nhóm 3 (IARC, 1993) [35, 42, 134]. JECFA đã thiết lập giá trị PMTDI cho ZEA là 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/ngày [78].



Hình 1.4. Công thức cấu tạo của ZEA.

Với ZEA, giới hạn tối đa theo QCVN 8-1:2011/BYT trong khoảng 20-400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ trong thực phẩm, cụ thể trong ngô là 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ và các loại bánh từ ngũ cốc là 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ [1].

1.2. TÌNH HÌNH THỰC PHẨM BỊ NHIỄM ĐỘC TỔ VI NẤM TRÊN THẾ GIỚI VÀ TRONG NƯỚC

1.2.1. Tình hình ngộ độc độc tố vi nấm từ thực phẩm

Các nghiên cứu độc học ngày nay đã cho thấy, các ĐTVN chủ yếu gây độc trường diễn và bán trường diễn, tuy nhiên không hiếm các trường hợp mức nhiễm quá lớn đã gây ngộ độc cấp.

Ngộ độc cấp tính do độc tố vi nấm đã được ghi nhận từ những năm 60 của thế XX. Aflatoxin được phát hiện đầu tiên ở bệnh gà Thổ Nhĩ Kỳ. Năm 1960, một dịch lớn làm chết hơn 10 vạn gà con 3 – 6 tuần tuổi ở miền đông nam nước Anh, với các triệu chứng biếng ăn, sã cánh, xù lông và chết sau một tuần, được đặt tên là bệnh X của gà. Hàng loạt các dịch nhiễm AF bùng phát do tiêu thụ sản củ bị mốc tại Uganda, gạo bị mốc tại Đài Loan năm 1967, ở Ấn Độ năm 1975, ở Kenya năm 1982. Các bệnh này được xem là hậu quả của việc bị nhiễm AF từ các sản phẩm bị mốc [90, 125]. Đầu tiên các triệu chứng nhiễm độc được phát hiện trên động vật nuôi. Sau đó, hàng loạt các vật nuôi khác như lợn, chó, thỏ... cũng được phát hiện là có thể bị nhiễm AF.

Trên người, vụ ngộ độc thực phẩm do ĐTVN được ghi nhận sớm nhất vào năm 1974 tại Ấn Độ với 106 người chết khi ăn phải ngô mốc nhiễm AF

[108]. Đây là vụ ngộ độc được nghiên cứu dịch tễ đầy đủ nhất cho đến thời điểm đó, xác định rõ nguyên nhân là do AF. Đến tháng 4/2004, tại vùng nông thôn phía tây Kenya xảy ra ngộ độc do AF nghiêm trọng với 317 người mắc và 125 người tử vong. Các nghiên cứu khảo sát cho thấy lương thực chính của người dân bị nhiễm AF có tới 50% số mẫu phát hiện hàm lượng AF lớn hơn giới hạn quy định của Kenya (20 ppb), trong đó 35% có mức trên 100 ppb và 7% có mức trên 1.000 ppb. Nghiên cứu dịch tễ cho thấy, khu vực có mức độ nhiễm AF cao hơn thì số người nhập viện tăng so với khu vực khác [54].

Trong 6 tháng đầu năm 2004, Bộ Y tế Kenya đã thông báo có 317 trường hợp suy giảm chức năng gan cấp tính ở miền đông Kenya dẫn đến 125 trường hợp tử vong. Nguyên nhân là do trong ngô được lưu trữ trong điều kiện ẩm ướt dẫn đến phơi nhiễm AFB1 với hàm lượng rất cao. Trong số 342 mẫu ngô được thu thập từ chợ, có 182 mẫu có hàm lượng AFB1 lớn hơn 20 ppb, 31 mẫu thu trong các hộ gia đình có nạn nhân tử vong, hàm lượng AFB1 trong khoảng 20- 8000 ppb so với mức giới hạn cho phép của Kenya là 20ppb [54, 94].

Ngộ độc cấp trên người do các độc tố vi nấm khác ít xảy ra hơn so với aflatoxin. Tại Ấn Độ, vào năm 1995 xảy ra mưa trái mùa gây thiệt hại cho ngô và lúa ở một số làng của cao nguyên Deccan. Sau đó, tại đây bùng phát dịch bệnh do thực phẩm, đặc trưng bởi triệu chứng đau bụng và tiêu chảy. Các nghiên cứu sau đó đã cho kết quả, thủ phạm gây dịch là fumonisin B1 [43]. Trong thời kỳ chiến tranh thế giới thứ hai, hàng ngàn người dân ở Orenburg (thuộc Liên Xô cũ) đã chết vì ăn phải lúa mì, lúa mạch nhiễm nấm mốc do bị bỏ lại trên đồng ruộng trong mùa đông. Sau này, nguyên nhân của đợt dịch được xác định là do trichothecene. Hai chủng nấm mốc sinh độc tố là *fusarium sporotrichioides* và *fusarium poae* [57, 101].

Tại Việt Nam, tình trạng ngộ độc với tỷ lệ tử vong cao tại một số tỉnh biên giới nơi có cộng đồng dân tộc H'Mông với lương thực chủ yếu là ngô, tập quán canh tác, bảo quản, chế biến lạc hậu, đặc biệt là tại Hà Giang. Trên thực tế từ năm 2007 đến nay đã xảy ra 16 vụ ngộ độc thực phẩm với 90 người và được xác định do ăn mèn mén (một loại thức ăn từ ngô), 31 người trong số

đó đã bị tử vong. Thời gian xảy ra các vụ ngộ độc do mèn mèn trên là vào các tháng 2 đến tháng 5 của năm. Tất cả các vụ ngộ độc đều có nguyên nhân là bữa ăn gia đình, do gia đình tự chế biến bột ngô và tự nấu ăn. Thức ăn được xác định gây ngộ độc thực phẩm là mèn mèn truyền thống bị ô nhiễm. Thực trạng vệ sinh trong quá trình chế biến mèn mèn còn chưa rõ ràng nên nguy cơ ngộ độc thực phẩm đối với thực phẩm này vẫn rất cao. Các vụ ngộ độc chủ yếu xảy ra ở các huyện vùng cao của Hà Giang (huyện Yên Minh, Mèo Vạc, Quản Bạ, Đồng Văn), nơi đa số đồng bào là người H'Mong [2].

Trong những năm vừa qua, nhiều nơi tại Hà Giang đặc biệt là các vùng núi cao thường xuyên xảy ra các vụ ngộ độc do độc tố vi nấm. Bánh trôi ngô và mèn mèn là các sản phẩm được sử dụng hàng ngày của đồng bào H'Mong. Thói quen sử dụng thực phẩm chính từ ngô và điều kiện bảo quản ngô không tốt đã làm tăng nguy cơ ngộ độc của những người dân vùng cao Hà Giang. Thống kê các vụ ngộ độc tại Hà Giang được trình bày trong bảng 1.1 [2].

Bảng 1.1. Thống kê các vụ ngộ độc do thực phẩm từ ngô tại Hà Giang

TT	Địa điểm	Thời gian	Số người mắc	Số người chết
1	Mèo Vạc	02/2007	3	1
2	Mèo Vạc	02/2007	4	4
3	Yên Minh	02/2007	5	2
4	Đồng Văn	03/2007	1	1
5	Đồng Văn	03/2008	7	0
6	Mèo Vạc	03/2008	2	2
7	Đồng Văn	04/2008	2	0
8	Mèo Vạc	04/2008	3	2
9	Đồng Văn	04/2008	15	2
10	Mèo Vạc	05/2008	2	2
11	Mèo Vạc	12/2008	16	0
12	Mèo Vạc	04/2009	8	3
13	Quản Bạ	09/2011	4	3
14	Mèo Vạc	06/2012	5	2

TT	Địa điểm	Thời gian	Số người mắc	Số người chết
15	Quản Bạ	04/2013	7	4
16	Mèo Vạc	06/2014	3	3
17	Mèo Vạc	10/2014	3	0
	Tổng số		90	31

1.2.2. Tình hình nhiễm độc tố vi nấm trong thực phẩm

1.2.2.1. Các nghiên cứu trên thế giới

Có rất nhiều nghiên cứu về hàm lượng ĐTVN trong thực phẩm. ĐTVN được quan tâm nhất là AF, trong đó AFB1 là loại độc tố được nghiên cứu nhiều nhất do các ảnh hưởng của nó đối với sức khỏe cũng như sự phổ biến trong tự nhiên. Do điều kiện khí hậu khác nhau giữa các nước trên thế giới nên hàm lượng ĐTVN ở các địa phương cũng có sự khác biệt. Phần lớn các nước nhiệt đới có tỷ lệ mẫu bị nhiễm AF cao hơn. Đối tượng mẫu thường gặp là ngũ cốc và các loại hạt có dầu.

Theo một thống kê của Marin và cộng sự năm 2013, hàng năm các quốc gia Châu Âu đã từ chối nhiều sản phẩm nông sản nhập khẩu vào châu Âu, do không đạt các tiêu chuẩn về hàm lượng ĐTVN [90]. Các trường hợp sản phẩm nông sản nhiễm ĐTVN bị từ chối nhập vào châu Âu từ năm 2008 đến 2012 được tổng hợp ở Bảng 1.2.

Bảng 1.2. Số trường hợp nông sản nhập khẩu bị nhiễm các loại ĐTVN ở Châu Âu

Độc tố vi nấm	2008	2009	2010	2011	2012	Tổng
AF	902	638	649	585	484	3258
OTA	20	27	34	35	32	148
DON	4	3	2	11	4	24
FU	2	1	3	4	4	14
ZEA	2	0	0	0	4	6
Tổng	930	669	688	635	525	3450

Có thể nhận thấy AF là ĐTVN nhiễm nhiều nhất trong nông sản nhập khẩu vào châu Âu ở giai đoạn từ 2008 đến 2012, chiếm đến gần 95% các trường hợp phát hiện. Ngoài ra, OTA cũng là ĐTVN được phát hiện khá lớn chiếm 4,2%. Tỷ lệ nhiễm DON, FU và ZEA thấp hơn rất nhiều. Nghiên cứu trên cũng đã thống kê được các đối tượng bị nhiễm ĐTVN như ở Bảng 1.3.

Bảng 1.3. Số trường hợp sản phẩm nhập khẩu vào Châu Âu năm 2012 bị nhiễm độc tố vi nấm

<i>Độc tố vi nấm</i>	<i>AF</i>	<i>OT</i>	<i>DON</i>	<i>ZEA</i>	<i>FU</i>
Ngũ cốc và bánh	17	6	4	3	4
Thức ăn chăn nuôi	79	0	0	0	0
Rau quả	137	19	0	1	0
Gia vị	33	4	0	0	0
Các loại hạt	204	0	0	0	0
Khác	14	3	0	0	0
<i>Tổng</i>	<i>484</i>	<i>32</i>	<i>4</i>	<i>4</i>	<i>4</i>

Ngũ cốc và các sản phẩm bánh là các đối tượng nhiễm nhiều nhóm ĐTVN nhất. Trong khi đó, các loại hạt chủ yếu nhiễm độc tố AF, chiếm tỷ lệ cao nhất trong tất cả các nhóm thực phẩm được thống kê [90]. Trong số các độc tố vi nấm, AF là nhóm độc tố được cảnh báo nhiều nhất. Mức ô nhiễm AF với từng sản phẩm với khác nhau được thống kê như ở Bảng 1.4.

Bảng 1.4. Hàm lượng AF trong một số mẫu thực phẩm ở châu Âu ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

<i>Loại thực phẩm</i>	<i>Số mẫu</i>	<i>Số mẫu phát hiện</i>		<i>Giá trị trung bình</i>		<i>Giá trị lớn nhất</i>	
		<i>n</i>	<i>%</i>	<i>AFB1</i>	<i>AF tổng</i>	<i>AFB1</i>	<i>AF tổng</i>
Lạc	8929	1830	20,5	1,39	2,69	935	985
Ngô	934	136	14,6	0,26	0,41	8	9
Ngũ cốc khác	3010	207	6,9	0,35	0,51	109	117
Gia vị	4698	1988	42,3	1,46	1,88	96	96

Lạc là loại hạt có mức ô nhiễm cao với tỷ lệ nhiễm đến 20% và hàm lượng trung bình của AFB1 là 1,39 µg/kg. Đối với nhóm ngũ cốc, ngô là loại sản phẩm chiếm nguy cơ cao nhất với 14% số mẫu phát hiện. Bên cạnh đó, gia vị cũng là nhóm sản phẩm có khả năng nhiễm AF cao.

Bảng 1.5. Ô nhiễm một số ĐTVN trong ngô ở châu Âu

Độc tố vi nấm	Số mẫu khảo sát	Số mẫu phát hiện ĐTVN		Giá trị trung bình (µg/kg)	Giá trị lớn nhất (µg/kg)
		n	%		
OTA	5180	2825	54	0,29	33,3
FUB1	801	534	67	346	10.200
DON	520	463	89	594	8850
ZEA	838	369	44	14	509

Bảng 1.5 cho thấy đối với các ĐTVN khác, các kết quả cho thấy ngô là mặt hàng thực phẩm ô nhiễm ĐTVN nhiều nhất. Ngoài AF, ngô còn có khả năng bị nhiễm OTA, FUB1, DON và ZEA với tỷ lệ phát hiện rất cao (lần lượt là 54%, 67%, 89% và 44%). Trong số đó, FUB1 và DON là hai loại ĐTVN có hàm lượng trung bình cao nhất, hơn nữa có nhiều mẫu vượt rất xa so với giới hạn tối đa cho phép.

Waenlor và cộng sự đã thực hiện phân tích các báo cáo nghiên cứu liên quan đến AF từ năm 1967 đến 2001 ở Thái Lan, qua đánh giá 13 báo cáo trong nước và quốc tế về phân tích hàm lượng AF ở Thái Lan và nước khác đã được đăng trong khoảng thời gian này. Với 3.206 mẫu thực phẩm và các sản phẩm thực phẩm được phân tích trong thời gian trên, kết quả cho thấy 1.248 mẫu bị nhiễm AF (chiếm tỉ lệ 38,9%), tỷ lệ AF ô nhiễm cao nhất trong lạc (36% trong tổng số mẫu bị nhiễm) [126].

Theo thống kê của Sempere Ferre từ nhiều nghiên cứu khác nhau về mức độ nhiễm ĐTVN trong gạo của nhiều quốc gia trên thế giới, đã phát hiện

nhều loại ĐTVN trong gạo bao gồm các AF, DON, fumonisin, ZEA và một số ĐTVN đặc biệt khác [64]. Thông tin về mức độ nhiễm và hàm lượng của các ĐTVN trong gạo của một số quốc gia châu Á được trình bày trong Bảng 1.6.

Bảng 1.6. Thực trạng ĐTVN nhiễm trong gạo tại một số quốc gia châu Á

<i>Quốc gia</i>	<i>Nguồn gốc</i>	<i>Số mẫu</i>	<i>Độc tố vi nấm</i>	<i>Tỷ lệ nhiễm (%)</i>	<i>Khoảng hàm lượng (µg/kg)</i>	<i>Trung bình (µg/kg)</i>
Hàn Quốc	Chợ	88	AFB1	5,6	1,8 - 7,3	4,3
		88	FUB1	2,2	48,2 - 60,6	54,4
		88	OTA	9,0	2,1 - 6,0	3,9
		88	DON	3,4	105 - 159	139
Phillipines	Kho	9	AF	100	0,03 - 8,66	2,7
Ấn Độ	Chợ	50	DON	24	20 - 500	-
		50	ZEA	12	20 - 300	-
		1200	AFB1	67,8	0,1 - 308	-
Iran	Chợ	60	ZEA	5,0	0 - 160	11,2

Qua đánh giá tổng hợp các nghiên cứu cho thấy, các nhóm ĐTVN thường được phát hiện gồm có AF (B1, B2, G1, G2), OTA, FU, DON và ZEA. Các nền mẫu thường được quan tâm gồm các loại ngũ cốc (trong đó chủ yếu là ngô và gạo) và các loại hạt (chủ yếu là lạc).

1.2.2.2. Các nghiên cứu ở Việt Nam

Ở Việt Nam, đã có nhiều nghiên cứu xác định hàm lượng ĐTVN trong thực phẩm. Tuy nhiên, hầu hết mới chỉ dừng lại ở mức xác định lượng độc tố và xác định các chủng nấm mốc trong thực phẩm.

Theo nghiên cứu của Phuong N và cộng sự về hàm lượng của AF, FU và ZEA trong ngô ở một số tỉnh miền Nam và Tây Nguyên Việt Nam, có 67% số mẫu nhiễm FU; 55,7% số mẫu nhiễm AF và 27,8% số mẫu nhiễm ZEA. Đặc biệt, có đến 53% số mẫu nhiễm từ hai loại ĐTVN trở lên và có trên 70% số mẫu dương tính có hàm lượng AF vượt mức 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Hàm lượng FU trong ngô lấy ở các tỉnh miền Nam trung bình là 1757 $\mu\text{g}/\text{kg}$, cao hơn đáng kể so với các tỉnh Tây Nguyên (740 $\mu\text{g}/\text{kg}$) [103].

Nguyen MT và cộng sự đánh giá mức độ nhiễm aflatoxin B1, citrinin và ochratoxin A trong gạo ở 5 tỉnh miền Trung Việt Nam. Aflatoxin B1 là độc tố có tỷ lệ nhiễm cao nhất, tiếp theo là ochratoxin A, không phát hiện thấy citrinin trong các mẫu nghiên cứu. Hàm lượng aflatoxin B1 lớn nhất phát hiện ở tỉnh Quảng Nam với giá trị trung bình là 10,08 $\mu\text{g}/\text{kg}$ và giá trị lớn nhất là 19,82 $\mu\text{g}/\text{kg}$ [95].

Ở miền Bắc, có nhiều nghiên cứu đã đánh giá hàm lượng ĐTVN trong ngũ cốc và hạt có dầu, chủ yếu tập trung vào các đối tượng có nguy cơ cao như ngô và lạc. Các nghiên cứu được thực hiện tại các vùng miền núi phía Bắc do tiêu thụ ngô của người dân tại các vùng này rất cao. Năm 2012, một nghiên cứu của Bùi Thị Mai Hương và cộng sự về hàm lượng AFB1 và FUB1 trong ngô và gạo ở Lào Cai cho thấy có khoảng 17,1% mẫu gạo và 28,1% mẫu ngô nhiễm AFB1; 6,3% mẫu gạo và 23,3% mẫu ngô nhiễm FUB1 [6].

Nghiên cứu của Lê Văn Giang và cộng sự năm 2011, cho thấy trên 123 mẫu ngô của tỉnh Hà Giang phát hiện tới 50 mẫu (40,7%) có OTA, trong đó có 2 mẫu vượt mức dư lượng theo quy định của Bộ Y tế [4]. Tác giả Lê Văn Giang và cộng sự cũng đã nghiên cứu đánh giá mức độ nhiễm AF trong lạc, ngô tại 3 xã (Kỳ Sơn - Kỳ Tân - Nghĩa Dũng) của huyện Tân Kỳ tỉnh Nghệ An (năm 2011) cho thấy 98,3% số mẫu kiểm tra phát hiện ô nhiễm AF [3].

Theo nghiên cứu của Lê Thị Phương Thảo, mức độ nhiễm AF trong lạc tại Nghệ An, Thanh Hóa và Bắc Giang chiếm lần lượt 40,0; 30,3 và 53,3%. Các tác giả đã sử dụng các biện pháp bảo quản để làm giảm nguy cơ gia tăng độc tố vi nấm trong các sản phẩm lạc [26].

Năm 2017, Đỗ Thị Kim Yên và cộng sự đã xác định tổng số 48 mẫu ớt khô được thu thập ngẫu nhiên tại các chợ và tiệm tạp hóa trên địa bàn 5 tỉnh Nam Bộ cho thấy 100% số mẫu đều có AF, hàm lượng AF trong khoảng 0,13 - 48,76 $\mu\text{g}/\text{kg}$, AFB1 dao động 0,13 - 46,57 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Trong đó số mẫu nhiễm AFB1 vượt quá giới hạn cho phép ($>5\mu\text{g}/\text{kg}$) chiếm 20,83% (10/48 mẫu) và số mẫu nhiễm AF tổng vượt quá giới hạn cho phép ($>10 \mu\text{g}/\text{kg}$) chiếm 12,5% (6/48 mẫu) [29].

Có thể nhận thấy rằng, tỷ lệ mẫu ngũ cốc và hạt có dầu bị nhiễm các loại ĐTVN ở Việt Nam là khá lớn. Các loại ĐTVN thường gặp chủ yếu là các nhóm aflatoxin, fumonisin, ochratoxin và zearalenon. Đây cũng là căn cứ để thực hiện đánh giá nguy cơ các độc tố vi nấm này trong một số đối tượng thực phẩm từ ngũ cốc và hạt có dầu ở miền Bắc Việt Nam.

1.3. CÁC PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH ĐỘC TỐ VI NẤM TRONG THỰC PHẨM

1.3.1. Giới thiệu chung

Có nhiều phương pháp đã được sử dụng để xác định từng độc tố vi nấm trong thực phẩm. Về nguyên tắc chung, các phương pháp này có thể chia làm 3 giai đoạn chính:

- Giai đoạn 1: Chiết độc tố vi nấm ra khỏi mẫu thực phẩm bằng một dung môi phù hợp với từng loại độc tố vi nấm.
- Giai đoạn 2: Làm sạch mẫu bằng các kỹ thuật chiết lỏng lỏng, hoặc chiết pha rắn hay chiết với cột ái lực miễn nhiễm.
- Giai đoạn 3: Phân tích bằng sắc ký lỏng với các detector phù hợp như detector UV, huỳnh quang hoặc MS.

Các phương pháp phân tích tập trung vào xác định từng loại ĐTVN hoặc từng nhóm ĐTVN riêng biệt nên có nhiều ưu điểm về tính đặc hiệu. Tuy nhiên, nếu cần xác định nhiều loại ĐTVN trong cùng một nền mẫu, cần thực hiện phối hợp các phương pháp phân tích khác nhau. Một số phương pháp theo TCVN để xác định ĐTVN trong ngũ cốc và sản phẩm ngũ cốc được tóm tắt ở Bảng 1.7.

Bảng 1.7. Một số phương pháp TCVN xác định ĐTVN trong ngũ cốc và sản phẩm từ ngũ cốc.

Độc tố vi nấm	Nền mẫu	Tiêu chuẩn	Kỹ thuật làm sạch	Định lượng
AF (B1, B2, G1, G2)	Ngũ cốc, hạt có dầu	TCVN 7407:2004 (AOAC 991.31) [9]	IAC	HPLC-FLD, dẫn xuất iod
	Ngũ cốc, hạt có dầu	TCVN 7596:2007 (ISO 16050:2003) [12]	IAC	HPLC-FLD, dẫn xuất brom hóa
	Ngũ cốc, quả có vỏ và sản phẩm	TCVN 7930:2008 (EN 12955:1999) [13]	IAC	HPLC-FLD, dẫn xuất iod
	Thủy sản và sản phẩm thủy sản	TCVN 8350:2010 (AOAC 975.36) [15]	SPE Si	HPLC-FLD, trực tiếp
	Thực phẩm chế biến từ ngũ cốc	TCVN 9522:2012 (EN 15851:2010) [17]	IAC	HPLC-FLD, dẫn xuất brom hóa
OTA	Thực phẩm	TCVN 7595-1:2007 (ISO 15141-1:1998) [10]	SPE Si	HPLC-FLD
	Thực phẩm	TCVN 7595-2:2007 (ISO 15141-2:1998) [11]	SPE C18	HPLC-FLD
	Cà phê nhân	TCVN 8426:2010 (AOAC 2004.10) [16]	IAC	HPLC-FLD
	Bia và rượu vang	TCVN 9524:2012 (EN 14132:2009) [18]	IAC	HPLC-FLD
	Cà phê rang và lúa mạch	TCVN 9724:2013 (EN 14133:2009) [20]	IAC	HPLC-FLD
OTA	Nho khô, hỗn hợp quả khô và quả vả khô	TCVN 10927:2015 [22]	IAC	HPLC-FLD
	Thực phẩm từ ngũ cốc	TCVN 10928:2015 [23]	IAC	HPLC-FLD

<i>Độc tố vi nấm</i>	<i>Nền mẫu</i>	<i>Tiêu chuẩn</i>	<i>Kỹ thuật làm sạch</i>	<i>Định lượng</i>
FU (FUB1, FUB2)	Thực phẩm	TCVN 8162:2009 (EN 13585:2001) [14]	SPE-SAX	HPLC-FLD dẫn xuất OPA
	Thực phẩm	TCVN 9711:2013 (EN 14352:2004) [19]	IAC	HPLC-FLD dẫn xuất OPA
	Thực phẩm chứa ngô	TCVN 10930:2015 [25]	IAC	HPLC-FLD dẫn xuất OPA
ZEA	Ngô, lúa mạch, sản phẩm ngũ cốc	TCVN 10640:2014 (EN 15850:2010) [21]	IAC	HPLC-FLD
DON	Thực phẩm từ ngũ cốc	TCVN 10929:2015 [24]	IAC	HPLC-UV

Đặc điểm chung của các phương pháp này là sử dụng kỹ thuật làm sạch bằng cột ái lực miễn nhiễm (IAC) hoặc chiết pha rắn (SPE). Đây là các kỹ thuật có độ đặc hiệu cao, nhưng chi phí khá cao. Hơn nữa, đây là các phương pháp xác định từng loại ĐTVN riêng nên chỉ có ứng dụng trong kiểm soát chất lượng hàng hóa không có khả năng ứng dụng thực tiễn trong đánh giá nguy cơ do số mẫu lớn, số chỉ tiêu kiểm nghiệm nhiều, kinh phí không đáp ứng được các phép thử độc lập. Do vậy, các tác giả trên thế giới hướng đến phương pháp để xác định đồng thời nhiều loại ĐTVN trong thực phẩm, đặc biệt là ngũ cốc và sản phẩm ngũ cốc.

1.3.2. Phương pháp QuEChERS ứng dụng xác định đồng thời các độc tố vi nấm

Năm 2003, Anastassiades và Lehotay giới thiệu phương pháp QuEChERS (viết tắt của **Q**uick – nhanh, **E**asy – dễ, **C**heap – rẻ, **E**ffective – hiệu quả, **R**ugged - ổn định và **S**afe – an toàn) ứng dụng trong phân tích dư lượng hóa chất bảo vệ thực vật. Phương pháp QuEChERS sau đó đã được ứng dụng để xác định đồng thời các độc tố vi nấm. Phương pháp này có nhiều thuận lợi so với các phương pháp truyền thống [33].

❖ *Nguyên tắc của phương pháp QuEChERS:*

Phương pháp xử lý mẫu theo QuEChERS thường gồm 2 giai đoạn chính như sau:

- Mẫu phân tích (với độ ẩm khoảng 80%, thêm nước nếu cần) được lắc với acetonitril, sau đó bổ sung thêm $MgSO_4$ và $NaCl$ để giúp quá trình phân lớp giữa nước và acetonitril.

- Chất phân tích được chiết vào lớp acetonitril sẽ được làm sạch qua chiết phân tán pha rắn (d-SPE) bằng cách trộn một phần dịch chiết với các chất hấp phụ như PSA, $MgSO_4$, GCB, C18 để loại tạp chất.

Dịch chiết sau đó được phân tích bằng GC-MS(/MS) hoặc LC-MS/MS. Đối với các độc tố vi nấm, thường sử dụng LC-MS/MS với cả hai chế độ ion dương và ion âm.

Phương pháp QuEChERS ra đời cho thấy có rất nhiều ưu điểm và có thể áp dụng trong xác định các độc tố vi nấm.

❖ *Ưu nhược điểm của phương pháp QuEChERS:*

Phương pháp QuEChERS là phương pháp xử lý mẫu có hiệu quả cao trong phân tích ĐTVN do: đơn giản, dễ thực hiện, thời gian ngắn, tiết kiệm dung môi hóa chất, có thể phân tích đồng thời nhiều ĐTVN cùng lúc. Đây là một phương pháp hiệu quả để xác định đồng thời nhiều ĐTVN với độ chính xác và độ nhạy tốt, độ ổn định cao, an toàn cho con người và môi trường.

Tuy nhiên, phương pháp QuEChERS vẫn còn một số hạn chế như: phải phối hợp với các phương pháp phân tích kỹ thuật cao GC-MS(/MS) và LC-MS/MS; một số nền mẫu phức tạp như chè, dược liệu vẫn chưa loại trừ được triệt để ảnh hưởng của nền...

❖ *Ứng dụng của QuEChERS trong phân tích độc tố vi nấm:*

Hiện nay, phương pháp QuEChER đang được nghiên cứu ứng dụng và phát triển trở thành một phương pháp hàng đầu trong phân tích đồng thời ĐTVN. Phương pháp QuEChERS được dùng để phân tích ĐTVN trên nền mẫu ngũ cốc và hạt có dầu vì đây là các nền mẫu có thể tồn tại đồng thời nhiều loại độc tố vi nấm. Bảng 1.8 tóm tắt một số nghiên cứu xác định đồng thời các ĐTVN sử dụng phương pháp QuEChERS.

Bảng 1.8. Một số ứng dụng của QuEChERS trong phân tích độc tố vi nấm

Nền mẫu	ĐTVN	Xử lý mẫu	Phương pháp phân tích	TLTK
Ngũ cốc	ZEA, DON, FUX, NIV	Dung môi: loại béo bằng n-hexan, chiết bằng acetonitril, không đệm Làm sạch: MgSO ₄ , C ₁₈	GC-MS dẫn xuất TMS	[58]
Bông ngô	DON, NIV, ZEA, 15a-DON, FUX	Dung môi: loại béo bằng n-hexan, chiết bằng acetonitril, không đệm Làm sạch: MgSO ₄ , C ₁₈	GC-MS dẫn xuất TMS	[65]
Quả khô	16 ĐTVN	Dung môi: acid acetic 1% trong acetonitril. Làm sạch: Không	LC-MS/MS	[39]
Bột ngô	AFB1, OTA, ZEA, DON, T-2	Dung môi: acetonitril:nước:acid formic (79:20:1) Làm sạch: Không	UPLC-MS/MS	[32]
Thực phẩm các loại	AFs, DON, OTA, T-2, HT-2, FUB1, FB2, ZEA	Dung môi: acid formic 1% trong acetonitril. Làm sạch: Không	UPLC-MS/MS	[40]
Lúa mì, malt	17 ĐTVN	Dung môi: acetonitril:nước:acid acetic (80:20:0,1) Làm sạch: Không	UPLC-MS/MS	[45]
Gạo	14 ĐTVN	Dung môi: acid formic 5% trong acetonitril, đệm citrat. Làm sạch: MgSO ₄ , C ₁₈ , Al-N, PSA	UPLC-MS/MS	[128]
Các loại hạt	14 ĐTVN	Dung môi: acid formic 5% trong acetonitril, đệm citrat. Làm sạch: DLLME	UPLC-MS/MS	[37]
Bánh mì	OTA	Dung môi: acid formic 5% trong acetonitril, đệm citrat. Làm sạch: MgSO ₄ , C ₁₈ , Al-N, PSA	LC-FLD	[99]
Bột mì và ngô	39 ĐTVN	Dung môi: acetonitril:nước:acid formic (79:20:1) Làm sạch: Không	LC-MS/MS	[122]
Bia, đồ uống từ bia	15 ĐTVN	Dung môi: acetonitril, NaCl, Na ₂ SO ₄ khan, Na Citrat Làm sạch: C ₁₈	UPLC-MS/MS	[123]

Một số phương pháp tiêu biểu đã sử dụng phương pháp QuEChERS trên các nền mẫu khác nhau như sau:

- Ferreira và cộng sự (2012) đã sử dụng kỹ thuật QuEChERS và GC-MS để xác định đồng thời các ĐTVN trong bông ngô. Các tác giả chiết AF bằng acetonitril và sử dụng $MgSO_4$ và C18 làm chất hấp phụ trong bước chiết phân tán pha rắn (d-SPE). Độ thu hồi dao động từ 61-118% và độ lệch chuẩn tương đối $\leq 18\%$ tùy từng loại ĐTVN [65].

- Cunha, Fernandes và cộng sự (2012) đã phát triển và xác nhận hiệu lực phương pháp phân tích 5 ĐTVN (ZEA, DON, FUX, 15-a DON, NIV) trên nền mẫu ngũ cốc trên cơ sở ứng dụng phương pháp QuEChERS. Sau khi thử các điều kiện làm sạch mẫu, các tác giả loại trừ PSA và florisil, chọn ra vật liệu tối ưu là $MgSO_4$ và C18, quy trình cho hệ số thu hồi 67-101% tùy theo chất phân tích, phương pháp có giới hạn định lượng từ 5-50 mg/kg [59].

- Arroyo-Manzanares và cộng sự (2012) đã xây dựng phương pháp đơn giản nhưng nhanh, nhạy để phân tích đồng thời 14 ĐTVN trong các loại hạt có dầu chỉ với quy trình chiết và làm sạch theo QuEChERS, riêng đối với phân tích AF phải thêm 1 công đoạn làm sạch mẫu bằng vi chiết lỏng - lỏng. Phương pháp cho hệ số thu hồi 60,7 - 104,3% và $RSD < 11\%$ [37].

- Koesukwiwat và cộng sự (2012) đã nghiên cứu thay đổi một số điều kiện QuEChERS trong nghiên cứu trên nền mẫu gạo. Các tác giả sử dụng dung môi chiết là acetonitril chứa 10% acid formic, làm sạch bằng d-SPE sử dụng các chất hấp phụ $MgSO_4$, C18, Al-N (oxid nhôm trung tính). Phương pháp có độ thu hồi từ 70 – 98% và $RSD < 7\%$ [82].

- Năm 2013, Yogendrarajah và cộng sự xác định 17 ĐTVN trong gia vị bằng phương pháp QuEChERS và LC-MS/MS. Các tác giả không sử dụng kỹ thuật chiết phân tán pha rắn d-SPE [132].

- Năm 2014, Liu và cộng sự cũng sử dụng QuEChERS và UPLC-MS/MS để xác định các ĐTVN trong bơ vùng. Tác giả chỉ sử dụng C18 làm chất hấp phụ trong bước d-SPE. Độ thu hồi đạt được từ 60-120% [87].

Có thể nhận thấy điểm chung của các phương pháp QuEChERS là sử dụng các kỹ thuật sắc ký hiện đại như GC-MS và đặc biệt là LC-MS/MS, do

phương pháp QuEChERS không có sự làm giàu mẫu nên cần phối hợp với các kỹ thuật phân tích hiện đại, có độ nhạy tốt. Trong đó, LC-MS/MS cho thấy có nhiều ưu điểm về tính đặc hiệu, độ nhạy và độ chính xác.

1.3.3. Các kỹ thuật phân tích độc tố vi nấm

Sau khi đã chiết ĐTVN ra khỏi nền mẫu và làm sạch dịch chiết, cần phải sử dụng các kỹ thuật phân tích phù hợp để có thể xác định và định lượng được chính xác hàm lượng của chúng. Trong số các kỹ thuật phân tích ĐTVN hiện nay, sắc ký khí và sắc ký lỏng kết nối với khối phổ là các kỹ thuật phân tích được sử dụng phổ biến hơn cả.

1.3.3.1. Kỹ thuật sắc ký khí

Sắc ký khí (GC) là kỹ thuật tách các hợp chất ở trạng thái khí, ứng dụng tốt đối với những hợp chất dễ bay hơi và bền nhiệt [28]. Trong phân tích ĐTVN, GC không có ứng dụng rộng rãi bằng LC. Trong các phương pháp tiêu chuẩn, AOAC chỉ đưa ra duy nhất với DON trong lúa mỳ, phương pháp này sử dụng thiết bị GC và detector ECD.

Phương pháp định lượng đồng thời ĐTVN bằng GC do Tanaka và cộng sự công bố lần đầu tiên năm 2000. Các tác giả sử dụng GC-MS và quá trình dẫn xuất hóa để định lượng DON và ZEA trong ngũ cốc [124]. Một số công trình sử dụng phương pháp GC trong phân tích ĐTVN được trình bày trong Bảng 1.9.

Bảng 1.9. Một số ứng dụng phương pháp GC trong phân tích ĐTVN

<i>TT</i>	<i>ĐTVN</i>	<i>Nền mẫu</i>	<i>Phương pháp phân tích</i>	<i>TLTK</i>
1	Các trichothecen	Thực phẩm, nước tiểu	GC/MS GC/ECD	[44]
3	Các trichothecen và ZEA	Ngũ cốc	GC/MS	[124]
4	ZEA và 8 trichothecen	Lúa mỳ	GC/MS	[113]
5	Các trichothecen và ZEA	Bia	GC/MS	[115]

Phương pháp GC-MS khó ứng dụng rộng rãi để xác định đồng thời nhiều ĐTVN do yêu cầu cần dẫn xuất trước khi phân tích. Ngày nay, phương pháp GC-MS/MS được nghiên cứu sử dụng nhiều hơn, nhưng phụ thuộc vào bản chất chất cần phân tích nên chỉ được nghiên cứu đối với ZEA, DON và các ĐTVN cùng nhóm.

1.3.2.2. Kỹ thuật sắc ký lỏng

Đa số ĐTVN có khả năng phát huỳnh quang nên thường được phân tích bằng HPLC-FLD. Tuy nhiên để tăng độ nhạy của phương pháp, có thể phải sử dụng thêm phương pháp dẫn xuất hóa sau cột để tạo dẫn chất có cường độ huỳnh quang mạnh hơn. Phân tích ĐTVN bằng HPLC với các detector thông thường gặp rất nhiều khó khăn do chỉ có thể phân tích một số ĐTVN có tính chất đặc biệt.

Kỹ thuật LC-MS/MS khắc phục được những nhược điểm của các phương pháp sắc ký khí và sắc ký lỏng với detector thông thường nên có thể được ứng dụng để phân tích các hợp chất phân cực, khó bay hơi hay kém bền nhiệt, những hợp chất không thể phân tích bằng GC-MS. LC-MS đặc biệt là sắc ký lỏng kết nối khối phổ hai lần (LC-MS/MS) có độ nhạy cao nên rất phù hợp để phân tích các ĐTVN có hàm lượng rất thấp. LC-MS/MS có khả năng xác định đồng thời nhiều loại ĐTVN trong cùng một lần phân tích do mỗi chất phân tích đặc trưng bởi các giá trị m/z nhất định. Vì thế nếu LC không tách được hoàn toàn vẫn có thể định lượng được nhờ vai trò của MS. Thông thường, mỗi chất phân tích cần xác định được 1 ion phân tử và 2 ion sản phẩm để cho kết quả tin cậy.

Sử dụng LC-MS/MS có thể xác định được đồng thời nhiều loại ĐTVN trong cùng một lần phân tích với thời gian chỉ 10-20 phút và phương pháp UPLC-MS/MS đã rút ngắn thời gian này lại chỉ trong vòng 2-4 phút. Nhiều kỹ thuật phân tích khối phổ khác nhau đã được ứng dụng để xác định đồng thời các ĐTVN, có thể kể đến gồm kỹ thuật khối phổ ba tứ cực với nguồn ESI, kỹ thuật khối phổ thời gian bay (TOF hay Q-TOF) và các kỹ thuật khối phổ phân giải cao khác.

Năm 2003, Nielsen và cộng sự phát triển phương pháp LC-UV-MS để định tính đồng thời 474 các chất chuyển hóa của ĐTVN, sử dụng nguồn ion hóa ESI và khối phổ TOF [97].

Theo nghiên cứu của Ren và cộng sự năm 2007 trên các nền mẫu ngũ cốc, giới hạn định lượng của các chất phân tích dao động từ 0,01-0,70 µg/kg và hiệu suất thu hồi từ 70,6% đến 119% [109].

Soleimany và cộng sự đã xác định đồng thời AF, OTA, ZEA, DON, FUM, T-2 và HT-2 trong ngũ cốc bằng UPLC-MS/MS sử dụng chiết bằng hỗn hợp dung môi acetonitril: nước: acid acetic (79:20:1). Độ thu hồi đạt được từ 83,5-107,3%. Tuy nhiên, do không có quá trình làm sạch nên dễ gây ảnh hưởng nền cũng như giảm tuổi thọ của thiết bị [117].

Năm 2011, Rahmani và cộng sự cũng đã nghiên cứu phương pháp xác định đồng thời AF, OTA và ZEA trong ngũ cốc. Phương pháp dựa trên quá trình làm sạch với cột ái lực miễn nhiễm đa chức năng AOZ, định lượng bằng HPLC-FLD sau khi tạo dẫn xuất sau cột. Phương pháp này có độ đặc hiệu tốt, nhưng việc sử dụng cột ái lực miễn nhiễm rất khó ứng dụng vì chi phí lớn và không mở rộng được trên các đối tượng phân tích khác [106]

Một số nghiên cứu được tóm tắt ở Bảng 1.10 cho thấy phương pháp LC-MS/MS đã được ứng dụng để xác định đồng thời nhiều ĐTVN trong cùng một lần phân tích.

Bảng 1.10. Ứng dụng phân tích đồng thời ĐTVN trong các nền mẫu thực phẩm bằng LC-MS/MS

Tác giả, năm	Số ĐTVN	Kỹ thuật chiết	Kỹ thuật LC-MS/MS	TLTK
Sulyok, 2006	39	Chiết pha lỏng	ESI(+) & LC-MS/MS (MRM)	[122]
Ren Y, 2007	17	SPE	ESI(+) & UPLC-MS/MS (MRM)	[109]
Spanjer, 2008	33	Chiết pha lỏng	ESI(+) & LC-MS/MS (MRM)	[118]
Mavungu, 2009	23	Chiết pha rắn	ESI(+) & LC-MS/MS (MRM)	[91]

<i>Tác giả, năm</i>	<i>Số ĐTVN</i>	<i>Kỹ thuật chiết</i>	<i>Kỹ thuật LC-MS/MS</i>	<i>TLTK</i>
Rasmussen, 2010	27	QuEChERS	ESI(+) & LC-MS/MS (MRM)	[107]
Zachariasova , 2010	11	QuEChERS	ESI(+) & UPLC-HRMS	[133]
Koesukwiwat, 2014	14	QuEChERS	ESI(+) & LC-MS/MS (MRM)	[82]
Azaiez, 2014	16	QuEChERS	ESI(+) & LC-MS/MS (MRM)	[39]
Jia, 2014	58	QuEChERS	ESI (+) & LC-HR-MS	[80]
Huang, 2017	15	QuEChERS	ESI(+) & LC-MS/MS (MRM)	[72]
Romera, 2018	14	Chiết pha lỏng	ESI(+) & LC-Q-TOF	[111]

Như vậy, LC-MS, đặc biệt là LC-MS/MS, là một kỹ thuật đóng vai trò rất quan trọng trong phân tích ĐTVN. Nguồn ion hóa được sử dụng là nguồn ESI ở chế độ ion dương. Kỹ thuật MRM được sử dụng phổ biến để định lượng, tuy nhiên với sự phát triển của các kỹ thuật Q-TOF hay Orbitrap, khối phổ phân giải cao đang ngày càng được sử dụng nhiều hơn để sàng lọc và định lượng nhiều loại ĐTVN hơn.

Sự phối hợp giữa phương pháp xử lý mẫu theo QuEChERS và phân tích bằng LC-MS/MS để ứng dụng phân tích ĐTVN là xu hướng phổ biến.

1.3.4. Yêu cầu đối với phương pháp phân tích độc tố vi nấm

Để bảo đảm tính chính xác của kết quả kiểm nghiệm, AOAC và EC đã quy định cụ thể các tiêu chí đánh giá và chấp nhận phương pháp phân tích. Các phòng thí nghiệm phải xác nhận hiệu lực theo các tiêu chí ở Bảng 1.11 [55, 81, 82].

Bảng 1.11. Tiêu chí thẩm định phương pháp

ĐTVN	Hàm lượng ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Yêu cầu	
		Hệ số thu hồi (%)	RSD _r (%)
AF	< 1,0	50 -120	≤ 40
	1,0 -10,0	70 -110	≤ 30
	>10	80 -110	≤ 20
OTA	< 1,0	50 - 120	≤ 40
	1,0 -10,0	70 -110	≤ 20
ZEA	≤ 50	60 -120	≤ 40
	> 50	70 -120	≤ 25
FU	≤ 500	60 -120	≤ 30
	> 500	70 -110	≤ 20

1.4. ĐÁNH GIÁ NGUY CƠ ĐỘC TỔ VI NĂM TRONG THỰC PHẨM

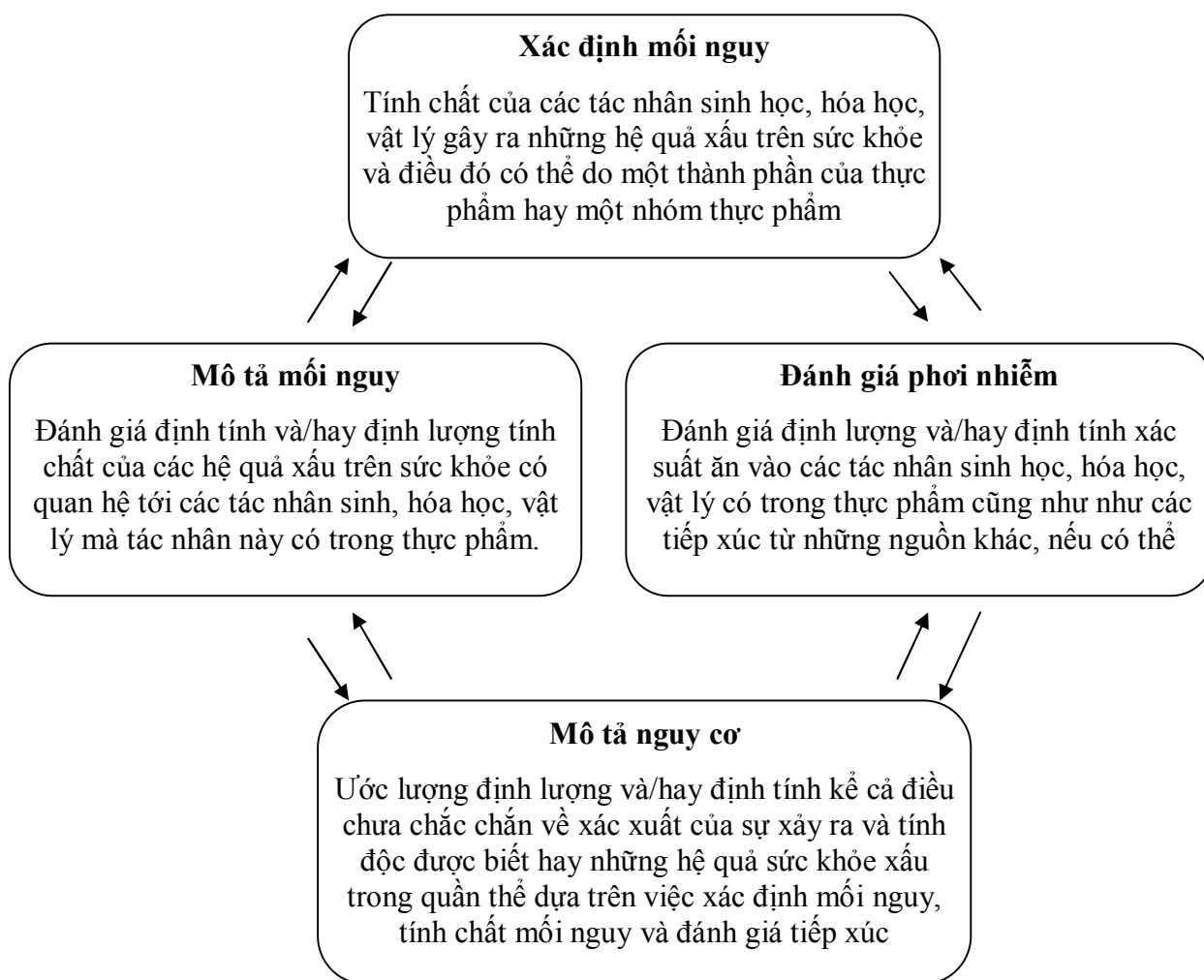
1.4.1. Giới thiệu về đánh giá nguy cơ

Đánh giá nguy cơ là một phương pháp khoa học được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu độc học, đánh giá tác động, ảnh hưởng lên sức khỏe do phơi nhiễm một mối nguy xác định vào cơ thể người (trong môi trường hoặc trong thực phẩm). Kết quả đánh giá nguy cơ chính là cơ sở mang tính khoa học của các quyết định quản lý, giám sát mối nguy.

Trên thế giới, Tổ chức Nông lương Liên hiệp quốc (FAO) và Tổ chức Y tế thế giới (WHO) đã cùng phối hợp để đưa ra các nguyên lý về đánh giá nguy cơ hóa học trong thực phẩm. Sự ra đời của một số đơn vị liên kết giữa hai tổ chức này, ví dụ như JECFA (Ủy ban hỗn hợp về phụ gia thực phẩm) hay JMPR (Hội nghị liên kết về Dư lượng hóa chất bảo vệ thực vật) đã dần hoàn thiện và chuẩn hóa việc đánh giá nguy cơ an toàn vệ sinh thực phẩm. Nhiều tài liệu đã được hai tổ chức này ban hành cho việc đánh giá nguy cơ hóa học trong thực phẩm [127].

Năm 2009, WHO đã ban hành tài liệu “Nguyên tắc và phương pháp đánh giá nguy cơ hóa học trong thực phẩm” – trong đó nêu rõ đánh giá nguy cơ là thành phần quan trọng nhất trong phân tích nguy cơ và là nền tảng khoa

cho quản lý và truyền thông về nguy cơ. Việc đánh giá nguy cơ được xác định gồm 4 giai đoạn chính, gồm xác định mối nguy, mô tả mối nguy, đánh giá phơi nhiễm và mô tả nguy cơ [127]. Sơ đồ và nội dung chính của các bước thực hiện quá trình đánh giá nguy cơ theo WHO được tóm tắt trong hình 1.5.



Hình 1.5. Sơ đồ quá trình đánh giá nguy cơ.

1.4.1.1. Xác định mối nguy

Xác định mối nguy là xác định loại và bản chất của các tác dụng phụ của một hóa chất gây ra trên sinh vật sống hoặc trên cộng đồng. Xác định mối nguy là bước đầu tiên của quá trình đánh giá nguy cơ [127].

Việc xác định mối nguy cần trả lời hai câu hỏi:

- Bản chất của bất kỳ mối nguy đến sức khỏe của một chất có thể gây ra?

- Các trường hợp mối nguy có thể xảy ra?

Xác định mối nguy dựa vào việc phân tích các số liệu từ việc quan sát trên con người hoặc động vật, nghiên cứu trên động vật ở phòng thí nghiệm và các nghiên cứu in vitro dựa vào mối quan hệ giữa cấu trúc và hoạt tính.

1.4.1.2. Mô tả mối nguy

Mô tả mối nguy là mô tả về mặt định tính và định lượng (nếu có thể) về các đặc tính tương quan của một chất hoặc tình huống tiềm tàng có thể gây ra các tác dụng phụ. Việc mô tả có thể gồm việc đánh giá tương quan liều – tác dụng và các yếu tố không đảm bảo. Mô tả mối nguy là bước thứ hai của quá trình đánh giá nguy cơ [127].

Trong trường hợp tác dụng gây độc có ngưỡng thấp nhất, việc mô tả mối nguy cần phải thiết lập giá trị gây ảnh hưởng đến kết quả. Ví dụ như liều thấp nhất không quan sát thấy tác dụng (NOAEL) hoặc liều thấp nhất gây tác dụng (LOAEL), lượng tiêu thụ hàng ngày chấp nhận được (ADI) đối với các chất phụ gia, chất tồn dư. Trường hợp tác dụng gây độc không có ngưỡng hay tác nhân độc có khả năng gây ung thư, việc mô tả mối nguy cần xác định được hệ số ung thư (cancer slope factor).

1.4.1.3. Đánh giá phơi nhiễm

Đánh giá phơi nhiễm là việc xác định lượng phơi nhiễm của một hóa chất và các dẫn chất của nó đối với sinh vật sống hoặc trên cộng đồng. Đánh giá phơi nhiễm là bước thứ ba của quá trình đánh giá nguy cơ [127].

Điều tra tiêu thụ thực phẩm là bước quan trọng nhằm đánh giá phơi nhiễm bên cạnh mức ô nhiễm của độc tố vi nấm trong khẩu phần ăn. Phương pháp được thực hiện phổ biến hiện nay là thông qua phỏng vấn trực tiếp hoặc sử dụng bộ câu hỏi về khẩu phần ăn. Phương pháp điều tra khẩu phần ăn 24 giờ thường hay sử dụng trong điều tra khẩu phần, ngoài ra có thể sử dụng ước lượng về mức tiêu thụ thực phẩm theo tuần, tháng trong trường hợp lượng thực phẩm không được sử dụng thường xuyên.

Trong trường hợp độc tố vi nấm, việc đánh giá phơi nhiễm bao gồm việc đánh giá sự tồn tại và hàm lượng của độc tố trong chế độ ăn, tổng lượng thực phẩm có chứa hóa chất trong chế độ ăn và cách thức phơi nhiễm là ăn

lượng lớn thực phẩm hay ăn lượng thực phẩm có chứa hàm lượng hóa chất cao. Ngoài ra, việc đánh giá phơi nhiễm có thể được ước tính cho cả cộng đồng dân cư hoặc cho từng nhóm dân cư (ví dụ như trẻ sơ sinh, trẻ nhỏ, người lớn).

1.4.1.4. Mô tả nguy cơ

Mô tả nguy cơ là việc xác định định tính hoặc định lượng (nếu có thể) khả năng xảy ra ảnh hưởng có hại của một hóa chất trên sinh vật sống hoặc trên cộng đồng, dưới các điều kiện phơi nhiễm nhất định, có tính đến các yếu tố không đảm bảo. Đây là bước cuối cùng của quá trình đánh giá nguy cơ [127].

Việc mô tả nguy cơ cần ước tính được nguy cơ tiềm tàng đối với sức khỏe con người. Thông tin về nguy cơ có thể được mô tả định tính hoặc định lượng.

❖ Các thông tin định tính:

Các thông tin định tính có thể gồm:

- Tuyên bố hoặc đưa ra bằng chứng hóa chất không gây ra nguy cơ gây độc ngay cả ở hàm lượng cao;
- Tuyên bố hoặc đưa ra bằng chứng hóa chất không gây ra nguy cơ gây độc dưới các điều kiện sử dụng nhất định;
- Khuyến cáo tránh, hạn chế hoặc giảm việc sử dụng hóa chất.

❖ Các thông tin định lượng:

Các thông tin định lượng có thể gồm:

- So sánh giá trị đánh giá được với các giá trị đã được hướng dẫn, công bố;
- Ước tính nguy cơ tại các mức phơi nhiễm khác nhau;
- Nguy cơ tại mức tiêu thụ tối thiểu và tối đa;
- Khung phơi nhiễm an toàn.

Việc mô tả nguy cơ cần bao gồm các giải thích rõ ràng của bất kỳ độ không đảm bảo đo đã được sử dụng và các thông tin về đánh giá trên các nhóm dân cư dễ tổn thương.

Việc mô tả định lượng có thể bao gồm đánh giá khả năng gây ung thư thông qua đánh giá mức tăng số ca ung thư do phơi nhiễm độc tố vi nấm hoặc đánh giá so sánh mức phơi nhiễm với giá trị khuyến cáo, thường là PMTDI hoặc dựa trên khung phơi nhiễm của các độc tố vi nấm.

1.4.2. Cách tiếp cận về đánh giá nguy cơ ĐTVN

Có nhiều cách tiếp cận để đánh giá nguy cơ ĐTVN tùy thuộc vào tính chất gây độc của từng loại ĐTVN.

1.4.2.1. Đánh giá tiềm năng gây ung thư

Đối với những hợp chất có khả năng gây ung thư, phương pháp theo khuyến cáo của JECFA, tiềm năng gây ung thư được tính dựa trên các nghiên cứu về dịch tễ học và độc tính trên động vật.

Theo Cơ quan Nghiên cứu Ung thư Quốc tế (IARC), aflatoxin B1 được phân loại vào nhóm 1 (nhóm gây ung thư cho người), ochratoxin A và fumonisin B1 được phân loại vào nhóm 2B (có thể gây ung thư cho người) [77, 79]. AFB1 là aflatoxin phổ biến nhất, được sản sinh chủ yếu bởi *Aspergillus spp.*, được chứng minh gây độc cho gan, gây đột biến, ức chế miễn dịch và gây ung thư. Phơi nhiễm của người dân với AFB1 đặc biệt nguy hiểm đối với sức khỏe cộng đồng ở quốc gia có tỷ lệ nhiễm vi rút viêm gan B (HBV) cao trong dân số như Việt Nam, vì nguy cơ ung thư gan do phơi nhiễm với aflatoxin ở người dương tính với HBV ước tính cao hơn khoảng 30 lần so với người âm tính với HBV. Đối với người âm tính với virus viêm gan B, tiềm năng gây ung thư được tính là 0,01 ca ung thư hàng năm trên 100.000 dân với lượng phơi nhiễm 1 ng AFB1/kg bw/ngày. Đối với người dương tính với virus viêm gan B, tiềm năng gây ung thư tương ứng là 0,3 ca. Phương pháp này đã được nhiều nghiên cứu sử dụng đối với AFB1 do tính chất gây ung thư nguy hiểm của hợp chất này [76, 86].

Đối với các độc tố vi nấm khác, khả năng gây ung thư thấp hơn so với AFB1, do đó thường được các nghiên cứu tiếp cận theo cách thứ hai dưới đây.

1.4.2.2. Đánh giá dựa trên liều hàng ngày chấp nhận được

Cách tiếp cận này đánh giá độc tính cấp của các ĐTVN, có thể được sử dụng cho nhiều loại độc tố vi nấm khác nhau. Về nguyên tắc, liều phơi nhiễm

của các ĐTVN hàng ngày được so với giá trị PMTDI (*provisional maximum tolerable daily intake* - liều tối đa hàng ngày dung nạp được) đã được thiết lập cho các ĐTVN. Thông thường giá trị PMTDI được tính toán thông qua các nghiên cứu trên động vật, sử dụng các giá trị NOAEL hoặc LOAEL. Một số nghiên cứu gọi giá trị này là liều tham chiếu cấp tính (*acute reference dose*). Một số nghiên cứu không thiết lập PMTDI mà thiết lập PMTWI (liều tối đa hàng tuần dung nạp được) [35, 127, 313].

Cách tiếp cận này có thể áp dụng đối với các độc tố vi nấm như OTA, FUB1 và ZEA. Phơi nhiễm với OTA có liên quan đến tác dụng gây độc tế bào. Ủy ban chuyên gia FAO/WHO về phụ gia thực phẩm (JECFA) đã thiết lập mức liều tối đa hàng tuần dung nạp được (PMTWI) của OTA ở mức 100 ng/kg bw/tuần [77]. Fumonisin là nhóm độc tố vi nấm được sản xuất bởi các loài *fusarium*. FUB1 là fumonisin phổ biến nhất, gây độc cho gan và thận trên động vật nghiên cứu. Zearalenon là một loại độc tố vi nấm khác được sản sinh bởi các loài *fusarium*. ZEA có thể ảnh hưởng đến chức năng sinh sản. JECFA đã thiết lập các giá trị liều tối đa hàng ngày dung nạp được (PMTDI) cho ZEA và FUB1 tương ứng là 0,5 và 2 µg/kg bw/ngày [15,16].

1.4.2.3. Đánh giá dựa trên khung phơi nhiễm (*margin of exposure*)

Khung phơi nhiễm (MOE – *margin of exposure*) là điểm tham chiếu được xác định từ mối quan hệ giữa liều và tác động, thường được áp dụng đối với các chất ô nhiễm có khả năng gây độc trên gen và gây ung thư. MOE là tỷ lệ giữa giá trị cận dưới của liều chuẩn (BMDL – *lower confidence limit of benchmark dose*) chia cho liều phơi nhiễm. Thông thường, BMDL₁₀ được sử dụng vì nó là giá trị có độ tin cậy đạt 95%. Giá trị MOE càng nhỏ thì nguy cơ càng cao. Theo quy định châu Âu, giá trị MOE trên 10.000 tính từ BMDL₁₀ cho thấy không có nguy cơ [73].

Cách tiếp cận theo MOE có thể được sử dụng để đánh giá nguy cơ đối với AFB1 và FUB1 do khả năng gây ung thư và gây độc trên gen. Theo Benford và cộng sự, giá trị BMDL₁₀ của AFB1 từ nhiều nghiên cứu khác nhau dao động từ 0,140 đến 0,306 mg/kg bw/ngày [41]. EFSA sử dụng giá trị BMDL₁₀ của AFB1 là 0,17 mg/kg bw/ngày để tính MOE. Đối với FUB1,

Bondy và cộng sự đề xuất sử dụng $BMDL_{10}$ từ 0,15 đến 1,11 mg/kg bw/ngày để xác định MOE [46]. Tuy nhiên, tiếp cận theo MOE thường ít được sử dụng hơn trong nghiên cứu đánh giá nguy cơ.

1.4.3. Nghiên cứu đánh giá nguy cơ độc tố vi nấm trên thế giới

Trên thế giới hiện nay, ĐTVN trong lương thực, thực phẩm là một mối đe dọa rất lớn đối với ngành công nghiệp thực phẩm và chăn nuôi gây thiệt hại về kinh tế và ảnh hưởng nghiêm trọng đến sức khỏe của người và vật nuôi. Đánh giá nguy cơ nhằm mục đích xác nhận nguy cơ sức khỏe đối với ĐTVN trong thực phẩm để can thiệp và quản lý nguy cơ ĐTVN trong thực phẩm.

Trong an toàn thực phẩm, nguy cơ ĐTVN được xếp hạng là nghiêm trọng nhất trên cả các chất gây ô nhiễm tổng hợp, độc tố thực vật, phụ gia thực phẩm hoặc dư lượng thuốc trừ sâu. Chính vì vậy, việc nghiên cứu đánh giá nguy cơ được coi là thiết yếu và cần thiết ở mọi quốc gia. Tuy nhiên, trong các báo cáo của JECFA, dữ liệu về thực phẩm nhiễm ĐTVN của hầu hết các nước đang phát triển thường được mô tả không đầy đủ nên không đủ cơ sở để đánh giá nguy cơ ĐTVN tại các quốc gia này [42, 76, 129].

1.4.3.1. Aflatoxin

Phơi nhiễm AF là một vấn đề sức khỏe toàn cầu nghiêm trọng. Đặc biệt nghiêm trọng là các nước ở khu vực nhiệt đới và cận nhiệt đới như Châu Phi, Đông nam Á và Trung Quốc... Theo ước tính, AF là nguyên nhân gây khoảng 4,6 - 28,2% các trường hợp ung thư tế bào gan nguyên phát (HCC) trên toàn thế giới [128].

Năm 1974, Wogan và cộng sự đã nghiên cứu mô hình thực nghiệm trên chuột cống cho thấy ở liều 50 $\mu\text{g/kg}$ AFB1 tỷ lệ chuột mắc ung thư biểu mô gan cao (80%) và ở liều 100 $\mu\text{g/kg}$ AFB1 100% (28/28) chuột mắc HCC. Trong khi đó, ngay ở khẩu phần ăn nhiễm 1 ppb AFB1 đã có 1 chuột thí nghiệm bị HCC và 7 chuột có dấu hiệu tổn thương bệnh lý gan [130].

Năm 1998, JECFA nghiên cứu mối liên quan giữa AF và nguy cơ HCC để xác định tỉ lệ mắc HCC nhằm đưa giới hạn AF đến một ngưỡng an toàn hơn từ mức 20 $\mu\text{g/kg}$ xuống còn 10 $\mu\text{g/kg}$. Với giả thiết, tất cả lương thực thực

phẩm phơi nhiễm AF cao hơn ngưỡng tiêu chuẩn bị loại bỏ, thì ở các nước có tỉ lệ dân số mắc HBV 25%, HCC sẽ giảm khoảng 300 ca/1 tỷ người mỗi năm. Nhưng ở các nước có tỉ lệ dân số mắc HBV 1% thì HCC chỉ giảm khoảng 2 ca/1 tỷ người mỗi năm. Điều này chứng minh sự phơi nhiễm AF trong lương thực, thực phẩm liên quan chặt chẽ đến nguy cơ HCC [76].

Theo nghiên cứu của Liu và Wu (2010) ước tính gánh nặng toàn cầu do HCC gây ra do phơi nhiễm AF bằng cách thu thập dữ liệu về mức độ tiêu thụ ngô, lạc nhiễm AF và tỉ lệ dân số mắc HBV. Nguy cơ mắc HCC do phơi nhiễm AFB1 cùng với yếu tố nguy cơ của số người mắc và không mắc HBV. Từ đó Liu và Wu đã ước tính rằng trong 550.000 – 600.000 ca mắc ung thư gan mới mỗi năm trên toàn thế giới, có khoảng 25.200 đến 155.000 ca có thể quy cho AFB1. Nói cách khác, AF có thể là nguyên nhân của 4,6 - 28,2% trường hợp ung thư gan trên toàn cầu. Những trường hợp này hầu hết xảy ra ở Nam Sahara (châu Phi), Đông nam Á và Trung Quốc là nơi dân cư có tỉ lệ mắc HBV và sử dụng lương thực nhiễm AF cao không kiểm soát [86].

Kimanya và cộng sự chứng minh có sự phơi nhiễm AF (158 µg/kg) và fumonisin (11,05 µg/kg) trong cao ngô của Tanzania [81]. Adetunji và cộng sự cũng công bố lượng phơi nhiễm AF (tối đa 6738 µg/kg), fumonisin B1 (tối đa 10,447 µg/kg) và ZEA (tối đa 2044 µg/kg) lần lượt trong 67,9 và 17,0% mẫu ngô hạt được lưu trữ ở Nigeria [30]. Tương tự, năm 2015, Okeke và cộng sự đã công bố mức phơi nhiễm AF (588 µg/kg), citrinin (17 µg/kg), fumonisin (2294 µg/kg) và ZEA (205 µg/kg) trong một mẻ ngô vàng được sử dụng cho việc chế biến ogi (cháo ngô lên men) [98]. Năm 2016, AFB1 cũng được báo cáo tìm thấy ở ngô và ogi ở Nigeria có nồng độ tối đa tương ứng là 8222 µg/kg và 1903 µg/kg [52]

Trong một nghiên cứu đánh giá và phân tích mối nguy giữa HCC và AF, Yan Liu và cộng sự đã phân tích kết quả của 17 công trình nghiên cứu với tổng số 1.680 ca mắc HCC với 3.052 ca đối chứng trong 479 bài báo. Tất cả các nghiên cứu này được thực hiện ở Trung Quốc, Đài Loan hoặc Nam Sahara (châu Phi). Qua phân tích tổng hợp các số liệu thu được, các tác giả đã cho rằng phơi nhiễm AF liên quan có ý nghĩa với nguy cơ HCC, cho dù có

hay không có yếu tố HBV. Tuy nhiên nếu đồng thời phơi nhiễm AF và mắc HBV thì sẽ tăng nguy cơ mắc HCC [85].

Ngoài HCC, còn có các bằng chứng cho rằng AF là nguyên nhân gây ra các khối u ác tính trong cơ thể, đặc biệt là phổi. Một nghiên cứu dịch tễ học ở Hà Lan từ năm 1963 đến 1980 trên một nhóm công nhân ép dầu lạc phơi nhiễm AFB1 cho thấy, trong thời gian nghiên cứu, tỷ lệ tử vong do ung thư phổi và các ung thư khác ở nhóm phơi nhiễm (n=71) cao hơn so với nhóm không phơi nhiễm (n=67) [69].

Các nghiên cứu đánh giá mức độ phơi nhiễm AF đã được nhiều quốc gia thực hiện, có thể trên các đối tượng thực phẩm có nguy cơ hoặc trên tất cả các loại thực phẩm theo chế độ ăn. Phần lớn các nghiên cứu hướng đến đánh giá nguy cơ gây ung thư gan (số lượng ca ung thư trên 100.000 dân/năm) dựa trên khuyến nghị của WHO rằng người mang vi rút viêm gan (HBV) phơi nhiễm với AF có thể làm tăng nguy cơ ung thư gan cao gấp 30 lần so với người không mang HBV. Ước tính nguy cơ ung thư gan do AFB1 của nhóm người âm tính với HBV là 0,01 ca/năm trên 100.000 người và nhóm dân số dương tính với HBV là 0,3 ca/năm trên 100.000 người ứng với liều phơi nhiễm 1 ng AFB1/kg bw/ngày [104].

Bảng 1.12 tổng hợp kết quả của một số nghiên cứu đánh giá nguy cơ về aflatoxin tại một số quốc gia.

Bảng 1.12. Liều phơi nhiễm và nguy cơ ung thư theo một số nghiên cứu đánh giá nguy cơ ở các quốc gia trên thế giới

Quốc gia	Thời gian	Loại thực phẩm	Liều phơi nhiễm (ng/kg bw/ngày)	Nguy cơ ung thư (ca/100.000 dân/năm)	TLTK
Châu Phi	2008	Từng loại thực phẩm	NL: 1,4-850	Mozambique: 79,4 Gambia: 46,5 Namibia: 3,1	[114]
New Zealand	2011	Toàn bộ chế độ ăn	NL: 0,19-0,21 TE: 0,46-0,54	NL: <0,1	[55]
Pháp	2011	Toàn bộ chế độ ăn	NL: 0,0019-0,89 TE: 0,0013-1,56	NL: 0,011	[83,116]

<i>Quốc gia</i>	<i>Thời gian</i>	<i>Loại thực phẩm</i>	<i>Liều phơi nhiễm</i> (ng/kg bw/ngày)	<i>Nguy cơ ung thư</i> (ca/100.000 dân/năm)	<i>TLTK</i>
Malaysia	2012	Toàn bộ chế độ ăn	NL: 24,3-34,0	NL: 0,61-0,85	[53]
Brazil	2012	Lạc và các loại hạt	NL: 6,8-27,6	NL: 0,075-0,31	[34]
Trung Quốc	2012	Lạc	NL: 0,106-0,108 TE: 0,218-0,222	NL: 0,003-0,17	[59]
Hồng Kông	2013	Toàn bộ chế độ ăn	NL: 0,2-2,8	NL: 0,033-0,039	[51]
Nhật Bản	2013	Gạo	NL: 1,2 TE: 2,34	NL: 0,021 TE: 0,040	[112]
Hàn Quốc	2016	Toàn bộ chế độ ăn	NL: 0,26-1,1	-	[92]
Thái Lan	2016	Gạo	NL: 0,12-0,80	NL: 0.011	[100]
Ai Len	2016	Toàn bộ chế độ ăn	NL: 0,23-10,6 TE: 0,60-6,8	-	[67]
Pakistan	2018	Gạo	NL: 4,11-7,21 TE: 4,16-7,48	NL: 0,07-0,122 TE: 0,071-0,127	[88]
ASEAN	2019	Ngô và lạc (từng sản phẩm)	-	Indonesia: 1,228 (ngô) Malaysia: 0,371 (lạc) Phillipines: 0,045 (lạc) Thái Lan: 0,071 (ngô)	[38]

Ghi chú: NL: người lớn TE: trẻ em

Có thể thấy rằng, các kết quả về liều phơi nhiễm và nguy cơ gây ung thư gan của aflatoxin khá khác biệt giữa các quốc gia. Nhìn chung, nguy cơ gây ung thư ở các quốc gia phát triển như Nhật Bản, Pháp, New Zealand thấp hơn các quốc gia đang phát triển (châu Phi, Đông Nam Á). Tuy nhiên, nguy cơ này phụ thuộc vào loại thực phẩm được lựa chọn để đánh giá; kết quả trên một loại thực phẩm hay toàn bộ chế độ ăn của người dân.

1.4.3.2. Các độc tố vi nấm ochratoxin A, fumonisin B1 và zearalenon

Các ĐTVN có cấu trúc hóa học và sinh tổng hợp rất khác nhau do đó có nhiều tác dụng sinh học tác động không tốt đến sức khỏe như: gây ung thư, ức chế miễn dịch hoặc rối loạn hormon sinh dục, có khả năng gây ra rối loạn chuyển hóa nghiêm trọng ở người.

So với AF thì đánh giá nguy cơ gây ung thư của FU và OTA phức tạp hơn vì thiếu sự xác định mối nguy của các loại ĐTVN này đối với bệnh tật của con người [79]. Đối với OTA, cơ chế gây ung thư vẫn không rõ ràng, hiện nay có 6 giả thuyết gây ung thư của chất này được liệt kê bởi JECFA [78]. Kết quả gây biến đổi gen, ung thư thận khi bị phơi nhiễm OTA liều cao. Sự phơi nhiễm hàng ngày với OTA chủ yếu là ở châu Âu, nơi lương thực, thực phẩm chế biến thường nhiễm OTA cao [78, 119].

Do đó, các nghiên cứu đánh giá nguy cơ của các chất FUB1, OTA và ZEA thông qua so sánh với giá trị TDI. Thông tin độc tính và phân nhóm về khả năng gây ung thư của IARC đối với 3 loại độc tố được trình bày ở bảng 1.13.

Bảng 1.13. Thông tin về độc tính được sử dụng trong đánh giá nguy cơ của 3 độc tố vi nấm FUB1, OTA và ZEA

Độc tố vi nấm	Cách tính	PMTDI hoặc PMTWI	IARC
Ochratoxin A	PMTWI	0,1 µg/kg bw/tuần	Nhóm 2B
Fumonisin B1	PMTDI	2,0 µg/kg bw/ngày	Nhóm 2B
Zearalenon	PMTDI	0,5 µg/kg bw/ngày	Nhóm 3

Đối với OTA, do giá trị PMTDI chưa được thiết lập, các nghiên cứu có thể chuyển từ PMTWI bằng cách chia giá trị này cho 7 hoặc sử dụng nghiên cứu về liều phơi nhiễm trong 1 tuần. Giá trị PMTDI ước tính cho OTA là 0,0143 µg/kg bw/ngày hay 14,3 ng/kg bw/ngày [56].

Bảng 1.14, 1.15 và 1.16 tổng hợp một số kết quả về liều phơi nhiễm của OTA, FUB1 và ZEA theo một số nghiên cứu đánh giá nguy cơ đã được thực hiện trên thế giới.

Bảng 1.14. Liều phơi nhiễm của độc tố vi nấm OTA (ng/kg bw/ngày)

Quốc gia	Năm	Loại thực phẩm	Liều phơi nhiễm	TLTK
Bồ Đào Nha	2010	Ngũ cốc	NL: 3,98	[60]
Châu Âu	2011	Nhiều loại thực phẩm	NL: 49-100	[47]
Hồng Kông	2013	Toàn bộ chế độ ăn	NL: 0,19-0,77	[51]
Nhật Bản	2013	Toàn bộ chế độ ăn	NL: 0,21 (P95) TE: 0,32 (P95)	[121]
Pháp	2013	Bánh mì, đồ uống có cồn	NL: 0,28-1,92 TE: 0,23-2,82	[116]
New Zealand	2014	Toàn bộ chế độ ăn	NL: 0,3-1,5 TE: 0,8-3,2	[56]
Trung Quốc	2014	Ngũ cốc	NL: 4,62 TE: 13,9	[84]
Li băng	2014	Toàn bộ chế độ ăn	NL: 4,28	[105]
Ai Len	2016	Toàn bộ chế độ ăn	NL: 0,5-7,3 TE: 2,3-4,7	[67]
Hàn Quốc	2016	Toàn bộ chế độ ăn	NL: 0,27-2,6	[92]
Pakistan	2018	Gạo	NL: 1,17-1,93 TE: 1,18-2,00	[88]

Ghi chú: NL: người lớn TE: trẻ em

Bảng 1.15. Liều phơi nhiễm của độc tố vi nấm FUB1 (ng/kg bw/ngày)

Quốc gia	Năm	Loại thực phẩm	Liều phơi nhiễm	TLTK
Pháp	2013	Bánh mì, đồ uống có cồn	NL: 7,45-29,1 TE: 15,4-44,6	[116]
Hồng Kông	2013	Toàn bộ chế độ ăn	NL: 1,6-97,3	[51]
Nhật Bản	2013	Toàn bộ chế độ ăn	NL: 0 (P95) TE: 1,2-10,2 (P95)	[121]

Pakistan	2018	Gạo	NL: 34,1-61,9 TE: 34,5-64,2	[88]
Hàn Quốc	2016	Toàn bộ chế độ ăn	NL: 49,0-210	[92]

Ghi chú: NL: người lớn TE: trẻ em

Bảng 1.16. Liều phơi nhiễm của độc tố vi nấm ZEA (ng/kg bw/ngày)

<i>Quốc gia</i>	<i>Năm</i>	<i>Loại thực phẩm</i>	<i>Liều phơi nhiễm</i>	<i>TLTK</i>
Hà Lan	2010	Toàn bộ chế độ ăn	NL: 0,05-0,50	[89]
Hồng Kông	2013	Toàn bộ chế độ ăn	NL: 6,1-101,5	[51]
Pháp	2013	Bánh mì, đồ uống có cồn	NL: 5,9-25,5 TE: 11,5-46,3	[116]
Trung Quốc	2014	Ngũ cốc	NL: 155 TE: 464	[84]
Hàn Quốc	2016	Toàn bộ chế độ ăn	NL: 4,4-17,0	[92]
Pakistan	2018	Gạo	NL: 17,2-26,7 TE: 17,4-27,7	[88]

Ghi chú: NL: người lớn TE: trẻ em

Như vậy, có rất nhiều nghiên cứu về đánh nguy cơ đối với các độc tố vi nấm đã được thực hiện trên thế giới. Phần lớn các nghiên cứu đều sử dụng phương pháp so sánh với giá trị PMTDI đã được thiết lập. Ngoài ra, một số nghiên cứu thực hiện đánh giá thông qua khung phơi nhiễm, tuy nhiên không nhiều. Các nghiên cứu cho thấy nguy cơ cao đối với OTA (PMTDI chỉ 14,3 ng/kg bw/ngày), trong khi hầu hết các liều phơi nhiễm của FUB1 và ZEA đều thấp hơn mức PMTDI.

1.4.4. Nghiên cứu đánh giá nguy cơ ĐTVN ở Việt Nam

Tại Việt Nam, Luật An toàn thực phẩm (2010) đã yêu cầu áp dụng đánh giá nguy cơ đối với các sản phẩm nguy cơ cao, đối với cả các sản phẩm tiêu thụ trên thị trường nội địa lẫn xuất khẩu [8]. Tuy nhiên, trên thực tế, năng

lực đánh giá nguy cơ vẫn còn nhiều hạn chế do cả về nguồn lực lẫn kinh phí và do hình thức kinh doanh bán lẻ thực phẩm vẫn chiếm ưu thế trên thị trường trong nước. Vì vậy, việc xây dựng cách tiếp cận dựa vào nguy cơ để cải thiện quản lý an toàn thực phẩm nói chung và ĐTVN nói riêng là hết sức cần thiết để giúp đưa ra các bằng chứng cho các nhà hoạch định chính sách về ứng dụng của đánh giá nguy cơ trong quản lý an toàn thực phẩm.

Hầu hết các công trình nghiên cứu mới chỉ dừng lại ở mức định lượng độc tố và xác định các chủng nấm mốc trong thực phẩm. Đến nay mới chỉ có vài công trình thực hiện các nghiên cứu về độc tính, đánh giá phơi nhiễm và đánh giá nguy cơ các độc tố vi nấm trong thực phẩm.

Năm 2003, theo kết quả nghiên cứu của Bùi Thị Thanh Hà trong các bệnh nhân ung thư gan nguyên phát điều trị tại Bệnh viện Hữu Nghị (Hà Nội) phát hiện thấy AFB1 trong tổ chức gan của 86,84% số bệnh nhân; 62,78% bệnh nhân có cùng lúc 2 yếu tố nguy cơ là AFB1 và HBV; 43,33% bệnh nhân mang cùng lúc 3 yếu tố nguy cơ là AFB1, HBV và uống rượu. Điều này cho thấy AFB1 là yếu tố nguy cơ liên quan trong bệnh ung thư gan nguyên phát [5].

Năm 2016, nhóm nghiên cứu của Huong BTM và cộng sự đã công bố các nghiên cứu về đánh giá nguy cơ đối với aflatoxin B1, ochratoxin A và fumonisin tại Lào Cai. Kết quả cho thấy mức độ phơi nhiễm của aflatoxin B1 và ochratoxin A lần lượt là 39,4 ng/kg bw/ngày và 18,7 ng/kg bw/ngày cao hơn so với mức PMTDI, trong khi liều phơi nhiễm của fumonisin là 1,4 µg/kg bw/ngày thấp hơn so với PMTDI. Nguy cơ gây ung thư của aflatoxin B1 là 2,7 ca/100.000 người/năm. Khung phơi nhiễm (MOE) gây ung thư thận do ochratoxin A và ung thư gan do fumonisins lần lượt là 1.124 và 1.954 đều thấp hơn nhiều so với mức an toàn 10.000 do châu Âu đề xuất cho thấy nguy cơ cao của 2 loại độc tố vi nấm này [73].

Trong một nghiên cứu khác tại Lào Cai, nhóm tác giả Huong BTM và cộng sự cũng công bố nguy cơ gây ung thư gan do phơi nhiễm aflatoxin B1 từ sản phẩm gạo và ngô là 1,5 ca/100.000 người/năm (đối với người lớn) và 2,3 ca/100.000 người/năm (đối với trẻ em). Theo đó, liều phơi nhiễm của

aflatoxin từ gạo là 21,7 ng/kg bw/ngày (người lớn) và 33,7 ng/kg bw/ngày (trẻ em). Liều phơi nhiễm của fumonisin từ gạo là 536 ng/kg bw/ngày (người lớn) và 1019 ng/kg bw/ngày (trẻ em). Tuy nhiên, nghiên cứu này chỉ đánh giá liều phơi nhiễm từ gạo và sử dụng phương pháp ELISA để xác định hàm lượng aflatoxin tổng số và fumonisin tổng số [74].

Có thể thấy rằng, nghiên cứu đánh giá nguy cơ ở Việt Nam còn rất hạn chế và thường chỉ tập trung vào một nhóm dân cư hoặc nhóm sản phẩm nhất định. Vai trò của đánh giá nguy cơ do đó còn hạn chế, chưa có đóng góp vào việc kiểm soát ô nhiễm độc tố vi nấm ở Việt Nam, trong khi kết quả đánh giá nguy cơ là dữ liệu khoa học làm cơ sở để các quốc gia đưa ra các hàng rào kỹ thuật, biện pháp kiểm soát an toàn thực phẩm. Ngoài ý nghĩa về việc đánh giá tác động đối với sức khỏe, các kết quả đánh giá nguy cơ còn có ý nghĩa rất lớn trong việc bảo vệ lợi thế cạnh tranh của sản phẩm hàng hóa, bảo vệ thị trường nội địa bằng các hàng rào kỹ thuật trước tác động của thương mại trong xu thế toàn cầu hóa.

Chương 2

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG TIỆN NGHIÊN CỨU

2.1.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu của đề tài là 7 độc tố vi nấm gồm 4 aflatoxin (B1, B2, G1 và G2), fumonisin B1, ochratoxin A và zearalenon.

Các thực phẩm nghiên cứu đánh giá mức độ ô nhiễm các độc tố trên là một số loại ngũ cốc (gạo, ngô) và các hạt có dầu (lạc, vừng) được thu thập tại một số địa phương ở phía Bắc Việt Nam.

2.1.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu xây dựng phương pháp, thẩm định phương pháp xác định đồng thời các độc tố vi nấm trong ngũ cốc và hạt có dầu được thực hiện tại phòng thí nghiệm thuộc Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm Quốc gia. Thời gian thực hiện từ năm 2015-2016.

Nghiên cứu điều tra tiêu thụ thực phẩm và lấy mẫu đánh giá hàm lượng độc tố vi nấm trong thực phẩm được thực hiện từ 2016 – 2018, tại các địa phương thuộc 5 tỉnh thành phố gồm:

- Bắc Giang: thị trấn Kép, xã Đại Lâm, huyện Lạng Giang
- Hà Nội: phường Nhân Chính và Thanh Xuân Nam, quận Thanh Xuân
- Thái Bình: xã Song Lãng và Song An, huyện Vũ Thư
- Thanh Hóa: xã Đa Lộc và Hưng Lộc, huyện Hậu Lộc
- Hà Giang: xã Cán Tỷ, huyện Quản Bạ và xã Thái Phìn Lũng, huyện Mèo Vạc.

2.1.3. Phương tiện nghiên cứu

2.1.3.1. Thiết bị, dụng cụ

❖ *Thiết bị:*

Các thiết bị sử dụng trong nghiên cứu, được định kỳ hiệu chuẩn, gồm:

- Hệ thống sắc ký lỏng khối phổ hai lần (LC-MS/MS) gồm thiết bị sắc ký lỏng của Shimadzu, Nhật Bản kết nối khối phổ ba tứ cực của SCIEX, Mỹ.
- Máy lắc xoáy, IKA, Trung Quốc.
- Máy đồng nhất mẫu HR1843, Philips, Việt Nam.

- Máy li tâm Z383K, Hermle, Đức.
- Cân phân tích (có độ chính xác 0,1 mg), Mettler Toledo, Thụy Sĩ.
- Cân kỹ thuật (có độ chính xác 0,01 g), Mettler Toledo, Thụy Sĩ.



Hình 2.1. Thiết bị sắc ký lỏng khối phổ hai lần sử dụng trong nghiên cứu.

❖ Dụng cụ

- Micropipet 20-200 μL , 100-1000 μL và 1000-5000 μL .
- Bình định mức: 5, 10, 50, 100 mL, 250 mL, 1000 mL.
- Ống ly tâm nhựa 2 mL và 50 mL.
- Lọ đựng mẫu loại 1,8 mL, có nắp.
- Màng lọc mẫu 0,2 μm .
- Pipet pasteur.
- Ống đong, phễu.
- Giấy lọc.

2.1.3.2. Dung môi, hóa chất

Các loại hoá chất sử dụng đều thuộc loại tinh khiết phân tích.

- Dung môi loại dùng cho sắc ký: methanol, acetonitril của Merck, Đức.
- Các hóa chất HCOOH, CH₃COOH, MgSO₄ khan, CH₃COONa, CH₃COONH₄ của Merck, Đức.
- Chất hấp phụ PSA (primary secondary amines), C18 được cung cấp bởi Agilent, Mỹ.
- Nước cất 2 lần thu được từ hệ thống cất nước Hamilton, Anh.

- Dung môi chiết: Dung dịch acetonitril chứa 1% acid acetic (v/v): Hút 10 mL acid acetic hòa vào acetonitril, định mức đến 1 L.
- Hỗn hợp muối chiết: Cân $8,0 \pm 0,05$ g $MgSO_4$ khan và $2 \pm 0,01$ g NaCl trên cân phân tích cho vào túi hoặc dụng cụ chứa có thể đậy kín, trộn đều.
- Hỗn hợp chất phân bố (d-SPE): Cân 100 ± 5 mg C18 và 150 ± 20 mg $MgSO_4$ trên cân phân tích cho vào ống ly tâm nhỏ 2 mL. Lắc để trộn đều.

2.1.3.3. Chất chuẩn

- Chuẩn aflatoxin B1 (lô số 025M4092V), có hàm lượng 99,64%;
- Chuẩn aflatoxin B2 (lô số 025M4138V), có hàm lượng 99,00%;
- Chuẩn aflatoxin G1 (lô số 055M4047V), có hàm lượng 98,31%;
- Chuẩn aflatoxin G2 (lô số 114M4032V), có hàm lượng 100,00%;
- Chuẩn ochratoxin A (lô số 045M4021V), có hàm lượng 99,8%;
- Chuẩn zearalenon (lô số 084M4034V), có hàm lượng 100,0%.

Các chất chuẩn trên của hãng Sigma Aldrich, Mỹ.

- Chuẩn funimisin B1 (lô số 2-TIM-16-1), có hàm lượng 98%, của hãng TRC, Canada.

Chứng chỉ các chất chuẩn được minh chứng ở Phụ lục 1.

2.2. NỘI DUNG NGHIÊN CỨU

2.2.1. Xây dựng phương pháp xác định đồng thời các độc tố vi nấm bằng LC-MS/MS

2.2.1.1. Khảo sát các điều kiện phân tích các độc tố vi nấm bằng LC-MS/MS

- Khảo sát điều kiện sắc ký lỏng: tìm các điều kiện tách sắc ký bao gồm pha động, pha tĩnh.
- Khảo sát điều kiện khối phổ: tìm các điều kiện tối ưu của MS để xác định ion phân tử; lựa chọn các ion sản phẩm phù hợp.

2.2.1.2. Khảo sát các điều kiện xử lý mẫu

Ứng dụng phương pháp QuEChERS và thực hiện các khảo sát:

- Về dung môi chiết
- Về quá trình làm sạch bằng d-SPE

2.2.1.3. Xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp xây dựng được

Phương pháp xây dựng được thẩm định với các thông số sau:

- Tính đặc hiệu
- Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ)
- Xây dựng đường chuẩn
- Độ lặp lại và độ đúng (độ thu hồi)

2.2.2. Xác định tỷ lệ nhiễm và hàm lượng các độc tố vi nấm trong các mẫu lấy tại một số địa phương phía Bắc Việt Nam

- Lấy mẫu tại các địa phương ở phía Bắc Việt Nam với 5 tỉnh thành phố gồm Hà Giang, Thanh Hóa, Bắc Giang, Thái Bình và Hà Nội.
- Ứng dụng phương pháp xây dựng được để phân tích các độc tố có thể có trong các mẫu và tính kết quả.

2.2.3. Đánh giá nguy cơ ĐTVN

2.2.3.1. Điều tra lượng tiêu thụ thực phẩm và đánh giá phơi nhiễm ĐTVN

Thực hiện điều tra chế độ tiêu thụ thực phẩm tại các địa phương lấy mẫu phân tích ở phía Bắc theo lứa tuổi và giới. Kết hợp với hàm lượng ĐTVN trong các đối tượng mẫu để đánh giá lượng phơi nhiễm độc tố vi nấm AFB1, FUB1, OTA và ZEA.

2.2.3.2. Mô tả nguy cơ độc tố vi nấm

Báo cáo phân tích nguy cơ một số loại ĐTVN trong thực phẩm gồm:

- Nguy cơ gây ung thư gan của AFB1.
- Nguy cơ do phơi nhiễm FUB1, OTA và ZEA so với PMTDI.

2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

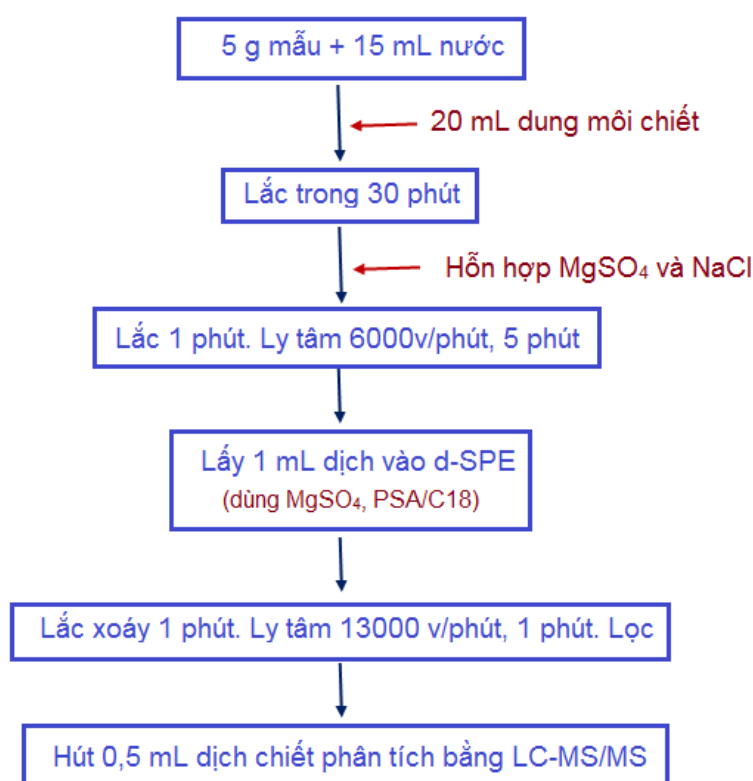
2.3.1. Xây dựng phương pháp xác định các độc tố vi nấm trong ngũ cốc và hạt có dầu

2.3.1.1. Hoàn thiện phương pháp xử lý mẫu

Phương pháp QuEChERS dựa trên chiết bằng acetonitril và tách nước bằng phân bố lỏng lỏng nhờ muối MgSO₄. Dịch chiết được làm sạch bằng chiết phân tán pha rắn (d-SPE), sau đó được xác định bằng LC-MS/MS. Việc xử lý mẫu được tiến hành chủ yếu theo phương pháp QuEChERS, với một số khảo

sát cải tiến phù hợp với nền mẫu là các loại ngũ cốc và hạt có dầu nghiên cứu. Các khảo sát tập trung vào việc chọn dung môi chiết và các yếu tố của quá trình làm sạch với d-SPE.

Tham khảo một số quy trình đã được công bố [82, 132], dự kiến quy trình chiết các ĐTVN như ở Hình 2.2.



Hình 2.2. Dự kiến quy trình khảo sát chiết các độc tố vi nấm

2.3.1.2. Xác định điều kiện sắc ký lỏng khối phổ hai lần (LC-MS/MS)

Trong nghiên cứu này, thiết bị phân tích chính được sử dụng là hệ thống LC-MS/MS gồm:

- Sắc ký lỏng của Shimadzu gồm 2 bơm cao áp LC 20AD-XR với bộ ổn nhiệt cột CTO-20A và bộ tiêm mẫu tự động SIL 20AC-XR.
- Cột sắc ký C18 (150 mm × 4,6 mm; 5µm) và tiền cột tương ứng của hãng Waters, Hoa Kỳ.
- Khối phổ ba tứ cực 5500 QQQ của ABSciex.

❖ **Lựa chọn các điều kiện khối phổ:**

Mỗi ĐTVN lựa chọn điều kiện phân mảnh phù hợp để có thể thu được 1 ion phân tử và 2 ion sản phẩm, ion có cường độ cao hơn được sử dụng để định lượng, ion có cường độ thấp hơn để xác nhận.

Cả hai chế độ ion dương và ion âm được khảo sát để lựa chọn các chế độ phù hợp với từng độc tố vi nấm.

❖ **Lựa chọn các điều kiện sắc ký lỏng:**

- Lựa chọn pha tĩnh.
- Lựa chọn pha động: thành phần pha động, các yếu tố của chế độ gradient, chọn chất nền sử dụng để tăng hiệu quả của quá trình ion hóa.

2.3.1.3. Thẩm định phương pháp phân tích

❖ **Pha dung dịch chuẩn:**

- Dung dịch chuẩn gốc: Cân một lượng chuẩn chính xác khoảng 10 mg từng chất chuẩn độc tố vi nấm, hòa tan và định mức đến 10 mL bằng acetonitril. Nồng độ của các dung dịch chuẩn gốc được tính chính xác dựa trên lượng cân thực tế và độ tinh khiết của chất chuẩn. Bảo quản ở -20°C trong lọ màu nâu, giữ được trong 2 năm.

- Dung dịch chuẩn trung gian hỗn hợp 1 (nồng độ AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 đều là 200 ng/mL; nồng độ của FUB1 là 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$; nồng độ của OTA, ZEA đều là 1000 ng/mL): Hút các lượng chuẩn gốc tương ứng và pha vào bình định mức 5 mL với acetonitril để thu được các nồng độ như trên. Bảo quản ở nhiệt độ khoảng 4°C , có thể giữ được trong 6 tháng.

- Dung dịch chuẩn trung gian hỗn hợp 2 (nồng độ AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 đều là 20 ng/mL; nồng độ của FUB1 là 2000 ng/mL; nồng độ của OTA, ZEA đều là 100 ng/mL): Hút 0,5 mL chuẩn hỗn hợp 1 và pha vào bình định mức 5 mL với acetonitril để thu được các nồng độ như trên. Bảo quản ở nhiệt độ khoảng 4°C , có thể giữ được trong 6 tháng.

Các dung dịch chuẩn xây dựng đường chuẩn: Pha dãy dung dịch dùng để xây dựng đường chuẩn như ở bảng 2.1.

Bảng 2.1. Pha dung dịch chuẩn xây dựng đường chuẩn

<i>Tên dung dịch</i>	<i>Dung dịch chuẩn trung gian 2 (μL)</i>	<i>Acetonitril có 1% acid acetic (*) (μL)</i>	<i>AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 (ng/mL)</i>	<i>OTA, ZEA (ng/mL)</i>	<i>FUB1 (ng/mL)</i>
C1	10	990	0,2	1,0	20
C2	50	950	1,0	5,0	100
C3	100	900	2,0	10	200
C4	250	750	5,0	25	500
C5	500	500	10	50	1000

(*) Trường hợp pha đường chuẩn trên nền mẫu thì thay thế bằng dịch chiết mẫu trắng.

❖ *Thẩm định tính đặc hiệu*

Tính đặc hiệu của phương pháp được đánh giá qua thực hiện phân tích và so sánh phổ của các chất phân tích trên 3 mẫu: mẫu trắng, mẫu chuẩn và mẫu thêm chuẩn. Mẫu trắng phải không được xuất hiện tín hiệu của chất phân tích, mẫu thêm chuẩn phải có tín hiệu chất phân tích tại thời gian lưu tương ứng thời gian lưu trên mẫu chuẩn.

Ngoài ra, tính đặc hiệu còn được khẳng định bằng số điểm nhận dạng (IP) và tỷ lệ các ion theo tiêu chuẩn EC657/2002 của Châu Âu [63].

❖ *Xây dựng đường chuẩn:*

Đường chuẩn dung môi được xây dựng bằng cách phân tích dãy dung dịch chuẩn có nồng độ thay đổi trên nền dung môi và lập phương trình phụ thuộc giữa tín hiệu chất phân tích và nồng độ tương ứng.

Đường chuẩn trên nền mẫu thực được xây dựng nhằm đánh giá ảnh hưởng nền và được sử dụng để loại trừ ảnh hưởng của nền mẫu đến kết quả phân tích.

Ảnh hưởng nền được đánh giá thông qua việc so sánh hệ số góc đường chuẩn được xây dựng trên nền dung môi và đường chuẩn xây dựng trên dịch chiết mẫu trắng của các nền mẫu. Ảnh hưởng nền (ME) được tính theo công thức (1):

$$ME = \frac{a_m - a_s}{a_s} \times 100 \quad (1)$$

trong đó:

ME (matrix effect): ảnh hưởng nền (%)

a_m : hệ số góc đường chuẩn trên nền mẫu (matrix)

a_s : hệ số góc đường chuẩn trên dung môi (solvent)

❖ **Thẩm định độ lặp lại và độ thu hồi:**

Để thẩm định độ lặp lại và độ thu hồi của phương pháp phân tích xây dựng được tiến hành thí nghiệm lặp lại trên nền mẫu trắng thêm chuẩn ở 3 mức nồng độ khác nhau, mỗi mức phân tích lặp lại 6 lần và tính toán kết quả theo các công thức:

- *Độ lặp lại*: được biểu diễn theo hệ số biến thiên CV(%), theo (2):

$$CV (\%) = \frac{S}{x} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{với } s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (3)$$

trong đó:

S: là độ lệch chuẩn

x_i : Nồng độ tính được của lần thử nghiệm thứ “i”

\bar{x} : Nồng độ trung bình tính được của n lần thử nghiệm.

n : Số lần thử nghiệm.

- *Độ thu hồi*: (công thức (4))

$$R (\%) = \frac{C}{C_c} \times 100 \quad (4)$$

trong đó:

R: độ thu hồi (%)

C: Nồng độ chất phân tích trong mẫu trắng thêm chuẩn.

C_c : Nồng độ chuẩn thêm (lý thuyết).

❖ **Xác định giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng:**

Trong nghiên cứu này giới hạn phát hiện (LOD) được xác định dựa trên tỷ lệ tín hiệu với nhiễu nền (S/N, Signal to noise ratio) qua phân tích mẫu thêm chuẩn ở nồng độ thấp bằng cách pha loãng dịch chiết mẫu thêm chuẩn đến khi còn phát hiện được tín hiệu của chất phân tích.

LOD là nồng độ mà tại đó tín hiệu lớn gấp 3 lần nhiễu (S/N = 3).

LOQ là nồng độ mà tại đó tín hiệu lớn gấp 10 lần nhiễu (S/N = 10).

2.3.2. Phương pháp lấy mẫu để đánh giá mức độ nhiễm độc tố vi nấm

2.3.2.1. Cỡ mẫu

Sử dụng công thức tính cỡ mẫu như sau [7]:

$$n = Z_{(1-\alpha/2)}^2 \frac{p(1-p)}{d^2} \quad (5)$$

trong đó:

n: cỡ mẫu tối thiểu cần đạt được;

$Z_{(1-\alpha/2)}$: hệ số tin cậy, được lấy ở độ tin cậy 95%;

α : mức ý nghĩa, với $\alpha = 0,05$, có $Z_{(1-\alpha/2)} = 1,96$;

p: ước lượng tỉ lệ biến nghiên cứu chính trong quần thể, trong nghiên cứu này p được ước lượng bằng tỉ lệ nhiễm độc tố vi nấm dự kiến, được ước tính là $p = 0,4$ (trên cơ sở nghiên cứu của Lê Thị Phương Thảo [26], Lê Văn Giang [3]);

d: sai số chấp nhận được của ước lượng, với $p = 0,4$ lấy $d = 0,1$.

Thay vào công thức, cỡ mẫu tính toán theo lý thuyết cho mỗi địa phương là 92 mẫu, tổng số lượng mẫu tối thiểu của cả 5 địa phương là 460 mẫu.

Thực tế, số lượng mẫu tại mỗi địa phương được lấy đều vượt mức tối thiểu nêu trên (Bảng 3.12).

2.3.2.2. Phương pháp và địa điểm lấy mẫu

- Các loại mẫu thu thập tại các địa phương gồm: gạo, ngô (đại diện cho ngũ cốc), lạc và vừng (đại diện cho hạt có dầu).

- Địa điểm lấy mẫu: 5 tỉnh, thành phố phía Bắc Việt Nam gồm: Hà Nội, Thanh Hóa, Thái Bình, Bắc Giang và Hà Giang. Địa điểm lấy mẫu thực phẩm

được lựa chọn theo địa điểm điều tra khẩu phần, ngoài ra mở rộng lấy mẫu tại các địa phương lân cận.

- Lấy mẫu theo phương pháp lấy mẫu ngẫu nhiên theo danh sách các cơ sở (là cửa hàng hoặc hộ gia đình) tại mỗi địa phương. Mỗi cơ sở lấy 1 mẫu đối với 1 loại sản phẩm. Các mẫu đều có hình thức bên ngoài bình thường, không có dấu hiệu của nấm mốc. Lượng mẫu tối thiểu được lấy là 1 kg, được đóng túi kín, mã hóa và chuyển về phòng thí nghiệm phân tích các độc tố vi nấm.

2.3.3. Phương pháp điều tra tiêu thụ thực phẩm

Tại các địa phương lấy mẫu tiến hành song song điều tra lượng tiêu thụ thực phẩm và cân nặng theo lứa tuổi, giới tính. Các hộ gia đình đã được điều tra về lượng thực phẩm gồm gạo, ngô, lạc và vùng sử dụng hàng ngày của từng thành viên.

2.3.3.1. Cỡ mẫu

Cỡ mẫu được xác định theo công thức (6) [7]:

$$n = \frac{t^2 \cdot \delta^2 \cdot N}{e^2 \cdot N + t^2 \cdot \delta^2} \quad (6)$$

trong đó:

n: cỡ mẫu cần chọn;

t: phân vị chuẩn hóa (thường là 2 ở xác suất 0,954);

δ : độ lệch chuẩn (của Tiêu thụ gạo, tham khảo kết quả Tổng điều tra năm 2010 của Viện Dinh dưỡng quốc gia [27]);

e: dung sai cho phép (5% giá trị tiêu thụ trung bình, tham khảo kết quả Tổng điều tra năm 2010 của Viện Dinh dưỡng [27]);

N: quy mô dân số ở khu vực điều tra.

Cỡ mẫu tính toán theo lý thuyết và cỡ mẫu điều tra theo thực tế về số người và về số hộ gia đình (quy ước mỗi gia đình gồm trung bình 4 người) được trình bày ở bảng 2.2.

Bảng 2.2. Cỡ mẫu theo lý thuyết và cỡ mẫu thực tế điều tra

<i>Tỉnh</i>	<i>Cỡ mẫu về người</i>		<i>Cỡ mẫu về hộ gia đình</i>	
	<i>Lý thuyết</i>	<i>Thực tế</i>	<i>Lý thuyết</i>	<i>Thực tế</i>
Bắc Giang	182	222	46	60
Hà Giang	193	268	48	60
Thái Bình	181	218	46	60
Thanh Hóa	181	232	46	60
Hà Nội	185	257	46	60

2.3.3.2. Kỹ thuật điều tra

Điều tra tiêu thụ thực phẩm phục vụ phân tích nguy cơ theo kỹ thuật hỏi ghi tiêu thụ thực phẩm 24 giờ; kết hợp với cân đong khẩu phần, xác định cân nặng cơ thể.

2.3.3.3. Tiêu chuẩn chọn mẫu và mẫu phiếu điều tra

- Chọn mẫu trong điều tra tiêu thụ thực phẩm: Các mẫu được chọn để điều tra như sau:

+ Tại các tỉnh, thành phố: Hà Nội, Bắc Giang, Thanh Hóa, Thái Bình: Chọn mẫu ngẫu nhiên tại 02 đơn vị hành chính cấp xã để thực hiện điều tra đối với mỗi địa phương.

+ Đối với Hà Giang: Chọn mẫu có chủ đích tại 4 huyện thường xảy ra ngộ độc do tiêu thụ sản phẩm từ ngô.

Tiêu chuẩn chọn mẫu: Người dân đang sống tại địa bàn ít nhất là 1 năm trước nghiên cứu, khả năng giao tiếp bình thường, tình nguyện tham gia nghiên cứu, không phân biệt giới tính, nghề nghiệp. Loại trừ những người mất năng lực hành vi, rối loạn tâm thần, sa sút trí tuệ (căn cứ vào danh sách quản lý của trạm Y tế).

Nội dung phiếu điều tra được trình bày ở Phụ lục 2.

2.3.4. Phương pháp đánh giá nguy cơ

2.3.4.1. Phương pháp đánh giá phơi nhiễm

Căn cứ vào tỷ lệ mẫu không phát hiện độc tố vi nấm (kết quả dưới LOD hoặc LOQ) lớn hơn 50% tổng số mẫu, hàm lượng độc tố vi nấm trong mẫu được tính theo hướng dẫn của Cơ quan an toàn thực phẩm châu Âu (EFSA): giới hạn dưới (LB) được tính bằng cách thay mẫu không phát hiện bởi giá trị "0" và thay mẫu phát hiện thấp hơn LOQ bởi LOD và giới hạn trên (UB) được tính bằng cách thay mẫu không phát hiện bằng LOD và thay mẫu phát hiện thấp hơn LOQ bởi LOQ.

Dữ liệu tiêu thụ thực phẩm trung bình ở các địa phương nghiên cứu được tính dựa trên thông tin thu thập được từ việc khảo sát lượng tiêu thụ thực phẩm được thực hiện đồng thời với việc lấy mẫu của nhóm nghiên cứu. Tuy nhiên, vì lạc và vừng thường được trộn lẫn với nhau trong bữa ăn, dữ liệu cho hai loại thực phẩm này đã được kết hợp và các giá trị cao hơn được chọn để tính liều phơi nhiễm. Tất cả dữ liệu tiêu thụ thực phẩm được ước tính cho 4 nhóm tuổi khác nhau là từ 3-6 tuổi, 7-11 tuổi, 12-18 tuổi và nhóm lớn hơn 18 tuổi. Riêng nhóm trên 18 tuổi được tính riêng theo giới tính và tính chung cho cả nhóm. Mức độ phơi nhiễm trung bình và phân vị 95% (p95) đã được tính để xét đến sự thay đổi của dữ liệu tiêu thụ thực phẩm. Kết quả điều tra cũng xác định cân nặng trung bình của các nhóm tuổi nghiên cứu cho từng địa phương.

Liều phơi nhiễm của các độc tố vi nấm từ một nhóm thực phẩm được tính theo công thức (7) [127]:

$$LPN = \frac{HL_{DTVN} \times TTTP_{TB}}{BW_{TB}} \quad (7)$$

trong đó:

LPN: Liều phơi nhiễm ($\mu\text{g}/\text{kg bw}/\text{ngày}$)

HL_{DTVN} : hàm lượng độc tố vi nấm ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

$TTTP_{TB}$: tiêu thụ thực phẩm trung bình ($\text{kg}/\text{người}/\text{ngày}$)

BW_{TB} : cân nặng trung bình (kg)

2.3.4.2. Phương pháp mô tả mối nguy

Nguy cơ của OTA, ZEA và FUB1 đến sức khỏe người sử dụng được đánh giá bằng cách so sánh liều phơi nhiễm với giá trị PMTDI của chúng: với ZEA là 0,5 µg/kg bw/ngày và với FUB1 là 2,0 µg/kg bw/ngày hoặc so sánh với PMTWI của OTA (là 0,1 µg/kg bw/tuần).

Nguy cơ của AFB1 đối với sức khỏe người sử dụng được đánh giá thông qua nguy cơ tăng ung thư gan của cộng đồng (số lượng ca ung thư trên 100.000 dân mỗi năm). Để đánh giá nguy cơ ung thư gan do phơi nhiễm AFB1, giá trị tiềm năng trung bình được tính dựa trên tỷ lệ dân số Việt Nam nhiễm HBV và ước tính nguy cơ ung thư gan do AFB1 của nhóm dân số âm tính với HBV là 0,01 ca/năm trên 100.000 người và nhóm dân số dương tính với HBV là 0,3 ca/năm trên 100.000 người ứng với liều phơi nhiễm 1 ng AFB1/kg bw/ngày [104]. Theo một nghiên cứu trước đây, tỷ lệ nhiễm HBV ở Việt Nam có thể lên tới 20% trong dân số nói chung [96]. Do đó, tỷ lệ lưu hành là 20% được sử dụng để tính giá trị tiềm năng trung bình (ca ung thư/năm/100.000 người với liều 1 ng AFB1/kg bw/ngày) theo công thức (8):

$$\text{Tiềm năng trung bình} = 0,3 \times 0,2 + 0,01 \times 0,8 = 0,068 \quad (8)$$

Nguy cơ gây ung thư (ca ung thư/năm/100.000 người) được tính toán theo công thức (9):

$$\text{Nguy cơ gây ung thư} = \text{Tiềm năng trung bình} \times \text{Liều phơi nhiễm} \quad (9)$$

Các số liệu được tổng hợp theo từng địa phương nghiên cứu. Kết quả của 4 tỉnh, thành phố gồm Hà Nội, Bắc Giang, Thái Bình và Thanh Hóa được tổng hợp để đại diện cho miền Bắc. Riêng số liệu tại Hà Giang, chủ yếu tại các vùng cao nơi tỷ lệ người H'Mong sinh sống chiếm đa số, được tập hợp làm cơ sở đánh giá riêng cho các vùng này.

2.3.5. Phương pháp xử lý số liệu

Kết quả phân tích được tính và xử lý bằng phần mềm Analyst của hãng SCIEX. Hàm lượng độc tố vi nấm được tính theo công thức (10).

$$X (\mu\text{g}/\text{kg}) = \frac{C_x \times V \times k}{m} \quad (10)$$

Trong đó:

X: Hàm lượng độc tố vi nấm trong mẫu ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

C_x : Nồng độ chất phân tích trong dịch tính theo đường chuẩn ($\mu\text{g}/\text{L}$)

V là thể tích dung môi chiết (mL)

m là khối lượng mẫu (g)

k: hệ số pha loãng mẫu (nếu có)

Kết quả điều tra về lượng tiêu thụ thực phẩm và kết quả hàm lượng độc tố vi nấm trong các mẫu thực phẩm được tổng hợp và xử lý bằng phần mềm SPSS 16.0. Chuẩn t-student được sử dụng để so sánh sự sai khác giữa giá trị trung bình của 2 tập số liệu.

Kết quả tính toán liều phơi nhiễm và nguy cơ gây ung thư được tính toán bằng phần mềm Microsoft Excel.

Chương 3

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. KẾT QUẢ XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH ĐỒNG THỜI MỘT SỐ ĐỘC TỐ VI NẤM TRONG THỰC PHẨM

3.1.1. Khảo sát điều kiện tách và xác định độc tố vi nấm trên LC-MS/MS

3.1.1.1. Lựa chọn các điều kiện khối phổ

Để xác định các ion phân tử và ion sản phẩm của từng độc tố vi nấm, dung dịch chuẩn của từng ĐTVN được tiêm vào khối phổ và thực hiện các khảo sát sau:

Chế độ ion hóa: Sử dụng nguồn ESI với hai chế độ ion dương và ion âm. Các chất phân tích bằng ESI(+) là: AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, FUB1. Các chất phân tích bằng ESI(-): OTA, ZEA.

Bảng 3.1. Các điều kiện phân tích độc tố vi nấm bằng ESI(±)-MS/MS

Chất phân tích	Chế độ ion hóa	Mảnh mẹ (m/z)	Mảnh con (m/z)	CE (eV)	CXP (V)	Ghi chú
AFB1	ESI(+)	313	241	30	35	Định lượng
			269	30	18	Định tính
AFB2	ESI(+)	315	259	30	11	Định lượng
			287	30	26	Định tính
AFG1	ESI(+)	329	243	25	30	Định lượng
			215	25	20	Định tính
AFG2	ESI(+)	331	245	25	30	Định lượng
			285	25	20	Định tính
FUB1	ESI(+)	722	352	45	20	Định lượng
			334	49	34	Định tính
OTA	ESI(-)	402	358	-24	-25	Định lượng
			167	-35	-25	Định tính
ZEA	ESI(-)	317	175	-20	-22	Định lượng
			131	-30	-24	Định tính

Để tối ưu hóa điều kiện khối phổ, tiêm trực tiếp vào MS hỗn hợp các chất chuẩn 50 ng/mL để khảo sát. Ion phân tử được lựa chọn dựa vào khối lượng phân tử, thường có dạng [M+H] hoặc [M-H]. Chọn chế độ khảo sát tự động để bắn phá ion phân tử thành các ion con, lựa chọn ion con có cường độ cao nhất để định lượng và ion có cường độ thấp hơn để xác nhận. Tối ưu hóa năng lượng bắn phá (CE) và các thông số khác của nguồn ESI tự động theo phần mềm của thiết bị. Các kết quả được trình bày trong các Bảng 3.1 và 3.2.

Bảng 3.2. Các thông số tối ưu của MS đối với chế độ ion dương và ion âm

Thông số	Giá trị tối ưu	
	Chế độ ion dương	Chế độ ion âm
Thế nguồn ion hóa - ISV (V)	5000	-4000
Nhiệt độ nguồn - TEM (°C)	450	450
Khí nguồn 1 - GS1 (psi)	25	25
Khí nguồn 2 - GS2 (psi)	20	20
Khí màng - CUR (psi)	20	20
Thế phân tách - DP (V)	130	-130
Thế đầu vào - EP (V)	9	-9
Khí phân mảnh - CAD (psi)	7	7

Như vậy, các điều kiện khối phổ đã được lựa chọn để xác định các độ tổ vi nấm nghiên cứu bằng MS/MS ở cả hai chế độ ion dương và ion âm đồng thời.

3.1.1.2. Lựa chọn các điều kiện sắc ký lỏng

❖ Chọn pha tĩnh:

Cột tách là bộ phận quan trọng của hệ thống sắc ký, có đóng góp mang tính quyết định trong quá trình tách. Qua tham khảo các tài liệu [80,109] và với điều kiện của phòng thí nghiệm, cột tách pha đảo C18 được lựa chọn. Trong

nghiên cứu này, cột Cortecs C18 (150 × 4,6 mm; 2,7 μm) và tiền cột tương ứng của Waters, Mỹ đã được sử dụng.

❖ *Khảo sát thành phần pha động:*

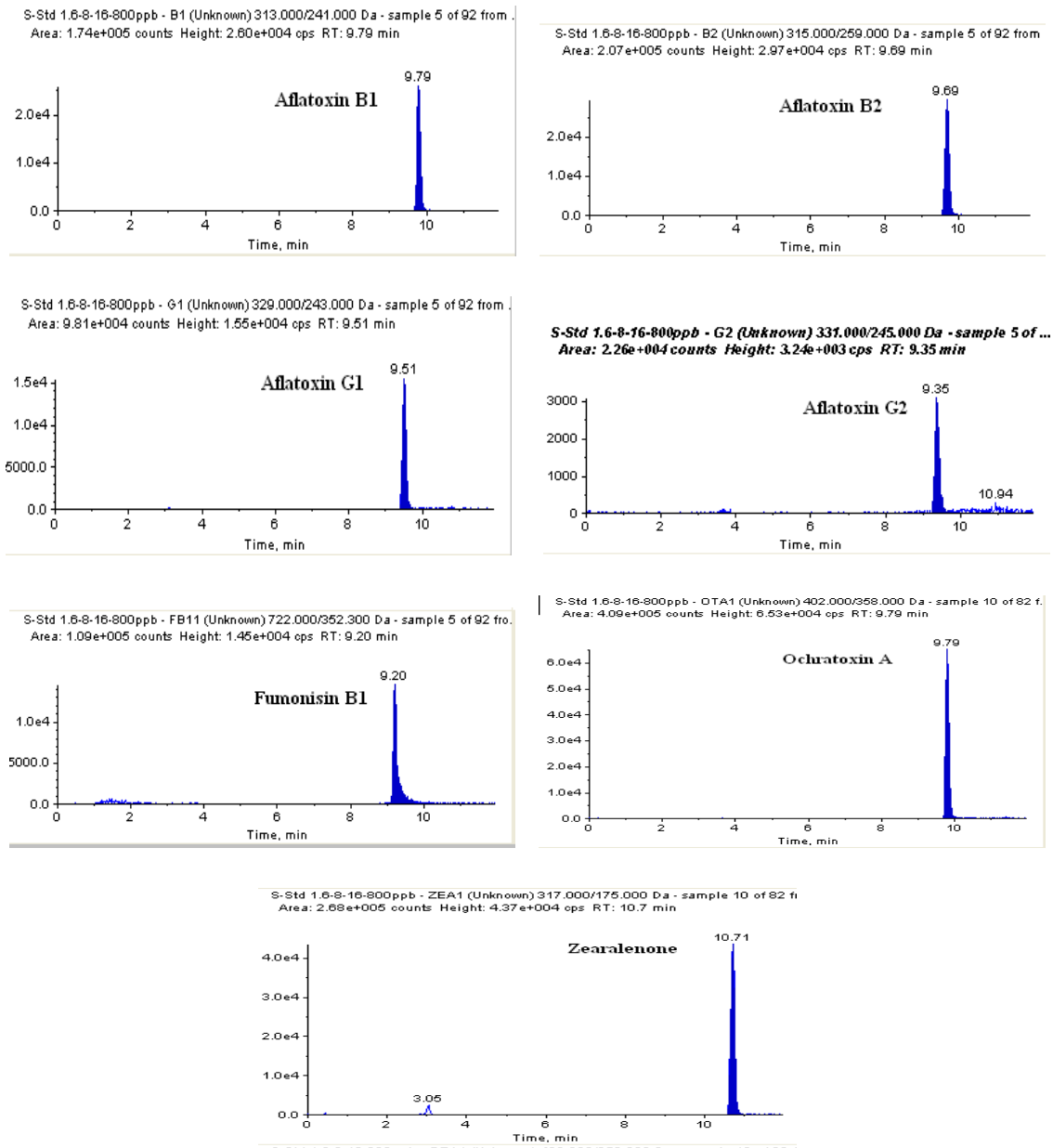
Trong LC-MS/MS, pha động không chỉ ảnh hưởng tới quá trình tách các chất mà nó còn ảnh hưởng tới quá trình ion hóa và tín hiệu của chất phân tích. Với kỹ thuật ESI, quá trình ion hóa tăng khi có thêm các chất nền như acid acetic, acid formic, amoni acetat... Với pha tĩnh sử dụng là cột C₁₈, không phân cực nên pha động phải là hệ dung môi phân cực. Do đó, pha động với 2 thành phần là dung dịch amoni acetat 10 mM trong nước (kênh A) và methanol (kênh B) đã được sử dụng ở chế độ gradient.

Điều kiện gradient đã được khảo sát và thu được kết quả như ở Bảng 3.3 và các sắc ký đồ thu được như ở Hình 3.1. Tốc độ dòng giữ cố định 0,5 mL/phút. Tổng thời gian phân tích là 12 phút.

Bảng 3.3. Chương trình gradient dùng trong phân tích các độc tố nghiên cứu

Thời gian (phút)	Kênh A (%) (amoni acetat 10 mM)	Kênh B (%) (MeOH)	Ghi chú
0,01	80	20	
2,00	80	20	thay đổi tuyến tính
6,00	0	100	
9,00	0	100	thay đổi tuyến tính
10,00	80	20	
12,00	80	20	

Các sắc đồ cho thấy các pic thu được đều sắc nhọn, không bị lẫn các tín hiệu tạp chất khác từ nền mẫu. Thời gian lưu của các chất dao động từ 9,2 đến 10,7 phút. Tuy thời gian lưu của một số chất khá gần nhau nhưng các chất đã được tách về tín hiệu khối phổ do đó không ảnh hưởng đến kết quả định lượng các độc tố vi nấm.



Hình 3.1. Sắc ký đồ các ion định lượng của các độc tố vi nấm nghiên cứu

3.1.2. Khảo sát điều kiện xử lý mẫu

Việc chiết mẫu thực hiện theo phương pháp QuEChERS như đã giới thiệu ở Hình 2.1. Quá trình xử lý mẫu được tiếp tục khảo sát thêm một số yếu tố tập trung vào: dung môi chiết và quá trình làm sạch với d-SPE.

3.1.2.1. Khảo sát dung môi chiết

Do các độc tố vi nấm đều là các chất phân cực yếu nên việc sử dụng dung môi chiết chỉ là acetonitril không tạo độ phân cực cần thiết cho quá trình

phân bố khi chiết lỏng - lỏng giữa 2 pha acetonitril và nước. Do vậy, việc thêm acid vào dung môi chiết để tạo độ phân cực làm tăng hiệu suất chiết các độc tố vi nấm sang dung môi acetonitril là cần thiết. Hai loại acid thường được sử dụng trong LC-MS/MS là acid formic và acid acetic được lựa chọn để khảo sát. Một số nghiên cứu trước đây cho thấy tỷ lệ phù hợp của các acid này là 1% trong dung môi acetonitril.

Ba hệ dung môi chiết được thử nghiệm là: acetonitril; acetonitril có chứa 1% acid formic và acetonitril có chứa 1% acid acetic đã được sử dụng để khảo sát. Cố định các yếu tố chiết khác trong quy trình xử lý mẫu, sử dụng nền mẫu lạc không bị nhiễm các độc tố vi nấm và thêm chuẩn hỗn hợp để thu được nồng độ các aflatoxin là 3 ng/mL; của OTA và ZEA là 10 ng/mL và của FUB1 là 200 ng/mL. Phân tích lặp lại 3 lần lấy giá trị trung bình. Kết quả thu được như ở bảng 3.4.

Bảng 3.4. So sánh các loại dung môi chiết đến độ thu hồi các độc tố vi nấm

Dung môi chiết	Độ thu hồi (%)						
	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2	FUB1	OTA	ZEA
Acetonitril (ACN)	95,0	84,9	93,4	96,1	5,8	36,0	92,5
ACN có 1% acid formic	90,0	79,2	87,0	95,0	79,5	88,5	90,8
ACN có 1% acid acetic	94,9	75,4	83,1	98,3	69,9	87,0	89,2

Kết quả cho thấy: Việc sử dụng acid formic và acid acetic trong acetonitril có ảnh hưởng rất rõ rệt đến độ thu hồi của FUB1 và OTA. Sử dụng acetonitril hầu như không thể chiết được FUB1 và chỉ chiết được khoảng 36% OTA. Sự khác biệt giữa hai loại acid không có ý nghĩa lớn, tuy nhiên độ thu hồi của AFB1 cao hơn khi sử dụng acid acetic. Do vậy, dung môi chiết là acetonitril có chứa 1% acid acetic được lựa chọn cho các khảo sát tiếp theo.

3.1.2.2. Khảo sát bước làm sạch bằng d-SPE

Chất hấp phụ trong bước làm sạch bằng d-SPE đóng vai trò loại các tạp chất ảnh hưởng trong quá trình chiết. MgSO₄ là chất hấp phụ quan trọng trong

bước này giúp loại nước còn dư từ dịch chiết trước đó. Ngoài ra, hai loại chất hấp phụ là PSA và C18 đã được khảo sát. PSA có vai trò loại các hợp chất phân cực mạnh như các acid hữu cơ, trong khi C18 được sử dụng để loại các chất béo.

Sử dụng mẫu trắng là mẫu lạt và thêm chuẩn ở nồng độ các aflatoxin là 3 ng/mL; của OTA và ZEA là 10 ng/mL; của FUB1 là 200 ng/mL. Khảo sát bước làm sạch với 3 loại d-SPE có thành phần như sau:

- Loại 1 dùng 150 mg MgSO₄ cho mỗi mililit dịch chiết.
- Loại 2 dùng 150 mg MgSO₄ và 50 mg PSA cho mỗi mililit dịch chiết.
- Loại 3 dùng 150 mg MgSO₄ và 50 mg C18 cho mỗi mililit dịch chiết.

Mỗi loại d-SPE được tiến hành nghiên cứu lặp lại 3 lần lấy giá trị trung bình. Các kết quả khảo sát được thể hiện ở bảng 3.5.

Bảng 3.5. Ảnh hưởng của việc sử dụng PSA và C18 đến độ thu hồi các độc tố

<i>Thành phần d-SPE</i>	<i>Độ thu hồi (%)</i>						
	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2	FUB1	OTA	ZEA
150 mg MgSO ₄	84,2	69,4	76,5	72,9	75,9	92,0	79,9
150 mg MgSO ₄ +50 mg PSA	90,0	79,4	84,3	85,4	71,8	93,5	91,2
150 mg MgSO ₄ +50 mg C18	91,2	80,3	88,1	95,0	82,1	89,9	91,3

Kết quả cho thấy: Khi sử dụng C18 làm chất hấp phụ, hầu hết các chất đều cho độ thu hồi cao hơn so với khi sử dụng PSA làm chất hấp phụ ngoại trừ OTA. Khi không sử dụng PSA và C18, độ thu hồi cũng thấp hơn nhiều. Do vậy C18 được lựa chọn làm chất hấp phụ trong bước d-SPE.

Tiếp tục tiến hành khảo sát các khối lượng khác nhau của C18. Sử dụng các lượng C18 khác nhau từ 25 mg, 50 mg, 100 mg; cùng với 150 mg MgSO₄. Phân tích lặp lại 3 lần lấy giá trị trung bình. Kết quả thu được trong Bảng 3.6.

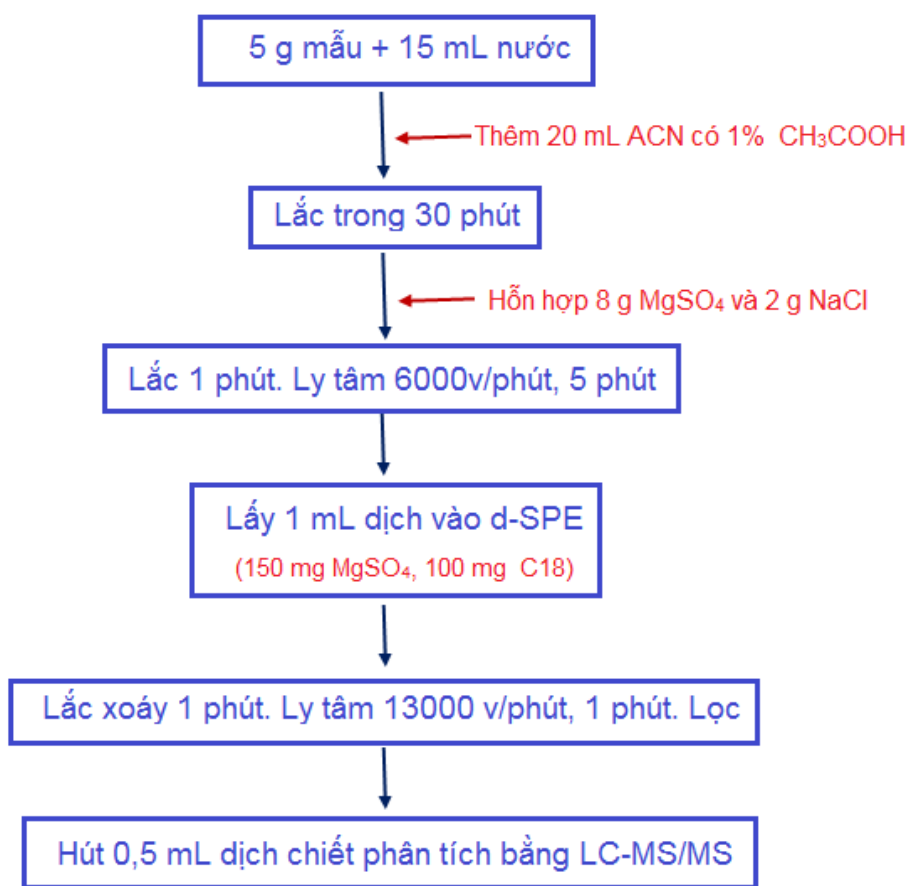
Bảng 3.6. Ảnh hưởng của lượng C18 đến độ thu hồi các độc tố trên nền lạc

<i>Thành phần d-SPE</i>	<i>Độ thu hồi (%)</i>						
	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2	FUB1	OTA	ZEA
150 mg MgSO ₄ +100 mg C18	91,9	93,9	95,2	96,4	83,1	94,7	90,0
150 mg MgSO ₄ +50 mg C18	78,3	80,3	89,0	72,5	95,5	81,1	86,5
150 mg MgSO ₄ +25 mg C18	72,8	77,5	77,6	64,0	86,5	82,1	86,9

Kết quả cho thấy khi sử dụng lượng 100 mg bột C18 cho diện tích pic của 6/7 chất phân tích là lớn nhất, trừ FUB1. Để hiệu suất thu hồi tốt nhất và đảm bảo khả năng loại tạp chất, khối lượng C18 được lựa chọn là 100 mg.

Có thể tóm tắt quy trình xử lý mẫu theo phương pháp QuEChERS đã tối ưu như sau: Mẫu được xay nhỏ và trộn đều, sau đó cân 5 g vào ống ly tâm 50 mL. Thêm 15 mL nước và lắc đều trong 1 phút cho nước thấm hoàn toàn vào mẫu. Thêm 20 mL acetonitril có 1% acid acetic và lắc bằng máy lắc ngang trong 30 phút. Thêm hỗn hợp muối gồm 8 g MgSO₄ khan và 2 g NaCl và lắc kỹ trong 1 phút. Ly tâm mẫu ở tốc độ 6000 vòng/phút trong 5 phút. Hút 1 mL dịch chiết vào ống ly tâm 2 mL đã có chứa 150 mg MgSO₄ và 100 mg C18. Lắc kỹ trong 1 phút và ly tâm với tốc độ 13000 vòng/phút trong 1 phút. Lọc lớp trên qua màng lọc 0,2 µm để được mẫu tiêm vào LC-MS/MS.

Sơ đồ xử lý đồng thời các độc tố vi nấm đã tối ưu được trình bày ở Hình 3.2.



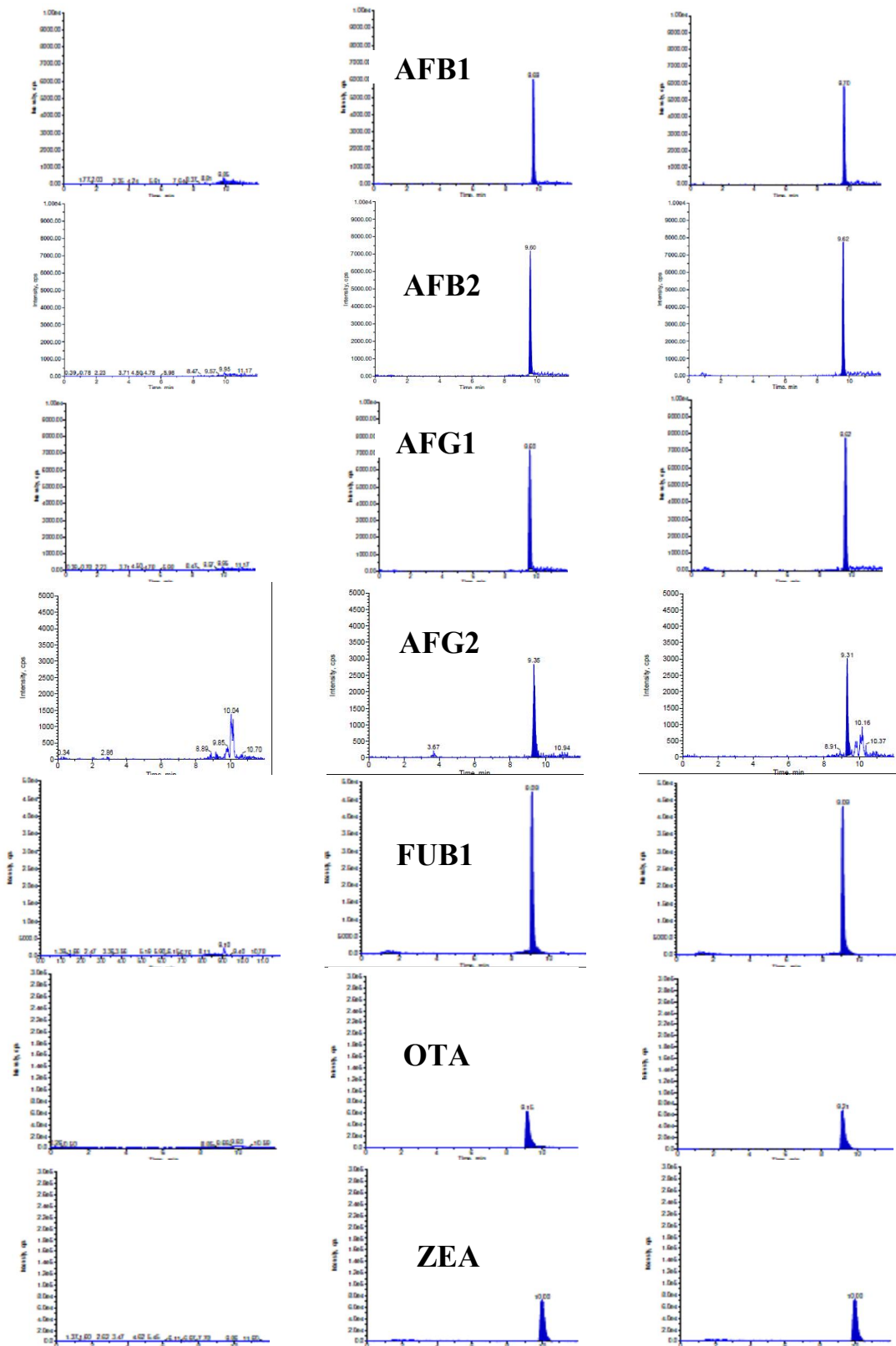
Hình 3.2. Sơ đồ xử lý mẫu phân tích đồng thời các độc tố nghiên cứu

3.1.3. Thảm định phương pháp

3.1.3.1. Tính đặc hiệu

Tính đặc hiệu của phương pháp được đánh giá qua phân tích các mẫu trắng, mẫu chuẩn và mẫu thêm chuẩn. Mẫu trắng (ngô và lạc) được xác định không bị nhiễm các độc tố vi nấm qua phân tích bằng các phương pháp tiêu chuẩn tại phòng thí nghiệm Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm Quốc gia. Mẫu thêm chuẩn được chuẩn bị từ mẫu trắng có bổ sung lượng chuẩn phù hợp (tại LOQ).

Sắc đồ một số kết quả đánh giá độ đặc hiệu của phương pháp được trình bày ở Hình 3.3.



a)

b)

c)

Hình 3.3. Sắc đồ thăm định độ đặc hiệu với các độc tố nghiên cứu

a) mẫu trắng

b) mẫu chuẩn

c) mẫu trắng thêm chuẩn

Kết quả thu được ở Hình 3.3 cho thấy: Thời gian lưu của các độc tố vi nấm trên nền mẫu trắng thêm chuẩn hoàn toàn tương tự như trên mẫu chuẩn, không xuất hiện pic đối với mẫu trắng ở khoảng thời gian của các pic nói trên. Các kết quả này cho thấy phương pháp đáp ứng về tính đặc hiệu.

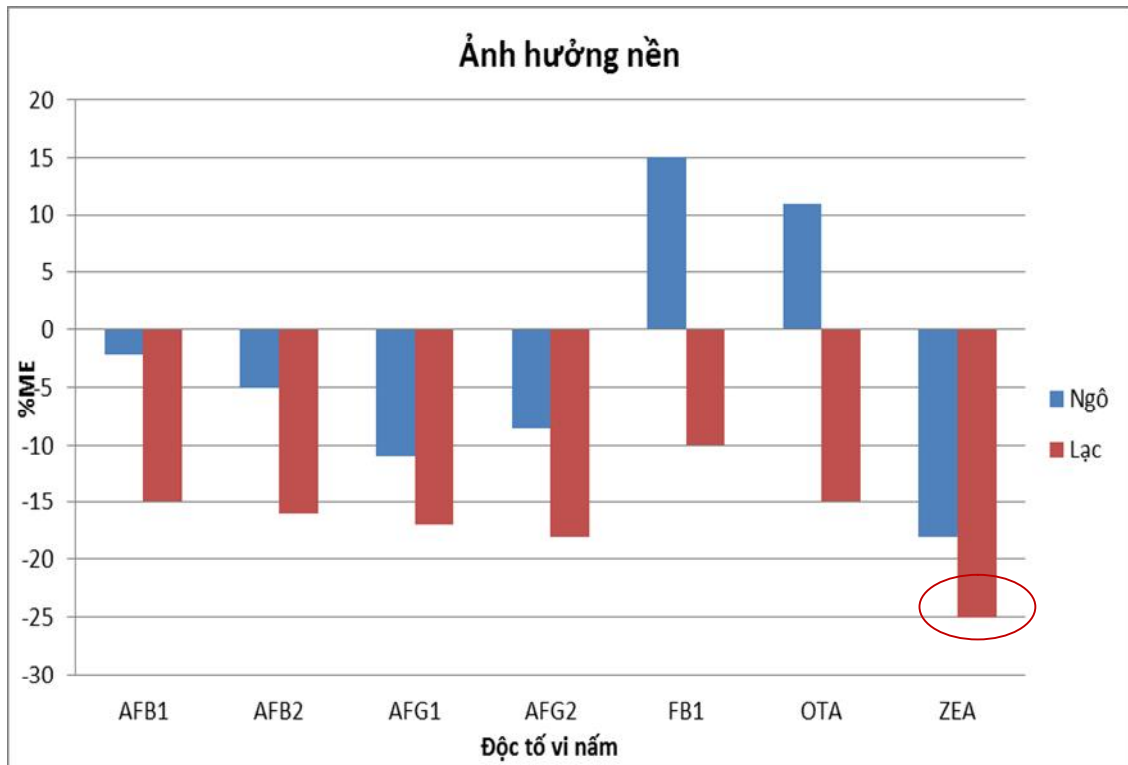
Ngoài ra, để xác định tính đặc hiệu của phương pháp LC-MS/MS, tỷ lệ ion đã được đánh giá theo quy định EC 657/2002 của Châu Âu. Các kết quả ở Bảng 3.7 cho thấy, chênh lệch tỷ lệ ion trên mẫu thêm chuẩn so với chuẩn đều đáp ứng được yêu cầu của châu Âu theo EC 657/2002.

Bảng 3.7. Tỷ lệ ion của các độc tố vi nấm so với tiêu chuẩn châu Âu

<i>Tên chất phân tích</i>	<i>m/z dùng tính tỷ lệ</i>	<i>Tỷ lệ ion (%)</i>		<i>Khoảng chấp nhận (theo EC 657/2002)</i>
		<i>Chuẩn</i>	<i>Mẫu thêm chuẩn</i>	
AFB1	269/241	78,5	79,7	62,8 - 94,2 ($\pm 20\%$)
AFB2	259/287	76,3	76,3	61,0 - 91,6 ($\pm 20\%$)
AFG1	215/243	44,2	47,1	33,2 - 55,3 ($\pm 25\%$)
AFG2	285/245	77,0	77,3	61,6 - 92,4 ($\pm 20\%$)
FUB1	334/352	94,5	94,9	75,6 - 113 ($\pm 20\%$)
OTA	167/358	20,6	20,7	15,5 - 25,8 ($\pm 25\%$)
ZEA	131/175	23,2	21,9	17,4 - 29,0 ($\pm 25\%$)

3.1.3.2. Ảnh hưởng nền

Ảnh hưởng nền được tính bằng chênh lệch của tỷ lệ hệ số góc của đường chuẩn trên nền mẫu so với đường chuẩn trên nền dung môi. Kết quả xác định ảnh hưởng nền của các nền mẫu ngô và lạc được trình bày ở Hình 3.4.



Hình 3.4. Ảnh hưởng của nền mẫu ngô và lạc đến tín hiệu đo của các độc tố vi nấm

Các kết quả cho thấy, nền mẫu ngô và lạc có ảnh hưởng đến tín hiệu đo. Trên nền mẫu ngô, ảnh hưởng nền dao động từ -18% đến 15%, đáp ứng được yêu cầu theo quy định châu Âu [63] (ảnh hưởng nền trong khoảng $\pm 20\%$). Tuy nhiên, trên nền mẫu lạc ảnh hưởng nền đối với ZEA là -25% vượt quá giới hạn -20%. Có thể do nền mẫu lạc, có hàm lượng béo cao nên ảnh hưởng nền khá lớn.

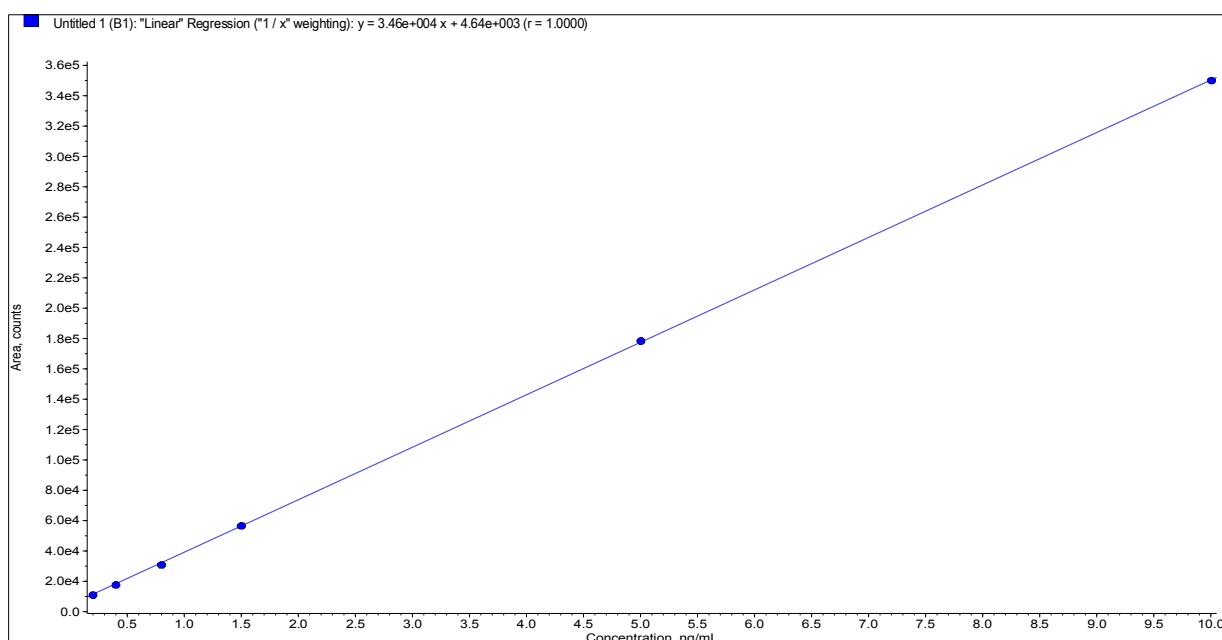
Để khắc phục ảnh hưởng nền, đường chuẩn trên nền mẫu đã được sử dụng. Theo đó, mẫu trắng được chiết theo quy trình, sau đó dịch chiết được sử dụng để pha đường chuẩn dùng cho định lượng. Với kỹ thuật dựng đường chuẩn trên nền mẫu, ảnh hưởng của nền mẫu sẽ được loại bỏ.

3.1.3.3. Xây dựng đường chuẩn

Phân tích dãy chuẩn có nồng độ các độc tố thay đổi như ở Bảng 3.8 với dung môi được thay thế bằng dịch chiết mẫu trắng để xây dựng các đường chuẩn trên nền mẫu. Khảo sát sự phụ thuộc của diện tích pic sắc ký vào nồng độ. Ví dụ về đường chuẩn trên nền mẫu lạc được trình bày ở Bảng 3.8 và Hình 3.5.

Bảng 3.8. Đường chuẩn của các độc tố vi nấm trên nền mẫu lạc

Độc tố vi nấm	Nồng độ trên dịch (ng/mL)	Nồng độ trên mẫu (µg/kg)	Phương trình đường chuẩn	Hệ số R²
AFB1	0,2-10	0,8-40	$y = 8938,7x + 1193$	0,9991
AFB2	0,2-10	0,8-40	$y = 11854x + 1180$	0,9992
AFG1	0,2-10	0,8-40	$y = 14969x + 1012$	0,9993
AFG2	0,2-10	0,8-40	$y = 5563,7x + 633,4$	0,9989
FUB1	20-1000	80-4000	$y = 477,57x - 1486$	0,9999
OTA	1-50	4-200	$y = 960,69x - 156,3$	0,9998
ZEA	1-50	4-200	$y = 552,13x + 68,4$	1,0000



Hình 3.5. Đường chuẩn phân tích độc tố AFB1 trên nền lạc ($R^2=1,000$)

Các đường chuẩn đều có hệ số tương quan tốt (giá trị R² đều trên 0,99), do đó trong khoảng nồng độ đã khảo sát có sự phụ thuộc tuyến tính giữa diện tích pic và nồng độ tương ứng của các độc tố. Ngoài ra, đường chuẩn được kiểm tra về độ chệch của từng điểm luôn đảm bảo trong khoảng $\pm 15\%$ theo khuyến cáo của AOAC.

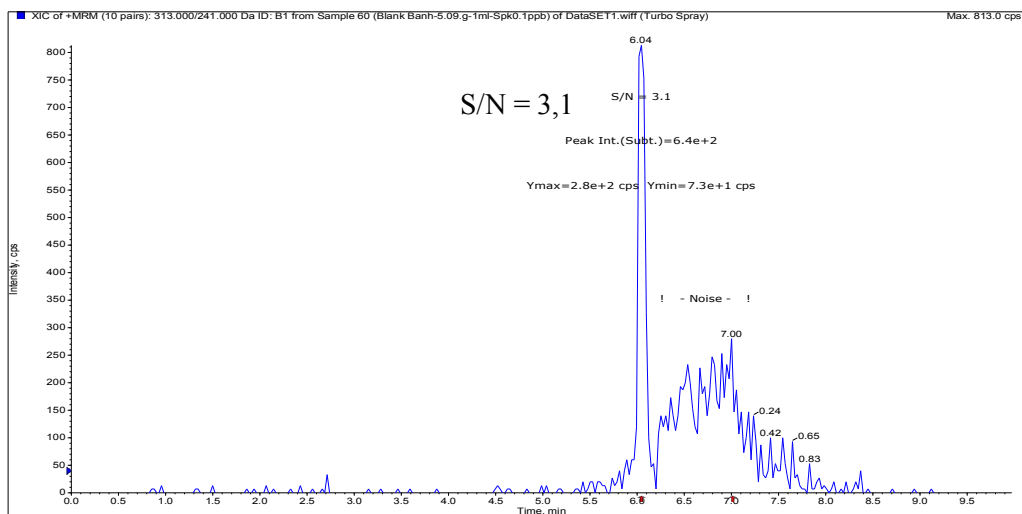
3.1.3.4. Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ)

LOD và LOQ được xác định thông qua đánh giá tỷ số tín hiệu trên nhiễu (S/N). LOD được xác định tại nồng độ thu được S/N khoảng bằng 3; LOQ được xác định tại nồng độ thu được S/N khoảng bằng 10. Phân tích các mẫu trắng thêm chuẩn ở các nồng độ thấp gần giới hạn phát hiện của thiết bị và xác định giá trị S/N. Dựa vào S/N để xác định LOD, LOQ như ở Bảng 3.9 và Hình 3.6, 3.7.

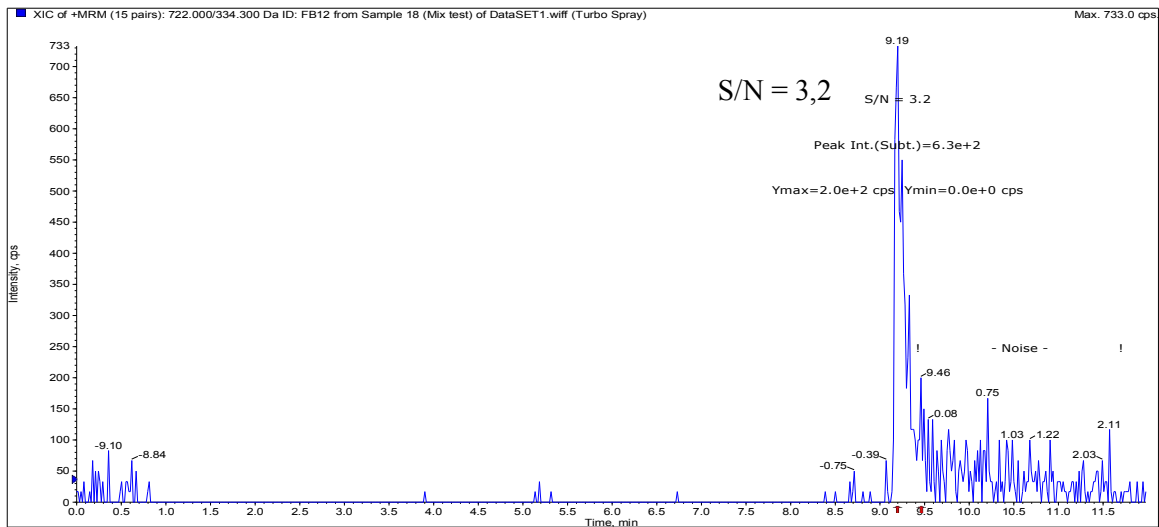
Bảng 3.9. LOD và LOQ của các độc tố vi nấm nghiên cứu

Độc tố vi nấm	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)	Giới hạn cho phép ML (µg/kg) (*)
AFB1	0,1	0,3	AFB1: 2 AF tổng: 4
AFB2	0,1	0,3	
AFG1	0,1	0,3	
AFG2	0,1	0,3	
FUB1	25	75	1000
OTA	0,5	1,5	3
ZEA	0,5	1,5	100

(*) Theo quy định tại QCVN 8-1:2011/BYT



Hình 3.6. Sắc đồ AFB1 tại LOD 0,1 µg/kg



Hình 3.7. Sắc đồ FUB1 tại LOD 25 µg/kg

Các kết quả cho thấy, tất cả các độc tố vi nấm đều có thể định lượng được tại nồng độ thấp hơn hoặc bằng giá trị ML. Do đó, phương pháp đáp ứng được yêu cầu để ứng dụng phân tích độc tố vi nấm trong các nền mẫu ngũ cốc và hạt có dầu.

3.1.3.5. Độ lặp lại và độ thu hồi

Độ lặp lại và độ thu hồi của phương pháp được đánh giá bằng cách phân tích các mẫu trắng thêm chuẩn ở 3 mức nồng độ khác nhau, phân tích lặp lại 6 lần cho mỗi nồng độ. Các kết quả độ lệch chuẩn tương đối (RSD_r) và độ thu hồi ($R\%$) được trình bày ở Bảng 3.10.

Bảng 3.10. Kết quả xác định độ lặp lại và độ thu hồi trên các nền ngô và lạc

Độc tố vi nấm	Nồng độ (µg/kg)	Nền mẫu ngô		Nền mẫu lạc		Giới hạn RSD_r (*)	Giới hạn $R\%$ (*)
		RSD_r	$R\%$	RSD_r	$R\%$		
AFB1	1	7,2	86	12	105	≤30	70-120
	10	9,8	98	5,2	111	≤20	70-120
	20	4,2	115	4,3	112	≤20	80-110
AFB2	1	12	109	10	96	≤30	70-120
	10	11	102	4,6	114	≤20	70-120
	20	8,1	110	7,8	113	≤20	80-110

Độc tố vi nấm	Nồng độ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Nền mẫu ngô		Nền mẫu lạc		Giới hạn RSD_r (*)	Giới hạn $R\%$ (*)
		RSD_r	$R\%$	RSD_r	$R\%$		
AFG1	1	11	110	13	92	≤ 30	70-120
	10	8,3	103	5,7	112	≤ 20	70-120
	20	7,3	113	1,5	118	≤ 20	80-110
AFG2	1	4,4	114	5,7	86	≤ 30	70-120
	10	6,3	107	6,4	88	≤ 20	70-120
	20	4,2	109	5,0	99	≤ 20	80-110
FUB1	100	6,1	101	4,9	86	≤ 30	60-120
	1000	4,2	98	2,4	84	≤ 20	70-110
	2000	3,7	106	6,4	87	≤ 20	70-110
OTA	1	12	89	8,2	102	≤ 20	70-120
	10	6,5	102	6,1	109	≤ 20	70-120
	20	2,2	92	4,3	95	≤ 20	70-120
ZEA	10	12	108	13	89	≤ 40	60-120
	100	6,5	108	7,2	100	≤ 25	70-120
	200	3,2	108	3,9	109	≤ 25	70-120

(*) Theo quy định châu Âu EC 401/2006

Các kết quả cho thấy RSD_r và $R\%$ dao động tùy từng độc tố vi nấm, tuy nhiên đều đáp ứng được yêu cầu theo quy định của châu Âu EC 401/2006. Kết quả này cho thấy phương pháp có độ lặp lại và độ thu hồi tốt.

3.1.3.6. Kiểm tra độ đúng thông qua thử nghiệm thành thạo

Phương pháp xác định đồng thời các độc tố vi nấm đã được sử dụng để tham gia chương trình thử nghiệm thành thạo do Fapas tổ chức. Các kết quả thử nghiệm trên một số độc tố nghiên cứu được tóm tắt trong Bảng 3.11. Kết quả đạt yêu cầu khi có giá trị Z-score nằm trong khoảng -2 đến 2.

Bảng 3.11. Kết quả thử nghiệm thành thạo (nền ngô)

<i>Độc tố vi nấm</i>	<i>Kết quả tham chiếu (µg/kg)</i>	<i>Độ lệch chuẩn tham chiếu (µg/kg)</i>	<i>Kết quả thử nghiệm (µg/kg)</i>	<i>Z-score</i>
AFB1	5,09	1,15	5,84	0,7
OTA	3,29	0,70	3,57	0,4
ZEA	200	40	136	-1,6

Các giá trị Z-score đều nằm trong khoảng cho phép cho thấy phương pháp có độ đúng tốt, có thể áp dụng trong phân tích đồng thời các độc tố vi nấm trong nền mẫu ngũ cốc và hạt có dầu.

Phương pháp đã được xác nhận giá trị sử dụng và đánh giá kết quả theo tiêu chuẩn châu Âu gồm tiêu chuẩn chung EC 657/2002 và tiêu chuẩn EC 401/2006 áp dụng riêng cho phân tích độc tố vi nấm [62, 63]. Các thông số xác nhận gồm có tính đặc hiệu, đường chuẩn, độ thu hồi, độ lặp lại và độ đúng thông qua thử nghiệm thành thạo đều đạt yêu cầu. Quy trình hoàn chỉnh xác định đồng thời các độc tố vi nấm bằng LC-MS/MS được đưa ra ở Phụ lục 3.

3.2. KẾT QUẢ PHÂN TÍCH CÁC ĐỘC TỐ VI NẤM TRONG CÁC MẪU THU THẬP ĐƯỢC Ở MỘT SỐ TỈNH PHÍA BẮC VIỆT NAM

3.2.1. Thu thập mẫu phân tích

Mẫu thực phẩm được thu thập trong nghiên cứu là ngũ cốc (ngô, gạo) và hạt có dầu (lạc, vừng) được lấy ngẫu nhiên tại 5 tỉnh, thành phố ở miền Bắc gồm Bắc Giang, Hà Nội, Thái Bình, Thanh Hóa và Hà Giang trong giai đoạn từ 2016-2018. Riêng tại Hà Giang, để phục vụ đánh giá mối nguy độc tố vi nấm đối cho nhóm người ở vùng cao, mẫu được lấy tại các huyện có nhiều người H'Mong sinh sống.

Các mẫu đều có hình thức bên ngoài bình thường, không có dấu hiệu của nấm mốc. Lượng mẫu tối thiểu được lấy là 1 kg, được đóng túi kín, mã hóa và chuyển về phòng thí nghiệm để kiểm nghiệm xác định các độc tố vi nấm.

Số lượng và địa điểm lấy mẫu được trình bày trong Bảng 3.12.

Bảng 3.12. Tổng hợp số lượng mẫu tại các tỉnh, thành phố

<i>Đối tượng</i>	<i>Bắc Giang</i>	<i>Hà Nội</i>	<i>Hà Giang</i>	<i>Thái Bình</i>	<i>Thanh Hóa</i>	<i>Tổng cộng</i>
Ngô	56	40	100	42	49	287
Gạo	51	40	56	43	48	238
Lạc	59	40	58	49	46	252
Vùng	49	40	40	41	49	219
<i>Tổng số</i>	215	160	254	175	192	996

Như vậy, số lượng mẫu của từng sản phẩm tại từng địa phương đều lớn hơn 30, đảm bảo đủ đại diện từng nhóm sản phẩm tại mỗi tỉnh. Riêng Hà Giang, do tỷ lệ người sử dụng ngô cao hơn so với các loại thực phẩm khác, ngô được lấy nhiều hơn tại các huyện khác nhau để có đánh giá đầy đủ hơn về hàm lượng độc tố vi nấm trong nhóm thực phẩm chủ yếu này.

3.2.2. Kết quả phân tích các độc tố vi nấm nhiễm trong các mẫu

3.2.2.1. Hàm lượng các độc tố nhiễm trong mẫu nghiên cứu

Các mẫu ngô, gạo, lạc và vùng lấy ở 5 tỉnh, thành phố được phân tích hàm lượng các độc tố vi nấm. Tóm tắt các kết quả phân tích các mẫu thu được tại các địa phương như trong các Bảng 3.13 đến Bảng 3.17.

Bảng 3.13. Kết quả xác định độc tố vi nấm trong các mẫu thu thập tại Bắc Giang

Đối tượng mẫu	Số lượng mẫu	Độc tố vi nấm	Số mẫu có độc tố	Kết quả định lượng ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	
				Trung bình	Cao nhất
Ngô	56	AFB1	18	21,5	169,0
		AFB2	4	8,1	27,0
		AFG1	1	11,0	11,0
		AFG2	0	-	-
		FUB1	3	460,3	890,0
		OTA	7	23,5	112,0
		ZEA	1	7,5	7,5
Gạo	51	AFB1	7	12,8	31,0
		AFB2	5	1,9	4,0
		AFG1	0	-	-
		AFG2	0	-	-
		FUB1	0	-	-
		OTA	0	-	-
		ZEA	1	6,2	6,2
Lạc	59	AFB1	13	72,5	239,0
		AFB2	8	15,4	45,0
		AFG1	5	11,7	33,0
		AFG2	0	-	-
		FUB1	0	-	-
		OTA	4	6,8	15,0
		ZEA	0	-	-
Vừng	49	AFB1	3	5,2	6,8
		AFB2	0	-	-
		AFG1	0	-	-
		AFG2	0	-	-
		FUB1	0	-	-
		OTA	0	-	-
		ZEA	0	-	-

Ghi chú: “-” Không có số liệu

Bảng 3.14. Kết quả xác định độc tố vi nấm trong các mẫu thu thập tại Hà Nội

Đối tượng mẫu	Số lượng mẫu	Độc tố vi nấm	Số mẫu có độc tố	Kết quả định lượng (µg/kg)	
				Trung bình	Cao nhất
Ngô	40	AFB1	14	8,4	25,0
		AFB2	5	0,9	1,6
		AFG1	0	-	-
		AFG2	0	-	-
		FUB1	4	127,8	215,0
		OTA	4	9,1	12,0
		ZEA	2	12,3	15,0
Gạo	40	AFB1	4	5,4	13,0
		AFB2	1	0,6	0,6
		AFG1	0	-	-
		AFG2	0	-	-
		FUB1	0	-	-
		OTA	0	-	-
		ZEA	0	-	-
Lạc	40	AFB1	10	7,8	16,0
		AFB2	6	6,8	18,0
		AFG1	4	7,1	23,0
		AFG2	0	-	-
		FUB1	0	-	-
		OTA	2	3,0	4,5
		ZEA	0	-	-
Vừng	40	AFB1	3	4,9	6,6
		AFB2	0	-	-
		AFG1	0	-	-
		AFG2	0	-	-
		FUB1	0	-	-
		OTA	0	-	-
		ZEA	0	-	-

Ghi chú: “-” Không có số liệu

Bảng 3.15. Kết quả xác định độc tố vi nấm trong các mẫu thu thập tại Hà Giang

Đối tượng mẫu	Số lượng mẫu	Độc tố vi nấm	Số mẫu có độc tố	Kết quả định lượng ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	
				Trung bình	Cao nhất
Ngô	100	AFB1	30	139,3	1572,5
		AFB2	25	32,4	155,0
		AFG1	12	40,5	92,5
		AFG2	0	-	-
		FUB1	39	355,0	1545
		OTA	15	44,3	126,0
		ZEA	27	62,5	212,0
Gạo	56	AFB1	3	17,4	26,0
		AFB2	2	2,5	2,9
		AFG1	0	-	-
		AFG2	0	-	-
		FUB1	3	397,7	675,0
		OTA	0	-	-
		ZEA	0	-	-
Lạc	58	AFB1	12	71,0	362,0
		AFB2	7	21,0	100,0
		AFG1	2	59,5	92,0
		AFG2	0	-	-
		FUB1	1	545	545,0
		OTA	5	21,1	87,5
		ZEA	2	40,0	53,0
Vừng	40	AFB1	5	15,8	30,0
		AFB2	1	2,2	2,2
		AFG1	0	-	-
		AFG2	0	-	-
		FUB1	0	-	-
		OTA	0	-	-
		ZEA	0	-	-

Ghi chú: “-” Không có số liệu

Bảng 3.16. Kết quả xác định độc tố vi nấm trong các mẫu thu thập tại Thái Bình

Đối tượng mẫu	Số lượng mẫu	Độc tố vi nấm	Số mẫu có độc tố	Kết quả định lượng ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	
				Trung bình	Cao nhất
Ngô	42	AFB1	13	10,4	32,0
		AFB2	3	1,3	2,8
		AFG1	1	0,5	0,5
		AFG2	0	-	-
		FUB1	3	138,3	520,0
		OTA	4	5,0	14,0
		ZEA	3	122,7	220,0
Gạo	43	AFB1	5	3,9	15,0
		AFB2	1	1,0	1,0
		AFG1	0	-	-
		AFG2	0	-	-
		FUB1	0	-	-
		OTA	0	-	-
		ZEA	0	-	-
Lạc	49	AFB1	13	17,9	77,7
		AFB2	8	29,0	217,0
		AFG1	1	75	75
		AFG2	0	-	-
		FUB1	0	-	-
		OTA	1	2,7	2,7
		ZEA	0	-	-
Vừng	41	AFB1	4	3,5	6,2
		AFB2	2	2,5	4,6
		AFG1	0	-	-
		AFG2	0	-	-
		FUB1	0	-	-
		OTA	1	8,1	8,1
		ZEA	0	-	-

Ghi chú: “-” Không có số liệu

Bảng 3.17. Kết quả xác định độc tố vi nấm trong các mẫu thu thập tại Thanh Hóa

Đối tượng mẫu	Số lượng mẫu	Độc tố vi nấm	Số mẫu có độc tố	Kết quả định lượng (µg/kg)	
				Trung bình	Cao nhất
Ngô	49	AFB1	13	25,3	94,5
		AFB2	5	5,5	11,0
		AFG1	3	21,3	35,0
		AFG2	0	-	-
		FUB1	20	432,6	1662,0
		OTA	7	13,6	44,0
		ZEA	7	64,3	132,0
Gạo	48	AFB1	6	19,0	93,0
		AFB2	1	11,0	11,0
		AFG1	0	-	-
		AFG2	0	-	-
		FUB1	0	-	-
		OTA	0	-	-
		ZEA	0	-	-
Lạc	46	AFB1	12	19,8	159,0
		AFB2	6	4,4	21,0
		AFG1	1	11,0	11,0
		AFG2	0	-	-
		FUB1	1	12,0	12,0
		OTA	3	8,7	23,0
		ZEA	0	-	-
Vừng	49	AFB1	4	10,8	20,0
		AFB2	3	1,8	2,0
		AFG1	0	-	-
		AFG2	0	-	-
		FUB1	0	-	-
		OTA	0	-	-
		ZEA	0	-	-

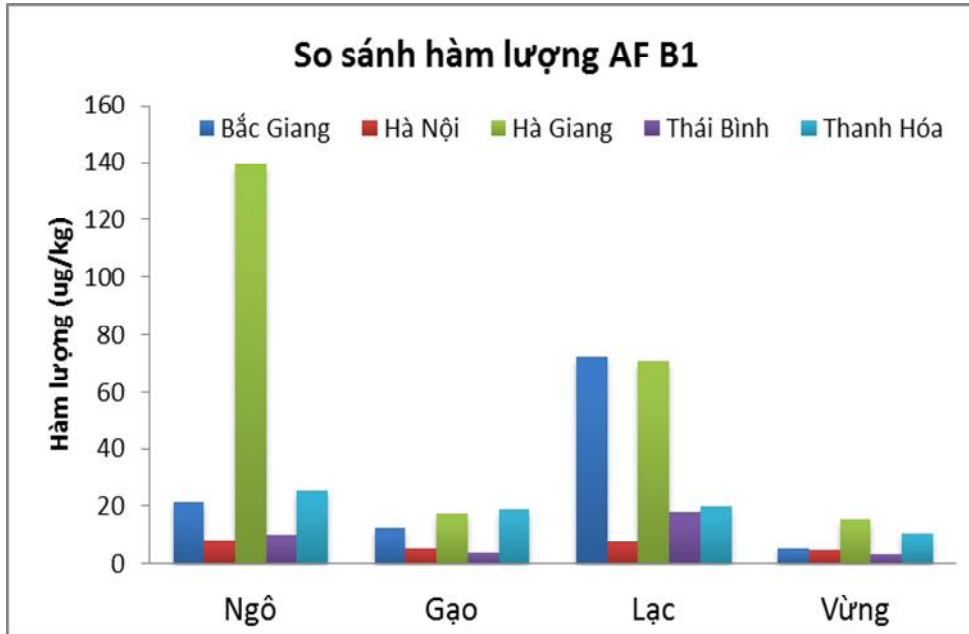
Ghi chú: “-” Không có số liệu

Bảng 3.18. Kết quả xác định độc tố vi nấm trong tất cả các mẫu thu thập được

Đối tượng mẫu	Số lượng mẫu	Độc tố vi nấm	Số mẫu có độc tố	Kết quả định lượng ($\mu\text{g/kg}$)			
				Trung vị	Trung bình	SD	Cao nhất
Ngô	287	AFB1	88	12,0	58,5	234,6	1572,5
		AFB2	42	3,2	21,0	42,5	155,0
		AFG1	17	28,0	33,0	26,8	92,5
		AFG2	0	-	-	-	-
		FUB1	69	250,0	366,8	322,6	1662
		OTA	37	11,0	26,5	37,9	126,0
		ZEA	40	48,8	63,4	53,2	220,0
Gạo	238	AFB1	25	4,1	11,9	19,3	93,0
		AFB2	10	2,0	2,7	3,1	11,0
		AFG1	0	-	-	-	-
		AFG2	0	-	-	-	-
		FUB1	3	428,0	397,7	293,7	675,0
		OTA	0	-	-	-	-
		ZEA	1	6,2	6,2	-	6,2
Lạc	252	AFB1	60	9,3	39,0	72,6	362,0
		AFB2	35	2,8	16,3	39,4	217,0
		AFG1	13	11,0	22,4	29,3	92,0
		AFG2	0	-	-	-	-
		FUB1	2	278,5	278,5	376,9	545,0
		OTA	15	3,6	10,6	21,3	87,5
		ZEA	2	40,5	40,5	17,7	53,0
Vừng	219	AFB1	19	5,8	8,8	8,5	30,0
		AFB2	6	1,9	2,1	1,4	4,6
		AFG1	0	-	-	-	-
		AFG2	0	-	-	-	-
		FUB1	0	-	-	-	-
		OTA	1	8,1	8,1	-	8,1
		ZEA	0	-	-	-	-

Ghi chú: “-” Không có số liệu

Hàm lượng độc tố vi nấm có sự khác biệt đáng kể giữa các địa phương nghiên cứu và các nền mẫu. Hình 3.8 tổng hợp kết quả hàm lượng trung bình của AFB1 tại các địa phương.



Hình 3.8. So sánh hàm lượng AFB1 trên một số nền mẫu tại các địa phương

Đối với mẫu ngô, hàm lượng AFB1 có sự khác biệt rõ giữa Hà Giang và các địa phương còn lại. Hàm lượng trung bình của AFB1 trong ngô tại Hà Giang là 139 µg/kg, trong khi giá trị này tại các tỉnh, thành phố khác chỉ dao động trong khoảng 8 - 25 µg/kg. Điều này có thể bắt nguồn từ tập tục của người H'Mong tại Hà Giang, với thói quen tích trữ ngô dùng làm thực phẩm chính. Hàm lượng aflatoxin trong lạc cao nhất tại Bắc Giang và Hà Giang với giá trị trung bình khoảng 70 µg/kg. Giá trị này cũng vượt nhiều lần so với giới hạn tối đa cho phép theo QCVN 8-1:2011/BYT (đối với lạc là 8 µg/kg). Số lượng mẫu phát hiện và giá trị trung bình của các mẫu bị nhiễm AFB1 trong gạo và vừng thấp hơn nhiều so với trong ngô và lạc.

Tóm tắt số lượng mẫu có hàm lượng độc tố vi nấm vượt giới hạn cho phép theo QCVN 8-1:2011/BYT ở Bảng 3.19. Kết quả cho thấy, ngô và lạc là đối tượng có tỷ lệ mẫu bị nhiễm độc tố vi nấm vượt giới hạn cho phép nhiều nhất. Có từ 10-27% mẫu ngô có hàm lượng AFB1 vượt giới hạn cho phép (5 µg/kg) và khoảng 10-15% mẫu lạc có hàm lượng AFB1 vượt giới hạn cho phép

(8 µg/kg). Có 4 mẫu ngô không có AFB1 nhưng có hàm lượng AFG1 cao (10,8; 72,5; 23 và 65 µg/kg) làm cho AF tổng vượt giới hạn cho phép (đối với ngô, gạo). OTA là độc tố vi nấm chiếm tỷ lệ vượt giới hạn tối đa cho phép (5 µg/kg) khá lớn, cao nhất ở Hà Giang với 14,00% số mẫu vượt giới hạn. Tỷ lệ mẫu có hàm lượng FUB1 vượt giới hạn cho phép (1000 µg/kg) rất thấp, với chỉ có 3 mẫu ngô ở Hà Giang và 2 mẫu ngô ở Thanh Hóa. Không có mẫu nào có hàm lượng ZEA vượt giới hạn cho phép (100-350 µg/kg).

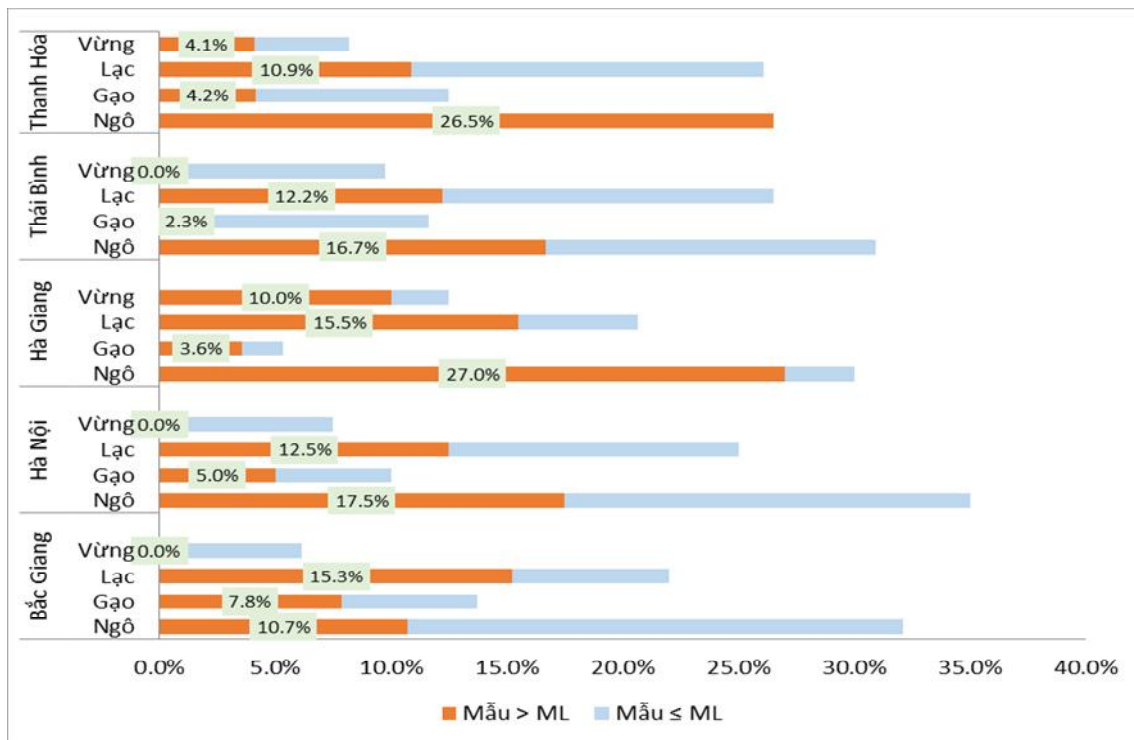
Bảng 3.19. Số lượng và tỷ lệ mẫu vượt giới hạn cho phép

Mẫu	Địa phương	AFB1		FUB1		OTA		ZEA	
		n	%	n	%	n	%	n	%
Ngô	Bắc Giang	6	10,76	0	-	3	5,36	0	-
	Hà Nội	7	17,50	0	-	4	10,00	0	-
	Hà Giang	27	27,00	3	3,00	14	14,00	0	-
	Thái Bình	7	16,67	0	-	1	2,38	0	-
	Thanh Hóa	13	26,53	2	4,08	6	12,24	0	-
Gạo	Bắc Giang	4	7,84	0	-	0	-	0	-
	Hà Nội	2	5,00	0	-	0	-	0	-
	Hà Giang	2	3,57	0	-	0	-	0	-
	Thái Bình	1	2,33	0	-	0	-	0	-
	Thanh Hóa	2	4,17	0	-	0	-	0	-
Lạc	Bắc Giang	9	15,25	0	-	2	3,39	0	-
	Hà Nội	5	12,50	0	-	0	-	0	-
	Hà Giang	9	15,52	0	-	3	5,17	0	-
	Thái Bình	6	12,24	0	-	0	-	0	-
	Thanh Hóa	5	10,87	0	-	1	2,17	0	-
Vùng	Bắc Giang	0	-	0	-	0	-	0	-
	Hà Nội	0	-	0	-	0	-	0	-
	Hà Giang	4	10,00	0	-	0	-	0	-
	Thái Bình	0	-	0	-	1	2,44	0	-
	Thanh Hóa	2	4,08	0	-	0	-	0	-
Cộng		111	11,14	5	0,50	35	3,51	0	0,00

3.2.2.2. Tỷ lệ nhiễm độc tố vi nấm

Aflatoxin là độc tố vi nấm được phát hiện nhiều nhất, trong đó chủ yếu là AFB1 với 192/996 mẫu (chiếm 19,28%). Ngô là đối tượng bị nhiễm độc tố AFB1 cao nhất, với 88/287 mẫu (chiếm 30,66%). Tiếp theo là lạc với 60/252 mẫu bị nhiễm AFB1 (chiếm 23,81%). Chỉ có 25/238 mẫu gạo (10,50%) và 19/219 mẫu vừng (8,68%) bị nhiễm AFB1. Tỷ lệ bị nhiễm AFB2 và AFG1 thấp hơn, lần lượt là 93/996 mẫu (chiếm 9,34%) và 30/996 mẫu (chiếm 3,01%). Không có mẫu nào bị nhiễm độc tố AFG2.

Tỷ lệ bị nhiễm các độc tố vi nấm FUB1, OTA và ZEA lần lượt là 7,43%; 5,32% và 4,32%. Các mẫu bị nhiễm chủ yếu tập trung vào các mẫu ngô. Tỷ lệ mẫu ngô bị nhiễm FUB1, OTA và ZEA lần lượt là 24,04%; 12,89% và 13,94%. OTA cũng được phát hiện trong lạc với tỷ lệ khá cao, chiếm 5,95% các mẫu nghiên cứu. Các mẫu gạo và vừng có tỷ lệ bị nhiễm FUB1, OTA và ZEA rất thấp. Chỉ có 3/238 và 1/238 mẫu gạo bị nhiễm FUB1 và ZEA, không có mẫu gạo nào bị nhiễm OTA. Tương tự, chỉ có 1 mẫu vừng bị nhiễm OTA, không có mẫu vừng nào bị nhiễm FUB1 và ZEA.



Hình 3.9. Tỷ lệ mẫu vượt giới hạn cho phép và tỷ lệ mẫu nhiễm độc tố AFB1 trên một số nền mẫu tại các địa phương

Hình 3.9 tóm tắt tỷ lệ mẫu nhiễm AFB1 và tỷ lệ mẫu có hàm lượng AFB1 vượt giới hạn cho phép. Các kết quả cho thấy có nhiều mẫu có phát hiện độc tố vi nấm nhưng chưa vượt giới hạn cho phép. Trong các đối tượng thực phẩm được nghiên cứu, ngô và lạc là hai nhóm sản phẩm có tỷ lệ nhiễm cũng như tỷ lệ vượt giới hạn đối với AFB1 lớn nhất, kết quả này cũng phù hợp với nhiều nghiên cứu tại Việt Nam [6, 26, 74].

3.3. ĐÁNH GIÁ NGUY CƠ

3.3.1. Kết quả khảo sát lượng tiêu thụ thực phẩm và cân nặng theo tuổi

Qua điều tra lượng thực phẩm tiêu thụ tại các địa phương, số liệu về lượng thực phẩm được tiêu thụ hàng ngày đã được tính theo từng nhóm tuổi, tại từng địa phương. Ngoài giá trị trung bình, giá trị phân vị 95% cũng được tính nhằm đánh giá mức độ phân bố của số liệu.

Các địa phương cụ thể được điều tra lượng tiêu thụ thực phẩm như sau:

- Bắc Giang: thị trấn Kép, xã Đại Lâm, huyện Lạng Giang
- Hà Nội: phường Nhân Chính và Thanh Xuân Nam, quận Thanh Xuân
- Thái Bình: xã Song Lãng và Song An, huyện Vũ Thư
- Thanh Hóa: xã Đa Lộc và Hưng Lộc, huyện Hậu Lộc
- Hà Giang: xã Cán Tỷ, huyện Quản Bạ và xã Thái Phìn Lũng, huyện Mèo Vạc.

Lượng tiêu thụ của 4 loại thực phẩm thu được qua điều tra được tóm tắt trong Bảng 3.20. Do lạc và vừng được sử dụng cùng với nhau nên lượng tiêu thụ của hai nhóm sản phẩm này được tính chung và tính theo lượng lớn hơn. Cân nặng trung bình của các nhóm tuổi khác nhau ở các địa phương cũng được tính và kết quả ghi cùng ở Bảng 3.20.

Bảng 3.20. Lượng tiêu thụ thực phẩm (g/người/ngày) và cân nặng trung bình theo nhóm tuổi

Địa điểm	Nhóm tuổi, giới tính	Số lượng	Cân nặng cơ thể (kg)	Gạo		Ngô		Lạc và vùng	
				Trung bình	P95	Trung bình	P95	Trung bình	P95
Bắc Giang	3-6	22	17,5	158,2	240,0	10,7	55,0	1,5	5,4
	7-11	30	28,6	211,3	458,0	14,3	76,4	3,2	14,3
	12-18	23	47,7	262,6	436,4	22,9	40,4	4,3	20,0
	>18	147	55,2	278,0	480,0	27,6	57,1	4,8	14,4
	Nam >18	67	62,7	304,0	544,7	24,7	57,1	5,3	20,0
	Nữ > 18	80	52,6	256,2	456,1	30,1	57,1	4,5	14,4
Thái Bình	3-6	18	20,4	183,6	320,0	9,6	28,6	1,2	7,1
	7-11	18	32,9	249,7	459,0	12,6	42,9	2,5	17,1
	12-18	34	43,7	312,3	480,0	15,8	57,1	3,1	20,0
	>18	148	54,6	341,9	600,0	17,6	57,1	3,1	11,7
	Nam >18	69	58,6	410,9	687,1	18,9	57,1	4,5	15,7
	Nữ > 18	79	51,0	281,6	461,5	16,0	57,1	2,9	8,8
Hà Nội	3-6	24	15,5	168,6	224,0	7,9	17,7	2,2	4,1
	7-11	32	26,5	228,9	396,7	26,6	76,5	3,8	6,3
	12-18	46	48,3	267,8	545,2	35,0	80,0	4,4	7,8
	>18	155	55,2	286,6	514,5	53,2	147,8	4,8	9,6
	Nam >18	75	58,3	286,6	514,5	53,2	147,8	4,8	9,6
	Nữ >18	80	52,0	286,6	514,5	53,2	147,8	4,8	9,6
Thanh Hóa	3-6	31	13,6	165,2	240,0	8,0	40,0	1,1	4,3
	7-11	56	21,5	227,2	342,9	15,0	57,1	2,1	5,7
	12-18	26	40,7	262,4	437,5	28,6	85,7	3,4	8,6
	>18	119	56,0	300,5	480,0	31,0	85,7	3,9	12,9
	Nam >18	57	62,8	339,3	522,9	31,1	85,7	4,6	14,3
	Nữ >18	62	49,7	264,9	448,1	31,0	85,7	3,2	9,9
Hà Giang	3-6	38	14,4	163,7	325,0	63,6	246,1	1,8	6,7
	7-11	29	26,4	205,0	420,8	152,6	419,2	2,2	8,3
	12-18	48	39,6	208,8	566,7	232,1	554,4	3,0	9,3
	>18	153	50,5	244,4	691,7	338,6	650,0	3,9	12,5
	Nam >18	76	54,3	248,1	769,9	346,5	669,9	3,8	9,0
	Nữ >18	77	49,0	240,8	645,2	330,8	650,0	4,1	13,9

Kết quả thu được ở Bảng 3.20 cho thấy lượng thực phẩm chủ yếu được sử dụng là gạo, tỷ lệ sử dụng ngô khá thấp và tỷ lệ sử dụng lạc và vừng không đáng kể. Các giá trị thu được có sự tương đồng giữa các nhóm tuổi của các địa phương. Giá trị phân vị 95% (P95) phản ánh mức độ dao động của các kết quả và có sự khác biệt giữa các địa phương. Sự phân bố giữa các nhóm tuổi khác nhau có sự khác biệt. Điều này dẫn đến mức độ dao động của kết quả và giá trị P95 có thể được sử dụng để tính đến sự dao động này.

3.3.2. Kết quả xác định liều phơi nhiễm các độc tố

3.3.2.1. Hàm lượng trung bình của độc tố vi nấm trong các mẫu

Vì tỷ lệ mẫu không phát hiện độc tố vi nấm (kết quả dưới LOD hoặc LOQ) lớn hơn 50% tổng số mẫu, do đó hàm lượng độc tố vi nấm trong mẫu được xác định theo hướng dẫn của Cơ quan an toàn thực phẩm châu Âu: giới hạn dưới (LB) được tính bằng cách thay mẫu không phát hiện bởi giá trị "0" và thay mẫu phát hiện thấp hơn LOQ bởi LOD, còn giới hạn trên (UB) được xác định bằng cách thay mẫu không phát hiện bằng LOD và thay mẫu phát hiện thấp hơn LOQ bởi LOQ [61].

Phương pháp xác định đồng thời độc tố vi nấm đã được thẩm định trên các nền mẫu nghiên cứu. LOD và LOQ của các độc tố vi nấm xác định được với AFB1 là 0,1 và 0,3 µg/kg; với FUB1 là 25 và 75 µg/kg; với OTA là 0,5 và 1,5 µg/kg; với ZEA là 0,5 và 1,5 µg/kg. Các giá trị này được sử dụng để tính liều phơi nhiễm.

Các giá trị giới hạn trên (UB) và giới hạn dưới (LB) đã được tính dựa trên các giá trị LOD và LOQ thu được và hàm lượng độc tố vi nấm có trong mẫu. Kết quả xác định độc tố vi nấm được trình bày ở Bảng 3.21.

Bảng 3.21. Giá trị hàm lượng trung bình các độc tố vi nấm được sử dụng để đánh giá nguy cơ

Địa điểm	Loại mẫu	Số lượng	AFB1 (µg/kg)		FUB1 (µg/kg)		OTA (µg/kg)		ZEA (µg/kg)	
			LB	UB	LB	UB	LB	UB	LB	UB
Bắc Giang	Ngô	56	6,91	6,98	24,7	48,3	2,93	3,37	0,13	0,63
	Gạo	51	0,33	0,42	0	25,0	0	0,50	0	0,50
	Lạc	59	19,2	19,3	0	25,0	0,56	1,01	0	0,50

Địa điểm	Loại mẫu	Số lượng	AFB1 (µg/kg)		FUB1 (µg/kg)		OTA (µg/kg)		ZEA (µg/kg)	
			LB	UB	LB	UB	LB	UB	LB	UB
	Vùng	49	0,45	0,54	0	25,0	0	0,50	0	0,50
Thái Bình	Ngô	42	3,22	3,29	21,6	44,8	0,48	0,93	3,50	3,98
	Gạo	43	0,35	0,45	0	25,0	0	0,50	0	0,50
	Lạc	49	4,96	5,04	0	25,0	0,06	0,55	0	0,50
	Vùng	41	2,78	2,85	0	25,0	0,40	0,87	0	0,50
Hà Nội	Ngô	40	2,56	2,62	12,8	35,3	0,91	1,36	0,61	1,09
	Gạo	40	0,33	0,42	0	25,0	0	0,50	0	0,50
	Lạc	40	9,20	9,28	0	25,0	0,15	0,63	0	0,50
	Vùng	40	0,37	0,46	0	25,0	0	0,50	0	0,50
Thanh Hóa	Ngô	49	5,31	5,39	127,0	129,0	1,95	2,38	64,50	64,90
	Gạo	48	1,94	2,04	0	25,0	0	0,50	0	0,50
	Lạc	46	4,87	4,96	0	25,0	0,57	1,03	0	0,50
	Vùng	49	1,65	1,74	0	25,0	0	0,50	0	0,50
Hà Giang	Ngô	100	66,0	66,1	154,0	169,0	7,44	7,87	20,90	21,30
	Gạo	56	0,91	1,01	15,0	38,7	0	0,50	0	0,50
	Lạc	58	16,5	16,6	9,4	34,0	1,78	2,25	1,40	1,88
	Vùng	40	0,75	0,85	0	25,0	0	0,50	0	0,50

Đối với AFB1, các giá trị LB, UB tương ứng cao nhất tại Hà Giang, tiếp đến là Bắc Giang và Thanh Hóa, thấp nhất là Thái Bình và Hà Nội. Giá trị cao nhất được xác định trên mẫu ngô tại Hà Giang là 66,00 µg/kg (LB) và 66,10 µg/kg (UB). Hàm lượng trung bình AFB1 trên lạc thấp hơn so với ngô, cao nhất tại Bắc Giang (UB = 19,3 µg/kg) và Hà Giang (UB = 16,6 µg/kg). Trên gạo, giá trị LB và UB ở các địa phương đều thấp, cao nhất là tại Thanh Hóa (1,94 và 2,04 µg/kg). Đối với vùng, giá trị này tương đối thấp so với các loại thực phẩm khác, dao động từ 0,37 µg/kg (LB tại Hà Nội) đến 2,85 µg/kg (UB tại Thái Bình).

Đối với các độc tố vi nấm khác, giá trị LB và UB của FUB1 trong ngô cao nhất tại Hà Giang (154,0 và 169,0 µg/kg), tiếp đến là Thanh Hóa (127,0 và

129,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$), khá tương đồng tại Bắc Giang (24,7 và 48,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$) và Thái Bình (21,6 và 44,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$), thấp nhất là tại Hà Nội (12,8 và 35,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Đối với gạo và lạc, FUB1 chỉ phát hiện tại Hà Giang, với giá trị LB và UB thấp hơn nhiều so với ngô. Không có mẫu vùng nào bị phát hiện có nhiễm FUB1.

Giá trị LB và UB của OTA trong ngô cao nhất tại Hà Giang là 7,44 và 7,87 $\mu\text{g}/\text{kg}$ và cao hơn tại các địa phương còn lại. Tiếp theo là lạc với giá trị UB dao động tại các địa phương từ 0,55 đến 2,25 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Không có mẫu vùng nào bị phát hiện nhiễm FUB1.

Giá trị LB và UB của ZEA trong ngô tại Thanh Hóa là 64,50 và 64,90 $\mu\text{g}/\text{kg}$ cao hơn giá trị tương ứng tại Hà Giang (20,90 và 21,30 $\mu\text{g}/\text{kg}$) và cao hơn hẳn các địa phương còn lại. Chỉ có 2 mẫu gạo và 1 mẫu lạc có phát hiện ZEA. Không có mẫu vùng nào bị nhiễm ZEA.

Tất cả các mẫu được thu thập trong nghiên cứu này đều là mẫu có vẻ ngoài bình thường, không bị tổn thương. Tuy nhiên, sự có mặt của các độc tố vi nấm đặc biệt là AFB1 trong các mẫu cho thấy vẫn có nguy cơ người sử dụng phơi nhiễm với các độc tố vi nấm này.

3.3.2.2. Tính liều phơi nhiễm các độc tố vi nấm

Dựa trên kết quả hàm lượng độc tố vi nấm trong thực phẩm và mức tiêu thụ thực phẩm đã được đưa ra trong Bảng 3.20, liều phơi nhiễm với 4 loại độc tố AFB1, FUB1, OTA và ZEA đã được tính cho từng nhóm tuổi. Kết quả được trình bày ở Bảng 3.22 đến 3.29 và Hình 3.10.

Kết quả chi tiết được trình bày trong phụ lục 6.

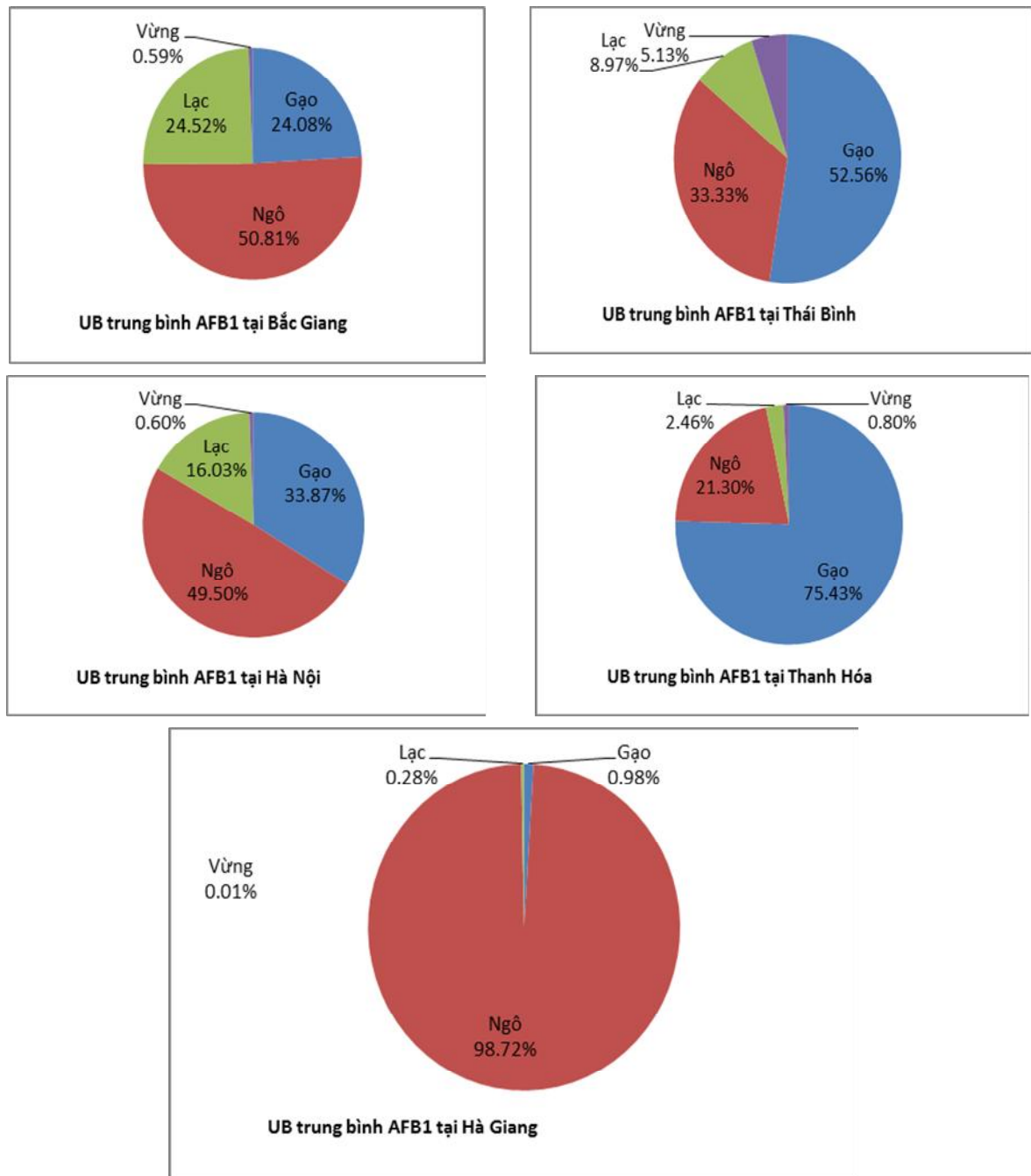
Bảng 3.22. Liều phơi nhiễm của AFB1 (ng/kg bw/ngày)

Địa điểm	Nhóm tuổi	Trung bình		P95	
		LB	UB	LB	UB
Bắc Giang	3-6	8,8	9,8	32,2	33,9
	7-11	8,1	8,8	33,5	35,3
	12-18	6,9	7,5	17,1	18,1
	>18	6,8	7,3	15,1	16,1
	Nam >18	6,0	6,5	15,9	16,4
	Nữ > 18	7,2	7,8	15,7	16,7
Thái Bình	3-6	5,1	6,0	12,7	14,4
	7-11	4,5	5,3	13,1	14,6
	12-18	4,2	4,9	11,6	12,8
	>18	3,7	4,3	8,9	10,0
	Nam >18	4,1	4,8	9,3	10,6
	Nữ > 18	3,4	3,9	8,1	9,1
Hà Nội	3-6	6,2	7,3	10,2	11,7
	7-11	6,7	7,7	14,5	16,2
	12-18	4,5	5,1	9,5	10,7
	>18	5,0	5,6	11,5	12,7
	Nam >18	4,7	5,3	10,9	12,0
	Nữ > 18	5,3	5,9	12,3	13,4
Thanh Hóa	3-6	27,2	28,5	51,9	54,0
	7-11	24,8	26,0	46,8	48,6
	12-18	16,8	17,5	33,4	34,7
	>18	13,8	14,4	26,3	27,3
	Nam >18	13,6	14,2	24,9	25,9
	Nữ > 18	14,1	14,7	27,9	29,0
Hà Giang	3-6	304,0	305,6	1156,3	1160,6
	7-11	390,0	391,4	1067,8	1071,2
	12-18	392,9	394,1	941,0	943,9
	>18	448,3	449,4	866,1	868,9
	Nam >18	426,5	427,6	829,9	832,7
	Nữ > 18	451,5	452,7	892,3	895,1

Các kết quả cho thấy, liều phơi nhiễm AFB1 tại Hà Giang cao hơn rõ rệt so với các địa phương còn lại, cả về giá trị trung bình và phân vị 95%, liều trung bình UB tại Hà Giang ở nhóm người trưởng thành là 449,4 ng/kg bw/ngày; trong khi đó liều tương tự tại Thanh Hóa chỉ là 14,4 ng/kg bw/ngày và tại 3 tỉnh còn lại dao động từ 4,3 đến 7,4 ng/kg bw/ngày.

Bảng 3.23. Phân bố mức độ phơi nhiễm AFB1 theo loại thực phẩm trong tổng liều đối với nhóm người trưởng thành (>18 tuổi)

<i>Địa điểm</i>	<i>Thực phẩm</i>	<i>Trung bình</i>		<i>P95</i>	
		<i>LB</i>	<i>UB</i>	<i>LB</i>	<i>UB</i>
Bắc Giang	Gạo	1,64	2,13	2,83	3,68
	Ngô	3,46	3,49	7,15	7,22
	Lạc	1,67	1,68	5,01	5,03
	Vùng	0,04	0,05	0,12	0,14
	Tổng	6,80	7,35	15,10	16,07
Thái Bình	Gạo	1,64	2,13	2,83	3,68
	Ngô	1,04	1,06	3,37	3,44
	Lạc	0,28	0,29	1,06	1,08
	Vùng	0,16	0,16	0,60	0,61
	Tổng	3,66	4,31	8,86	10,04
Hà Nội	Gạo	1,69	2,20	3,03	3,94
	Ngô	2,47	2,53	6,85	7,02
	Lạc	0,80	0,81	1,60	1,61
	Vùng	0,03	0,04	0,06	0,08
	Tổng	4,99	5,57	11,55	12,65
Thanh Hóa	Gạo	10,41	10,95	16,63	17,49
	Ngô	2,94	2,98	8,13	8,25
	Lạc	0,34	0,35	1,12	1,14
	Vùng	0,11	0,12	0,38	0,40
	Tổng	13,80	14,40	26,26	27,28
Hà Giang	Gạo	4,40	4,89	12,46	13,83
	Ngô	442,5	443,2	849,5	850,8
	Lạc	1,27	1,28	4,08	4,10
	Vùng	0,06	0,07	0,09	0,21
	Tổng	448,3	449,4	866,1	868,9



Hình 3.10. So sánh tỷ lệ đóng góp của các loại thực phẩm vào liều phơi nhiễm AFB1 tại các địa phương

Qua so sánh tỷ lệ đóng góp vào tổng liều phơi nhiễm AFB1 cho thấy tại Hà Giang nguồn phơi nhiễm chủ yếu từ ngô, trong khi ở Thanh Hóa và Thái Bình chủ yếu từ gạo. Ở Bắc Giang và Hà Nội, nguồn phơi nhiễm từ lạc chiếm tỷ lệ đáng kể.

Bảng 3.24. Liều phơi nhiễm của FUB1 (ng/kg bw/ngày)

Địa điểm	Nhóm tuổi	Trung bình		P95	
		LB	UB	LB	UB
Bắc Giang	3-6	15,1	259,8	77,6	510,1
	7-11	12,4	214,4	66,0	554,4
	12-18	11,9	165,3	20,9	290,6
	>18	12,4	154,4	25,6	280,4
	Nam >18	9,7	144,5	22,5	277,1
	Nữ > 18	14,1	153,7	26,8	282,9
Thái Bình	3-6	10,1	249,0	30,2	472,3
	7-11	8,3	210,7	28,1	433,1
	12-18	7,8	198,4	28,2	356,0
	>18	6,9	173,8	22,5	332,2
	Nam >18	7,0	193,6	21,0	350,1
	Nữ > 18	6,8	154,9	24,1	285,0
Hà Nội	3-6	6,5	297,0	14,6	414,8
	7-11	12,8	258,5	37,0	488,0
	12-18	9,3	168,7	21,2	348,7
	>18	12,3	168,2	34,3	336,2
	Nam >18	11,7	159,2	32,5	318,4
	Nữ > 18	13,1	178,5	36,4	356,9
Thanh Hóa	3-6	74,7	383,6	373,5	836,4
	7-11	88,6	359,1	337,3	754,6
	12-18	89,2	256,0	267,4	550,9
	>18	70,3	209,0	194,4	423,2
	Nam >18	62,9	202,6	267,4	395,6
	Nữ > 18	79,2	216,9	267,4	457,8
Hà Giang	3-6	851,9	1193,7	2974,8	3789,1
	7-11	1007,4	1282,3	2687,4	3318,9
	12-18	982,4	1199,1	2372,9	2933,7
	>18	1105,9	1325,0	2190,0	2719,9
	Nam >18	1051,9	1259,4	2114,1	2643,4
	Nữ > 18	1114,2	1336,0	2243,0	2768,1

Liều phơi nhiễm FUB1 cao nhất ghi nhận tại Hà Giang, tiếp theo là Thanh Hóa. Liều trung bình UB tại Hà Giang ở nhóm người trưởng thành là 1325,0 ng/kg bw/ngày; trong khi đó liều tương tự tại Thanh Hóa chỉ là 209,0 ng/kg bw/ngày và tại 3 tỉnh còn lại dao động từ 154,4 đến 173,8 ng/kg bw/ngày.

Bảng 3.25. Phân bố mức độ phơi nhiễm FUB1 theo loại thực phẩm trong tổng liều đối với nhóm người trưởng thành (>18 tuổi)

<i>Địa điểm</i>	<i>Thực phẩm</i>	<i>Trung bình</i>		<i>P95</i>	
		<i>LB</i>	<i>UB</i>	<i>LB</i>	<i>UB</i>
Bắc Giang	Gạo	0	125,9	0	217,4
	Ngô	12,4	24,2	25,6	50
	Lạc	0	2,2	0	6,5
	Vừng	0	2,2	0	6,5
	Tổng	12,4	154,4	25,6	280,4
Thái Bình	Gạo	0	156,5	0	274,7
	Ngô	6,9	14,4	22,5	46,8
	Lạc	0	1,4	0	5,4
	Vừng	0	1,4	0	5,4
	Tổng	6,9	173,8	22,5	332,2
Hà Nội	Gạo	0,0	129,8	0,0	233,0
	Ngô	12,3	34,0	34,3	94,5
	Lạc	0,0	2,2	0,0	4,3
	Vừng	0,0	2,2	0,0	4,3
	Tổng	12,3	168,2	34,3	336,2
Thanh Hóa	Gạo	0,0	134,2	0,0	214,3
	Ngô	70,3	71,4	194,4	197,4
	Lạc	0,0	1,7	0,0	5,8
	Vừng	0,0	1,7	0,0	5,8
	Tổng	70,3	209,0	194,4	423,2
Hà Giang	Gạo	72,6	187,3	205,5	530,1
	Ngô	1032,6	1133,1	1982,2	2175,2
	Lạc	0,7	2,6	2,3	8,4
	Vừng	0,0	1,9	0,0	6,2
	Tổng	1105,9	1325,0	2190,0	2719,9

Kết quả cho thấy nguồn phơi nhiễm FUB1 tại các địa phương chủ yếu từ ngô. Riêng tại Hà Giang, có sự đóng góp của gạo vào tổng liều, tuy nhiên không đáng kể. Lạc và vừng không đóng góp vào tổng liều phơi nhiễm FUB1.

Bảng 3.26. Liều phơi nhiễm của OTA (ng/kg bw/ngày)

Địa điểm	Nhóm tuổi	Trung bình		P95	
		LB	UB	LB	UB
Bắc Giang	3-6	1,8	6,7	9,4	17,9
	7-11	1,5	5,5	8,1	17,8
	12-18	1,5	4,5	2,7	8,1
	>18	1,5	4,3	3,2	8,2
	Nam >18	1,2	3,9	2,8	7,9
	Nữ > 18	1,7	4,5	3,3	8,4
Thái Bình	3-6	0,3	5,0	0,8	9,6
	7-11	0,2	4,3	0,9	8,9
	12-18	0,2	4,0	0,8	7,4
	>18	0,2	3,5	0,6	6,8
	Nam >18	0,2	3,9	0,6	7,1
	Nữ > 18	0,2	3,1	0,6	5,8
Hà Nội	3-6	0,5	6,3	1,1	9,1
	7-11	0,9	5,8	2,7	11,7
	12-18	0,7	3,9	1,5	8,1
	>18	0,9	4,0	2,5	8,5
	Nam >18	0,8	3,8	2,3	8,0
	Nữ > 18	0,9	4,3	2,6	9,0
Thanh Hóa	3-6	1,2	7,6	5,9	16,3
	7-11	1,4	7,1	5,3	14,7
	12-18	1,4	5,0	4,2	10,7
	>18	1,1	4,1	3,1	8,3
	Nam >18	1,0	4,0	2,8	7,8
	Nữ > 18	1,3	4,2	3,5	8,9
Hà Giang	3-6	33,1	40,8	128,0	147,1
	7-11	43,2	49,6	118,7	133,8
	12-18	43,7	49,0	104,6	118,0
	>18	50,0	55,4	96,2	108,8
	Nam >18	47,6	52,7	92,1	104,6
	Nữ > 18	50,4	55,8	99,2	111,8

Liều phơi nhiễm OTA cao nhất ghi nhận tại Hà Giang với liều trung bình UB ở nhóm người trưởng thành là 55,4 ng/kg bw/ngày, cao hơn khoảng 10 lần so với các địa phương còn lại; liều tương tự tại 4 tỉnh còn lại dao động từ 3,5 đến 4,3 ng/kg bw/ngày.

Bảng 3.27. Phân bố mức độ phơi nhiễm OTA theo loại thực phẩm trong tổng liều đối với nhóm người trưởng thành (>18 tuổi)

<i>Địa điểm</i>	<i>Thực phẩm</i>	<i>Trung bình</i>		<i>P95</i>	
		<i>LB</i>	<i>UB</i>	<i>LB</i>	<i>UB</i>
Bắc Giang	Gạo	0,00	2,52	0,00	4,35
	Ngô	1,47	1,69	3,03	3,49
	Lạc	0,05	0,09	0,14	0,26
	Vùng	0,00	0,04	0,00	0,13
	Tổng	1,52	4,34	3,13	8,23
Thái Bình	Gạo	0,00	3,13	0,00	5,49
	Ngô	0,15	0,30	0,50	0,97
	Lạc	0,00	0,03	0,01	0,12
	Vùng	0,02	0,05	0,08	0,19
	Tổng	0,17	3,51	0,59	6,77
Hà Nội	Gạo	0,00	2,60	0,00	4,66
	Ngô	0,88	1,31	2,43	3,64
	Lạc	0,01	0,05	0,03	0,11
	Vùng	0,00	0,04	0,00	0,09
	Tổng	0,89	4,00	2,46	8,50
Thanh Hóa	Gạo	0,00	2,68	0,00	4,29
	Ngô	1,08	1,32	2,98	3,64
	Lạc	0,04	0,07	0,13	0,24
	Vùng	0,00	0,03	0,00	0,12
	Tổng	1,12	4,11	3,11	8,28
Hà Giang	Gạo	0,00	2,42	0,00	6,85
	Ngô	49,88	52,77	95,76	101,30
	Lạc	0,14	0,17	0,44	0,56
	Vùng	0,00	0,04	0,00	0,12
	Tổng	50,02	55,40	96,20	108,83

Nguồn phơi nhiễm OTA tại các địa phương chủ yếu từ ngô và lạc. Tuy nhiên, tỷ lệ đóng góp của lạc không đáng kể so với ngô. Gạo và vùng không đóng góp vào tổng liều phơi nhiễm OTA.

Bảng 3.28. Liều phơi nhiễm của ZEA (ng/kg bw/ngày)

Địa điểm	Nhóm tuổi	Trung bình		P95	
		LB	UB	LB	UB
Bắc Giang	3-6	0,1	5,0	0,4	9,1
	7-11	0,1	4,1	0,4	10,2
	12-18	0,1	3,1	0,1	5,5
	>18	0,1	2,9	0,1	5,3
	Nam >18	0,1	2,8	0,1	5,2
	Nữ > 18	0,1	2,9	0,1	5,3
Thái Bình	3-6	1,6	6,4	4,9	13,8
	7-11	1,3	5,4	4,6	12,7
	12-18	1,3	5,1	4,6	11,2
	>18	1,1	4,5	3,7	9,9
	Nam >18	1,1	4,9	3,4	10,0
	Nữ > 18	1,1	4,1	3,9	9,2
Hà Nội	3-6	0,3	6,1	0,7	8,7
	7-11	0,6	5,6	1,8	10,9
	12-18	0,4	3,7	1,0	7,6
	>18	0,6	3,7	1,6	7,8
	Nam >18	0,6	3,5	1,6	7,3
	Nữ > 18	0,6	4,0	1,7	8,2
Thanh Hóa	3-6	37,9	44,3	189,7	200,0
	7-11	45,0	50,7	171,3	180,6
	12-18	45,3	48,9	135,8	142,2
	>18	35,7	38,7	98,7	103,8
	Nam >18	31,9	34,9	88,0	93,0
	Nữ > 18	40,2	43,2	111,2	116,6
Hà Giang	3-6	92,5	100,1	357,8	376,4
	7-11	120,9	127,2	332,3	346,9
	12-18	122,6	127,7	292,9	305,9
	>18	140,2	145,4	269,4	281,6
	Nam >18	133,5	138,4	258,1	270,3
	Nữ > 18	141,2	146,5	277,6	289,8

Tương tự các độc tố vi nấm khác, liều phơi nhiễm ZEA tại Hà Giang cao nhất với liều trung bình UB ở nhóm người trưởng thành là 145,4 ng/kg bw/ngày; tiếp theo là Thanh Hóa với liều tương ứng là 38,7 cao hơn khoảng 10 lần so với các địa phương còn lại; liều tương ứng tại 3 tỉnh còn lại dao động từ 2,9 đến 4,5 ng/kg bw/ngày.

Bảng 3.29. Phân bố mức độ phơi nhiễm ZEA theo loại thực phẩm trong tổng liều đối với nhóm người trưởng thành (>18 tuổi)

Địa điểm	Thực phẩm	Trung bình		P95	
		LB	UB	LB	UB
Bắc Giang	Gạo	0,00	2,52	0,00	4,35
	Ngô	0,07	0,31	0,14	0,65
	Lạc	0,00	0,04	0,00	0,13
	Vừng	0,00	0,04	0,00	0,13
	Tổng	0,07	2,92	0,14	5,26
Thái Bình	Gạo	0,00	3,13	0,00	5,49
	Ngô	1,13	1,28	3,66	4,16
	Lạc	0,00	0,03	0,00	0,11
	Vừng	0,00	0,03	0,00	0,11
	Tổng	1,13	4,47	3,66	9,87
Hà Nội	Gạo	0,00	2,60	0,00	4,66
	Ngô	0,59	1,05	1,64	2,92
	Lạc	0,00	0,04	0,00	0,09
	Vừng	0,00	0,04	0,00	0,09
	Tổng	0,59	3,73	1,64	7,75
Thanh Hóa	Gạo	0,00	2,68	0,00	4,29
	Ngô	35,71	35,93	98,71	99,32
	Lạc	0,00	0,03	0,00	0,12
	Vừng	0,00	0,03	0,00	0,12
	Tổng	35,71	38,68	98,71	103,84
Hà Giang	Gạo	0,00	2,42	0,00	6,85
	Ngô	140,13	142,82	269,01	274,16
	Lạc	0,11	0,15	0,35	0,47
	Vừng	0,00	0,04	0,00	0,12
	Tổng	140,24	145,42	269,36	281,60

Kết quả cũng cho thấy nguồn phơi nhiễm ZEA tại các địa phương chủ yếu từ ngô. Riêng tại Hà Giang, có sự đóng góp của gạo vào tổng liều nhưng không đáng kể. Lạc và vừng không đóng góp vào tổng liều phơi nhiễm ZEA.

Liều phơi nhiễm của các độc tố vi nấm tại các địa phương theo từng nhóm tuổi và giới (người lớn) sẽ được sử dụng để đánh giá nguy cơ của các độc tố vi nấm trong chế độ ăn.

3.3.3. Kết quả đánh giá nguy cơ phơi nhiễm độc tố vi nấm

3.3.3.1. Aflatoxin B1

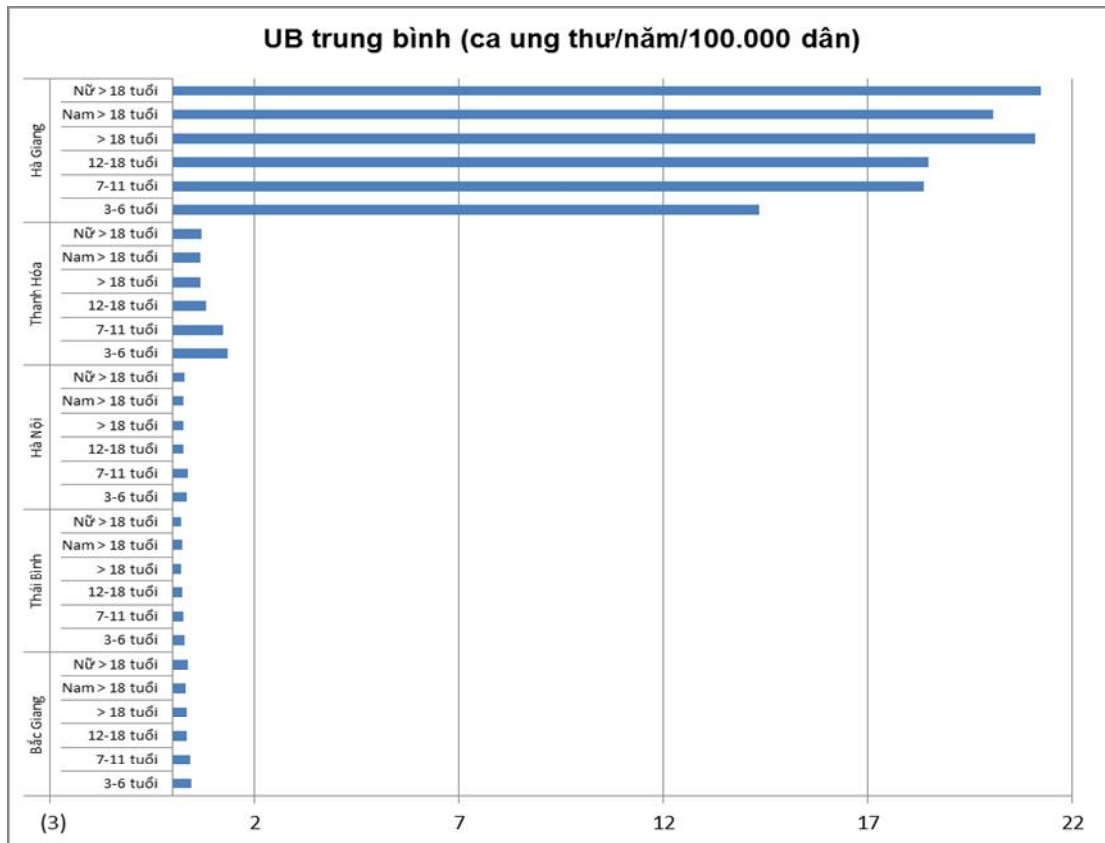
Nguy cơ của AFB1 đối với sức khỏe người sử dụng được đánh giá thông qua nguy cơ tăng ung thư gan của cộng đồng (số lượng ca ung thư trên 100.000 dân mỗi năm). Căn cứ trên liều phơi nhiễm, tiềm năng gây ung thư và hiệu chuẩn liều từ thực phẩm sống sang thực phẩm chín, nguy cơ gây ung thư gan của AFB1 đã được tính và trình bày ở Bảng 3.30 và Hình 3.11.

Bảng 3.30. Nguy cơ gây ung thư gan của AFB1 tại các địa phương

Địa điểm	Nhóm tuổi	Nguy cơ gây ung thư gan của AFB1 (ca ung thư/năm/100.000 dân)			
		LB trung bình	UB trung bình	LB P95	UB P95
Bắc Giang	3-6	0,41	0,46	1,51	1,59
	7-11	0,38	0,41	1,57	1,66
	12-18	0,32	0,35	0,80	0,85
	>18	0,32	0,34	0,71	0,75
	Nam >18	0,28	0,30	0,75	0,77
	Nữ > 18	0,34	0,36	0,74	0,78
Thái Bình	3-6	0,24	0,28	0,60	0,67
	7-11	0,21	0,25	0,61	0,69
	12-18	0,20	0,23	0,54	0,60
	>18	0,17	0,20	0,42	0,47
	Nam >18	0,19	0,23	0,44	0,50
	Nữ > 18	0,16	0,19	0,38	0,43
Hà Nội	3-6	0,29	0,34	0,48	0,55
	7-11	0,32	0,36	0,68	0,76
	12-18	0,21	0,24	0,44	0,50
	>18	0,23	0,26	0,54	0,59
	Nam >18	0,22	0,25	0,51	0,56
	Nữ > 18	0,25	0,28	0,58	0,63

Địa điểm	Nhóm tuổi	Nguy cơ gây ung thư gan của AFB1 (ca ung thư/năm/100.000 dân)			
		LB trung bình	UB trung bình	LB P95	UB P95
Thanh Hóa	3-6	1,28	1,34	2,44	2,53
	7-11	1,17	1,22	2,19	2,28
	12-18	0,79	0,82	1,57	1,63
	>18	0,65	0,68	1,23	1,28
	Nam >18	0,64	0,67	1,17	1,21
	Nữ > 18	0,66	0,69	1,31	1,36
Hà Giang	3-6	14,26	14,34	54,26	54,45
	7-11	18,30	18,36	50,10	50,26
	12-18	18,44	18,49	44,15	44,29
	>18	21,03	21,09	40,64	40,77
	Nam >18	20,01	20,06	38,94	39,07
	Nữ > 18	21,18	21,24	41,87	42,00

Từ các kết quả ở Bảng 3.30 và Hình 3.11, có thể dễ dàng nhận thấy nguy cơ gây ung thư gan cao nhất ở Hà Giang. Giá trị UB trung bình của các nhóm tuổi tại Hà Giang dao động từ khoảng 14 đến 21 ca ung thư/năm/100.000 dân; cao hơn nhiều lần so với các tỉnh còn lại. Tiếp theo, nguy cơ ung thư gan tại Thanh Hóa tuy thấp hơn Hà Giang, nhưng cũng cao hơn từ 2-5 lần so với 3 địa phương Hà Nội, Thái Bình và Bắc Giang với giá trị UB dao động từ 0,64 đến 1,28 ca ung thư/năm/100.000 dân. Giá trị UB trung bình của nguy cơ gây ung thư tại Bắc Giang cao hơn tại Thái Bình và Hà Nội đối với tất cả các nhóm tuổi.



Hình 3.11. So sánh nguy cơ gây ung thư trung bình do phơi nhiễm AFB1 (theo UB) tại các địa phương theo các nhóm tuổi

Về mặt xu hướng, tại 4 địa phương Thanh Hóa, Hà Nội, Thái Bình và Bắc Giang, nguy cơ ung thư cao gặp phải ở nhóm tuổi nhỏ (3-6 tuổi) và giảm dần ở các nhóm tuổi cao hơn. Tuy nhiên, xu hướng này ngược lại ở Hà Giang khi nguy cơ ung thư ở người lớn (trên 18 tuổi) cao hơn các nhóm tuổi nhỏ. Điều này có thể được giải thích thông qua chế độ ăn của đồng bào H'Mong ở Hà Giang, với ngô là nguồn lương thực chính của người lớn, trong khi đối với trẻ em là gạo.

So sánh về nguy cơ ung thư theo giới đối với nhóm tuổi trên 18 cho thấy nhìn chung nguy cơ ở nữ cao hơn ở nam (trừ Thái Bình). Sử dụng kiểm định t-test để đánh giá cho thấy sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê, với độ tin cậy 95%.

Các giá trị trung bình về nguy cơ gây ung thư tại 4 tỉnh Thanh Hóa, Hà Nội, Thái Bình và Bắc Giang có sự khác biệt rõ rệt so với Hà Giang do thiết kế nghiên cứu tại Hà Giang tập trung vào nhóm đồng bào H'Mong vùng núi cao

với tập tục tiêu thụ ngô là phổ biến. Để đảm bảo tính đại diện khi đánh giá nguy cơ ung thư của miền Bắc, số liệu của 4 địa phương vùng đồng bằng và trung du được đánh giá và đại diện cho miền Bắc. Kết quả được tóm tắt trong Bảng 3.31.

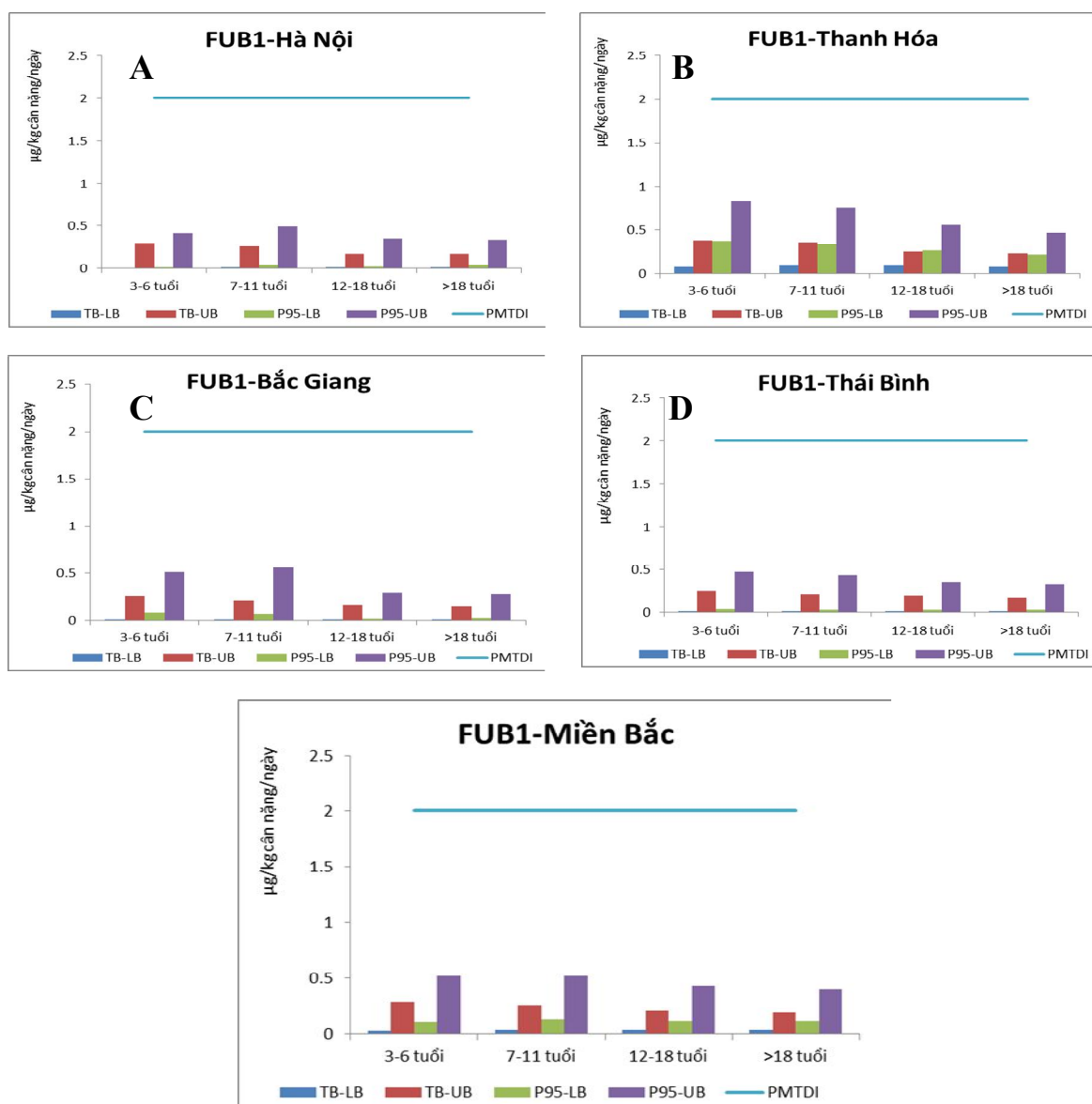
Bảng 3.31. Nguy cơ gây ung thư gan của AFB1 tại miền Bắc

Địa điểm	Nhóm tuổi	Nguy cơ gây ung thư gan của AFB1 (ca ung thư/năm/100.000 dân)			
		LB trung bình	UB trung bình	LB P95	UB P95
Miền Bắc	3-6	0,71	0,76	1,38	1,46
	7-11	0,64	0,68	1,37	1,45
	12-18	0,52	0,55	1,17	1,23
	>18	0,48	0,50	1,07	1,12
	Nam >18	0,47	0,50	1,03	1,08
	Nữ > 18	0,48	0,51	1,08	1,13

Như vậy, giá trị UB trung bình của các nhóm tuổi dao động từ 0,50 đến 0,76 ca ung thư/năm/100.000 dân. Nguy cơ ung thư ở nhóm tuổi nhỏ cao hơn ở người lớn, cao nhất là ở nhóm tuổi 3-6 tuổi.

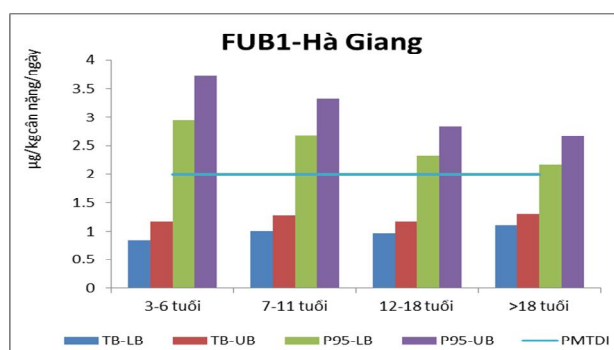
3.3.3.2. Fumonisin B1

Nguy cơ của FUB1 đến sức khỏe người sử dụng được đánh giá bằng cách so sánh liều phơi nhiễm với giá trị PMTDI 2,0 µg/kg bw/ngày. Kết quả đánh giá nguy cơ ở một số địa phương được thể hiện ở Hình 3.12 và Hình 3.13. Giá trị liều phơi nhiễm của miền Bắc được tổng hợp từ 4 tỉnh, thành phố Hà Nội, Thanh Hóa, Bắc Giang và Thái Bình.



Hình 3.12. So sánh liều phơi nhiễm với PMTDI của FUB1 tại một số địa phương và miền Bắc

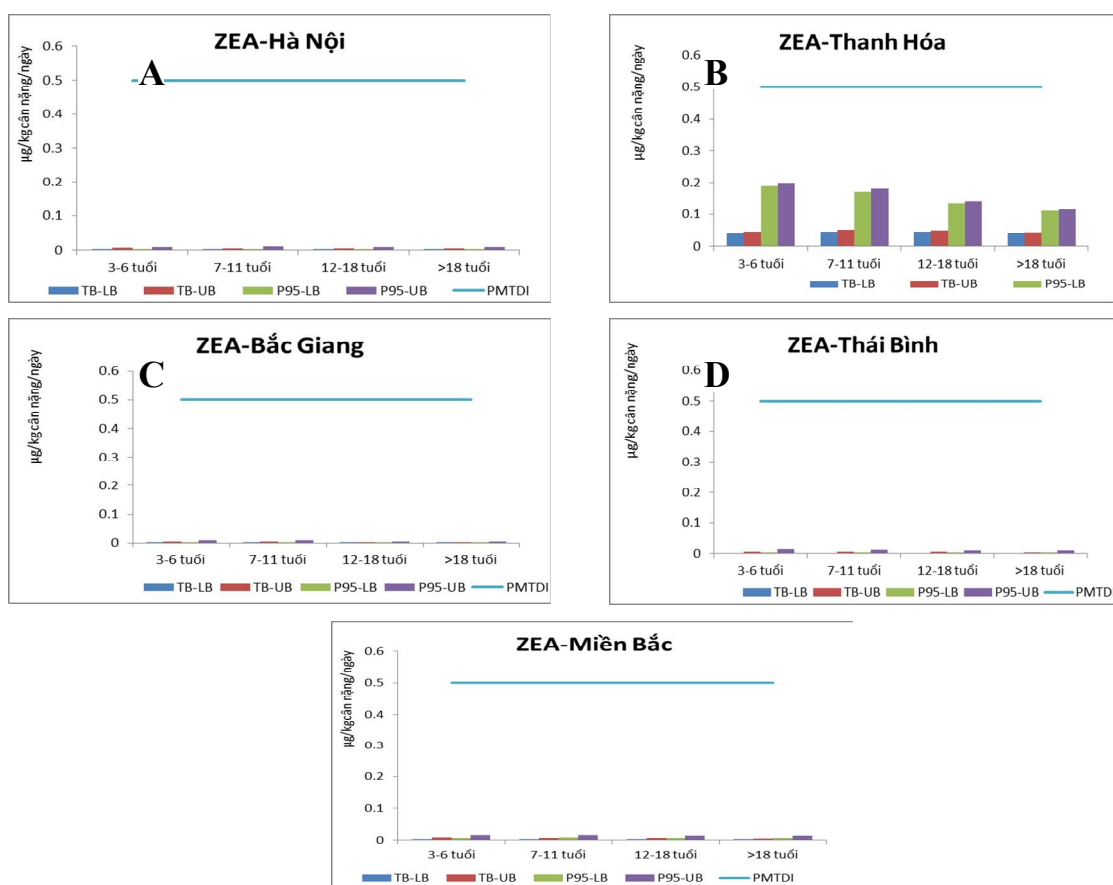
Các kết quả cho thấy, liều phơi nhiễm của tất cả các nhóm tuổi nghiên cứu tại các tỉnh, thành phố Hà Nội, Bắc Giang, Thái Bình và Thanh Hóa đều thấp hơn so với giá trị PMTDI. Tại Hà Giang, liều phơi nhiễm trung bình cũng thấp hơn so với PMTDI, tuy nhiên liều phân vị 95% của các nhóm tuổi đều cao hơn so với PMTDI. Điều này cho thấy một bộ phận dân cư tại vùng cao của Hà Giang có nguy cơ do phơi nhiễm FUB1 (Hình 3.13). Tương tự, như nguy cơ gây ung thư do phơi nhiễm AFB1, nguy cơ của FUB1 cũng xuất phát từ chế độ ăn uống chủ yếu là ngô của đồng bào H'Mong ở đây.



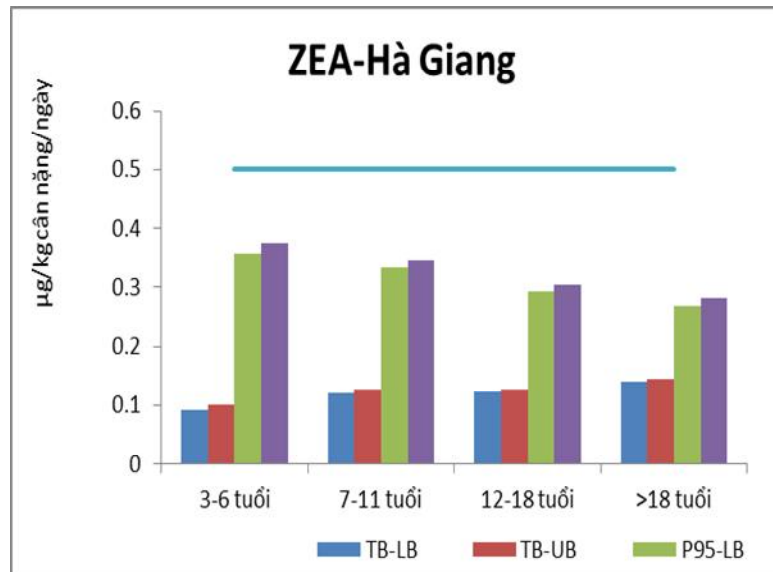
Hình 3.13. So sánh liều phơi nhiễm với PMTDI của FUB1 tại Hà Giang

3.3.3.3. Zearalenon

Nguy cơ của ZEA đến sức khỏe người sử dụng được đánh giá bằng cách so sánh liều phơi nhiễm với giá trị PMTDI của ZEA (0,5 µg/kg bw/ngày). Các kết quả được trình bày trong Hình 3.14 và Hình 3.15. Giá trị liều phơi nhiễm của miền Bắc cũng được tổng hợp từ 4 địa phương Hà Nội, Thanh Hóa, Bắc Giang và Thái Bình.



Hình 3.14. So sánh liều phơi nhiễm với PMTDI của ZEA tại một số địa phương và miền Bắc

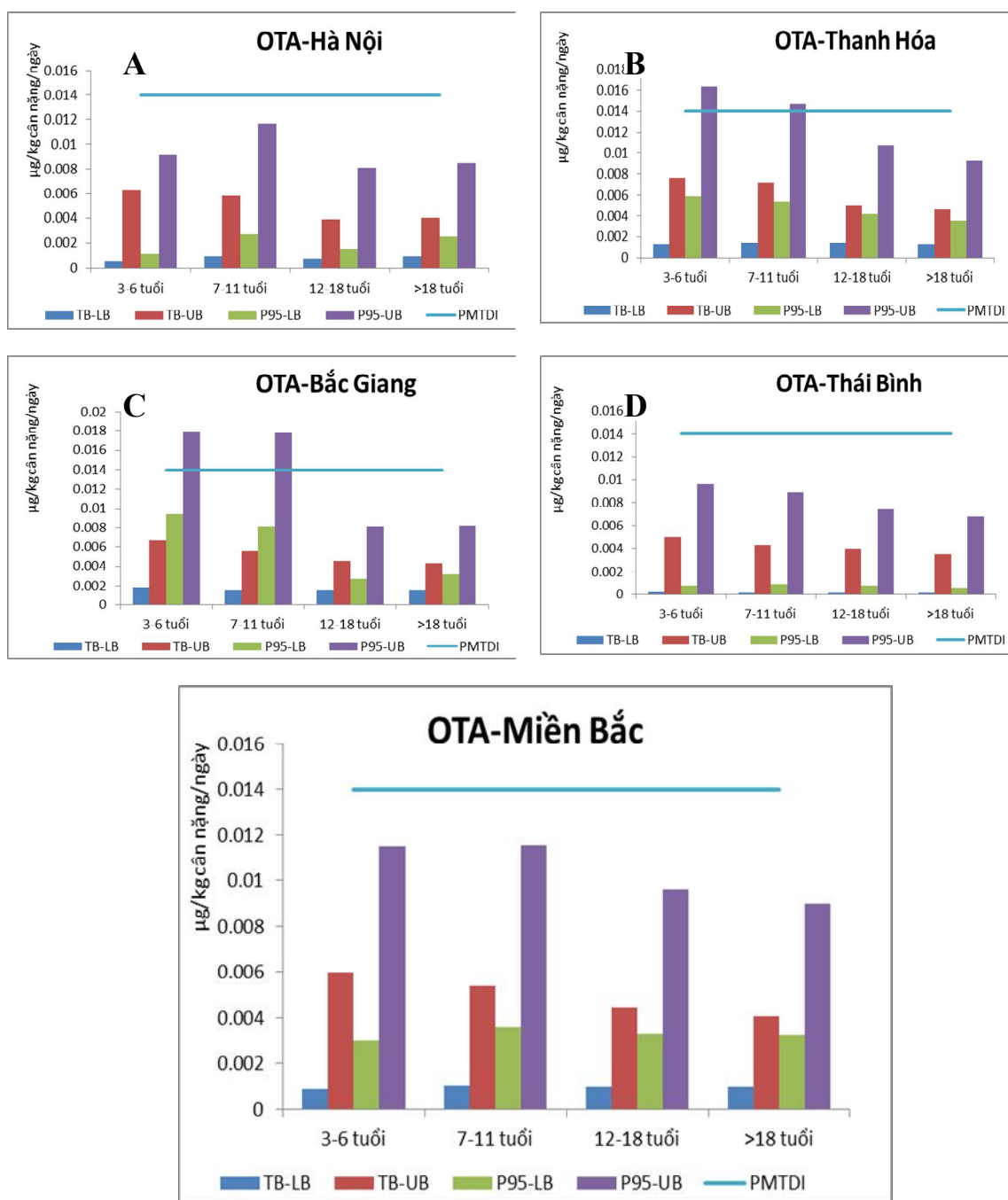


Hình 3.15. So sánh liều phơi nhiễm với PMTDI của ZEA tại Hà Giang

Các kết quả cho thấy, tại tất cả các địa phương nghiên cứu, nguy cơ do phơi nhiễm ZEA đối với tất cả các nhóm tuổi thấp hơn so với PMTDI. Nguy cơ cao nhất gặp phải ở Hà Giang và Thanh Hóa nhưng giá trị trung bình chỉ khoảng 20% so với PMTDI. Mức phân vị 95% tại Hà Giang cao nhất khoảng 70% so với PMTDI, gặp ở nhóm tuổi nhỏ từ 3-6 tuổi (Hình 3.15). Tính chung cho toàn miền Bắc, liều phơi nhiễm cao nhất chỉ khoảng 3% so với PMTDI. Kết quả này cho thấy nguy cơ thấp của độc tố vi nấm ZEA trong chế độ ăn.

3.3.3.4. *Ochratoxin A*

Nguy cơ của OTA đến sức khỏe người sử dụng được đánh giá bằng cách so sánh liều phơi nhiễm với giá trị PMTDI của OTA. Tuy nhiên chỉ có giá trị PMTWI của OTA là 0,1 µg/kg bw/tuần, do đó giá trị ước tính PMTDI của OTA từ PMTWI là 0,014 µg/kg bw/ngày được sử dụng để đánh giá nguy cơ. Các kết quả được trình bày trong hình 3.16. Giá trị liều phơi nhiễm của miền Bắc cũng được tổng hợp từ 4 địa phương Hà Nội, Thanh Hóa, Bắc Giang và Thái Bình. Giá trị tương tự của Hà Giang được trình bày trong Hình 3.17.

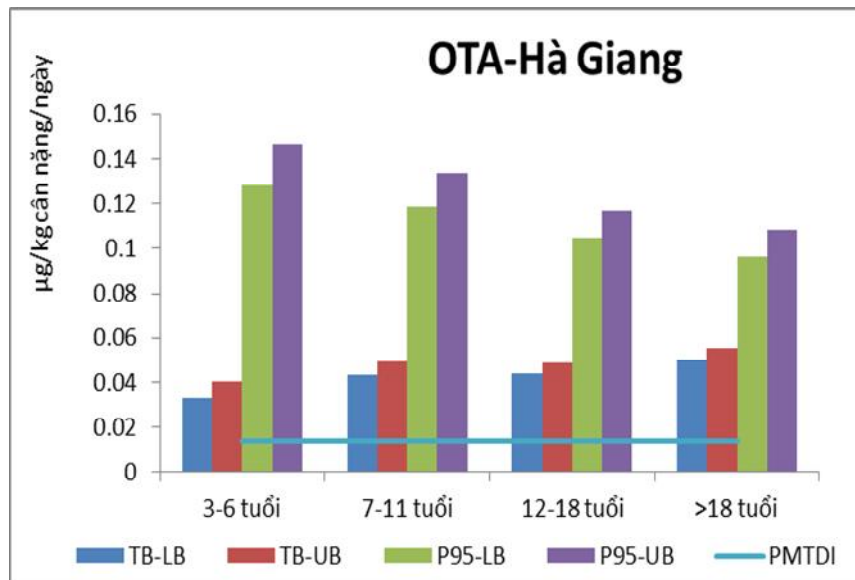


Hình 3.16. So sánh liều phơi nhiễm với PMTDI của OTA tại một số địa phương và miền Bắc

Các kết quả cho thấy mức phơi nhiễm OTA khá gần so với PMTDI tại tất cả các địa phương nghiên cứu. Tại Hà Giang, mức phơi nhiễm trung bình đã vượt PMTDI cho thấy nguy cơ cao của nhóm độc tố này tại đây. Trong tự nhiên, OTA thường được sinh ra bởi các loài nấm *Aspergillus* hay *Penicillium*

tương tự như AFB1, do đó kết quả này cũng tương đồng với kết quả về nguy cơ gây ung thư của AFB1 tại Hà Giang.

Tại Thanh Hóa và Bắc Giang, mặc dù mức phơi nhiễm trung bình chưa vượt quá PMTDI, tuy nhiên ở các nhóm tuổi nhỏ (nhóm từ 3 đến 6 tuổi và nhóm từ 7 đến 11 tuổi) mức phơi nhiễm phân vị 95% UB đã vượt quá PMTDI (tại Thanh Hóa vượt 103-114% và tại Bắc Giang vượt 125%) cho thấy có một bộ phận dân số các nhóm tuổi này có thể có nguy cơ đối với OTA trong chế độ ăn. Tại Hà Nội và Thái Bình, các giá trị phơi nhiễm trung bình và phân vị 95% đều thấp hơn so với PMTDI. Tính chung cho toàn miền Bắc, chưa thấy có nguy cơ đối với độc tố vi nấm OTA trong chế độ ăn. Giá trị trung bình cận trên của liều phơi nhiễm OTA ở mức khoảng 30-40% PMTDI.



Hình 3.17. So sánh liều phơi nhiễm với PMTDI của OTA tại Hà Giang

Tại Hà Giang, mức phơi nhiễm trung bình đã vượt PMTDI cho thấy nguy cơ cao của nhóm độc tố này tại đây (Hình 3.17). Trong tự nhiên, OTA thường được sinh ra bởi các loài nấm *Aspergillus* hay *Penicillium* tương tự như AFB1, do đó kết quả này cũng tương đồng với kết quả về nguy cơ gây ung thư của AFB1 tại Hà Giang.

Chương 4

BÀN LUẬN

4.1. VỀ KẾT QUẢ XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH ĐỒNG THỜI MỘT SỐ ĐỘC TỐ VI NẤM TRONG THỰC PHẨM

4.1.1. Về quy trình xử lý mẫu và xác định đồng thời độc tố vi nấm bằng LC-MS/MS

4.1.1.1. Về quy trình xử lý mẫu

❖ Về phương pháp xử lý mẫu:

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã khảo sát và lựa chọn được các điều kiện tối ưu của phương pháp xử lý mẫu theo QuEChERS áp dụng trên các nền mẫu ngũ cốc và hạt có dầu. Đây là lần đầu tiên ở Việt Nam, phương pháp QuEChERS được ứng dụng trong nghiên cứu phân tích đồng thời các độc tố vi nấm. Các kết quả cho thấy phương pháp có nhiều ưu điểm so với các phương pháp hiện nay đang được sử dụng để xác định từng độc tố vi nấm trong ngũ cốc và hạt có dầu. Đó là:

- Phương pháp có thể áp dụng để chiết đồng thời 7 độc tố vi nấm trên các loại nền mẫu ngũ cốc và hạt có dầu. Với số lượng mẫu khoảng gần 1000 mẫu, nếu sử dụng từng phương pháp riêng biệt để chiết từng loại độc tố vi nấm thì phải tiêu tốn nhiều chi phí cho các loại cột ái lực miễn nhiễm và dung môi, hóa chất. Bên cạnh đó thời gian cho xử lý mẫu và phân tích với số lượng mẫu trên cũng là một vấn đề khó khăn cần khắc phục.

- Các kết quả xác nhận giá trị sử dụng cho thấy, độ thu hồi của các độc tố vi nấm sử dụng trong nghiên cứu đạt từ 84-118% đáp ứng được các yêu cầu theo tiêu chuẩn châu Âu (EC 657/2002).

- Phương pháp xử lý mẫu được chọn sử dụng ít dung môi (15 mL acetonitril), không sử dụng các dung môi có tính độc hại cao. Đây là dung môi có thể hòa tan tốt các độc tố vi nấm do đó hiệu suất chiết được đảm bảo. Như vậy, một mặt vừa đảm bảo được hiệu suất chiết, mặt khác có thể làm giảm ảnh hưởng đến sức khỏe kiểm nghiệm viên, giảm các ảnh hưởng đến môi trường, tiết kiệm chi phí phân tích.

- Với việc sử dụng kỹ thuật làm sạch với chiết phân tán pha rắn (d-SPE), không cần thực hiện làm sạch bằng cột ái lực miễn nhiễm như quy định theo TCVN [15, 20, 21, 23], quy trình chiết nhanh, tổng thời gian xử lý một lô 6 mẫu chỉ chưa đến 30 phút mà vẫn đảm bảo được hiệu quả làm sạch mẫu cũng như độ chính xác của phương pháp.

❖ *Về lượng mẫu được lấy để xử lý và dung môi chiết sử dụng:*

Độc tố vi nấm phân bố trong mẫu thường không đều, phụ thuộc vào vị trí có sự phát triển của nấm. Do đó, lượng mẫu ban đầu cần phải đảm bảo đủ lớn để đảm bảo tính đồng nhất của độc tố vi nấm trong sản phẩm. Trong nghiên cứu này, lượng mẫu 1 kg đã được lấy và đồng nhất toàn bộ trước khi phân tích.

Phương pháp QuEChERS ban đầu được ứng dụng để xác định dư lượng hóa chất bảo vệ thực vật trong rau quả. Khi nghiên cứu phương pháp QuEChERS cho các độc tố vi nấm trên nền mẫu ngũ cốc và hạt có dầu, do nền mẫu có hàm lượng ẩm không cao, nên việc bổ sung thêm nước vào mẫu có ý nghĩa quan trọng để nâng cao hiệu suất chiết. Tỷ lệ pha nước và pha dung môi cần được duy trì khoảng 1:1 để đảm bảo hiệu suất chiết. Trong nghiên cứu này, 5 g mẫu được sử dụng sau đó bổ sung thêm 15 mL nước để thấm đều mẫu trước khi chiết bằng dung môi acetonitril.

Acetonitril là dung môi cho hiệu quả tốt nhất trong QuEChERS do có nhiều ưu điểm hơn một số dung môi khác như aceton và ethyl acetat. Thứ nhất, acetonitril có thể trộn lẫn với nước nhưng có thể tách lớp với nước khi thêm các muối. Thứ hai, acetonitril không kéo theo nhiều tạp chất như lipid hoặc protein, muối nên dịch chiết mẫu sạch hơn. Hơn nữa, acetonitril là dung môi phù hợp với cả sắc ký lỏng và sắc ký khí. Kết quả khảo sát cho thấy, nếu chỉ sử dụng acetonitril thì hiệu suất chiết đối với FUB1 và OTA không đạt yêu cầu (Bảng 3.4). Việc cho thêm acid làm giảm pH của mẫu, giúp ổn định các độc tố vi nấm nhạy với kiềm từ đó tăng được hiệu suất chiết. Nồng độ acid thêm vào dung môi chiết cũng dùng mức 1% tương tự như các phân tích khác bằng LC-MS/MS. Sự khác biệt giữa sử dụng acid formic và acid acetic là không nhiều, độ thu hồi với 7 độc tố vi nấm nghiên cứu đều đạt mức khoảng 70% trở lên, đáp ứng tốt quy định của châu Âu trong EC 401/2006. Mặt khác khi dùng acid

acetic, với một số độc tố như nhóm aflatoxin độ thu hồi có thể đạt 95-98%, do vậy acid acetic được chọn để xử lý mẫu.

So sánh với một số nghiên cứu đã được công bố, tùy thuộc vào từng nền mẫu và loại độc tố vi nấm, các tác giả thường sử dụng bổ sung thêm acid acetic hoặc acid formic với tỷ lệ từ 0,1 đến 5%. Kết quả của nghiên cứu này cũng phù hợp với một số nghiên cứu trước đây trên thế giới khi phân tích đồng thời nhiều loại độc tố vi nấm khác nhau, acid acetic được sử dụng với tỷ lệ khoảng 1% [40, 64, 126].

❖ *Về quá trình làm sạch mẫu:*

Chiết phân tán pha rắn (d-SPE) là bước làm sạch tạo nên hiệu quả của phương pháp QuEChERS. Trong đó, các chất hấp phụ như PSA, C18 đóng vai trò loại các tạp chất gây các ảnh hưởng không mong muốn khi phân tích mẫu. PSA là một chất hấp phụ trao đổi anion yếu trên nền silica dùng để hấp phụ các acid béo, acid hữu cơ. C18 là chất hấp phụ không phân cực, dùng để hấp phụ các chất béo, chất không phân cực. Với nền mẫu ngũ cốc và hạt có dầu, C18 cho thấy hiệu quả cao hơn so với PSA. Điều này cũng phù hợp với một số nghiên cứu về quy trình QuEChERS để xác định đồng thời các độc tố vi nấm trên thế giới [65, 87]. Lượng C18 được tối ưu là 100 mg với mỗi mililit dịch chiết cũng phù hợp để chiết đồng thời 7 độc tố vi nấm. Khi tăng lượng C18 hiệu quả làm sạch tốt hơn, tuy nhiên cũng có thể hấp phụ chất phân tích, đặc biệt như FUB1 là hợp chất có chuỗi C dài có thể bị C18 hấp phụ. Lượng C18 được sử dụng nhiều hơn so với Ferreira và cộng sự (sử dụng 50 mg với nền bắp rang) [65] nhưng thấp hơn so với Liu và cộng sự (sử dụng 150 mg với nền bơ lạc) [87].

Trong bước d-SPE, $MgSO_4$ khan có vai trò loại lượng nước còn dư trong dịch chiết acetonitril. Lượng $MgSO_4$ được sử dụng là 150 mg cho mỗi mililit dịch chiết. Theo nghiên cứu của Anastassiade [33], lượng nước có chứa trong dịch chiết acetonitril khoảng 8%. Nếu sử dụng 150 mg $MgSO_4$ khan, lượng nước trong dịch chiết cuối cùng khoảng 1-2%. Đây là tỷ lệ chấp nhận được và vẫn đảm bảo hiệu suất chiết.

Để đảm bảo khả năng hút nước, $MgSO_4$ được nung ở 450°C trong 2 giờ

và nghiền mịn rồi cho qua rây 20 mesh. $MgSO_4$ và C18 được cân và cho sẵn vào ống ly tâm lắc kỹ với 1 mililit dịch chiết trước khi ly tâm để thu dịch phân tích.

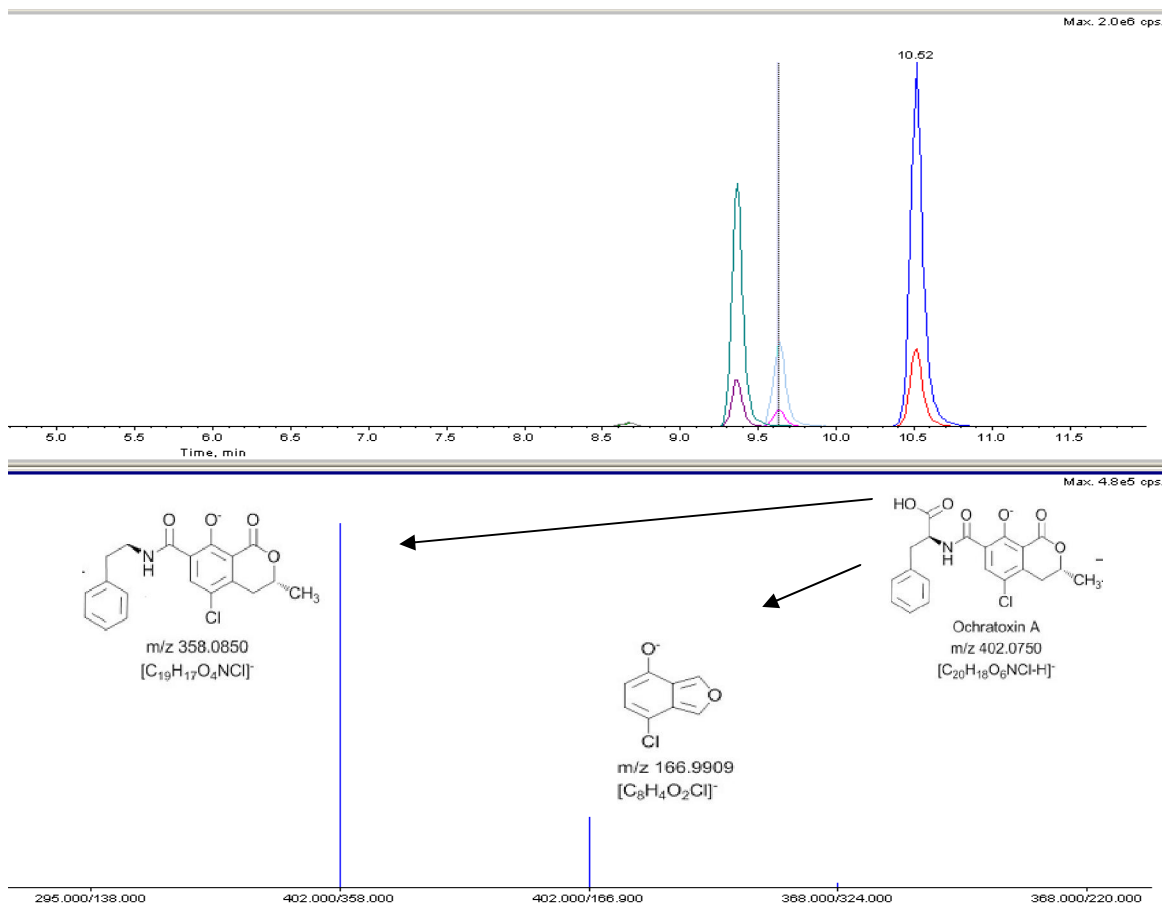
4.1.1.2. Về quy trình phân tích bằng LC-MS/MS

Các phương pháp phân tích độc tố vi nấm hiện nay theo TCVN hầu hết sử dụng HPLC với detector huỳnh quang. Tuy nhiên, sử dụng detector huỳnh quang chỉ có thể áp dụng để xác định 1 nhóm độc tố vi nấm trong một lần phân tích. Việc sử dụng LC-MS/MS kết hợp với phương pháp xử lý mẫu theo QuEChERS đáp ứng được yêu cầu xác định đồng thời các độc tố vi nấm, cũng như đáp ứng được độ nhạy theo yêu cầu.

Quá trình phân tích bằng LC-MS/MS gồm hai giai đoạn: tách bằng LC và xác định bằng MS/MS.

Trong nghiên cứu này, kỹ thuật sắc ký lỏng pha đảo đã được sử dụng với pha tĩnh là cột C18 và pha động là hỗn hợp methanol và amoni acetat 10 mM theo chế độ gradient. Đây là các điều kiện phân tích sắc ký lỏng rất cơ bản và có thể dễ dàng áp dụng. Chế độ gradient đã được nghiên cứu nhằm tách được các chất phân tích khỏi nền mẫu, đồng thời đưa điều kiện pha động về trạng thái ban đầu để phân tích các mẫu tiếp theo. Với các điều kiện này, một số độc tố vi nấm chưa tách khỏi nhau hoàn toàn. Tuy nhiên, việc sử dụng detector MS/MS có tính đặc hiệu rất cao đã giúp tách các độc tố vi nấm về tín hiệu.

Trong MS/MS, mỗi độc tố vi nấm khi được ion hoá, có thể tạo thành nhiều loại ion khác nhau tùy thuộc vào kỹ thuật ion hoá và chế độ ion dương hay âm. Phương pháp nghiên cứu sử dụng kỹ thuật ion hoá ESI, đồng thời cả 2 chế độ ion dương và ion âm. Với chế độ ESI(+), thông thường tạo được ion mẹ là $[M+H]^+$. Và với chế độ ESI(-), ion mẹ thu được là $[M-H]^-$. Mỗi ion mẹ khi đi qua tứ cực thứ hai lại được bắn phá để tạo thành các ion con, hai ion được lựa chọn là hai ion có cường độ cao nhất. Sự phân mảnh đại diện cho các độc tố vi nấm như của OTA ở điều kiện MS/MS được minh họa ở Hình 4.1.



*Hình 4.1. Sự phân mảnh của Ochratoxin A
(với 2 mảnh con m/z 358 và 167)*

Có thể nhận thấy, một ion mẹ có thể tạo ra nhiều ion con khác nhau. Tuy nhiên, 2 ion con và tỷ lệ của chúng là đủ để khẳng định sự có mặt của từng độc tố vi nấm trong mẫu nếu đáp ứng được yêu cầu hiện nay của châu Âu (EC 657/2002) [63].

Ngoài ra, thiết bị khối phổ 5500 QQQ của hãng SCIEX được sử dụng trong nghiên cứu có khả năng thực hiện đồng thời cả hai chế độ dương và âm trong cùng một lần phân tích. Đây là điểm thuận lợi nhằm tiết kiệm chi phí và thời gian phân tích mẫu.

4.1.2. Về kết quả thẩm định phương pháp

4.1.2.1. Tính đặc hiệu, chọn lọc

Kỹ thuật LC-MS/MS có tính đặc hiệu cao, sự có mặt của độc tố vi nấm nào được khẳng định chắc chắn thông qua sự có mặt của tối thiểu một ion mẹ và hai ion con. Theo quyết định 657/2002 của Châu Âu, tính đặc hiệu được

đánh giá thông qua số điểm nhận dạng (IP) và tỷ lệ của các ion xác nhận và ion định lượng [63].

Số điểm IP cần phải đạt là 4 điểm. Trong đó, mỗi ion mẹ được tính là 1 điểm, mỗi ion con được tính 1,5 điểm. Như vậy, theo các kết quả thu được số điểm IP có thể đạt được trong phương pháp này là từ 4-5 điểm, đáp ứng được yêu cầu đề ra.

Tỷ lệ các ion định tính và định lượng cũng được sử dụng để đánh giá tính đặc hiệu. Tỷ lệ ion trên mẫu thử so với tỷ lệ ion trên chuẩn (tỷ lệ ion trên chuẩn được giới thiệu ở bảng 3.7) đã được sử dụng trong đánh giá phương pháp theo phân mềm đi kèm thiết bị. Các kết quả được đánh giá và đáp ứng được các tiêu chí theo tiêu chuẩn châu Âu EC 657/2002 [63]. Do đó, tính đặc hiệu của phương pháp phân tích được đảm bảo tốt hơn.

So với các phương pháp hiện hành như HPLC-UV hoặc HPLC-FLD theo TCVN, kỹ thuật LC-MS/MS cho độ đặc hiệu tốt hơn. Các phương pháp HPLC thông thường chỉ dựa vào thời gian lưu để xác định chất phân tích, do đó nếu có mặt các hợp chất khác đồng rửa giải ở cùng khoảng thời gian lưu có thể gây sai số dương. Kỹ thuật LC-MS/MS sử dụng đồng thời các tiêu chí về thời gian lưu và mảnh khối (bao gồm ion mẹ và ion con, tỷ lệ các ion) do đó, đảm bảo được độ tin cậy của kết quả.

4.1.2.2. Ảnh hưởng nền

Trong sắc ký lỏng khối phổ, nền mẫu có ảnh hưởng nhiều đến kết quả phân tích đặc biệt là khi mẫu không được xử lý tốt. Quy trình QuEChERS có quá trình chiết đơn giản, không qua nhiều bước loại tạp nền nên khả năng bị ảnh hưởng bởi nền mẫu cao hơn các phương pháp xử lý mẫu đặc hiệu như chiết bằng cột ái lực miễn nhiễm.

Nhìn chung, ảnh hưởng nền của quy trình phân tích khá cao, tuy chỉ có ZEA trên nền lạc có ảnh hưởng nền vượt quá giới hạn $\pm 20\%$ nhưng ảnh hưởng nền của các độc tố vi nấm khác, đặc biệt trên nền lạc dao động từ 10-15% cho thấy phương pháp bị ảnh hưởng bởi nền mẫu, nhất là nền mẫu nhiều béo. Đường chuẩn trên nền mẫu tuy không loại bỏ về bản chất của ảnh hưởng nền, nhưng đã triệt tiêu được các ảnh hưởng nền. Đây là điều kiện cần thiết để đảm

bảo việc sự chính xác của kết quả. Qua khảo sát, đường chuẩn pha trên dịch chiết mẫu trắng đã giúp loại bỏ phần lớn ảnh hưởng nền. Trong nghiên cứu này, đường chuẩn được xây dựng trên từng nền: ngô, gạo, lạc, vừng bằng cách pha dãy chuẩn từ dịch chiết mẫu trắng tương ứng của các nền này.

4.1.2.3. Xây dựng đường chuẩn

Đường chuẩn của tất cả các độc tố vi nấm bao trùm được mức giới hạn tối đa của các độc tố vi nấm nghiên cứu. Trong nghiên cứu này, đối với các mẫu có nồng độ độc tố vi nấm trong mẫu sau xử lý cao hơn nồng độ tối đa của đường chuẩn sẽ được tiến hành pha loãng bằng dịch chiết mẫu trắng trước khi phân tích. Ảnh hưởng của nền mẫu được loại trừ bằng chuẩn bị đường chuẩn phân tích các độc tố vi nấm được chuẩn bị trên dịch chiết mẫu trắng theo quy trình xử lý mẫu.

4.1.2.4. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng

Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng thu được trong nghiên cứu này khá tương đồng với các kết quả của các nghiên cứu trên thế giới. Trong nghiên cứu này, tất cả các chất phân tích đều có thể định lượng được tại nồng độ thấp hơn mức tối đa cho phép của từng độc tố vi nấm.

Giới hạn phát hiện của phương pháp xây dựng được và một số phương pháp đã được công bố trên thế giới được so sánh ở Bảng 4.1.

Bảng 4.1. So sánh giới hạn phát hiện của phương pháp được xây dựng với một số nghiên cứu đã công bố

Phương pháp trong TLTK tương ứng	Nền mẫu	Giới hạn phát hiện ($\mu\text{g}/\text{kg}$)			
		AFB1	FUB1	OTA	ZEA
Phương pháp đề xuất	Ngũ cốc và hạt có dầu	0,1	25	0,5	0,5
Amirahmadi [32]	Bột ngô	0,6	-	0,6	16
Azaiez [39]	Quả khô	0,08	5,0	3,0	-
Beltran [40]	Ngô hạt	0,2	1,0	0,3	1,0
Bolechova [45]	Lúa mì và malt	0,3	3,0	1,5	3,0
Koesukwiwat [82]	Gạo	0,5	-	0,5	0,5
Sulyok [122]	Bột mì và ngô	8	16	3,5	0,5

So với một số nghiên cứu trên thế giới, giới hạn phát hiện của phương pháp xây dựng đối với AFB1 khá thấp, tương đương với nghiên cứu của Azaiez và cộng sự và tốt hơn các nghiên cứu khác. Giới hạn phát hiện của OTA và ZEA đều ở mức thấp hơn so với các nghiên cứu nêu trên. LOD đối với FUB1 theo phương pháp đề xuất cao hơn các phương pháp khác, lý do không phải là thiết bị không đạt được độ nhạy mà do mức giới hạn tối đa của FUB1 rất cao (1000 µg/kg đối với ngũ cốc), do đó không cần thiết phải hạ giới hạn phát hiện xuống quá thấp.

Giới hạn phát hiện có ý nghĩa quan trọng không chỉ để đánh giá về hàm lượng độc tố vi nấm trong thực phẩm, mà còn ảnh hưởng đến kết quả đánh giá nguy cơ. Các giá trị giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng được sử dụng để tính hàm lượng độc tố vi nấm trung bình trong từng sản phẩm (mức giới hạn trên – UB và mức giới hạn dưới – LB).

4.1.2.5. Độ lặp lại và độ thu hồi

Các kết quả về độ lặp lại và độ thu hồi trên các nền mẫu khác nhau, tại 3 nồng độ thấp, trung bình và cao cho thấy phương pháp có độ lặp lại tốt và độ thu hồi đáp ứng được yêu cầu. Kết quả này khá tương đồng so với các nghiên cứu trước đây. Bảng 4.2 so sánh độ lặp lại (thông qua RSD_r %) và độ thu hồi (R%) của phương pháp nghiên cứu so với một số nghiên cứu gần đây sử dụng cùng phương pháp LC-MS/MS và xử lý mẫu theo QuEChERS.

Bảng 4.2. So sánh độ lặp lại và độ thu hồi của phương pháp xây dựng với các nghiên cứu khác

Phương pháp trong TLTK tương ứng	Nền mẫu	Kết quả thu được	
		RSD_r (%)	R%
Phương pháp đề xuất	Ngũ cốc và hạt có dầu	1,5 - 13	84 - 114
Amirahmadi [53]	Bột ngô	3,7 - 20	93 - 104
Azaiez [58]	Quả khô	2,0 - 18	60 - 117
Beltran [59]	Ngô hạt	< 20	70 - 110
Bolechova [64]	Lúa mì và malt	2,0 - 17	79 - 110

<i>Phương pháp trong TLTK tương ứng</i>	<i>Nền mẫu</i>	<i>Kết quả thu được</i>	
		<i>RSD_r (%)</i>	<i>R%</i>
Koesukwiwat [82]	Gạo	< 7	62 - 104
Sulyok [122]	Bột mì và ngô	1,9 - 45	43 - 102
Yêu cầu (tại 10 µg/kg theo AOAC) [36]	-	≤ 21	60 - 115
Yêu cầu (tại 10 µg/kg theo EC) [36]	-	≤ 20	70 - 110
Yêu cầu (tại 1 µg/kg theo EC) [36]	-	≤ 30	50 - 120

Như vậy, phương pháp đề xuất có độ lặp lại và độ thu hồi khá tương đồng với các nghiên cứu xác định độc tố vi nấm bằng QuEChERS và LC-MS/MS; kết quả đạt được cũng đáp ứng được yêu cầu theo AOAC và EC. Phương pháp cũng đã được xây dựng và thẩm định cho phép phân tích đồng thời với cả 8 độc tố (có DON) nhưng thực tế lúa mì hầu như không trồng tại nước ta nên không tiến hành phân tích và điều tra đối với DON.

Như vậy, qua các nghiên cứu xây dựng và thẩm định phương pháp, luận án đã đóng góp một phương pháp phân tích mới áp dụng để phân tích đồng thời 7 độc tố vi nấm trong ngũ cốc và hạt có dầu. Phương pháp dựa trên kỹ thuật chiết QuEChERS và phân tích bằng LC-MS/MS có thể áp dụng để phân tích đồng thời nhiều độc tố vi nấm hơn so với các phương pháp thông thường hiện nay. Hơn nữa, phương pháp mới cũng có nhiều ưu điểm, đó là giảm thời gian xử lý mẫu và phân tích, quy trình đơn giản dễ thực hiện, giảm chi phí phân tích, ít ảnh hưởng đến môi trường và sức khoẻ của kiểm nghiệm viên mà vẫn đạt được độ chính xác theo yêu cầu.

4.2. VỀ KẾT QUẢ PHÂN TÍCH ĐỘC TỐ VI NẤM TRONG CÁC MẪU NGÔ, GẠO, LẠC, VÙNG TẠI MỘT SỐ TỈNH PHÍA BẮC VIỆT NAM

4.2.1. Về việc lấy mẫu phân tích độc tố

Mẫu thực phẩm được thu thập trong nghiên cứu là ngũ cốc (ngô, gạo) và hạt có dầu (lạc, vừng) được lấy ngẫu nhiên tại 5 tỉnh, thành phố ở miền Bắc đại diện cho vùng thành phố và lân cận (Hà Nội), đồng bằng (Thái Bình), đồng bằng có xen lẫn đồi núi (Bắc Giang, Thanh Hóa) và vùng cao dân tộc ít người (một số huyện của tỉnh Hà Giang) (Hình 4.2). Tại các tỉnh, mẫu được thu thập tại các chợ, cửa hàng ở 2 khu vực thành thị và nông thôn. Các mẫu được lấy đều có hình thức bên ngoài bình thường, không có dấu hiệu của nấm mốc. Lượng mẫu lấy tối thiểu là 1 kg, được đóng túi kín, mã hóa.



Hình 4.2. Bản đồ các khu vực lấy mẫu (dấu X trên bản đồ)

Số lượng mẫu được lấy từng tỉnh, thành phố đã đáp ứng được yêu cầu về cỡ mẫu theo lý thuyết. Ngoài việc lấy đủ số mẫu tối thiểu theo lý thuyết cho từng địa phương là 92 mẫu, việc lấy mẫu còn đảm bảo số mẫu cho mỗi loại

thực phẩm đạt tối thiểu 30 mẫu để đảm bảo tính đại diện. Kết quả số mẫu cho từng loại thực phẩm đã được lấy tại từng địa phương đều từ 40 mẫu trở lên. Do đó, số mẫu được lấy tại từng địa phương cho 4 loại thực phẩm nghiên cứu nằm trong khoảng 160 mẫu (Hà Nội) đến 254 mẫu (Hà Giang). Số mẫu lấy cho từng loại thực phẩm tại cả 5 địa phương nằm trong khoảng 219 mẫu (vùng) đến 287 mẫu (ngô). Riêng Hà Giang, do tỷ lệ người sử dụng ngô cao hơn so với các loại thực phẩm khác, ngô được lấy nhiều hơn (100 mẫu) và lấy tại các huyện khác nhau để có thể đánh giá đầy đủ hơn về hàm lượng độc tố vi nấm trong nhóm thực phẩm chủ yếu này.

Như vậy, số lượng mẫu đã được lấy vượt yêu cầu số mẫu cần có cho từng địa phương cũng như từng loại thực phẩm.

4.2.2. Về hàm lượng độc tố vi nấm và tỷ lệ bị nhiễm các độc tố

Kết quả phân tích các độc tố vi nấm trong các mẫu thu thập được cho thấy hàm lượng độc tố vi nấm có sự khác biệt đáng kể giữa các địa phương nghiên cứu và các nền mẫu. Bảng 4.3. và Bảng 4.4 là kết quả thống kê số mẫu bị nhiễm các loại độc tố theo địa phương và theo loại thực phẩm.

Bảng 4.3. Thống kê số mẫu bị nhiễm các độc tố theo từng địa phương

Địa phương	Số mẫu	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2	FUB1	OTA	ZEA
Bắc Giang	215	41	17	6	0	3	11	2
Hà Nội	160	31	12	4	0	4	6	2
Hà Giang	254	50	35	14	0	43	20	29
Thái Bình	175	35	14	2	0	3	6	3
Thanh Hóa	192	35	15	4	0	21	10	7
Cộng	996	192	93	30	0	74	53	43
<i>Tỷ lệ (%)</i>		<i>19,28</i>	<i>9,34</i>	<i>3,01</i>	<i>0,00</i>	<i>7,43</i>	<i>5,32</i>	<i>4,32</i>

Bảng 4.4. Thống kê số mẫu bị nhiễm các độc tố theo từng loại thực phẩm

Thực phẩm	Số mẫu	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2	FUB1	OTA	ZEA
Ngô	287	88	42	17	0	69	37	40
Gạo	238	25	10	0	0	3	0	1

Lạc	252	60	35	13	0	2	15	2
Vùng	219	19	6	0	0	0	1	0
Cộng	996	192	93	30	0	74	53	43
<i>Tỷ lệ (%)</i>		<i>19,28</i>	<i>9,34</i>	<i>3,01</i>	<i>0,00</i>	<i>7,43</i>	<i>5,32</i>	<i>4,32</i>

Bảng 4.5. là kết quả tổng hợp số mẫu và tỷ lệ mẫu bị nhiễm các độc tố vượt giới hạn tối đa cho phép.

Bảng 4.5. Tổng hợp số mẫu và tỷ lệ mẫu bị nhiễm các độc tố vượt giới hạn tối đa cho phép theo loại thực phẩm

<i>Thực phẩm</i>	<i>Tổng số mẫu</i>	<i>AFB1</i>		<i>FUB1</i>		<i>OTA</i>		<i>ZEA</i>	
		n	%	n	%	n	%	n	%
Ngô	287	60	20,91	5	1,74	28	9,76	0	0,0
Gạo	238	11	4,62	0	0,00	0	0,00	0	0,0
Lạc	252	34	13,49	0	0,00	6	2,38	0	0,0
Vùng	219	6	2,74	0	0,00	1	0,46	0	0,0

Kết quả cho thấy, đối với AFB1, số mẫu bị nhiễm độc tố là 192/996 mẫu (19,28%) với mẫu bị nhiễm có hàm lượng cao nhất là 1572,5 µg/kg. Số mẫu bị nhiễm AFB1 chiếm tỷ lệ cao nhất trong các mẫu ngô 30,66% (88/287 mẫu), tiếp theo là trong các mẫu lạc 23,81% (60/252 mẫu), tiếp đến là trong các mẫu gạo 10,50% (25/238 mẫu) và ít nhất là trong các mẫu vùng 8,68% (19/219 mẫu).

Số mẫu bị nhiễm AFB1 trong các mẫu ngô vượt giới hạn tối đa cho phép chiếm tỷ lệ cao nhất là ở Hà Giang và Thanh Hóa (26,53 - 27,00%). Tỷ lệ này với các mẫu lạc là ở Hà Giang và Bắc Giang (khoảng 15%). Đặc biệt, hàm lượng trung bình của AFB1 trong ngô tại Hà Giang là 139 µg/kg, trong khi giá trị này tại các tỉnh, thành phố khác chỉ dao động trong khoảng 8 - 25 µg/kg. Ngô cũng là loại thực phẩm có tỷ lệ nhiễm AFB1 vượt giới hạn cho phép chiếm đến 20,91% (60/287 mẫu). Tỷ lệ này ở Hà Giang là 27,00% (27/100

mẫu), tiếp theo địa phương có tỷ lệ này cao là Thanh Hóa 26,53% (13/49 mẫu). Loại thực phẩm tiếp theo có tỷ lệ nhiễm AFB1 vượt giới hạn cho phép là lạc, chiếm đến 13,49% (34/252 mẫu) và tỷ lệ này ở Hà Giang là 15,52%.

Đối với AFB2, số mẫu bị nhiễm độc tố là 93/996 mẫu (9,34%) với mẫu bị nhiễm có hàm lượng cao nhất là 155 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Còn với AFG1, số mẫu bị nhiễm độc tố là 30/996 mẫu (3,01%) với mẫu bị nhiễm có hàm lượng cao nhất là 92,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Không có mẫu nào bị nhiễm độc tố AFG2. Các aflatoxin này tuy không có giới hạn tối đa cho phép riêng nhưng góp phần làm tăng nguy cơ mẫu bị vượt quá giới hạn tối đa cho phép đối với AF tổng.

Đối với các độc tố còn lại, số mẫu bị nhiễm độc tố chiếm tỷ lệ không cao. Cụ thể với FUB1 là 74/996 mẫu (7,43%) với mẫu bị nhiễm có hàm lượng cao nhất là 1662 $\mu\text{g}/\text{kg}$; với OTA là 53/996 mẫu (5,32%) với mẫu bị nhiễm có hàm lượng cao nhất là 126 $\mu\text{g}/\text{kg}$; với ZEA là 43/996 mẫu (4,32%) với mẫu bị nhiễm có hàm lượng cao nhất là 220 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Theo loại thực phẩm, ngô vẫn là loại thực phẩm bị nhiễm các loại độc tố cao nhất, tiếp đến là lạc. Kết quả này tương đồng với một số nghiên cứu đã được công bố ở Việt Nam [3, 26], theo đó ngô và lạc là hai đối tượng có nguy cơ cao nhất nhiễm AF. Đối với các nhóm độc tố vi nấm khác, phần lớn các mẫu nhiễm đều từ ngô, với mức nhiễm cao nhất là FUB1 và thấp nhất là ZEA. Ngoài ngô, OTA còn được phát hiện trên các mẫu lạc. Điều này có thể giải thích là OTA được sản sinh bởi các loài nấm mốc *Aspergillus* và *Penicillium*, cũng là các loài sinh độc tố AF. Trong khi đó, FUB1 và ZEA chủ yếu được sinh ra bởi các loài nấm *Fusarium*, thường có mặt nhiều trong ngô và lúa mì.

Mặt khác, từ tập tục của người H'Mong tại Hà Giang và một số địa phương với thói quen tích trữ ngô dùng làm thực phẩm chính. Cách thu hoạch và bảo quản ngô, lạc ở các tỉnh vùng cao và đồng bào dân tộc ít người cũng khá khác biệt với các địa phương khác. Ngô có thể để nguyên trên nương trên cây ngô khô và lấy về khi cần dùng (Hình 4.3), khá dễ hơn là ngô được bảo quản thành đồng trên gác không có bao bì (Hình 4.4).



Hình 4.3. Ngô trên nương chờ thu hoạch.



Hình 4.4. Ngô được trữ trên gác nhà lấy dùng dần

Một cách khá phổ biến là ngô, lạc treo trước hiên nhà vừa được dùng để trang trí cho các nhà nghỉ kiểu “homestay”, vừa bảo quản dùng dần (Hình 4.5). Do đó, nguy cơ bị nhiễm các độc tố là rất cao trong điều kiện nóng ẩm và sương mù.



Hình 4.5. Ngô được dùng để trang trí các “homestay”

Khác với người dân ở vùng đồng bằng ngô chỉ dùng để “ăn vặt”, không như ở Hà Giang ngô lại là lương thực chính nên nhu cầu tích trữ là cần thiết. Tại các địa phương vùng cao điều kiện bảo quản cũng sơ sài hơn vùng đồng bằng. Hơn nữa, ngô không có vỏ như lúa và lạc nên nguy cơ bị nhiễm các độc tố cao hơn.

Kết quả phân tích độc tố trong các mẫu thu thập được từ các địa phương cho thấy:

- Aflatoxin là loại độc tố bị nhiễm nhiều nhất, AFB1 bị nhiễm với tỷ lệ cao nhất (19,28%) trong các loại độc tố nghiên cứu, tiếp đến là AFB2 với 9,34%.

- Ngô là loại thực phẩm dễ bị nhiễm các độc tố vi nấm nghiên cứu nhất, đặc biệt là AFB1, tiếp đến là lạc.

- Tỷ lệ thực phẩm bị nhiễm các độc tố và hàm lượng các độc tố tại các địa phương vùng cao và trung du cao hơn vùng đồng bằng và thành phố do điều kiện bảo quản lương thực, thực phẩm và tập tục của cư dân chưa thật phù hợp. Hà Giang là địa phương bị nhiễm nhiều nhất. Thanh Hóa và Bắc Giang cũng có tỷ lệ nhiễm khá cao nhưng tùy thuộc loại thực phẩm. Tỷ lệ bị nhiễm độc tố thấp hơn tại Hà Nội và Thái Bình.

- Tỷ lệ thực phẩm bị nhiễm các độc tố rất phụ thuộc vào quá trình bảo quản sau thu hoạch. Do vậy công tác tuyên truyền vận động người dân thực hiện các biện pháp bảo quản sau thu hoạch phù hợp để giảm bớt nguy cơ bị nhiễm các độc tố vi nấm là rất cần thiết.

4.3. VỀ KẾT QUẢ ĐÁNH GIÁ NGUY CƠ

4.3.1. Về lượng tiêu thụ thực phẩm

Lượng tiêu thụ của 4 loại thực phẩm ở các địa phương thu được qua điều tra kết hợp với lấy mẫu thực phẩm để phân tích độc tố.

Cân nặng trung bình của các nhóm tuổi khác nhau ở các địa phương cũng được tính toán. Lượng tiêu thụ thực phẩm trung bình được tính theo gam/người/ngày theo từng nhóm tuổi khác nhau. Riêng nhóm trên 18 tuổi còn được tính tách thêm theo giới tính vì người trưởng thành mức độ tiêu thụ thực phẩm có thể khác nhau đối với nam và nữ. Do mức độ tiêu thụ ít nên lạc và vừng được gộp lại để tính Bên cạnh giá trị tiêu thụ thực phẩm trung bình, giá trị phân vị 95% (P95) cũng được tính để phản ánh mức độ dao động của các kết quả và có sự khác biệt giữa các địa phương.



Hình 4.6. Hình ảnh điều tra tiêu thụ thực phẩm tại các địa phương

Kết quả thu được cho thấy lượng thực phẩm chủ yếu được sử dụng là gạo, tỷ lệ sử dụng ngô khá thấp và tỷ lệ sử dụng lạc và vừng không đáng kể.

Các giá trị thu được có sự tương đồng giữa các nhóm tuổi giữa các địa phương. Cỡ mẫu trong nghiên cứu được thiết kế là 60 hộ gia đình cho mỗi địa phương. Sự phân bố giữa các nhóm tuổi khác nhau có sự khác biệt. Điều này dẫn đến mức độ dao động của kết quả và giá trị P95 có thể được sử dụng để tính đến sự dao động này.

Mức độ tiêu thụ các nhóm thực phẩm khá tương đồng ở các địa phương. Riêng Hà Giang có sự khác biệt lượng tiêu thụ ngô cao hơn hẳn các địa phương khác có thể do tập tục của đồng bào H'Mong dùng ngô làm lương thực chủ

yếu. Do dùng nhiều ngô nên lượng gạo tiêu thụ hàng ngày có thấp hơn các địa phương khác. Có thể địa phương này khó khăn trong trồng lúa nên nguồn cung cấp thực phẩm không dồi dào như các địa phương khác, chủ yếu được cung cấp theo các chính sách hỗ trợ đồng bào vùng cao và dân tộc ít người. Tuy lượng ngô tiêu thụ gấp nhiều lần so với các địa phương khác nhưng lượng gạo giảm không nhiều. Sự khác biệt này có thể do năng lượng cung cấp từ khẩu phần ăn hàng ngày của người dân ở địa phương này chưa đáp ứng nên họ phải tăng tiêu thụ ngũ cốc. Mặt khác, gạo được cung cấp sau khi bảo quản dài ngày, chất lượng có thể bị giảm sút so với gạo vừa xay sát dùng ngay trong một thời gian ngắn tại các địa phương đồng bằng và thành phố hiện nay. Tỷ lệ tiêu thụ gạo và ngô cũng thay đổi theo lứa tuổi, có thể gạo được ưu tiên dùng cho các trẻ nhỏ, còn lứa tuổi từ 12 trở lên ngô được tiêu thụ nhiều hơn gạo.



Hình 4.7. Mèn mèn – món ăn hàng ngày chế biến từ bột ngô của người H'Mong tại Hà Giang

Do có sự khác biệt về lượng tiêu thụ thực phẩm trung bình nêu trên, kết hợp với hàm lượng và tỷ lệ mẫu bị nhiễm các độc tố vi nấm đã phân tích ở mục 4.2 nên trong nghiên cứu này Hà Giang được đánh giá riêng để so sánh với 4 địa phương khác. Để đảm bảo tính đại diện, các số liệu thu được từ Hà Giang không gộp vào các địa phương khác để đánh giá nguy cơ chung cho miền Bắc Việt Nam.

Các kết quả cho thấy lượng tiêu thụ thực phẩm trung bình (TTTP_{TB}) với nam trên 18 tuổi về ngũ cốc đều cao hơn so với nhóm nữ trên 18 tuổi. Tuy

nhiên, cân nặng trung bình (BW_{TB}) của nhóm nam trên 18 tuổi cũng cao hơn so với nhóm nữ trên 18 tuổi. Do đó, tỷ lệ $TTTP_{TB}/BW_{TB}$ không có sự khác biệt khi tính liều phơi nhiễm theo công thức (với $HL_{ĐTVN}$ là hàm lượng độc tố vi nấm):

$$LPN = \frac{HL_{ĐTVN} \times TTTP_{TB}}{BW_{TB}}$$

Khi xử lý thống kê liều phơi nhiễm trung bình của 2 nhóm này cho thấy sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê.

4.3.2. Về tính toán liều phơi nhiễm các độc tố vi nấm

❖ *Tính toán hàm lượng trung bình của độc tố vi nấm trong các mẫu*

Vì tổng số lượt mẫu bị nhiễm các độc tố vi nấm nghiên cứu là 485 lượt nên tỷ lệ mẫu phát hiện bị nhiễm độc tố vi nấm chiếm tỷ lệ không quá 48,69% (485/996 mẫu). Tỷ lệ này thấp hơn 50% tổng số mẫu, do đó hàm lượng độc tố vi nấm trong mẫu được xác định theo hướng dẫn của Cơ quan an toàn thực phẩm châu Âu: giới hạn dưới (LB) được tính bằng cách thay mẫu không phát hiện bởi giá trị "0" và thay mẫu phát hiện thấp hơn LOQ bởi LOD, còn giới hạn trên (UB) được xác định bằng cách thay mẫu không phát hiện bằng LOD và thay mẫu phát hiện thấp hơn LOQ bởi LOQ [61].

Số lượng mẫu có hàm lượng các độc tố trên LOQ cũng được xác định cho từng loại mẫu tại từng địa phương. Kết hợp với các giá trị LOD và LOQ của phương pháp xây dựng được và hàm lượng độc tố vi nấm có trong mẫu để xác định các giá trị giới hạn trên (UB) và giới hạn dưới (LB).

Kết quả thu được cho thấy tỷ lệ mẫu phát hiện có AFB1 (19,28%) cao hơn rất nhiều so với các loại độc tố vi nấm khác. Trong số đó có 30,66% mẫu ngô và 23,81% mẫu lạc có hàm lượng vượt LOQ. Cũng phát hiện thấy có AFB1 trong các mẫu gạo và vừng nhưng với tỷ lệ thấp hơn.

Về hàm lượng, các giá trị LB, UB tương ứng cao nhất tại Hà Giang, tiếp đến là Bắc Giang và Thanh Hóa, thấp nhất là Thái Bình và Hà Nội. Giá trị cao nhất được xác định trên mẫu ngô tại Hà Giang là 66,00 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (LB) và 66,10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (UB). Có 10,50% mẫu gạo bị nhiễm AFB1 nhưng giá trị LB và UB ở các địa phương đều thấp, cao nhất là tại Thanh Hóa (1,94 và 2,04 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Có

8,68% mẫu vùng có nhiễm AFB1, tỷ lệ nhiễm khá tương đồng giữa các địa phương. Đây là lần đầu tiên hàm lượng AFB1 trong các mẫu vùng ở Việt Nam được báo cáo, nhưng giá trị này tương đối thấp so với các loại thực phẩm khác, dao động từ 0,37 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (LB tại Hà Nội) đến 2,85 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (UB tại Thái Bình).

Đối với các độc tố vi nấm khác, có khoảng 24% mẫu ngô phát hiện bị nhiễm FUB1 tại 5 địa phương. Giá trị LB và UB của FUB1 trong ngô cao nhất tại Hà Giang (154,0 và 169,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$), tiếp đến là Thanh Hóa (127,0 và 129,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$), khá tương đồng tại Bắc Giang (24,7 và 48,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$) và Thái Bình (21,6 và 44,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$), thấp nhất là tại Hà Nội (12,8 và 35,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Tỷ lệ bị nhiễm FUB1 với các mẫu gạo và lạc thấp hơn nhiều ở các địa phương với các tỷ lệ bị nhiễm FUB1 tương ứng là khoảng 1,3% và 0,8%. Không có mẫu vùng nào bị phát hiện có nhiễm FUB1.

Tỷ lệ phát hiện có OTA trong mẫu ngô cũng cao hơn so với các đối tượng mẫu khác, khoảng 13% mẫu phát hiện có OTA. Giá trị LB và UB của OTA trong ngô cao nhất tại Hà Giang là 7,44 và 7,87 $\mu\text{g}/\text{kg}$ và cao hơn tại các địa phương còn lại. Tỷ lệ mẫu phát hiện có OTA trong lạc là khoảng 6% còn trong vùng chỉ gần 0,5%. Không có mẫu gạo nào bị nhiễm OTA.

Tỷ lệ phát hiện có ZEA trong mẫu ngô cao hơn so với các đối tượng mẫu khác với khoảng 14% mẫu. Giá trị LB và UB của ZEA trong ngô tại Thanh Hóa là 64,50 và 64,90 $\mu\text{g}/\text{kg}$ cao hơn giá trị tương ứng tại Hà Giang (20,90 và 21,30 $\mu\text{g}/\text{kg}$) và cao hơn hẳn các địa phương còn lại. Tỷ lệ mẫu phát hiện có ZEA trong lạc là gần 0,8% còn trong gạo chỉ gần 0,5%. Không có mẫu vùng nào bị nhiễm ZEA.

Mặc dù các mẫu được thu thập trong nghiên cứu này đều là mẫu có vẻ ngoài bình thường, không bị tổn thương nhưng sự có mặt của các độc tố vi nấm đặc biệt là AFB1 trong các mẫu cho thấy vẫn có nguy cơ người sử dụng phơi nhiễm với các độc tố vi nấm này.

❖ *Tính liều phơi nhiễm các độc tố vi nấm*

Dựa trên kết quả hàm lượng độc tố vi nấm trong thực phẩm và mức tiêu thụ thực phẩm đã xác định, liều phơi nhiễm với 4 loại độc tố AFB1, FUB1, OTA và ZEA đã được tính cho từng nhóm tuổi. Về mặt xu hướng chung, liều

phơi nhiễm độc tố vi nấm của các nhóm tuổi nhỏ cao hơn so với các nhóm tuổi cao. Tuy nhiên, tại các huyện vùng cao Hà Giang do ảnh hưởng của chế độ ăn người lớn có thành phần chính là ngô, liều phơi nhiễm các độc tố vi nấm cao nhất ở người lớn. Nhìn chung, liều phơi nhiễm tại Hà Giang cao hơn so với các địa phương còn lại. Liều phơi nhiễm các độc tố vi nấm sẽ được bàn luận cụ thể trong phần đánh giá nguy cơ các độc tố vi nấm.

4.3.3. Về kết quả đánh giá nguy cơ phơi nhiễm aflatoxin B1

Nguy cơ của AFB1 đối với sức khỏe người sử dụng được đánh giá thông qua nguy cơ tăng ung thư gan của cộng đồng (số lượng ca ung thư trên 100.000 dân mỗi năm). Nguy cơ gây ung thư gan của AFB1 đã được tính căn cứ trên liều phơi nhiễm, tiềm năng gây ung thư và hiệu chuẩn liều từ thực phẩm sống sang thực phẩm chế biến.

Giá trị tiềm năng trung bình được tính dựa trên tỷ lệ dân số Việt Nam nhiễm HBV và ước tính nguy cơ ung thư gan do AFB1 của nhóm dân số âm tính với HBV là 0,01 ca/năm trên 100.000 người và nhóm dân số dương tính với HBV là 0,3 ca/năm trên 100.000 người ứng với liều 1 ng AFB1/kg bw/ngày. Tỷ lệ nhiễm HBV ở Việt Nam [96] có thể lên tới 20% trong dân số nói chung và tỷ lệ lưu hành này được sử dụng để tính giá trị tiềm năng trung bình. Giá trị tiềm năng trung bình (ca ung thư/năm/100.000 người với liều 1 ng AFB1/kg bw/ngày) xác định được là 0,0068 (xem mục 2.3.3.2). Giá trị tiềm năng này nhân với liều phơi nhiễm để xác định nguy cơ gây ung thư (ca ung thư/năm/100.000 người).

Các kết quả thu được dễ dàng cho thấy nguy cơ gây ung thư gan cao nhất ở Hà Giang. Giá trị UB trung bình của các nhóm tuổi tại Hà Giang dao động từ khoảng 14 đến 21 ca ung thư/năm/100.000 dân; cao hơn nhiều lần so với các tỉnh còn lại. Tiếp theo, nguy cơ ung thư gan tại Thanh Hóa tuy thấp hơn Hà Giang, nhưng cũng cao hơn từ 2-5 lần so với các địa phương còn lại là Hà Nội, Thái Bình và Bắc Giang với giá trị UB dao động từ 0,64 đến 1,28 ca ung thư/năm/100.000 dân. Giá trị UB trung bình của nguy cơ gây ung thư tại Bắc Giang cao hơn tại Thái Bình và Hà Nội đối với tất cả các nhóm tuổi.

Về mặt xu hướng, tại 4 địa phương Thanh Hóa, Hà Nội, Thái Bình và

Bắc Giang, nguy cơ ung thư cao gặp phải ở nhóm tuổi nhỏ (3-6 tuổi) và giảm dần ở các nhóm tuổi cao hơn. Tuy nhiên, xu hướng này ngược lại ở Hà Giang khi nguy cơ ung thư ở người lớn (trên 18 tuổi) cao hơn các nhóm tuổi nhỏ. Điều này có thể được giải thích thông qua chế độ ăn của đồng bào H'Mong ở Hà Giang, với ngô là nguồn lương thực chính của người lớn, trong khi đối với trẻ em là gạo.

Có thể thấy về mặt số liệu, nguy cơ ung thư theo giới đối với nhóm tuổi trên 18 ở nữ cao hơn ở nam (trừ Thái Bình). Tuy nhiên, khi sử dụng kiểm định t-test để đánh giá sự khác biệt cho thấy sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê, với độ tin cậy 95%.

Các giá trị trung bình về nguy cơ gây ung thư tại 4 địa phương Thanh Hóa, Hà Nội, Thái Bình và Bắc Giang có sự khác biệt rõ rệt so với Hà Giang do thiết kế nghiên cứu tại Hà Giang tập trung vào nhóm đồng bào H'Mong vùng núi cao với tập tục tiêu thụ ngô là phổ biến. Để đảm bảo tính đại diện khi đánh giá nguy cơ ung thư của miền Bắc, số liệu của 4 tỉnh vùng đồng bằng và trung du được sử dụng cho đánh giá và đại diện cho miền Bắc.

Bảng 4.6 so sánh nguy cơ gây ung thư gan trên người lớn do AFB1 với một số nghiên cứu đã được công bố trên thế giới và Việt Nam.

Bảng 4.6. So sánh nguy cơ gây ung thư với một số quốc gia trên thế giới

Quốc gia	Loại thực phẩm	Nguy cơ ung thư trung bình (ca/100.000 dân/năm)		TLTK
		LB	UB	
Miền Bắc Việt Nam (kết quả nghiên cứu)	Ngô, gạo, lạc, vừng	0,48	0,50	-
Hà Giang (kết quả nghiên cứu)	Ngô, gạo, lạc, vừng	21,03	21,09	-
Lào Cai	Ngô và gạo	-	1,5	[74]
Mozambique	Ngô	-	79,4	[114]
Kenya	Ngô (chợ vùng quê)	-	29,2	[114]

<i>Quốc gia</i>	<i>Loại thực phẩm</i>	<i>Nguy cơ ung thư trung bình (ca/100.000 dân/năm)</i>		<i>TLTK</i>
		<i>LB</i>	<i>UB</i>	
Gambia	Ngô, gạo	-	Ngô: 0,3 Gạo: 1,1	[114]
New Zealand	Toàn bộ chế độ ăn	-	<0,1	[55]
Pháp	Toàn bộ chế độ ăn	-	0,011	[83,116]
Brazil	Lạc và các loại hạt	0,075	0,31	[34]
Trung Quốc	Lạc	0,003	0,17	[59]
Hồng Kông	Toàn bộ chế độ ăn	0,033	0,039	[51]
Nhật Bản	Gạo	-	0,021	[112]
Pakistan	Gạo	0,07	0,122	[88]
Indonesia	Ngô	-	1,228 (max)	[38]
Malaysia	Toàn bộ chế độ ăn	0,61	0,85	[53]
	Lạc	-	0,371 (max)	[38]
Phillipines	Lạc	-	0,045 (max)	[38]
Thái Lan	Gạo	-	0,011	[100]
	Ngô	-	0,071 (max)	[38]

Nguy cơ gây ung thư trung bình của các nhóm tuổi tại miền Bắc dao động từ 0,50 đến 0,76 ca ung thư/năm/100.000 dân. Giá trị này khá tương đồng với một kết quả nghiên cứu tại Malaysia [53], nhưng cao hơn so với nhiều nghiên cứu tại Nhật Bản [112], Thái Lan [56, 103], Hồng Kông [51] và nhiều nước phát triển ở châu Âu. Tuy nhiên, kết quả này thấp hơn so với nghiên cứu của Bùi Mai Hương và cộng sự trên chế độ ăn của một số vùng tại Lào Cai với nguy cơ gây ung thư của AFB1 trên người lớn và trẻ em tương ứng là 1,5 và 2,3 ca ung thư/năm/100.000 dân [74]. So với báo cáo kết quả nghiên cứu đánh giá nguy cơ AFB1 tại ASEAN, giá trị phân vị 95% tại miền Bắc Việt Nam dao động từ 1,12 đến 1,46 ca ung thư/năm/100.000 dân cao hơn so với giá trị tối đa

của nguy cơ ung thư do AFB1 tại Thái Lan (0,071 ca ung thư/năm/100.000 dân) nhưng tương đồng với Indonesia (1,228 ca ung thư/năm/100.000 dân) [38].

Nguy cơ gây ung thư trung bình tại Hà Giang cao hơn rất nhiều so với các quốc gia trên thế giới, nguy cơ cao bất thường này tương đương với nguy cơ tại một số quốc gia châu Phi [114].

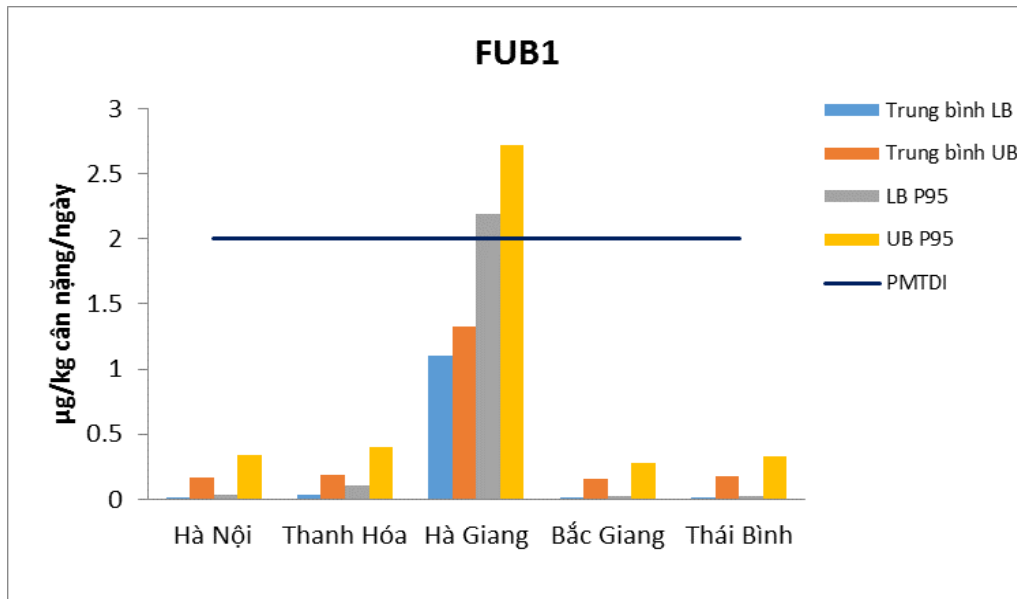
Hàm lượng aflatoxin B2 cũng có xuất hiện trong các mẫu được kiểm nghiệm. Tuy nhiên, nguy cơ phơi nhiễm aflatoxin B2 có thể được phản ánh thông qua nguy cơ phơi nhiễm aflatoxin B1, là chất nguy hiểm nhất trong nhóm. Do đó, trong nghiên cứu này, kết quả đánh giá nguy cơ đối với aflatoxin không được trình bày cụ thể.

4.3.4. Về kết quả đánh giá nguy cơ phơi nhiễm fumonisin B1

Nguy cơ của FUB1 đến sức khỏe người sử dụng được đánh giá bằng cách so sánh liều phơi nhiễm với giá trị PMTDI của FUB1 (2,0 µg/kg bw/ngày hay 2000 ng/kg bw/ngày). Kết quả so sánh liều phơi nhiễm của FUB1 giữa các địa phương nghiên cứu được tổng hợp ở Bảng 4.7 và Hình 4.8.

Bảng 4.7. Đánh giá liều phơi nhiễm FUB1 của người trưởng thành so với PMTDI

Địa phương	Trung bình LB		Trung bình UB		P95 LB		P95 UB	
	Giá trị (ng/kg bw/ngày)	% PMTDI	Giá trị (ng/kg bw/ngày)	% PMTDI	Giá trị (ng/kg bw/ngày)	% PMTDI	Giá trị (ng/kg bw/ngày)	% PMTDI
Hà Nội	12,3	0,6	168,2	8,4	34,3	1,7	336,2	16,8
Thanh Hóa	34,8	1,7	185,4	9,3	108,9	5,4	397,0	19,9
Hà Giang	1105,9	55,3	1325,0	66,2	2190,0	109,5	2719,9	136,0
Bắc Giang	12,4	0,6	154,4	7,7	25,6	1,3	280,4	14,0
Thái Bình	6,9	0,3	173,8	8,7	22,5	1,1	332,2	16,6



Hình 4.8. So sánh liều phơi nhiễm FUB1 giữa các địa phương nghiên cứu

Các kết quả cho thấy, liều phơi nhiễm của tất cả các nhóm tuổi nghiên cứu tại Hà Nội, Bắc Giang, Thái Bình và Thanh Hóa đều thấp hơn so với giá trị PMTDI. Riêng tại Hà Giang, liều phơi nhiễm trung bình cũng thấp hơn so với PMTDI, tuy nhiên liều phân vị 95% của các nhóm tuổi đều cao hơn so với PMTDI. Điều này cho thấy một bộ phận dân cư tại vùng cao của Hà Giang có nguy cơ do phơi nhiễm FUB1. Tương tự như nguy cơ gây ung thư do phơi nhiễm AFB1, nguy cơ của FUB1 cũng xuất phát từ chế độ ăn uống chủ yếu là ngô của đồng bào H'Mong ở đây.

Giá trị liều phơi nhiễm của miền Bắc được tổng hợp từ 4 địa phương Hà Nội, Thanh Hóa, Bắc Giang và Thái Bình cũng thấp hơn PMTDI với tất cả nhóm tuổi.

Kết quả so sánh với một số nghiên cứu đã được công bố về nguy cơ phơi nhiễm FUB1 được trình bày ở bảng 4.8.

Bảng 4.8. So sánh liều phơi nhiễm FUB1 với một số quốc gia trên thế giới

Quốc gia	Loại thực phẩm	Liều phơi nhiễm (ng/kg bw/ngày)		TLTK
		LB	UB	
Miền Bắc Việt Nam (kết quả nghiên cứu)	Ngô, gạo, lạc, vừng	34,8	185,4	-

<i>Quốc gia</i>	<i>Loại thực phẩm</i>	<i>Liều phơi nhiễm (ng/kg bw/ngày)</i>		<i>TLTK</i>
		<i>LB</i>	<i>UB</i>	
Hà Giang (kết quả nghiên cứu)	Ngô, gạo, lạc, vừng	1106	1325	-
Lào Cai	Ngô và gạo	-	536	[74]
Pháp	Bánh mì, đồ uống có cồn	7,45	29,1	[116]
Hồng Kông	Toàn bộ chế độ ăn	1,6	97,3	[51]
Nhật Bản	Toàn bộ chế độ ăn	0	0	[121]
Pakistan	Gạo	34,1	61,9	[88]
Hàn Quốc	Toàn bộ chế độ ăn	29,0	210	[92]

Có thể nhận thấy, liều phơi nhiễm tại miền Bắc theo nghiên cứu khá tương đồng với kết quả tại Hàn Quốc [92], nhưng cao hơn nhiều so với các kết quả tại các quốc gia khác. Kết quả này thấp hơn so với nghiên cứu của Bùi Mai Hương và cộng sự thực hiện tại Lào Cai công bố năm 2016 [74].

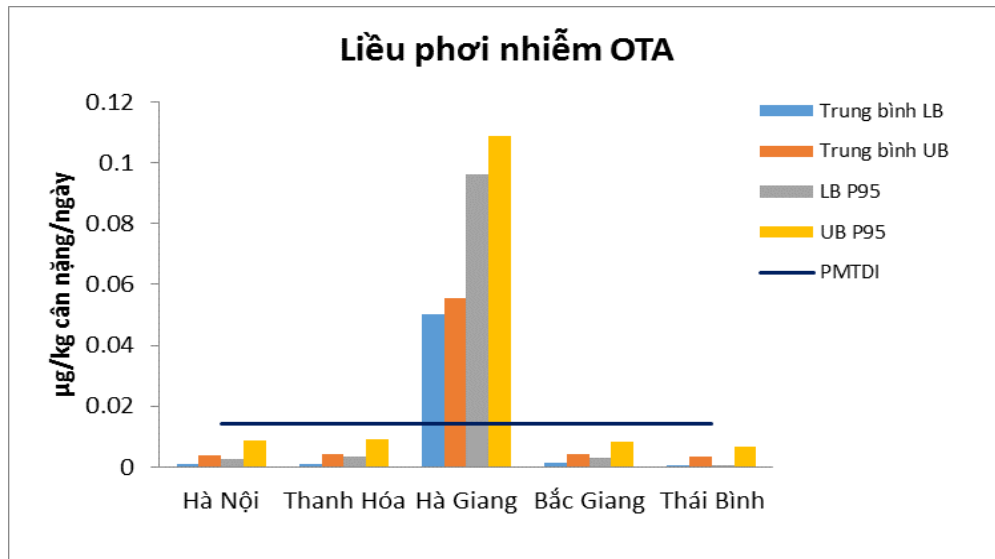
4.3.5. Về kết quả đánh giá nguy cơ phơi nhiễm ochratoxin A

Nguy cơ của OTA đến sức khỏe người sử dụng được đánh giá bằng cách so sánh liều phơi nhiễm với giá trị PMTDI của OTA. Tuy nhiên chỉ có giá trị PMTWI của OTA là 0,1 µg/kg bw/tuần, do đó giá trị ước tính PMTDI của OTA từ PMTWI là 14,3 ng/kg bw/ngày được sử dụng để đánh giá nguy cơ. Giá trị liều phơi nhiễm của miền Bắc cũng được tổng hợp từ 4 địa phương Hà Nội, Thanh Hóa, Bắc Giang và Thái Bình. Kết quả so sánh liều phơi nhiễm của FUB1 giữa các địa phương nghiên cứu được tổng hợp ở Bảng 4.9 và Hình 4.9.

Bảng 4.9. Đánh giá liều phơi nhiễm OTA của người trưởng thành so với PMTDI

Địa phương	Trung bình LB		Trung bình UB		P95 LB		P95 UB	
	Giá trị (ng/kg bw/ngày)	% PMTDI	Giá trị (ng/kg bw/ngày)	% PMTDI	Giá trị (ng/kg bw/ngày)	% PMTDI	Giá trị (ng/kg bw/ngày)	% PMTDI
Hà Nội	0,9	6,2	4,0	28,0	2,5	17,2	8,5	59,4
Thanh Hóa	1,0	7,2	4,1	28,4	3,2	22,5	9,0	63,2

Hà Giang	50,0	349,8	55,4	387,4	96,2	672,7	108,8	761,0
Bắc Giang	1,5	10,6	4,3	30,3	3,2	22,2	8,2	57,5
Thái Bình	0,2	1,3	3,5	24,6	0,6	4,2	6,8	47,3



Hình 4.9. So sánh liều phơi nhiễm OTA giữa các địa phương nghiên cứu

Các kết quả cho thấy mức phơi nhiễm OTA khá gần so với PMTDI tại tất cả các địa phương nghiên cứu. Tại Thanh Hóa và Bắc Giang, mặc dù mức phơi nhiễm trung bình chưa vượt quá PMTDI, tuy nhiên ở các nhóm tuổi nhỏ (nhóm từ 3 đến 6 tuổi và nhóm từ 7 đến 11 tuổi) mức phơi nhiễm phân vị 95% đã vượt quá PMTDI cho thấy có một bộ phận dân số các nhóm tuổi này có thể có nguy cơ đối với OTA trong chế độ ăn. Tại Hà Nội và Thái Bình, các giá trị phơi nhiễm trung bình và phân vị 95% đều thấp hơn so với PMTDI. Tính chung cho toàn miền Bắc, chưa thấy có nguy cơ đối với độc tố vi nấm OTA trong chế độ ăn. Giá trị trung bình cận trên của liều phơi nhiễm OTA ở mức khoảng 30-40% PMTDI.

Tại Hà Giang, mức phơi nhiễm trung bình đã vượt PMTDI cho thấy nguy cơ cao của nhóm độc tố này tại đây. Trong tự nhiên, OTA thường được sinh ra bởi các loài nấm *Aspergillus* hay *Penicillium* tương tự như AFB1, do đó kết quả này cũng tương đồng với kết quả về nguy cơ gây ung thư của AFB1 tại Hà Giang.

Kết quả so sánh với một số nghiên cứu đã được công bố về nguy cơ phơi nhiễm OTA được trình bày ở bảng 4.10.

Bảng 4.10. So sánh liều phơi nhiễm OTA với một số quốc gia trên thế giới

<i>Quốc gia</i>	<i>Loại thực phẩm</i>	<i>Liều phơi nhiễm (ng/kg bw/ngày)</i>		<i>TLTK</i>
		<i>LB</i>	<i>UB</i>	
Miền Bắc Việt Nam (kết quả nghiên cứu)	Ngô, gạo, lạc, vùng	1,0	4,1	-
Hà Giang (kết quả nghiên cứu)	Ngô, gạo, lạc, vùng	50,0	55,4	-
Bồ Đào Nha	Ngũ cốc	-	3,98	[60]
Hồng Kông	Toàn bộ chế độ ăn	0,19	0,77	[51]
Pháp	Bánh mì, đồ uống có cồn	0,28	1,92	[116]
New Zealand	Toàn bộ chế độ ăn	0,3	1,5	[56]
Trung Quốc	Ngũ cốc	-	4,62	[84]
Li băng	Toàn bộ chế độ ăn	-	4,28	[105]
Ai Len	Toàn bộ chế độ ăn	0,5	7,3	[67]
Hàn Quốc	Toàn bộ chế độ ăn	0,27	2,6	[92]
Pakistan	Gạo	1,17	1,93	[88]

Có thể thấy rằng, liều phơi nhiễm OTA tại miền Bắc khá tương đồng với nhiều nghiên cứu đã được công bố trên thế giới như tại Trung Quốc, Li băng, Bồ Đào Nha ... nhưng cao hơn kết quả tại Hồng Kông, Pháp, New Zealand. Kết quả tại Hà Giang cao hơn khác biệt so với các nghiên cứu trên thế giới.

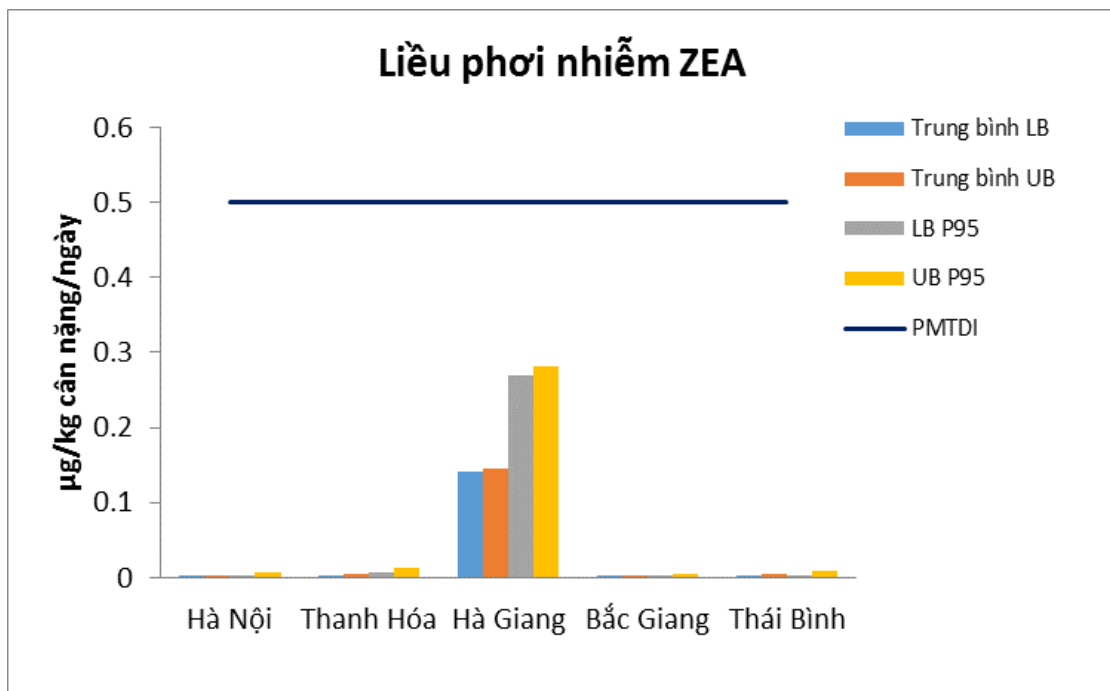
4.3.6. Về kết quả đánh giá nguy cơ phơi nhiễm zearalenon

Nguy cơ của ZEA đến sức khỏe người sử dụng được đánh giá bằng cách so sánh liều phơi nhiễm với giá trị PMTDI của ZEA (0,5 µg/kg bw/ngày hay 500 ng/kg bw/ngày). Giá trị liều phơi nhiễm của miền Bắc cũng được tổng hợp từ 4 địa phương là Hà Nội, Thanh Hóa, Bắc Giang và Thái Bình. Kết quả so sánh liều phơi nhiễm của FUB1 giữa các địa phương nghiên cứu được tổng hợp

ở Bảng 4.11 và Hình 4.10.

Bảng 4.11. Đánh giá liều phơi nhiễm ZEA của người trưởng thành so với PMTDI

Địa phương	Trung bình LB		Trung bình UB		P95 LB		P95 UB	
	Giá trị (ng/kg bw/ngày)	% PMTDI	Giá trị (ng/kg bw/ngày)	% PMTDI	Giá trị (ng/kg bw/ngày)	% PMTDI	Giá trị (ng/kg bw/ngày)	% PMTDI
Hà Nội	0,6	0,1	3,7	0,7	1,6	0,3	7,8	1,6
Thanh Hóa	2,2	0,4	5,2	1,0	6,5	1,3	12,4	2,5
Hà Giang	140,2	28,0	145,4	29,1	269,4	53,9	281,6	56,3
Bắc Giang	0,1	0,0	2,9	0,6	0,1	0,0	5,3	1,1
Thái Bình	1,1	0,2	4,5	0,9	3,7	0,7	9,9	2,0



Hình 4.10. So sánh liều phơi nhiễm ZEA giữa các địa phương nghiên cứu

Các kết quả cho thấy, tại tất cả các địa phương nghiên cứu, nguy cơ do phơi nhiễm ZEA đối với tất cả các nhóm tuổi thấp hơn so với PMTDI. Nguy cơ cao nhất gặp phải ở Hà Giang và Thanh Hóa nhưng giá trị trung bình chỉ khoảng 20% so với PMTDI. Mức phân vị 95% tại Hà Giang cao nhất khoảng

70% so với PMTDI, gặp ở nhóm tuổi nhỏ từ 3-6 tuổi. Tính chung cho toàn miền Bắc, liều phơi nhiễm cao nhất chỉ khoảng 3% so với PMTDI. Kết quả này cho thấy nguy cơ thấp của độc tố vi nấm ZEA trong chế độ ăn.

Kết quả so sánh với một số nghiên cứu đã được công bố về nguy cơ phơi nhiễm ZEA được trình bày ở bảng 4.12.

Bảng 4.12. So sánh liều phơi nhiễm ZEA với một số quốc gia trên thế giới

<i>Quốc gia</i>	<i>Loại thực phẩm</i>	<i>Liều phơi nhiễm (ng/kg bw/ngày)</i>		<i>TLTK</i>
		<i>LB</i>	<i>UB</i>	
Miền Bắc Việt Nam (kết quả nghiên cứu)	Ngô, gạo, lạc, vùng	2,2	5,2	-
Hà Giang (kết quả nghiên cứu)	Ngô, gạo, lạc, vùng	140,2	145,4	-
Hà Lan	Toàn bộ chế độ ăn	0,05	0,50	[89]
Hồng Kông	Toàn bộ chế độ ăn	6,1	101,5	[51]
Pháp	Bánh mì, đồ uống có cồn	5,9	25,5	[116]
Trung Quốc	Ngũ cốc	-	155	[84]
Hàn Quốc	Toàn bộ chế độ ăn	4,4	17,0	[92]
Pakistan	Gạo	17,2	26,7	[88]

Liều phơi nhiễm ZEA tại miền Bắc chỉ cao hơn kết quả nghiên cứu tại Hà Lan, còn lại đều thấp hơn so với các kết quả đã được công bố trên thế giới. Điều này cho thấy nguy cơ thấp của loại độc tố vi nấm này. Kết quả tại Hà Giang tuy cao hơn nhưng vẫn thấp hơn PMTDI của ZEA.

Nhìn chung, kết quả đánh giá về liều phơi nhiễm của các độc tố vi nấm FUB1, OTA và ZEA tại miền Bắc đều thấp và không có sự khác biệt nhiều so với một số nghiên cứu tại các quốc gia châu Á. Sự khác biệt được thể hiện rõ

rệt tại Hà Giang và chủ yếu là OTA xuất phát từ tập quán sử dụng ngô làm thực phẩm chính và thói quen bảo quản thực phẩm không đúng cách.

Các kết quả đánh giá nguy cơ phơi nhiễm các độc tố vi nấm AFB1, FUB1, OTA và ZEA trong chế độ ăn từ các sản phẩm ngô, gạo, lạc, vừng tại 5 địa phương cho thấy:

- AFB1 có thể gây ra từ 0,50-0,76 ca ung thư gan/100.000 dân/năm tại các tỉnh miền Bắc nước ta và khoảng 21 ca ung thư gan/100.000 dân/năm tại một số điểm vùng cao Hà Giang. Nhóm 3-11 tuổi có nguy cơ cao hơn các lứa tuổi khác, không có sự khác biệt theo giới tính với nhóm người trưởng thành (trên 18 tuổi).
- Liều phơi nhiễm trung bình của FUB1 thấp hơn so với mức PMTDI tại tất cả các địa phương nghiên cứu. Tuy nhiên tại Hà Giang liều phơi nhiễm phân vị 95% cao hơn mức PMTDI, cho thấy một bộ phận dân cư tại vùng cao Hà Giang có nguy cơ đối với FUB1.
- Liều phơi nhiễm trung bình của OTA tại 4 địa phương Hà Nội, Bắc Giang, Thanh Hóa, Thái Bình thấp hơn mức PMTWI, nhưng tại Hà Giang cao hơn PMTWI. Mức phân vị 95% của nhóm tuổi nhỏ (3-11 tuổi) tại Thanh Hóa và Bắc Giang cao hơn PMTWI cho thấy một bộ phận dân cư tại hai tỉnh này có nguy cơ đối với OTA.
- Liều phơi nhiễm trung bình và tối đa của ZEA tại tất cả các địa phương nghiên cứu đều thấp hơn PMTDI của nó cho thấy nguy cơ thấp của độc tố này tại miền Bắc Việt Nam.

4.4. CÁC ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

Qua quá trình thu thập các mẫu thực phẩm tại 5 địa phương đại diện cho các vùng khác nhau ở miền Bắc Việt Nam, phân tích các độc tố trong các mẫu thu được kết hợp với điều tra mức tiêu thụ thực phẩm để đánh giá nguy cơ phơi nhiễm các độc tố vi nấm nghiên cứu, luận án đã có một số đóng góp sau:

- ① Lần đầu tiên phương pháp QuEChERS được ứng dụng để xử lý mẫu trong phân tích các ĐTVN tại Việt Nam.
- ② Đã xây dựng được phương pháp phân tích đồng thời 7 ĐTVN bằng LC-MS/MS đạt tiêu chuẩn châu Âu EC 657/2002 và EC 401/2006.

- ③ Đã thu thập và phân tích đồng thời 7 ĐTVN trong 996 mẫu ngũ cốc và hạt có dầu lấy tại 5 địa phương thuộc phía Bắc Việt Nam.
- ④ Đã điều tra mức tiêu thụ thực phẩm và xác định được liều phơi nhiễm các ĐTVN nghiên cứu tại 5 địa phương lấy mẫu.
- ⑤ Đã đánh giá nguy cơ của 4 ĐTVN là AFB1, FUB1, OTA và ZEA tại các địa phương nghiên cứu và phía Bắc Việt Nam.
- ⑥ Đã phân tích và đề xuất một số giải pháp hạn chế nguy cơ phơi nhiễm các ĐTVN ở các địa phương phía Bắc Việt Nam.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

Luận án đã hoàn thành các mục tiêu đề ra và thu được các kết quả như sau:

1. Đã nghiên cứu xây dựng và thẩm định phương pháp xác định đồng thời 7 độc tố vi nấm là các AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, FUB1, OTA và ZEA bằng LC-MS/MS kết hợp với xử lý mẫu theo QuEChERS và đạt các tiêu chuẩn của châu Âu theo EC 657/2002 và EC 401/2006.

- Đã xác định được các điều kiện LC-MS/MS phù hợp để phân tích đồng thời 7 ĐTVN. Các ĐTVN được tách bằng sắc ký lỏng pha đảo với pha tĩnh C18 theo gradient pha động; phát hiện và định lượng bằng MS/MS với nguồn ion hoá ESI, chế độ ion dương và ion âm đồng thời, mỗi chất phân tích được lựa chọn một ion mẹ để tiếp tục phân mảnh tạo ra hai ion con đặc trưng.

- Đã khảo sát được điều kiện chiết ĐTVN trong các nền mẫu ngũ cốc và hạt có dầu theo nguyên lý của phương pháp chiết QuEChERS. Acid acetic được thêm vào acetonitril với tỷ lệ 1% để tăng hiệu suất chiết. C18 được sử dụng cùng với MgSO₄ trong bước d-SPE để tăng khả năng làm sạch mẫu. Lượng chất hấp phụ phù hợp của C18 là 100 mg cho mỗi mililit dịch chiết.

- Đã thẩm định phương pháp cho thấy phương pháp có tính đặc hiệu cao, có khả năng định lượng các ĐTVN tại nồng độ thấp hơn giới hạn tối đa cho phép; có độ chính xác đạt yêu cầu với độ lặp lại từ 1,5-13% và độ thu hồi từ 84-114% đáp ứng được các yêu cầu theo tiêu chuẩn châu Âu.

2. Đã áp dụng phương pháp để xác định hàm lượng các độc tố vi nấm trong 996 mẫu gạo, ngô, lạc và vừng được thu thập từ 5 tỉnh, thành phố phía Bắc Việt Nam. Kết quả xác định tỷ lệ nhiễm và hàm lượng các độc tố vi nấm trong các mẫu thu thập được cho thấy:

- Aflatoxin là nhóm độc tố bị nhiễm nhiều nhất, trong đó chủ yếu là AFB1 và AFB2.

- Ngô và lạc là 2 nhóm sản phẩm có tỉ lệ phát hiện độc tố vi nấm và hàm lượng độc tố vi nấm cao nhất.

- Hà Giang là địa phương có tỉ lệ nhiễm và hàm lượng độc tố vi nấm cao nhất.

3. Đã đánh giá nguy cơ phơi nhiễm các độc tố vi nấm AFB1, FUB1, OTA và ZEA trong chế độ ăn từ các sản phẩm ngô, gạo, lạc, vừng tại 5 địa phương cho thấy:

- AFB1 có thể gây ra từ 0,50-0,76 ca ung thư gan/100.000 dân/năm tại các tỉnh miền Bắc nước ta và khoảng 21 ca ung thư gan/100.000 dân/năm tại một số địa điểm vùng cao Hà Giang có lịch sử ngộ độc thực phẩm liên quan đến độc tố vi nấm.

- Liều phơi nhiễm trung bình của FUB1 thấp hơn so với mức PMTDI tại tất cả các địa phương nghiên cứu, tuy nhiên tại Hà Giang liều phơi nhiễm phân vị 95% cao hơn mức PMTDI, cho thấy một bộ phận dân cư tại vùng cao Hà Giang có nguy cơ đối với FUB1.

- Tại Hà Giang, liều phơi nhiễm trung bình OTA cao hơn PMTWI cho thấy có nguy cơ đối với sức khỏe. Tại 4 địa phương còn lại, liều phơi nhiễm OTA thấp hơn mức PMTWI, do đó không có nguy cơ đối với OTA tại các địa phương này. Riêng tại Thanh Hóa và Bắc Giang, mức phân vị 95% của nhóm tuổi nhỏ (3-11 tuổi) vượt quá PMTWI từ 103-125% ,cho thấy một bộ phận trẻ em tại hai tỉnh này có nguy cơ đối với OTA.

- Liều phơi nhiễm trung bình và tối đa của ZEA tại tất cả các địa phương nghiên cứu đều thấp hơn PMTDI tương ứng cho thấy không có nguy cơ của độc tố này tại miền Bắc Việt Nam.

KIẾN NGHỊ

- Tăng cường tuyên truyền cho người dân tại các tỉnh vùng cao Hà Giang cải thiện thói quen tích trữ lương thực, đặc biệt là ngô trong thời gian dài và dần dần chuyển sang sử dụng lương thực chính từ gạo.

- Có biện pháp tuyên truyền thích hợp với bảo quản ngô và lạc là 2 loại thực phẩm có nguy cơ bị nhiễm độc tố vi nấm cao không chỉ ở vùng cao mà cả ở vùng trung du và đồng bằng.
- Tích cực vận động người dân triển khai các biện pháp bảo quản sản phẩm sau thu hoạch để hạn chế bị nhiễm độc tố vi nấm, đặc biệt không để sản phẩm nông nghiệp “giải nắng dầm mưa” trên nương rẫy hoặc hiên nhà.
- Các kết quả đánh giá nguy cơ cho thấy chưa cần thiết phải sửa đổi các quy định pháp luật liên quan đến giới hạn tối đa của các độc tố vi nấm trong thực phẩm.
- Đối với vùng cao Hà Giang, tiếp tục giám sát chặt chẽ việc thực hiện các biện pháp đảm bảo an toàn thực phẩm tránh xảy ra các vụ ngộ độc cấp tính gây tử vong.

CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Đỗ Hữu Tuấn, Trần Cao Sơn, Lê Thị Hồng Hảo, Thái Nguyễn Hùng Thu (2016), "Xây dựng phương pháp phân tích hàm lượng đa độc tố vi nấm trong thực phẩm", *Tạp chí Dược học*, 479, 69-74.
2. Đỗ Hữu Tuấn, Thái Nguyễn Hùng Thu, Trần Cao Sơn, Lê Thị Hồng Hảo (2017), "Xác nhận hiệu lực của phương pháp xác định đồng thời một số độc tố vi nấm trong thực phẩm theo quy định châu Âu", *Tạp chí Dược học*, 496, 63-66.
3. Đỗ Hữu Tuấn, Trần Cao Sơn, Lê Thị Hồng Hảo, Thái Nguyễn Hùng Thu (2019), "Hàm lượng độc tố vi nấm trong ngũ cốc và hạt có dầu ở một số tỉnh, thành phố phía Bắc Việt Nam", *Tạp chí Dược học*, 518, 37-42.
4. Đỗ Hữu Tuấn, Trần Cao Sơn, Lê Thị Hồng Hảo, Lê Danh Tuyên, Thái Nguyễn Hùng Thu (2019), "Đánh giá nguy cơ độc tố vi nấm aflatoxin B1, ochratoxin A, fumonisin B1 và zearalenon trong thực phẩm tại Bắc Giang và Thái Bình", *Tạp chí Dược học*, 521, 41-47.
5. Đỗ Hữu Tuấn, Trần Cao Sơn, Vũ Tùng Lâm, Thái Nguyễn Hùng Thu (2019), "Đánh giá nguy cơ độc tố vi nấm aflatoxin B1, ochratoxin A, fumonisin B1 và zearalenon trong thực phẩm tại tỉnh Hà Giang", *Tạp chí Dược học*, 523, 54-60.
6. Tuan Huu Do, Son Cao Tran, Chi Dinh Le, Ha-Binh Thi Nguyen, Phuong-Thao Thi Le, Hong-Hao Thi Le, Tuyen Danh Le, Hung-Thu Thai-Nguyen (2020), "Dietary exposure and health risk characterization of aflatoxin B1, ochratoxin A, fumonisin B1, and zearalenone in food from different provinces in Northern Vietnam", *Food Control*, 112, 107108.
(<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107108>).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu tiếng Việt

1. Bộ Y tế (2011), *Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia đối với giới hạn ô nhiễm độc tố vi nấm trong thực phẩm (QCVN 8-1: 2011/BYT)*, Bộ Y tế, Hà Nội.
2. Cục An toàn thực phẩm (2019), *Cơ sở dữ liệu ngộ độc thực phẩm*, Cục An toàn thực phẩm.
3. Lê Văn Giang, Phan Thị Kim (2011), “Đánh giá ô nhiễm Aflatoxin trong lạc, ngô và thử nghiệm áp dụng biện pháp phòng trừ cho sản phẩm chế biến toạ 3 xã huyện Tân Kỳ tỉnh Nghệ An”, *Tạp chí Y học dự phòng*, Số 767 (6), 1–7.
4. Lê Văn Giang, Phan Thị Kim (2011), “Đánh giá tình trạng ô nhiễm độc tố vi nấm ochratoxin A trong ngô tại xã Cán Tỷ và xã Lùng Tám, huyện Quán Bạ, tỉnh Hà Giang”, *Tạp chí Y học dự phòng*, 767 (4), 1–8.
5. Bùi Thị Thanh Hà (2003), *Góp phần nghiên cứu sự có mặt của Aflatoxin B1 và vai trò của nó trong ung thư gan nguyên phát*, Luận án Tiến sĩ Y học, Trường Đại học Y Hà Nội.
6. Bùi Thị Mai Hương, Lê Danh Tuyên (2012), “Ô nhiễm độc tố vi nấm trong ngũ cốc: Nguy cơ về sức khỏe của người dân tỉnh Lào Cai”, *Tạp chí Y học dự phòng*, XXII.(2), 33–38.
7. Lê Hoàng Ninh (2011), *Phương pháp chọn mẫu và xác định cỡ mẫu trong nghiên cứu y học*, Viện Y tế công cộng thành phố Hồ Chí Minh.
8. Quốc hội 12 (2010), *Luật an toàn thực phẩm số 55/2010/QH12*, Quốc hội nước Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam.
9. TCVN 7407:2004 (2004), *Ngũ cốc, đậu đỗ và hạt có dầu – Xác định aflatoxin bằng phương pháp sử dụng cột ái lực miễn dịch*, Bộ Khoa học và Công nghệ.
10. TCVN 7595-1:2007 (2007), *Thực phẩm - xác định ocratoxin A trong ngũ cốc và sản phẩm ngũ cốc - Phần 1: Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao làm sạch bằng silica gel*, Bộ Khoa học và Công nghệ.

11. TCVN 7595-2:2007 (2007), *Thực phẩm - xác định ocratoxin A trong ngũ cốc và sản phẩm ngũ cốc - Phần 2: Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao làm sạch bằng bicacbonat*, Bộ Khoa học và Công nghệ.
12. TCVN 7596:2007 (2007), *Thực phẩm - xác định Aflatoxin B1, và hàm lượng tổng số Aflatoxin B1, B2, G1 và G2 trong ngũ cốc, các loại hạt và các sản phẩm của chúng - phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao*, Bộ Khoa học và Công nghệ.
13. TCVN 7930:2008 (2008), *Thực phẩm - Xác định aflatoxin B1 và tổng aflatoxin B1, B2, G1 và G2 trong ngũ cốc, quả có vỏ và sản phẩm của chúng - Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao có dẫn suất sau cột và làm sạch bằng cột ái lực miễn dịch*, Bộ Khoa học và Công nghệ.
14. TCVN 8162:2009 (2009), *Thực phẩm - Xác định fumonisin B1 và B2 trong ngô - Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao có làm sạch bằng chiết pha rắn*, Bộ Khoa học và Công nghệ.
15. TCVN 8350:2010 (2010), *Thủy sản và sản phẩm thủy sản - Xác định hàm lượng aflatoxin - Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao*, Bộ Khoa học và Công nghệ.
16. TCVN 8426:2010 (2010), *Cà phê nhân - Xác định ochratoxin A bằng phương pháp sắc ký lỏng có làm sạch bằng cột ái lực miễn nhiễm*, Bộ Khoa học và Công nghệ.
17. TCVN 9522:2012 (2012), *Thực phẩm - Xác định aflatoxin B1 trong thực phẩm chế biến từ ngũ cốc dành cho trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ - Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) có làm sạch bằng cột ái lực miễn nhiễm và detector huỳnh quang*, Bộ Khoa học và Công nghệ.
18. TCVN 9524:2012 (2012), *Thực phẩm - Xác định hàm lượng ochratoxin A trong rượu vang và bia - Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) có làm sạch bằng cột ái lực miễn nhiễm*, Bộ Khoa học và Công nghệ.
19. TCVN 9711:2013 (2013), *Thực phẩm - Xác định fumonisin B1 và B2 trong thực phẩm từ ngô - Phương pháp HPLC có làm sạch bằng cột ái lực miễn nhiễm*, Bộ Khoa học và Công nghệ.
20. TCVN 9724:2013 (2013), *Thực phẩm - Xác định Ochratoxin A trong cà phê rang và lúa mạch - Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) có làm sạch bằng cột miễn nhiễm*, Bộ Khoa học và Công nghệ.

21. TCVN 10640:2014 (2014), *Thực phẩm - Xác định zearalenon trong thực phẩm chứa ngô, bột đại mạch, bột ngô, bột ngô dạng nhuyễn, bột mì và ngũ cốc dành cho trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ - Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) có làm sạch bằng cột ái lực miễn nhiễm và sử dụng detector huỳnh quang*, Bộ Khoa học và Công nghệ.
22. TCVN 10927:2015 (2015), *Thực phẩm – Xác định ochratoxin A trong các loại nho khô, hỗn hợp quả khô và quả vả khô – Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao sử dụng detector huỳnh quang và làm sạch bằng cột ái lực miễn nhiễm*, Bộ Khoa học và Công nghệ.
23. TCVN 10928:2015 (2015), *Thực phẩm – Xác định ochratoxin A trong thực phẩm ngũ cốc dành cho trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ - Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao sử dụng detector huỳnh quang và làm sạch bằng cột ái lực miễn nhiễm*, Bộ Khoa học và Công nghệ.
24. TCVN 10929:2015 (2015), *Thực phẩm – Xác định deoxynivalenol trong ngũ cốc, sản phẩm ngũ cốc và thực phẩm từ ngũ cốc dành cho trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ - Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao sử dụng detector huỳnh quang và làm sạch bằng cột ái lực miễn nhiễm*, Bộ Khoa học và Công nghệ.
25. TCVN 10930:2015 (2015), *Thực phẩm – Xác định fumonisin B1 và fumonisin B2 trong thực phẩm chứa ngô dành cho trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ - Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao sử dụng detector huỳnh quang và làm sạch bằng cột ái lực miễn nhiễm có tạo dẫn xuất tiền cột*, Bộ Khoa học và Công nghệ.
26. Lê Thị Phương Thảo (2019), *Nghiên cứu mức độ nhiễm Aflatoxin và đề xuất một số giải pháp công nghệ bảo quản lạc sau thu hoạch ở các tỉnh miền Trung và Bắc Việt Nam*, Luận án tiến sĩ Công nghệ sau thu hoạch, Trường Đại học Bách khoa Hà Nội.
27. Viện Dinh dưỡng Quốc gia (2010), *Tổng điều tra dinh dưỡng 2009-2010*, Viện Dinh dưỡng Quốc gia.
28. Phạm Hùng Việt (2005), *Sắc ký khí - Cơ sở lý thuyết và khả năng ứng dụng*, Nhà xuất bản Đại học Quốc gia, Hà Nội.
29. Đỗ Thị Kim Yên, Nguyễn Thị Cẩm Hồng, Dương Ngọc Diễm, Phạm vũ Cao Sơn, Nguyễn Thanh Hương, Nguyễn Duy Anh, et al. (2007), “Hàm lượng aflatoxin trong mẫu ớt khô trên địa bàn 5 tỉnh phía Nam”, *Tạp chí Y học dự phòng*, 27 (11), 369–372.

Tài liệu tiếng Anh

30. Adetunji MC, Atanda OO, Ezekiel CN (2017), *Risk Assessment of Mycotoxins in Stored Maize Grains Consumed by Infants and Young Children in Nigeria*, *Children*, 4 (7), 1–10.
31. Al-Anati L, Petzinger E (2006), “Immunotoxic activity of ochratoxin A”, *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 29 (2), 79–90.
32. Amirahmadi M, Shoeibi S, Rastegar H, Elmi M, Mousavi Khaneghah A (2018), “Simultaneous analysis of mycotoxins in corn flour using LC/MS-MS combined with a modified QuEChERS procedure”, *Toxin Reviews*, 37 (3), 187–195.
33. Anastassiades M, Lehotay SJ, Stajnbaher D, Schenck FJ (2003), “Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and dispersive solid-phase extraction for the determination of pesticide residues in produce”, *Journal of AOAC international*, 86 (2), 412–431.
34. Andrade PD, Mello MH de, França JA, Caldas ED (2013), “Aflatoxins in food products consumed in Brazil: a preliminary dietary risk assessment”, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 30 (1), 127–36.
35. Anttila A, Bhat RV, Bond JA, Borghoff SJ, Bosch FX, Carlson GP, et al. (2002), *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene*, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 82.
36. AOAC INTERNATIONAL (2016), *Guidelines for Standard Method Performance Requirements, Official Methods of Analysis*, AOAC Official Method of Analysis, 20th ed. AOAC INTERNATIONAL, 1–18.
37. Arroyo-Manzanares N, García-Campaña AM, Gámiz-Gracia L (2013), “Multiclass mycotoxin analysis in *Silybum marianum* by ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry using a procedure based on QuEChERS and dispersive liquid–liquid microextraction”, *Journal of Chromatography A*, 1282, 11–19.
38. ASEAN Risk Assessment Centre for Food Safety (2019), *Risk assessment of Total Aflatoxins and Aflatoxin B1 through the*

consumption of peanut and corn, ASEAN Risk Assessment Centre for Food Safety.

39. Azaiez I, Giusti F, Sagratini G, Mañes J, Fernández-Franzón M (2014), “Multi-mycotoxins analysis in dried fruit by LC/MS/MS and a modified QuEChERS procedure”, *Food analytical methods*, 7 (4), 935–945.
40. Beltran E, Ibáñez M, Sancho JV, Hernandez F (2009), “Determination of mycotoxins in different food commodities by ultra-high-pressure liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry”, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 23 (12), 1801–1809.
41. Benford D, Bolger PM, Carthew P, Coulet M, DiNovi M, Leblanc J-C, et al. (2010), “Application of the Margin of Exposure (MOE) approach to substances in food that are genotoxic and carcinogenic”, *Food and Chemical Toxicology*, 48 , S2–S24.
42. Bennett JW, Klich M (2003), “Mycotoxins”, *Clinical Microbiology Reviews*, 16 (3), 497–516.
43. Bhat RV, Shetty PH, Amruth RP, Sudershan RV (1997), “A foodborne disease outbreak due to the consumption of moldy sorghum and maize containing fumonisin mycotoxins”, *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 35 (3), 249–255.
44. Black RM, Clarke RJ, Read RW (1987), “Detection of trace levels of trichothecene mycotoxins in environmental residues and foodstuffs using gas chromatography with mass spectrometric or electron-capture detection”, *Journal of Chromatography A*, 388 , 365–378.
45. Bolechová M, Benešová K, Běláková S, Čáslavský J, Pospíchalová M, Mikulíková R (2015), “Determination of seventeen mycotoxins in barley and malt in the Czech Republic”, *Food Control*, 47 , 108–113.
46. Bondy G, Mehta R, Caldwell D, Coady L, Armstrong C, Savard M, et al. (2012), “Effects of long term exposure to the mycotoxin fumonisin B1 in p53 heterozygous and p53 homozygous transgenic mice”, *Food and Chemical Toxicology*, 50 (10), 3604–3613.
47. Boon PE, Bonthuis M, van der Voet H, van Klaveren JD (2011), “Comparison of different exposure assessment methods to estimate the long-term dietary exposure to dioxins and ochratoxin A”, *Food and Chemical Toxicology*, 49 (9), 1979–1988.

48. Boudra H, Le Bars P, Le Bars J (1995), “Thermostability of Ochratoxin A in wheat under two moisture conditions”, *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (3), 1156–1158.
49. Cabañes FJ, Accensi F, Bragulat MR, Abarca ML, Castellá G, Minguéz S, et al. (2002), “What is the source of ochratoxin A in wine?”, *International Journal of Food Microbiology*, 79 (3), 213–215.
50. Castegnaro M, Wild CP (1995), “IARC activities in mycotoxin research”, *Natural Toxins*, 3 (4), 327–331.
51. Centre for Food Safety (2013), *The first Hong Kong total diet study: Mycotoxins*, Food and Environmental Hygiene Department, Hong Kong.
52. Chilaka CA, De Boevre M, Atanda OO, De Saeger S (2016), “Occurrence of Fusarium Mycotoxins in Cereal Crops and Processed Products (Ogi) from Nigeria”, *Toxins*, 8 (11), 342.
53. Chin CK, Abdullah A, Sugita-Konishi Y (2012), “Dietary intake of aflatoxins in the adult Malaysian population – an assessment of risk”, *Food Additives & Contaminants: Part B*, 5 (4), 286–294.
54. Control C for D, Prevention (CDC (2004), “Outbreak of aflatoxin poisoning—eastern and central provinces, Kenya, January-July 2004”, *MMWR Morbidity and mortality weekly report*, 53 (34), 790.
55. Cressey P (2011), *Dietary Exposure to Aflatoxins: Risk Estimates and Proportionality of Exposure Source*, Institute of Environmental Science and Research Limited, Ministry of Agriculture and Forestry, New Zealand.
56. Cressey P, Andrew P (2014), *Dietary exposure to ochratoxin A and trichothecene mycotoxins: Risk estimates and proportionality of exposure source*, Ministry for Primary Industry, New Zealand.
57. Croft WA, Jarvis BB, Yatawara CS (1986), “Airborne outbreak of trichothecene toxicosis”, *Atmospheric Environment* (1967), 20 (3), 549–552.
58. Cunha SC, Fernandes JO (2010), “Development and validation of a method based on a QuEChERS procedure and heart-cutting GC-MS for determination of five mycotoxins in cereal products”, *Journal of separation science*, 33 (4–5), 600–609.

59. Ding X, Li P, Bai Y, Zhou H (2012), “Aflatoxin B1 in post-harvest peanuts and dietary risk in China”, *Food Control*, 23 (1), 143–148.
60. Duarte SC, Alves MR, Pena A, Lino CM (2012), “Determinants of ochratoxin A exposure—A one year follow-up study of urine levels”, *International journal of hygiene and environmental health*, 215 (3), 360–367.
61. EFSA (2010), “Management of left-censored data in dietary exposure assessment of chemical substances”, *EFSA Journal*, 8 (3), 1–96.
62. European Commission (2006), *EC 401/2006: Commission Decision of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs*, European Commission.
63. European Commission (2002), *EC 657/2002: Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results*, European Commission.
64. Ferre FS (2016), “Worldwide occurrence of mycotoxins in rice”, *Food Control*, 62 , 291–298.
65. Ferreira I, Fernandes JO, Cunha SC (2012), “Optimization and validation of a method based in a QuEChERS procedure and gas chromatography–mass spectrometry for the determination of multi-mycotoxins in popcorn”, *Food Control*, 27 (1), 188–193.
66. Fink-Gremmels J, Jahn A, Blom MJ (1995), “Toxicity and metabolism of ochratoxin A”, *Natural Toxins*, 3 (4), 214–220.
67. Food Safety Authority of Ireland (2016), *Report on a Total Diet Study carried out by the Food Safety Authority of Ireland in the period 2012-2014*, Food Safety Authority of Ireland.
68. Fung F, Clark RF (2004), “Health effects of mycotoxins: a toxicological overview”, *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 42 (2), 217–234.
69. Hayes RB, van Nieuwenhuize JP, Raatgever JW, Ten Kate FJW (1984), “Aflatoxin exposures in the industrial setting: An epidemiological study of mortality”, *Food and Chemical Toxicology*, 22 (1), 39–43.

70. Hendrickse RG (1991), “Kwashiorkor: the hypothesis that incriminates aflatoxins”, *Pediatrics*, 88 (2), 376–379.
71. Hewitt TC, Flack CL, Kolodziejczyk JK, Chacon AM, D’Ovidio KL (2012), “Occurrence of zearalenone in fresh corn and corn products collected from local Hispanic markets in San Diego County, CA”, *Food Control*, 26 (2), 300–304.
72. Huang X, Wang S, Mao D, Miao S, Hu Q, Ji S (2017), “Optimized QuEChERS Method Combined with UHPLC-MS/MS for the Simultaneous Determination of 15 Mycotoxins in Licorice”, *Journal of AOAC International*, 101 (3), 633–642.
73. Huong BTM, Brimer L, Dalsgaard A (2016), “Dietary exposure to aflatoxin B1, ochratoxin A and fumonisins of adults in Lao Cai province, Viet Nam: A total dietary study approach”, *Food and chemical toxicology*, 98 , 127–133.
74. Huong BTM, Do TT, Madsen H, Brimer L, Dalsgaard A (2016), “Aflatoxins and fumonisins in rice and maize staple cereals in Northern Vietnam and dietary exposure in different ethnic groups”, *Food control*, 70 , 191–200.
75. Iqbal SZ, Selamat J, Ariño A (2016), *Mycotoxins in food and food products: current status*, Food Safety, Springer.
76. JECFA (2000), *Safety evaluation of certain food additives and contaminants - Report of Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*, 82.
77. JECFA (2004), *Safety evaluation of certain mycotoxins in food: seventy-four report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*.
78. JECFA JFEC on FA (2007), *Safety evaluation of certain food additives and contaminants: sixty-eighth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*.
79. JECFA JFEC on FA (2001), *Safety evaluation of certain mycotoxins in food*, Food & Agriculture Org.
80. Jia W, Chu X, Ling Y, Huang J, Chang J (2014), “Multi-mycotoxin analysis in dairy products by liquid chromatography coupled to

quadrupole orbitrap mass spectrometry”, *Journal of Chromatography A*, 1345 , 107–114.

81. Kimanya ME, Meulenaer BD, Tiisekwa B, Ndomondo-Sigonda M, Devlieghere F, Camp JV, et al. (2008), “Co-occurrence of fumonisins with aflatoxins in home-stored maize for human consumption in rural villages of Tanzania”, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 25 (11), 1353–1364.
82. Koesukwiwat U, Sanguankaew K, Leepipatpiboon N (2014), “Evaluation of a modified QuEChERS method for analysis of mycotoxins in rice”, *Food Chemistry*, 153 , 44–51.
83. Leblanc J-C, Sirot V (2011), *Second French Total Diet Study (TDS 2) Report 1: Inorganic contaminants, minerals, persistent organic pollutants, mycotoxins and phytoestrogens*, French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety.
84. Li R, Wang X, Zhou T, Yang D, Wang Q, Zhou Y (2014), “Occurrence of four mycotoxins in cereal and oil products in Yangtze Delta region of China and their food safety risks”, *Food Control*, 35 (1), 117–122.
85. Liu Y, Chang C-CH, Marsh GM, Wu F (2012), “Population attributable risk of aflatoxin-related liver cancer: Systematic review and meta-analysis”, *European Journal of Cancer*, 48 (14), 2125–36.
86. Liu Y, Wu F (2010), “Global burden of aflatoxin-induced hepatocellular carcinoma: a risk assessment”, *Environmental health perspectives*, 118 (6), 818–824.
87. Liu Y, Han S, Lu M, Wang P, Han J, Wang J (2014), “Modified QuEChERS method combined with ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for the simultaneous determination of 26 mycotoxins in sesame butter”, *Journal of Chromatography B*, 970 , 68–76.
88. Majeed S, De Boevre M, De Saeger S, Rauf W, Tawab A, Rahman M, et al. (2018), “Multiple mycotoxins in rice: Occurrence and health risk assessment in children and adults of Punjab, Pakistan”, *Toxins*, 10 (2), 1–30.
89. Maragos C (2010), “Zearalenone occurrence and human exposure”, *World Mycotoxin Journal*, 3 (4), 369–383.

90. Marin S, Ramos AJ, Cano-Sancho G, Sanchis V (2013), "Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment", *Food and Chemical Toxicology*, 60 , 218–237.
91. Mavungu JDD, Monbaliu S, Scippo M-L, Maghuin-Rogister G, Schneider Y-J, Larondelle Y, et al. (2009), "LC-MS/MS multi-analyte method for mycotoxin determination in food supplements", *Food Additives & Contaminants: Part A*, 26 (6), 885–895.
92. National Institute of Food and Drug Safety Evaluation (2016), *Risk assessment of mycotoxins*, Ministry of Food and Drug Safety, South Korea.
93. Newberne PM, Butler WH (1969), "Acute and chronic effects of aflatoxin on the liver of domestic and laboratory animals: a review", *Cancer Research*, 29 (1), 236–250.
94. Ngindu A, Kenya PatrickR, Ocheng DavidM, Omondi ThomasN, Ngare W, Gatei D, et al. (1982), "Outbreak of acute hepatitis caused by aflatoxin poisoning in Kenya", *The Lancet*, 319 (8285), 1346–1348.
95. Nguyen MT, Tozlovanu M, Tran TL, Pfohl-Leszkowicz A (2007), "Occurrence of aflatoxin B1, citrinin and ochratoxin A in rice in five provinces of the central region of Vietnam", *Food chemistry*, 105 (1), 42–47.
96. Nguyen VT (2012), "Hepatitis B infection in Vietnam: current issues and future challenges", *Asia Pacific Journal of Public Health*, 24 (2), 361–373.
97. Nielsen KF, Smedsgaard J (2003), "Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardised liquid chromatography–UV–mass spectrometry methodology", *Journal of Chromatography A*, 1002 (1), 111–136.
98. Okeke CA, Ezekiel CN, Nwangburuka CC, Sulyok M, Ezeamagu CO, Adeleke RA, et al. (2015), "Bacterial Diversity and Mycotoxin Reduction During Maize Fermentation (Steeping) for Ogi Production", *Frontiers in Microbiology*, 6 , 1402.
99. Paíga P, Morais S, Oliva-Teles T, Correia M, Delerue-Matos C, Duarte SC, et al. (2012), "Extraction of ochratoxin A in bread samples by the QuEChERS methodology", *Food Chemistry*, 135 (4), 2522–2528.

100. Panrapee I, Phakpoom K, Thanapoom M, Nampeung A, Warapa M (2016), "Exposure to aflatoxin B 1 in Thailand by consumption of brown and color rice", *Mycotoxin research*, 32 (1), 19–25.
101. Parent-Massin D (2004), "Haematotoxicity of trichothecenes", *Toxicology letters*, 153 (1), 75–81.
102. Pfohl-Leszkowicz A, Manderville RA (2007), "Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans", *Molecular nutrition & food research*, 51 (1), 61–99.
103. Phuong N, Thieu N, Ogle B, Pettersson H (2015), "Aflatoxins, fumonisins and zearalenone contamination of maize in the southeastern and central highlands provinces of Vietnam", *Agriculture*, 5 (4), 1195–1203.
104. Pitt JI, Wild CP, Baan RA, Gelderblom WC, Miller JD, Riley RT, et al. (2012), "Improving public health through mycotoxin control", *International Agency for Research on Cancer*, Lyon, France.
105. Raad F, Nasreddine L, Hilan C, Bartosik M, Parent-Massin D (2014), "Dietary exposure to aflatoxins, ochratoxin A and deoxynivalenol from a total diet study in an adult urban Lebanese population", *Food and Chemical Toxicology*, 73, 35–43.
106. Rahmani A, Jinap S, Soleimany F, Khatib A, Tan CP (2011), "Sample preparation optimization for the simultaneous determination of mycotoxins in cereals", *European Food Research and Technology*, 232 (4), 723–735.
107. Rasmussen RR, Storm IMLD, Rasmussen PH, Smedsgaard J, Nielsen KF (2010), "Multi-mycotoxin analysis of maize silage by LC-MS/MS", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397 (2), 765–776.
108. Reddy BN, Raghavender CR (2007), "Outbreaks of aflatoxicoses in India", *African journal of food, agriculture, nutrition and development*, 7 (5).
109. Ren Y, Zhang Y, Shao S, Cai Z, Feng L, Pan H, et al. (2007), "Simultaneous determination of multi-component mycotoxin contaminants in foods and feeds by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry", *Journal of Chromatography A*, 1143 (1), 48–64.

110. Richard JL (2007), “Some major mycotoxins and their mycotoxicoses—An overview”, *International journal of food microbiology*, 119 (1–2), 3–10.
111. Romera D, Mateo EM, Mateo-Castro R, Gómez JV, Gimeno-Adelantado JV, Jiménez M (2018), “Determination of multiple mycotoxins in feedstuffs by combined use of UPLC–MS/MS and UPLC–QTOF–MS”, *Food Chemistry*, 267 , 140–148.
112. Sakuma H, Watanabe Y, Furusawa H, Yoshinari T, Akashi H, Kawakami H, et al. (2013), “Estimated dietary exposure to mycotoxins after taking into account the cooking of staple foods in Japan”, *Toxins*, 5 (5), 1032–1042.
113. Seo J-A, Kim J-C, Lee D-H, Lee Y-W (1996), “Variation in 8-ketotrichothecenes and zearalenone production by *Fusarium graminearum* isolates from corn and barley in Korea”, *Mycopathologia*, 134 (1), 31–7.
114. Shephard GS (2008), “Risk assessment of aflatoxins in food in Africa”, *Food Additives and Contaminants*, 25 (10), 1246–1256.
115. Shim W-B, Kim J-C, Seo J-A, Lee Y-W (1997), “Natural occurrence of trichothecenes and zearalenone in Korean and imported beers”, *Food Additives & Contaminants*, 14 (1), 1–5.
116. Sirot V, Fremy J-M, Leblanc J-C (2013), “Dietary exposure to mycotoxins and health risk assessment in the second French total diet study”, *Food and Chemical Toxicology*, 52 , 1–11.
117. Soleimany F, Jinap S, Faridah A, Khatib A (2012), “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*, 25 (2), 647–53.
118. Spanjer MC, Rensen PM, Scholten JM (2008), “LC–MS/MS multi-method for mycotoxins after single extraction, with validation data for peanut, pistachio, wheat, maize, cornflakes, raisins and figs”, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 25 (4), 472–489.
119. Steyn PS, Gelderblom WCA, Shephard GS, Heerden FR van (2011), *Mycotoxins with a Special Focus on Aflatoxins, Ochratoxins and Fumonisins*, General, Applied and Systems Toxicology, American Cancer Society.

120. Stockmann-Juvala H, Savolainen K (2008), “A review of the toxic effects and mechanisms of action of fumonisin B1”, *Human & experimental toxicology*, 27 (11), 799–809.
121. Sugita-Konishi Y, Kamata Y, Sato T, Yoshinari T, Saito S (2013), “Exposure and risk assessment for ochratoxin A and fumonisins in Japan”, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 30 (8), 1392–1401.
122. Sulyok M, Berthiller F, Krska R, Schuhmacher R (2006), “Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize”, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20 (18), 2649–2659.
123. Tamura M, Uyama A, Mochizuki N (2011), “Development of a Multi-mycotoxin Analysis in Beer-based Drinks by a Modified QuEChERS Method and Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry”, *Analytical Sciences*, 27 (6), 629–629.
124. Tanaka T, Yoneda A, Inoue S, Sugiura Y, Ueno Y (2000), “Simultaneous determination of trichothecene mycotoxins and zearalenone in cereals by gas chromatography–mass spectrometry”, *Journal of chromatography A*, 882 (1–2), 23–28.
125. Tola M, Kebede B (2016), “Occurrence, importance and control of mycotoxins: A review”, *Cogent Food & Agriculture*, 2 (1), 1–26.
126. Waenlor W, Wiwanitkit V (2003), Aflatoxin contamination of food and food products in Thailand: an overview, *Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*, 34 , 184–190.
127. WHO (2009), *Principles and methods for the risk assessment of chemicals in food*, World Health Organization.
128. Wild CP, Gong YY (2010), “Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue”, *Carcinogenesis*, 31 (1), 71–82.
129. Wild CP, Hall AJ (2000), “Primary prevention of hepatocellular carcinoma in developing countries”, *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 462 (2), 381–393.
130. Wogan GN, Paglialunga S, Newberne PM (1974), “Carcinogenic effects of low dietary levels of aflatoxin B1 in rats”, *Food and Cosmetics Toxicology*, 12 (5), 681–685.


131. Wu F (2004), “Mycotoxin Risk Assessment for the Purpose of Setting International Regulatory Standards”, *Environmental Science & Technology*, 38 (15), 4049–4055.
132. Yogendrarajah P, Van Poucke C, De Meulenaer B, De Saeger S (2013), “Development and validation of a QuEChERS based liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the determination of multiple mycotoxins in spices”, *Journal of Chromatography A*, 1297, 1–11.
133. Zachariasova M, Cajka T, Godula M, Malachova A, Veprikova Z, Hajslova J (2010), “Analysis of multiple mycotoxins in beer employing (ultra)-high-resolution mass spectrometry”, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 24 (22), 3357–3367.
134. Zinedine A, Soriano JM, Molto JC, Manes J (2007), “Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin”, *Food and chemical toxicology*, 45 (1), 1–18.

PHỤ LỤC

Phụ lục 1. Chứng chỉ chất chuẩn độ tó vi nấm được sử dụng trong nghiên cứu...	PL2
Phụ lục 2. Mẫu phiếu điều tra.....	PL9
Phụ lục 3. Quy trình xác định độ tó vi nấm.....	PL11
Phụ lục 4. Sắc ký đồ xây dựng và thẩm định phương pháp.....	PL16
Phụ lục 5. Một số sắc ký đồ phân tích mẫu.....	PL300
Phụ lục 6. Liều phơi nhiễm của các độ tó vi nấm.....	PL366

Phụ lục 1. Chứng chỉ chất chuẩn độc tố vi nấm được sử dụng trong nghiên cứu

Handwritten: HHDN.C39.01



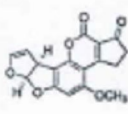
SIGMA ALDRICH

sigmaaldrich.com
 3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA
 Website: www.sigmaaldrich.com
 Email USA: techserv@sial.com
 Outside USA: eurtechserv@sial.com

Certificate of Analysis

Product Name:
Aflatoxin B₁ from *Aspergillus flavus* - from *Aspergillus flavus*

Product Number: A8638
Batch Number: 025M4692V
Brand: SIGMA
CAS Number: 1162-65-8
Formula: C₁₇H₁₂O₆
Formula Weight: 312.27 g/mol
Storage Temperature: Store at 2 - 8 °C
Quality Release Date: 21 JAN 2015
Recommended Retest Date: JAN 2020



Test	Specification	Result
Appearance (Form)	Powder	Powder
Appearance (Colour)	White to Faint Yellow	White
Solubility (Solvent)	Chloroform	Chloroform
Solubility (Conc)	9.80 - 10.20 mg/ml	10.00 mg/ml
Solubility (Turbidity)	Clear	Clear
Solubility (Color)	Colorless to Faint Yellow	Very Faint Yellow
Purity (HPLC)	≥ 99.00 %	99.64 %
Purity (TLC)	≥ 99.00 %	99.50 %

Theo Ackermann

Theo Ackermann PhD MScEng CCM
 Manager, Quality and Regulatory Affairs
 Jerusalem, Israel IL

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

Version Number: 1

Page 1 of 1

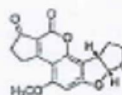
Aflatoxin B1

Certificate of Analysis

04.54 0022

Product Name:
Aflatoxin B₂

Product Number: **A9887**
 Batch Number: **025M4138V**
 Brand: **SIGMA**
 CAS Number: **7220-01-7**
 Formula: **C₁₇H₁₄O₆**
 Formula Weight: **314.29 g/mol**
 Storage Temperature: **Store at 2 - 8 °C**
 Quality Release Date: **10 FEB 2015**
 Recommended Re-test Date: **FEB 2020**



Test	Specification	Result
Appearance (Form)	Powder	Powder
Appearance (Colour)	White to Faint Yellow	Off-White
Solubility (Solvent)	Chloroform	Chloroform
Solubility (Conc)	9.80 - 10.20 mg/ml	10.00 mg/ml
Solubility (Turbidity)	Clear	Clear
Solubility (Color)	Colorless to Faint Yellow	Faint Yellow
Purity (TLC)	> 98.00 %	99.00 %

Theo Ackemann

Theo Ackemann PhD MScEng CQM
 Manager, Quality and Regulatory Affairs
 Jerusalem, Israel IL

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at SigmaAldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

Aflatoxin B₂

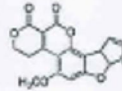
PL3

Certificate of Analysis

00.54.003.01

Product Name:
Aflatoxin G₁ - from *Aspergillus flavus*

Product Number: A0138
 Batch Number: 055M4047V
 Brand: SIGMA
 CAS Number: 1165-39-5
 Formula: C₁₇H₁₂O₇
 Formula Weight: 328.27 g/mol
 Storage Temperature: Store at 2 - 8 °C
 Quality Release Date: 29 OCT 2014
 Recommended Retest Date: OCT 2019



Test	Specification	Result
Appearance (Form)	Powder	Powder
Appearance (Colour)	White to Faint Yellow	White
Solubility (Solvent)	Chloroform	Chloroform
Solubility (Conc)	9.80 - 10.20 mg/ml	10.00 mg/ml
Solubility (Turbidity)	Clear	Clear
Solubility (Color)	Colorless to Faint Yellow	Very Faint Yellow
Purity (TLC)	≥ 98.00 %	100.00 %
Purity (HPLC)	≥ 98.00 %	98.31 %



Theo Ackermann

Theo Ackermann PhD MScEng CQM
 Manager, Quality and Regulatory Affairs
 Jerusalem, Israel IL

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at SigmaAldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

Aflatoxin G1

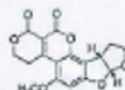
PL4

09.5.2014

Certificate of Analysis

Product Name:
Aflatoxin G2

Product Number: A0263
 Batch Number: 114M4032V
 Brand: SIGMA
 CAS Number: 7241-95-7
 Formula: C17H14O7
 Formula Weight: 330.29 g/mol
 Storage Temperature: Store at 2-8 DEGREE C
 Quality Release Date: 30 OCT 2014
 Recommended Retest Date: OCT 2019



Test	Specification	Result
Appearance (Form)	Powder	Powder
Appearance (Colour)	White to Faint Yellow	Off-White
Solubility (Solvent)	Chloroform	Chloroform
Solubility (Conc)	9.80 - 10.20 mg/ml	10.00 mg/ml
Solubility (Turbidity)	Clear	Clear
Solubility (Color)	Colorless to Faint Yellow	Almost Colorless
Purity (TLC)	≥ 98.00 %	100.00 %

Theo Ackermann

Theo Ackermann PhD MScEng CQM
 Manager, Quality and Regulatory Affairs
 Jerusalem, Israel IL

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

Aflatoxin G2

PL5

04.59.008

Certificate of Analysis

Product Name:

Ochratoxin A - from *Petromyces albertensis*, ≥98% (HPLC)

Product Number:

01877

Batch Number:

045M4021V

Brand:

SIGMA

Formula Weight:

403.81 g/mol

Storage Temperature:

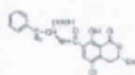
Store at 2 - 8 °C

Quality Release Date:

08 FEB 2015

Recommended Retest Date:

FEB 2018



Test	Specification	Result
Appearance (Form)	Powder	Powder
Appearance (Colour)	White to white with a Tan Cast	Off-White
Solubility (Solvent)	Chloroform	Chloroform
Solubility (Conc)	9.80 - 10.20 mg/ml	10.00 mg/ml
Solubility (Turbidity)	Clear	Clear
Solubility (Color)	Colorless to Light Yellow	Colorless
Water (by Karl Fischer)	> 0.00 %	0.20 %
Elemental Anal. (%C anhydrous)	59.18 - 59.78 %	59.28 %
Elemental Anal. (%N anhydrous)	3.17 - 3.77 %	3.46 %
Purity (HPLC)	> 99.0 %	99.8 %
NMR (Solvent)	CDCl ₃	CDCl ₃
Identity by NMR	Consistent	Consistent with Structure
NMR (Residual Solvent 1)	Ethylacetate	Ethylacetate
NMR (% Solvent 1)	< 2.00 %	0.00 %
NMR (Residual Solvent 2)	Petroleum Ether	Petroleum Ether
NMR (% Solvent 2)	< 2.00 %	0.29 %

Theo Ackermann PhD MScEng CQM
 Manager, Quality and Regulatory Affairs
 Jerusalem, Israel IL

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

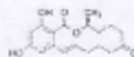
Ochratoxin A

PL6

Certificate of Analysis

Product Name:
Zearalenone - fungal mycotoxin

Product Number: **Z2125**
 Batch Number: **084M4034V**
 Brand: **SIGMA**
 CAS Number: **17924-92-4**
 Formula: **C₁₈H₂₂O₅**
 Formula Weight: **318.36 g/mol**
 Storage Temperature: **Store at -20 °C**
 Quality Release Date: **20 JUL 2014**
 Recommended Retest Date: **JUL 2017**



Test	Specification	Result
Appearance (Form)	Powder	Powder
Appearance (Colour)	White to White w/ Yellow Cast	White
Solubility (Solvent)	Methanol	Methanol
Solubility (Conc)	49.00 - 51.00 mg/ml	50.00 mg/ml
Solubility (Turbidity)	Clear	Clear
Solubility (Color)	Colorless to Faint Yellow	Very Faint Yellow
Water (by Karl Fischer)	≥ 0.00 %	0.34 %
Elemental Anal. (%C anhydrous)	87.50 - 88.30 %	88.08 %
Purity (HPLC)	≥ 99.0 %	100.0 %
NMR (Solvent)	CD ₃ OD	CD ₃ OD
Identity by NMR	Consistent	Consistent with Structure
NMR (Residual Solvent 1)	Dichloromethane	Dichloromethane
NMR (% Solvent 1)	≤ 1.00 %	0.27 %

Theo Ackermann PhD MScEng CQM
 Manager, Quality and Regulatory Affairs
 Jerusalem, Israel IL

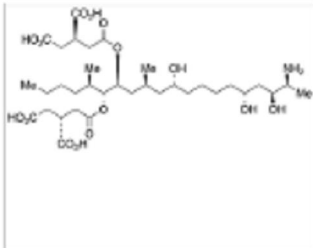
Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Services. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

Zearalenon



CERTIFICATE OF ANALYSIS
 20 Martin Ross Avenue, North York, ON, M3J 2K8, CANADA
 Tel: (416) 665-9696, Fax: (416) 665-4439
 Email: orders@trc-canada.com Website: www.trc-canada.com

1. Identification

Catalogue Number:	F862750	CAS Number:	116355-83-0
Product:	Fuminosin B1	Synonym:	(2R,2R)-1,2,3-Propanetricarboxylic Acid 1,1'-[(1S,2R)-1-[(2S,4R,9R,11S,12S)-1,2-Amino-4,9,11-trihydroxy-2-methyldecyl]-2-[(1R)-1-methylpentyl]-1,2-ethanediyl] Ester; Macrofusine;
Structure:			Molecular Formula: $C_{21}H_{35}NO_{11}$ Molecular weight: 721.83 Source of Product: N/A Solubility: Methanol (Slightly), Water (Very Slightly)
Lot Number:	2-TM-16-1	Purity:	98%
Shipping Condition:		Storage Condition:	Hygroscopic, -20°C Freezer, Under inert atmosphere

2. Warning

Warning 1:	Warning 2:	Warning 3:
-------------------	-------------------	-------------------

3. Analytical Information

Tests:	Specifications:	Results:
¹ H NMR	Conforms to structure	Conforms
Mass Spec	Conforms to structure	Conforms
Water Content	Report Results	Refer: Additional Information
Elemental Analysis	Report Results	Refer: Additional Information
Appearance		White to Off-White Solid

Additional Information: TLC Conditions: C18; Acetonitrile : Water : Acetic Acid = 8 : 2 : 0.2; Visualized with AMCS and KMnO₄; Single Spot, *r*_F = 0.60; ¹H NMR and MS conform to structure./Elemental Analysis: (Found) %C: 55.37, %H: 8.33, %N: 1.93; (Calculated) %C: 56.57, %H: 8.24, %N: 1.94/Contains: 1.6% Methanol

Purity is based on the analytical results of the tests performed. NMR and TLC may have an accuracy +-2%. Isotopic purity is based on mass distribution observed.

4. Signatures

Lot Number	Reviewed By	Reviewed By	C of A Approved By
2-TM-16-1	Philip Chan		
Test Date			
05/11/2017			
Retest Date	Date	Date	Date
05/09/2021			

Fuminosin B1

Phụ lục 2. Mẫu phiếu điều tra

Trang 1/2

PHIẾU ĐIỀU TRA NHÂN TRẮC HỘ GIA ĐÌNH

Mã số hộ gia đình:

Ngày điều tra:...../...../.....

TT	Quan hệ	Họ và tên	Ngày tháng năm sinh	Cân nặng, kg	Giới tính
1.	Thành viên 1				
2.	Thành viên 2				
3.	Thành viên 3				
4.	Thành viên 4				
5.	Thành viên 5				
6.	Thành viên 6				
7.	Thành viên 7				
8.	Thành viên 8				
9.	Thành viên 9				
10.	Thành viên 10				
11.	Thành viên 11				
12.	Thành viên 12				

PHIẾU HỎI GHI TÀN SUẤT ĂN

STT	Tên thực phẩm	Hãng ngày (số bữa/N)	Hãng tuần (số bữa/T)	Hãng tháng (số bữa/Th)	Trọng lượng TP mỗi lần chế biến sống (g)	Trọng lượng TP mỗi lần chế biến (chín) – quy ra bát/thìa	Thành viên 1	Thành viên 2	Thành viên 3	Thành viên 4	Thành viên 5	Thành viên 6	Thành viên 7	Phần còn lại
1	Gạo													
2	Ngô													
3	Lạc													
4	Vừng													

Phụ lục 3. Quy trình xác định độc tố vi nấm

XÁC ĐỊNH ĐỒNG THỜI MỘT SỐ ĐỘC TỐ VI NẤM TRONG THỰC PHẨM BẰNG LC-MS/MS

1. Nguyên lý

Các độc tố vi nấm trong mẫu thực phẩm được chiết bằng acetonitril có chứa 1% acid formic và tách nước bằng phân bố lỏng lỏng nhờ muối $MgSO_4$ và $NaCl$. Dịch chiết được làm sạch bằng chiết phân tán pha rắn (d-SPE) với các chất hấp phụ C18 và $MgSO_4$. Dịch chiết sau đó được phân tích trên thiết bị bằng LC-MS/MS.

2. Phạm vi áp dụng

Phương pháp này áp dụng để xác định các độc tố vi nấm sau đây trong các nền mẫu ngũ cốc và hạt có dầu: Aflatoxin B1, B2, G1, G2, Ochratoxin A (OTA), Fumonisin B1(FB1), Zearalenon (ZEA).

3. Dụng cụ, thiết bị

3.1. Thiết bị

3.1.1. Hệ thống sắc ký lỏng khối phổ hai lần (LC-MS/MS) Triple Quad 5500 AB Sciex

3.1.2. Máy lắc xoay Genius, IKA

3.1.3. Máy đồng nhất mẫu HR1843, Philips

3.1.4. Máy ly tâm Z383K tốc độ 6000÷18000 vòng/phút, Hermle

3.1.5. Cân phân tích (có độ chính xác 0,1 mg), Metter Toledo

3.1.6. Cân kỹ thuật (có độ chính xác 0,01 g), Metter Toledo

3.2. Dụng cụ

3.2.1. Micropipet điều chỉnh được thể tích 20-200 μL , 100-1000 μL và 1000-5000 μL .

3.2.2. Bình định mức thể tích 5 mL Isolab .

3.2.3. Ống ly tâm nhựa 50 mL.

3.2.4. Ống ly tâm nhựa 2 mL.

3.2.5. Vial loại 1,8 mL có nắp đậy septum, Agilent.

3.2.6. Màng lọc mẫu PTFE 0,2 μm .

4. Hóa chất, chất chuẩn

4.1. Hoá chất, thuốc thử

- Acetonitril, loại dùng cho sắc ký, Merck.

- Acid formic (HCOOH), loại dùng cho sắc ký, Merck.
- MgSO₄ khan, loại tinh khiết phân tích, Merck.
- NaCl, loại tinh khiết phân tích, Merck.
- Chất hấp phụ C18 của Agilent.
- Nước cất 2 lần thu được từ hệ thống cất nước Hamilton.
- Dung môi chiết: Lấy 10 mL acid formic hòa vào bình định mức 1 L và định mức đến vạch bằng acetonitril.
- Hỗn hợp muối chiết: Cân $8,0 \pm 0,05$ g MgSO₄ khan và $2 \pm 0,01$ g NaCl trên cân phân tích cho vào túi hoặc dụng cụ chứa có thể đậy kín, trộn đều.
- Hỗn hợp chất phân bố (d-SPE): Cân 100 ± 5 mg C18 và 150 ± 20 mg MgSO₄ trên cân phân tích cho vào ống ly tâm nhỏ 2 mL. Lắc để trộn đều.
- Pha động kênh A (HCOOH 0,1%): Lấy 1 mL HCOOH vào bình định mức 1 L và định mức đến vạch bằng nước cất hai lần. Lắc, lọc, rung loại khí.

4.2. Chất chuẩn

Các chuẩn AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, OTA, FB1, ZEA được cung cấp dưới dạng chuẩn rắn độ tinh khiết $\geq 95\%$ của Sigma Aldrich hoặc tương đương.

4.3. Pha dung dịch chuẩn

4.3.1. Từ các chuẩn rắn pha các chuẩn gốc riêng lẻ có nồng độ khoảng 1000 $\mu\text{g/mL}$ bằng methanol hoặc acetonitril. Nồng độ được tính chính xác theo khối lượng cân thực tế và theo độ tinh khiết. Các dung dịch chuẩn gốc được bảo quản ở -20°C trong lọ đựng chuẩn màu nâu, có thể bền trong vòng 2 năm.

4.3.2. Dung dịch chuẩn trung gian hỗn hợp 1 (nồng độ AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 đều là 200 ng/mL; nồng độ của FUB1 là 20 $\mu\text{g/mL}$; nồng độ của OTA, ZEA đều là 1000 ng/mL): Hút các lượng chuẩn tương ứng và pha vào bình định mức 5 mL với acetonitril để thu được các nồng độ như trên. Bảo quản ở nhiệt độ khoảng 4°C , có thể giữ được trong 6 tháng.

4.3.3. Dung dịch chuẩn trung gian hỗn hợp 2 (nồng độ AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 đều là 20 ng/mL; nồng độ của FUB1 là 2000 ng/mL; nồng độ của OTA, ZEA đều là

100 ng/mL): Hút 0,5 mL chuẩn hỗn hợp 1 và pha vào bình định mức 5 mL với acetonitril để thu được các nồng độ như trên. Bảo quản ở nhiệt độ khoảng 4°C, có thể giữ được trong 6 tháng.

4.3.4. Các dung dịch chuẩn xây dựng đường chuẩn: Pha dãy dung dịch dùng để xây dựng đường chuẩn như ở bảng sau, bảo quản được 1 tuần ở nhiệt độ khoảng 4°C.

Bảng 1. Pha các dung dịch chuẩn xây dựng đường chuẩn

Tên dung dịch	Dung dịch chuẩn trung gian 2 (μL)	Acetonitril có 1% acid acetic (*) (μL)	AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 (ng/mL)	OTA, ZEA (ng/mL)	FUB1 (ng/mL)
C1	10	990	0,2	1,0	20
C2	50	950	1,0	5,0	100
C3	100	900	2,0	10	200
C4	250	750	5,0	25	500
C5	500	500	10	50	1000

(*) Trường hợp pha đường chuẩn trên nền mẫu thì thay thế dung môi bằng dịch chiết mẫu trắng.

5. Cách tiến hành

5.1. Chuẩn bị mẫu sơ bộ

- Các mẫu được xay nhỏ bằng máy nghiền mẫu với lượng mẫu đủ lớn, nên lấy lượng mẫu tối thiểu 0,5 kg. Trường hợp tổng lượng mẫu nhỏ hơn 0,5 kg thì xay toàn bộ mẫu.

5.2. Chiết mẫu

- Cân chính xác khoảng 5 g mẫu vào ống ly tâm 50 mL
- Thêm 15 mL nước cất, lắc đều trong 1 phút để nước thấm hoàn toàn vào mẫu
- Thêm 20 mL dung môi chiết, lắc trên máy lắc ngang tại tốc độ 140 vòng/phút trong 30 phút.
- Thêm hỗn hợp muối chiết, lắc bằng tay trong 1 phút để muối hoàn toàn đồng nhất với dịch mẫu và ly tâm ở 6000 vòng/phút trong 5 phút.

5.3. Làm sạch bằng d-SPE

- Hút 1 mL dịch chiết từ bước 5.2 vào ống chiết pha rắn d-SPE.
- Lắc xoáy trong 1 phút bằng máy lắc xoáy.
- Ly tâm 13000 vòng/phút trong 1 phút bằng máy ly tâm.

- Hút dịch ly tâm vào lọ đựng mẫu 2 mL.

Song song, tiến hành phân tích mẫu trắng là mẫu đã được xác định là không có độc tố vi nấm và mẫu trắng thêm chuẩn tại nồng độ tương ứng C1.

6. Điều kiện thiết bị

- Cột sắc ký lỏng Cortecs C18 (150 mm × 4,6 mm x 2,7 μm) và tiền cột tương ứng của Waters.
- Pha động: gradient gồm hai kênh A (dung dịch acid formic 0,1% trong nước) và B (methanol) như ở bảng 2.

Bảng 2: Chương trình gradient

Thời gian	Kênh A (HCOOH 0,1%)	Kênh B (MeOH)
0,01	80	20
2	80	20
6	0	100
9	0	100
10	80	20
12	80	20

- Thể tích tiêm mẫu: 10 μL.

- Sử dụng nguồn ESI(+) và ESI(-) với các chế độ như ở bảng 3 và bảng 4.

Bảng 3. Các thông số tối ưu của MS đối với chế độ ion dương và ion âm

Thông số	Giá trị tối ưu	
	Chế độ ion dương	Chế độ ion âm
ISV (V)	5000	-4000
TEM (°C)	450	450
GS1 (psi)	25	25
GS2 (psi)	20	20
CUR (psi)	20	20
DP (V)	130	-130
EP (V)	9	-9
CAD (psi)	7	7

Bảng 4. Các điều kiện phân tích độc tố vi nấm bằng ESI(±)-MS/MS

Chất phân tích	Mảnh mẹ	Mảnh con	EP	CE	CXP
Aflatoxin B1	313	241/269	9/9	41/37	30/20
Aflatoxin B2	315	259/287	9/9	35/43	30/20
AflatoxinG1	329	243/215	10/10	39/33	35/18
Aflatoxin G2	331	245/285	10/10	47/41	11/26
Fumonisin B1	722	352/334	10/10	45/49	20/34
Zearalenone	317	175/131	-9/-9	-25/-25	-30/-30
Ochratoxin A	402	358/166.9	-10/-10	-24/-35	-25/-25

7. Tính kết quả

Dựa vào đường chuẩn tính hàm lượng của mỗi độc tố vi nấm theo công thức sau:

$$X (\mu g/kg) = \frac{C_x \times V \times k}{m}$$

Trong đó:

C_x : Nồng độ chất phân tích trong dịch tính theo đường chuẩn ($\mu g/L$)

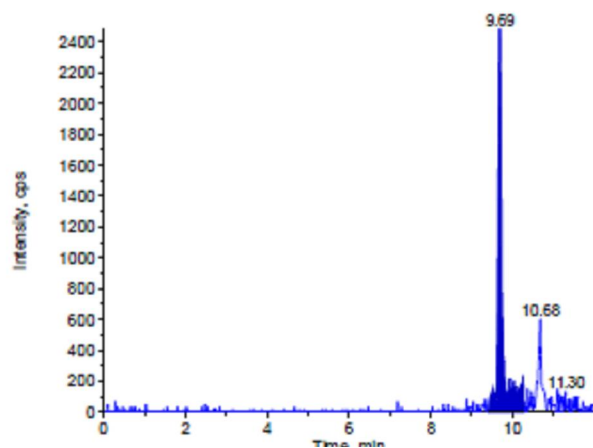
V là thể tích dung môi chiết (mL)

m là khối lượng mẫu (g)

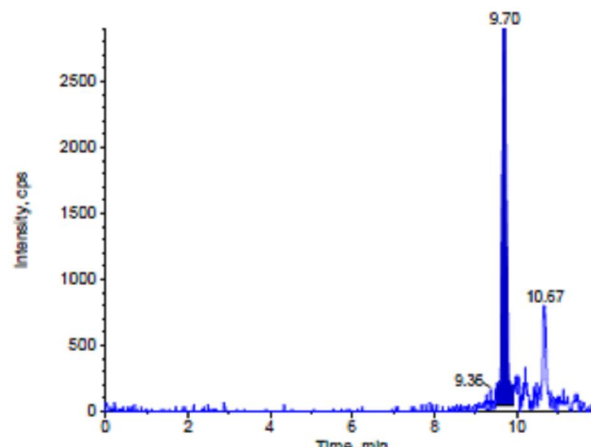
k: hệ số pha loãng mẫu (nếu có)

Phụ lục 4. Sắc ký đồ xây dựng và thẩm định phương pháp

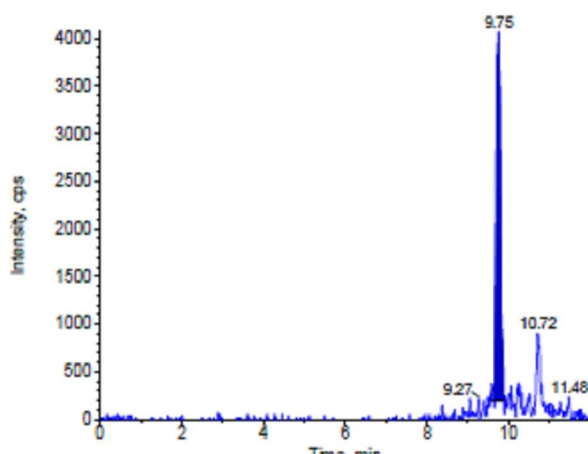
Nền mẫu lạc



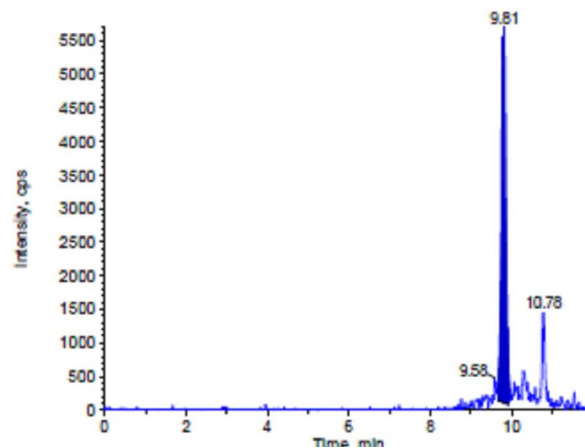
Lạc - Chuẩn AFB1 0,2 ng/mL



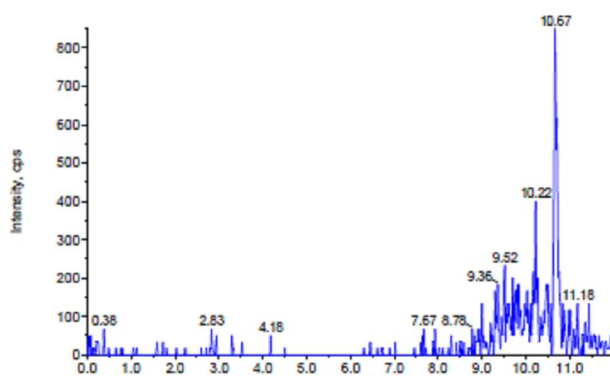
Lạc - Chuẩn AFB1 0,4 ng/mL



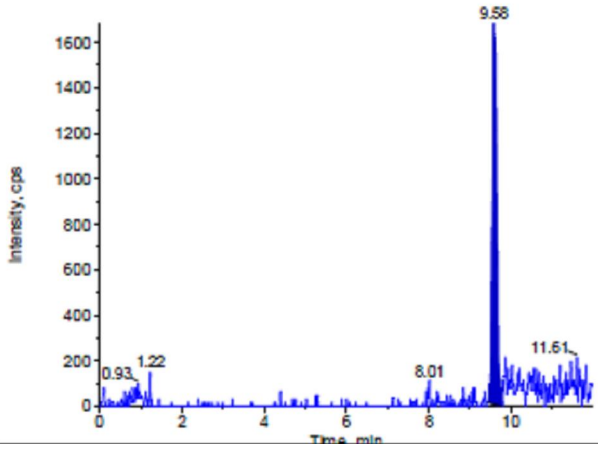
Lạc - Chuẩn AFB1 0,8 ng/mL



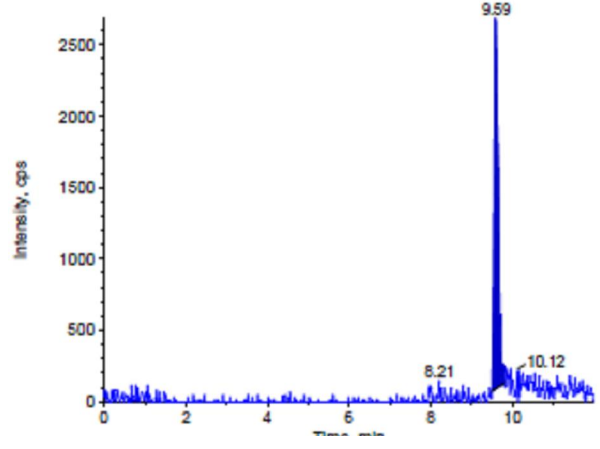
Lạc - Chuẩn AFB1 1,6 ng/mL



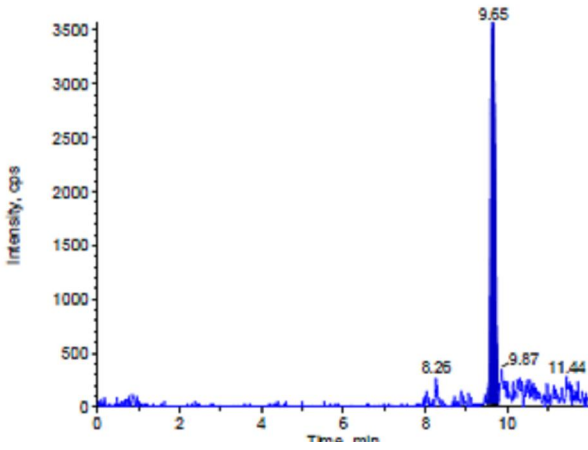
Lạc – Blank AFB1



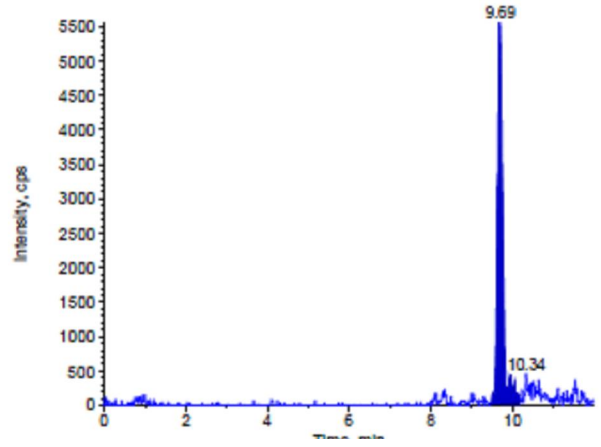
Lạc - Chuẩn AFB2 0,2 ng/mL



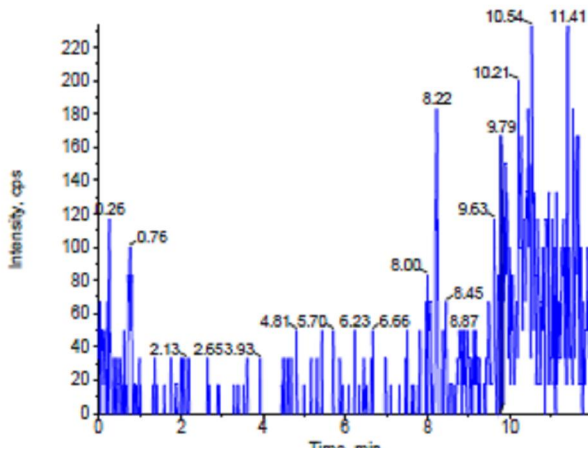
Lạc - Chuẩn AFB2 0,4 ng/mL



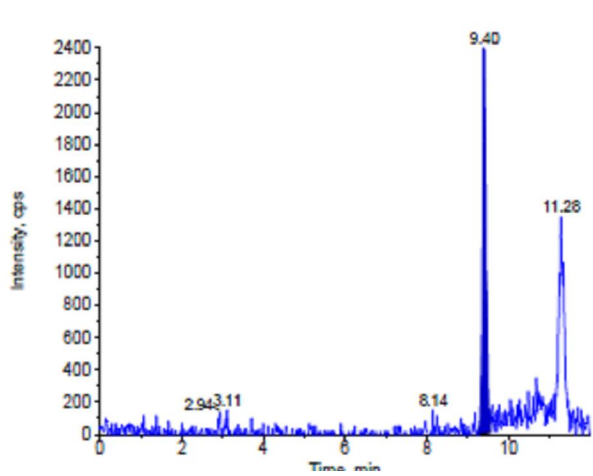
Lạc - Chuẩn AFB2 0,8 ng/mL



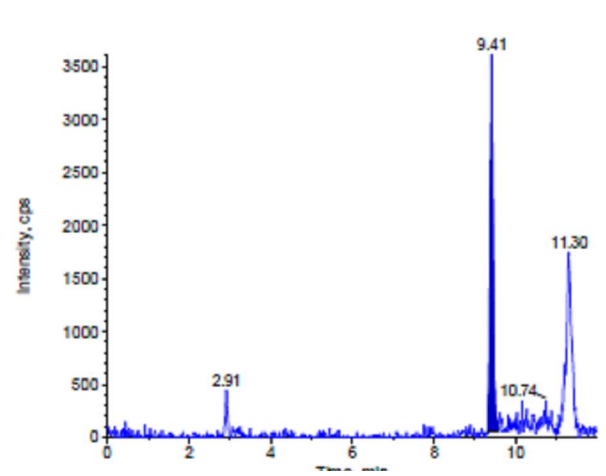
Lạc - Chuẩn AFB2 1,6 ng/mL



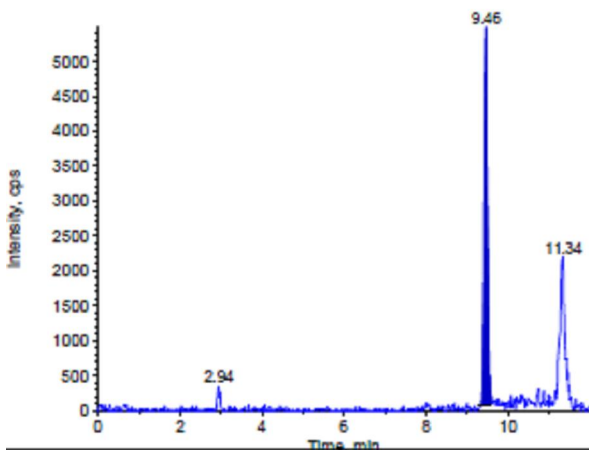
Lạc - Blank AFB2



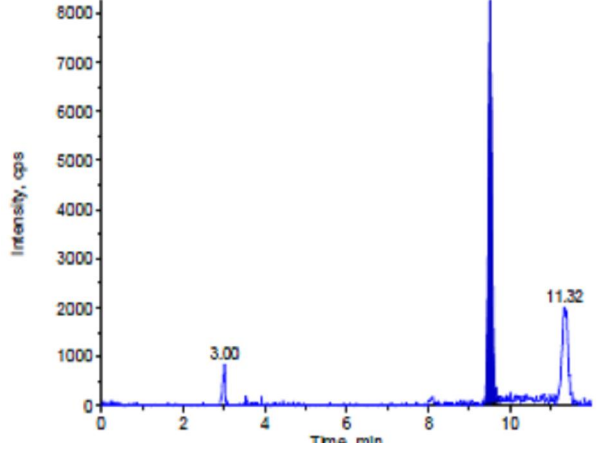
Lạc - Chuẩn AFG1 0,2 ng/mL



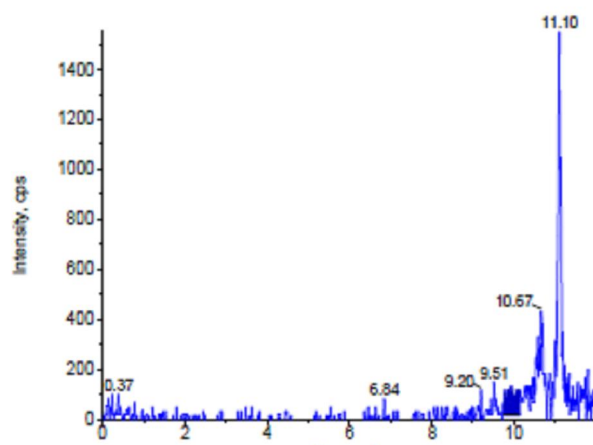
Lạc - Chuẩn AFG1 0,4 ng/mL



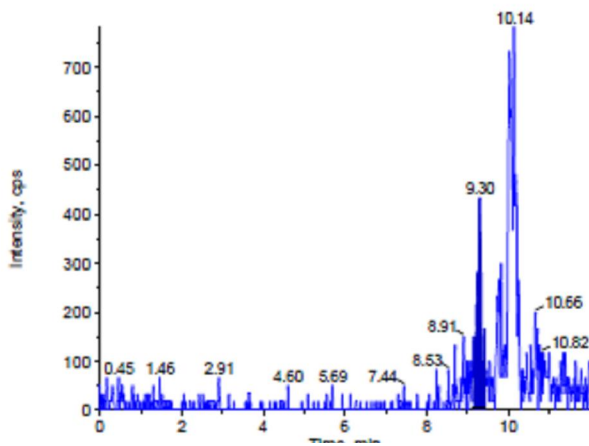
Lạc - Chuẩn AFG1 0,8 ng/mL



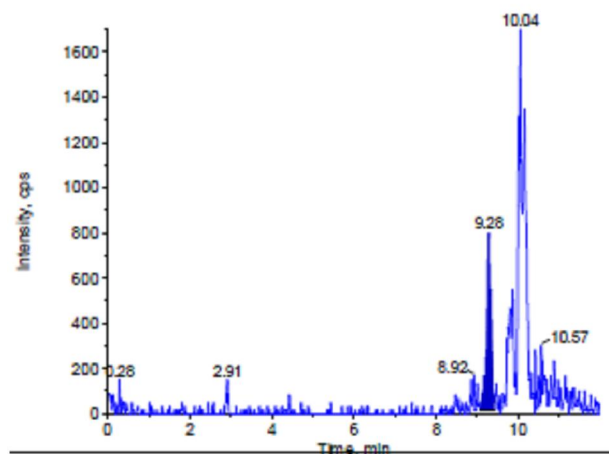
Lạc - Chuẩn AFG1 1,6 ng/mL



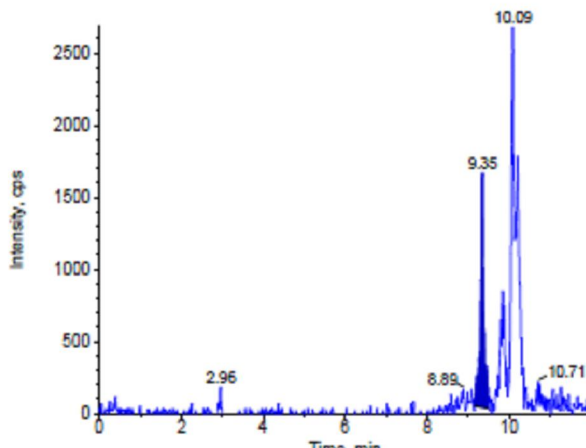
Lạc - Blank AFG1



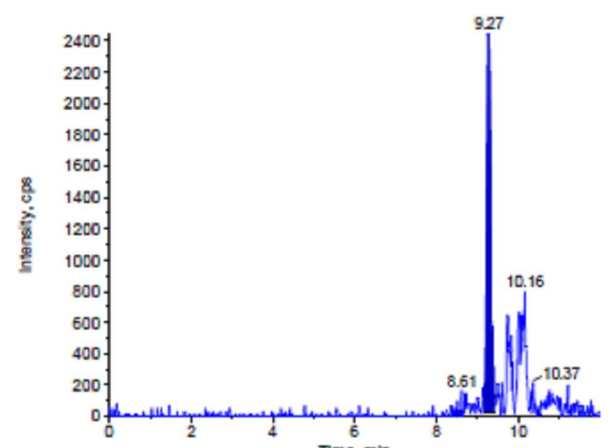
Lạc - Chuẩn AFG2 0,2 ng/mL



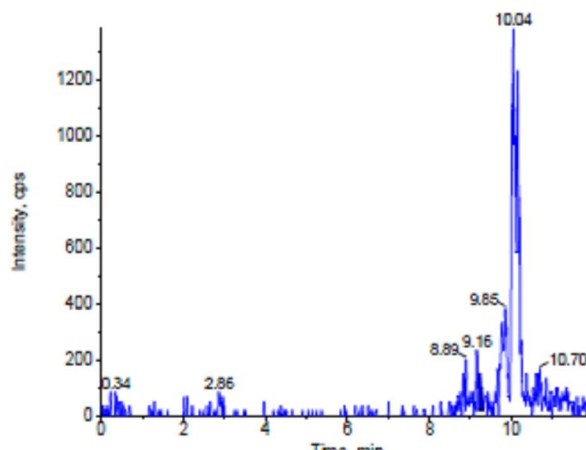
Lạc - Chuẩn AFG2 0,4 ng/mL



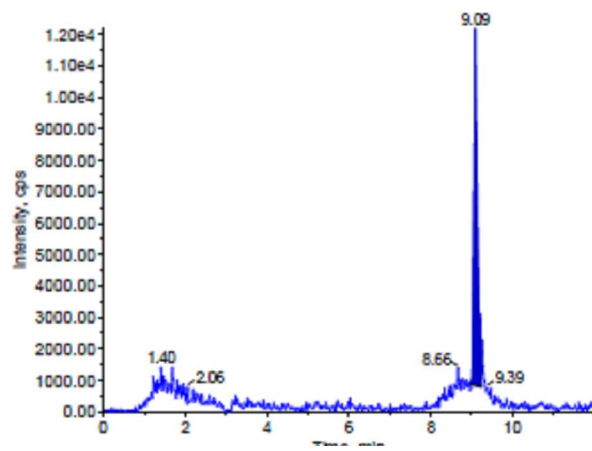
Lạc - Chuẩn AFG2 0,8 ng/mL



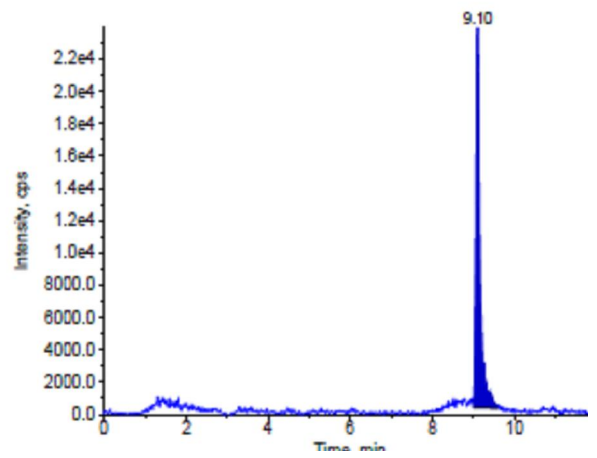
Lạc - Chuẩn AFG2 1,6 ng/mL



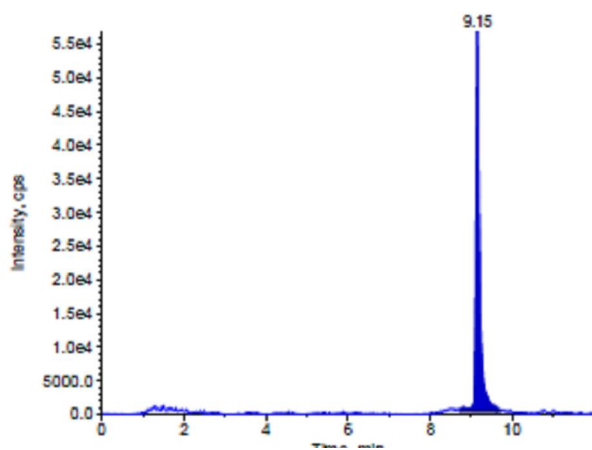
Lạc - Blank AFG2



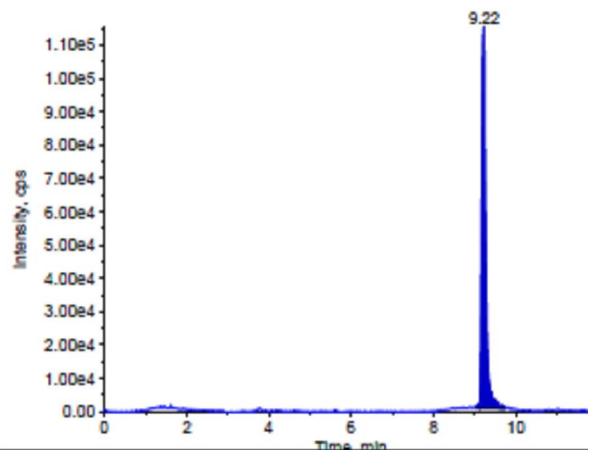
Lạc – Chuẩn FUB1 100 ng/mL



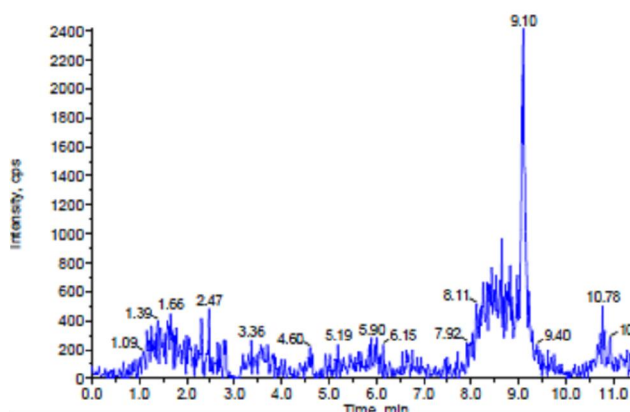
Lạc – Chuẩn FUB1 200 ng/mL



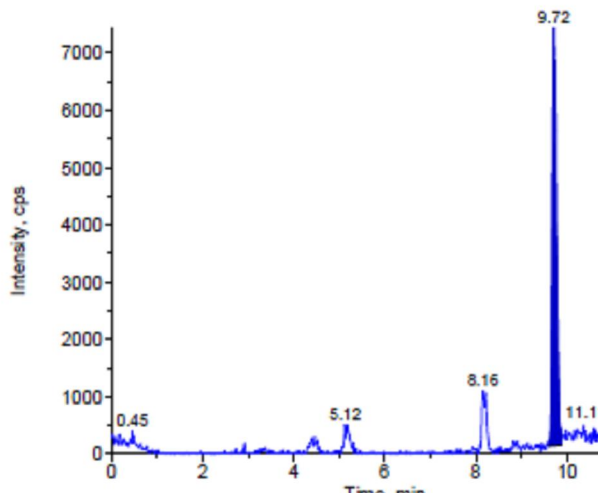
Lạc – Chuẩn FUB1 400 ng/mL



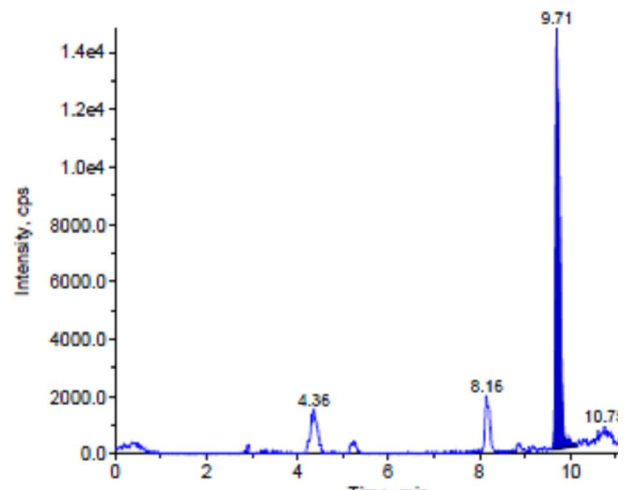
Lạc – Chuẩn FUB1 800 ng/mL



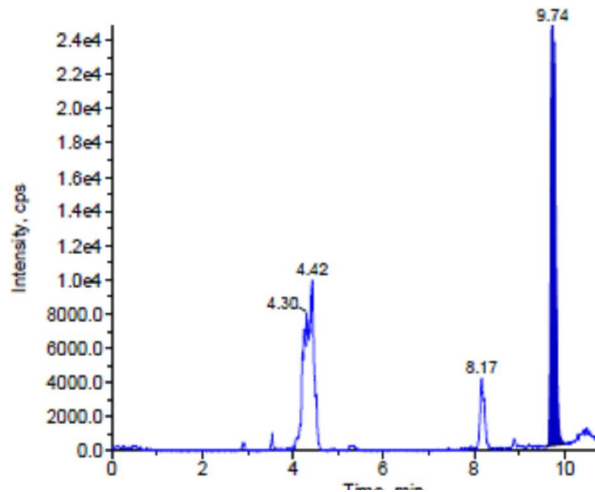
Lạc – Blank FUB1



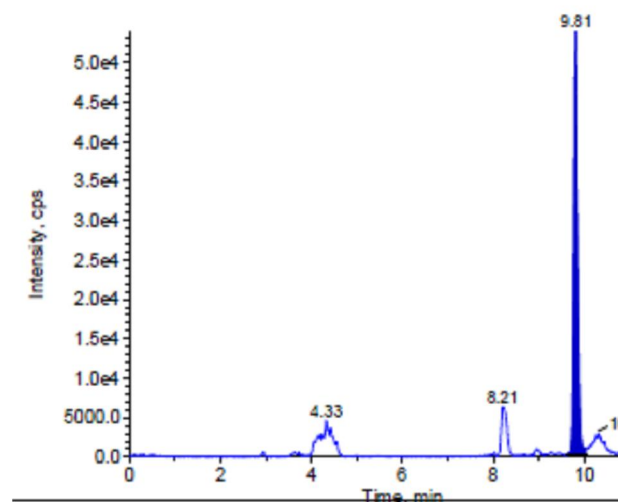
Lạc – Chuẩn OTA 1 ng/mL



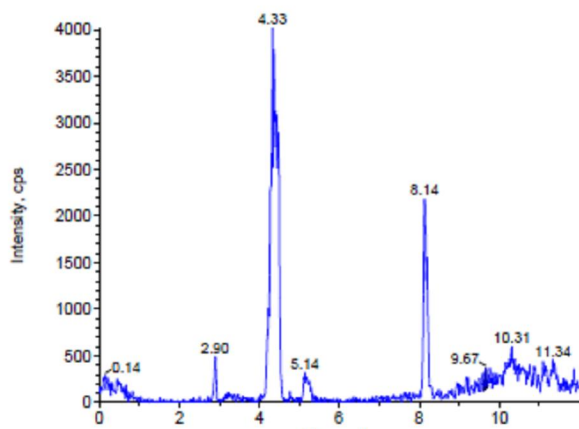
Lạc – Chuẩn OTA 2 ng/mL



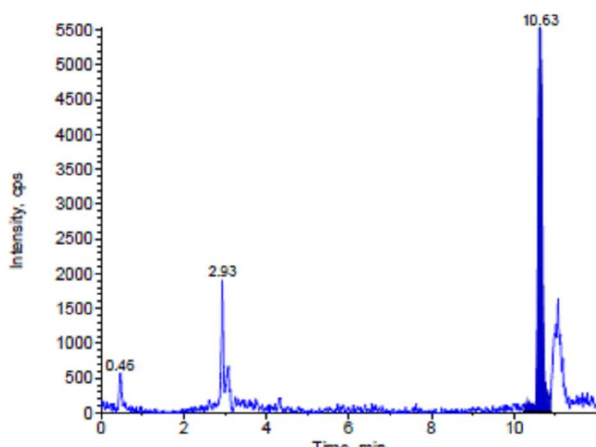
Lạc – Chuẩn OTA 4 ng/mL



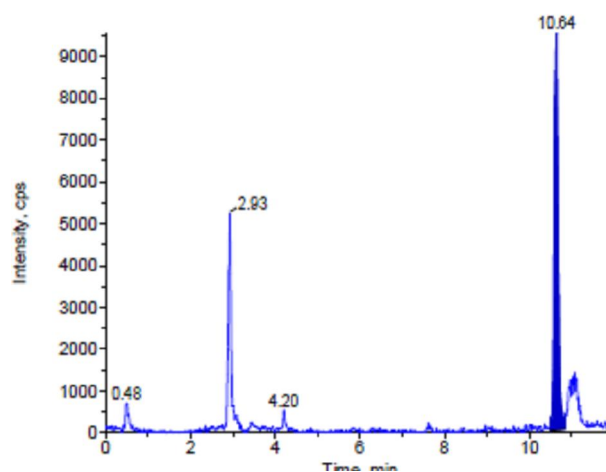
Lạc – Chuẩn OTA 8 ng/mL



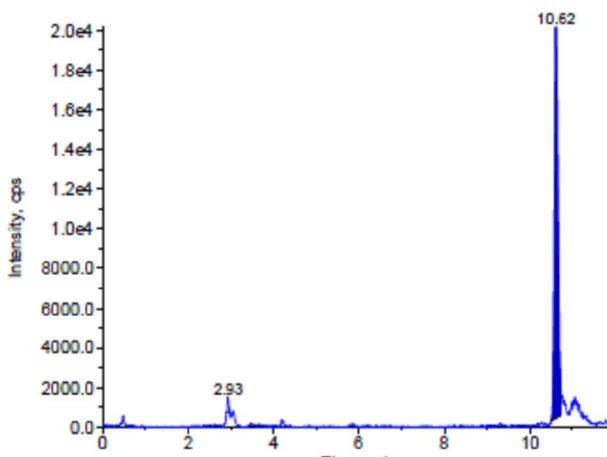
Lạc – Blank OTA



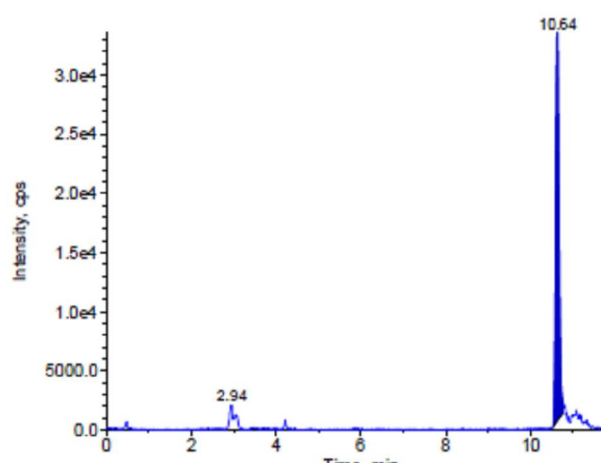
Lạc – Chuẩn ZEA 1 ng/mL



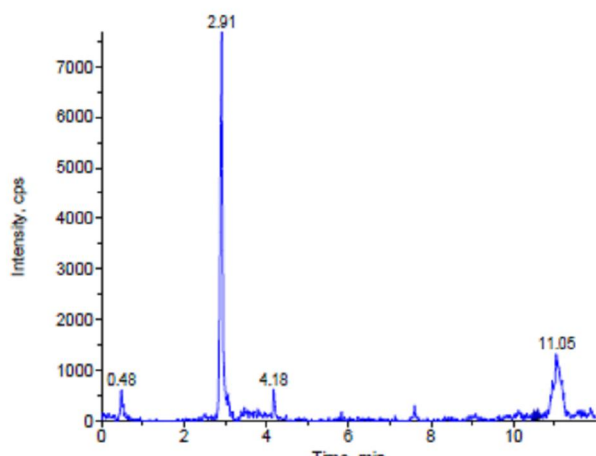
Lạc – Chuẩn ZEA 2 ng/mL



Lạc – Chuẩn ZEA 4 ng/mL

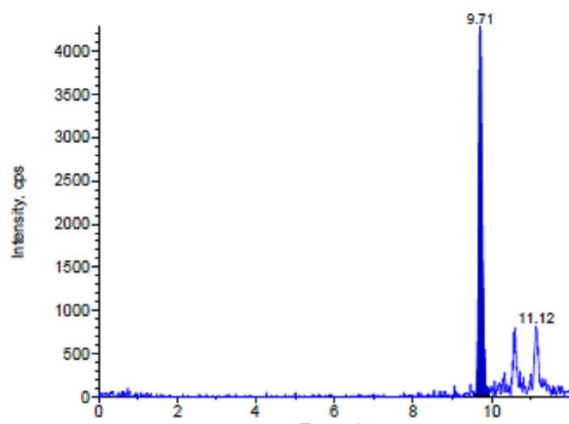


Lạc – Chuẩn ZEA 8 ng/mL

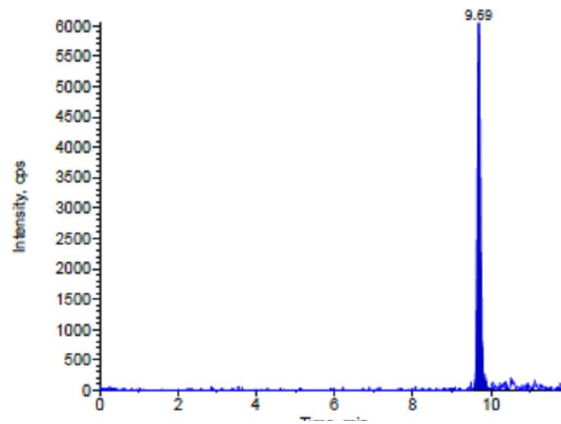


Lạc – Blank ZEA

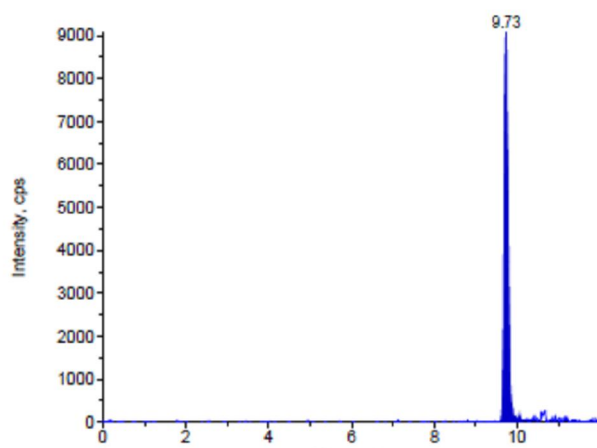
Nền mẫu ngô



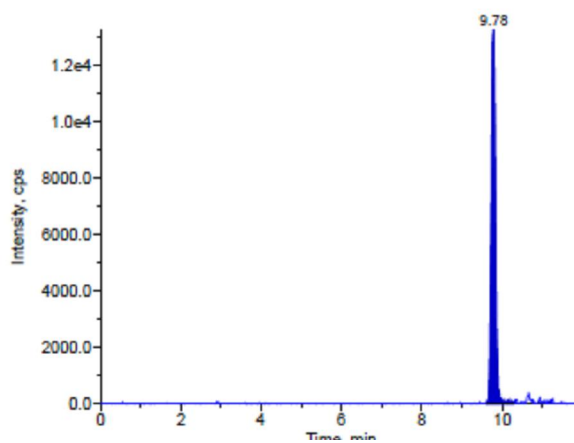
Ngô - Chuẩn AFB1 0,2 ng/mL



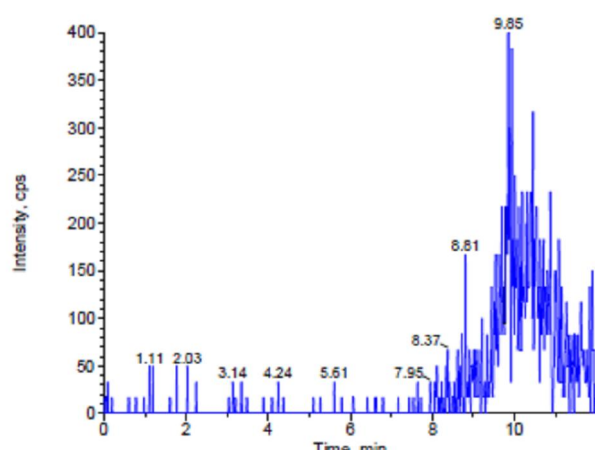
Ngô - Chuẩn AFB1 0,4 ng/mL



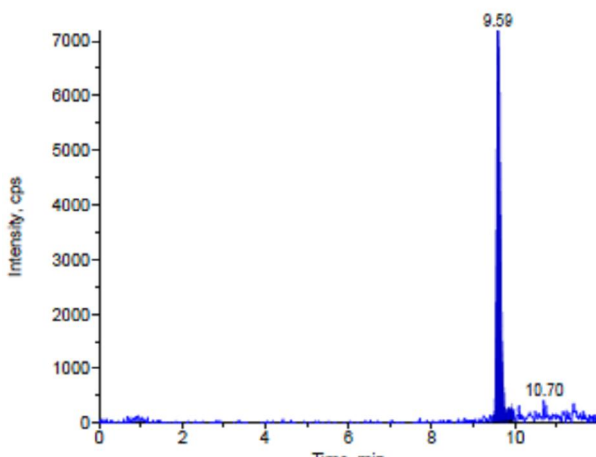
Ngô - Chuẩn AFB1 0,8 ng/mL



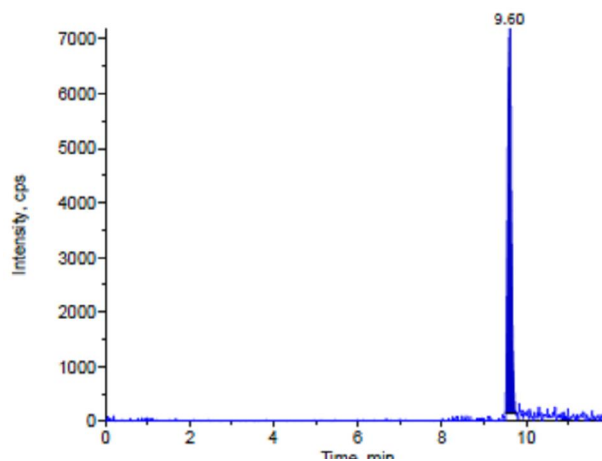
Ngô - Chuẩn AFB1 1,6 ng/mL



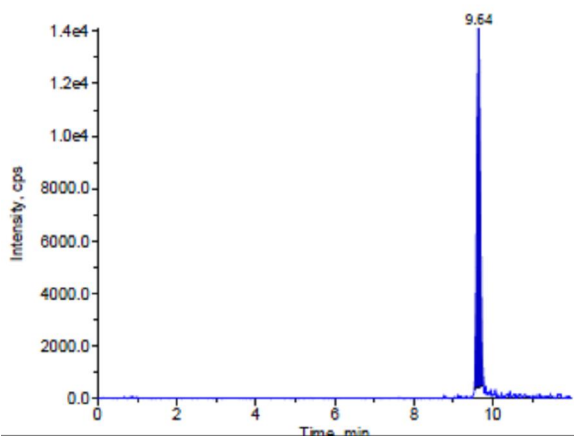
Ngô - Blank AFB1



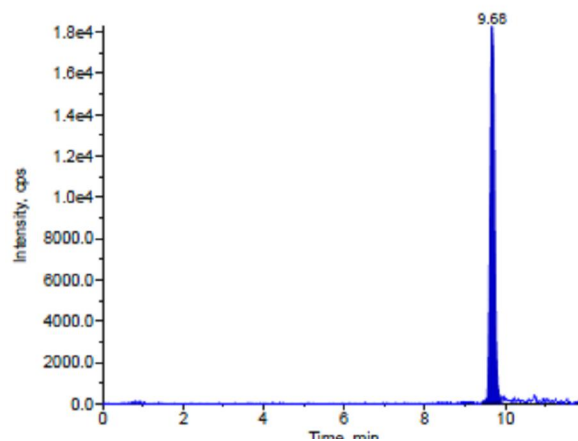
Ngô - Chuẩn AFB2 0,2 ng/mL



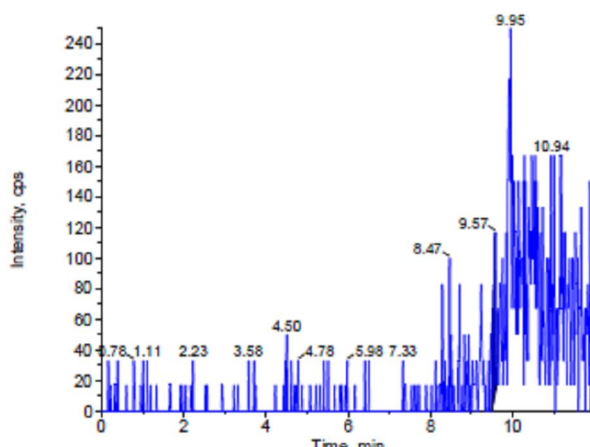
Ngô - Chuẩn AFB2 0,4 ng/mL



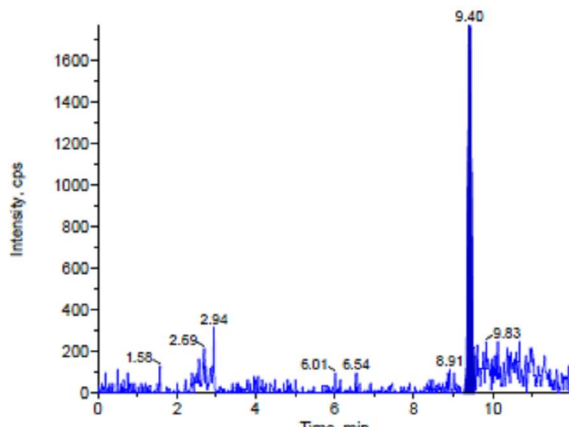
Ngô - Chuẩn AFB2 0,8 ng/mL



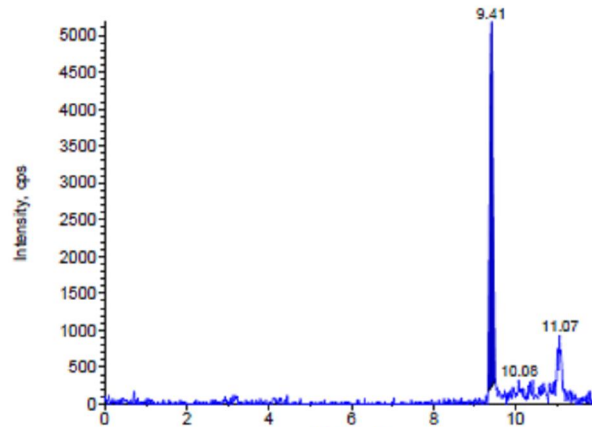
Ngô - Chuẩn AFB2 1,6 ng/mL



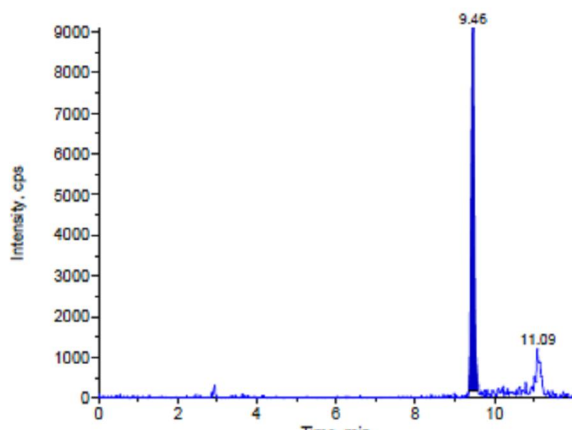
Ngô - Blank AFB2



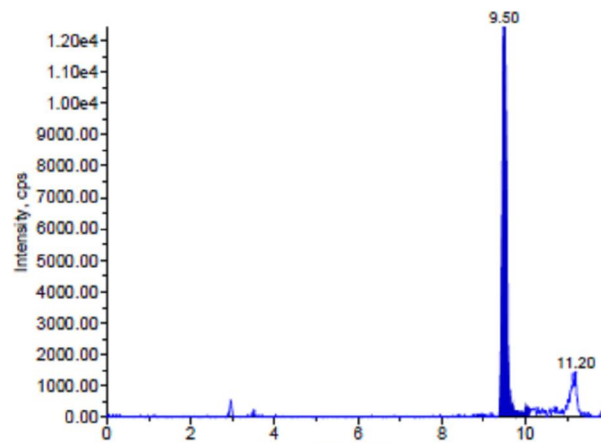
Ngô - Chuẩn AFG1 0,2 ng/mL



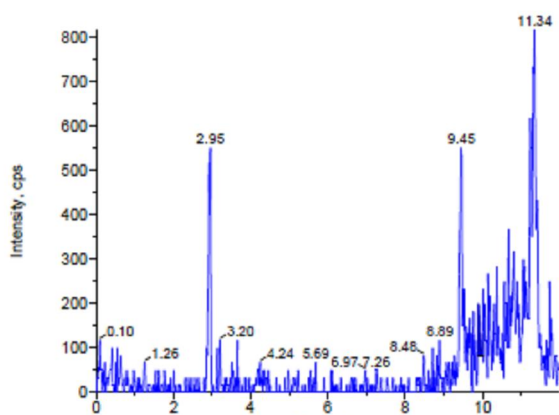
Ngô - Chuẩn AFG1 0,4 ng/mL



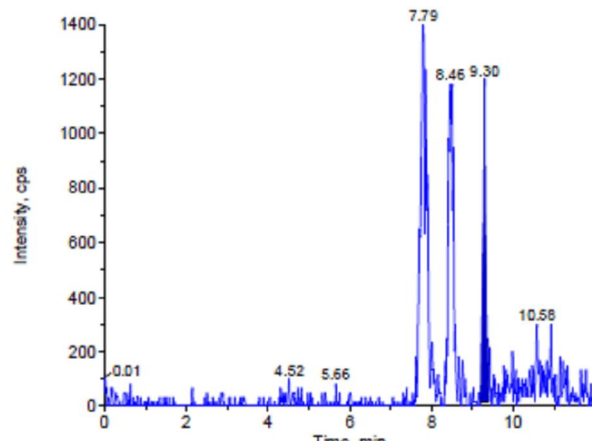
Ngô - Chuẩn AFG1 0,8 ng/mL



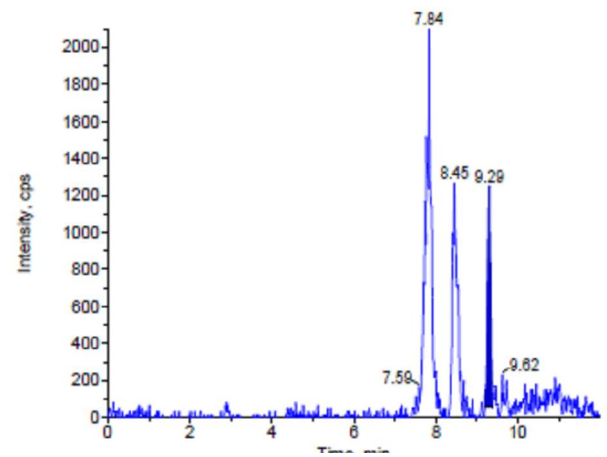
Ngô - Chuẩn AFG1 1,6 ng/mL



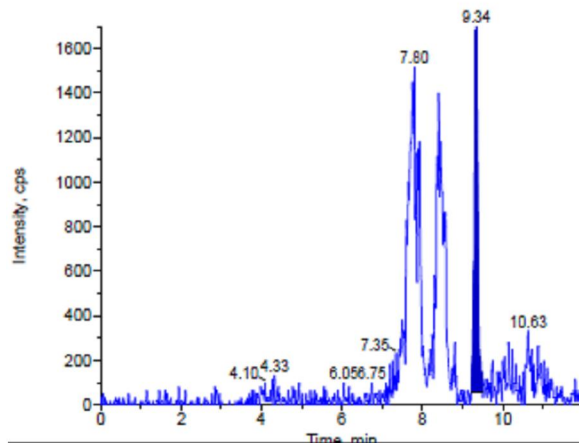
Ngô - Blank AFG1



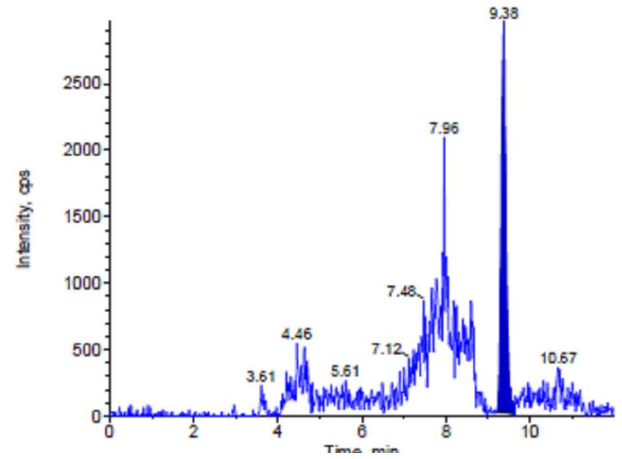
Ngô - Chuẩn AFG2 0,2 ng/mL



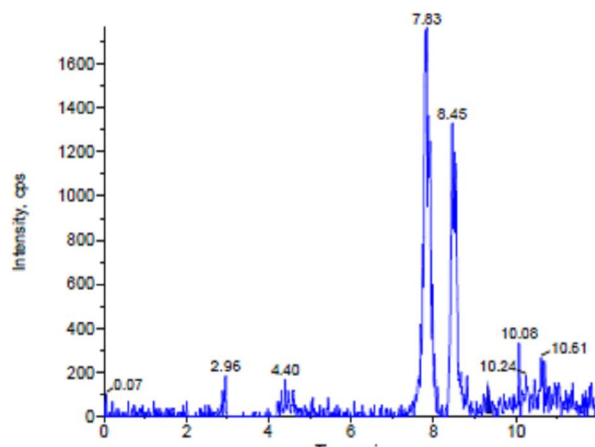
Ngô - Chuẩn AFG2 0,4 ng/mL



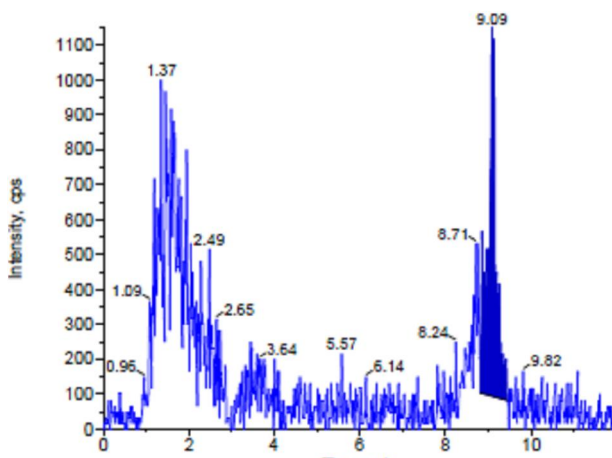
Ngô - Chuẩn AFG2 0,8 ng/mL



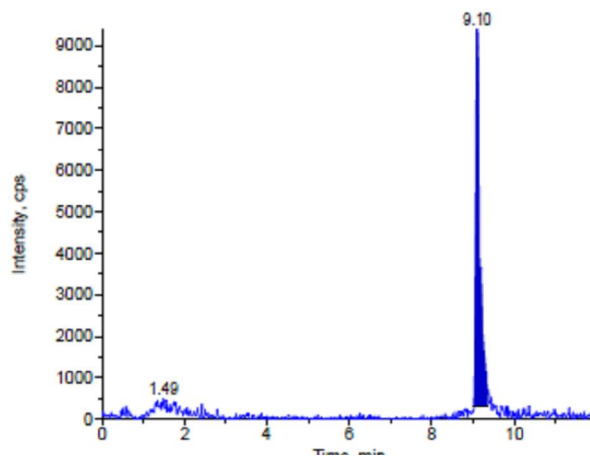
Ngô - Chuẩn AFG2 1,6 ng/mL



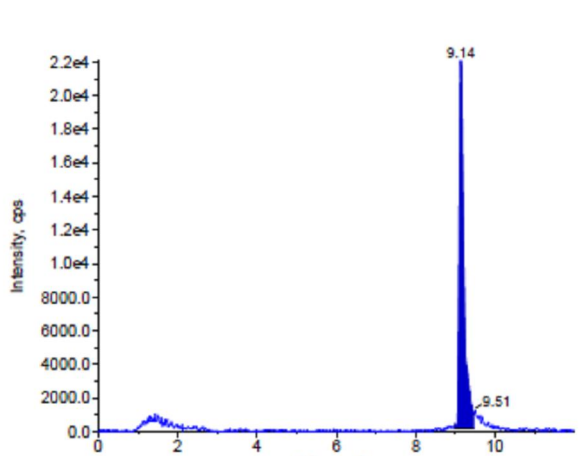
Ngô - Blank AFG2



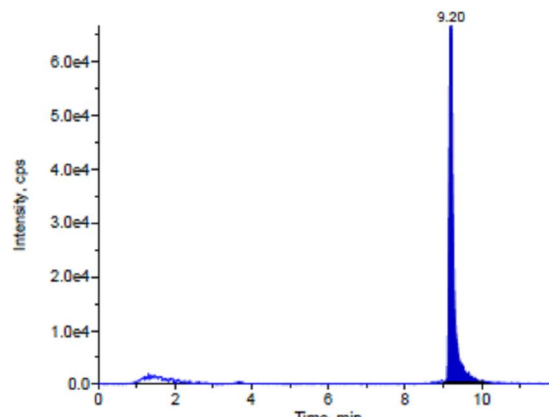
Ngô – Chuẩn FUB1 100 ng/mL



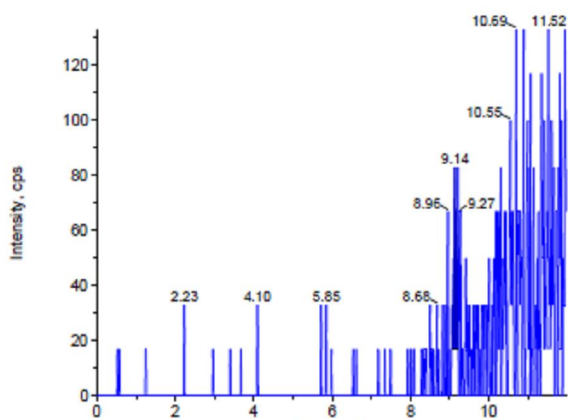
Ngô – Chuẩn FUB1 200 ng/mL



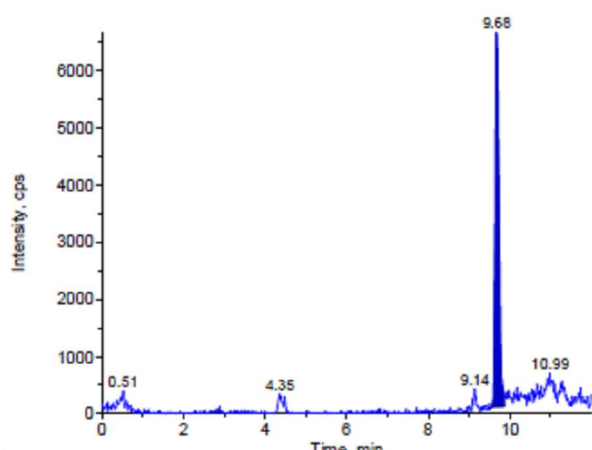
Ngô – Chuẩn FUB1 400 ng/mL



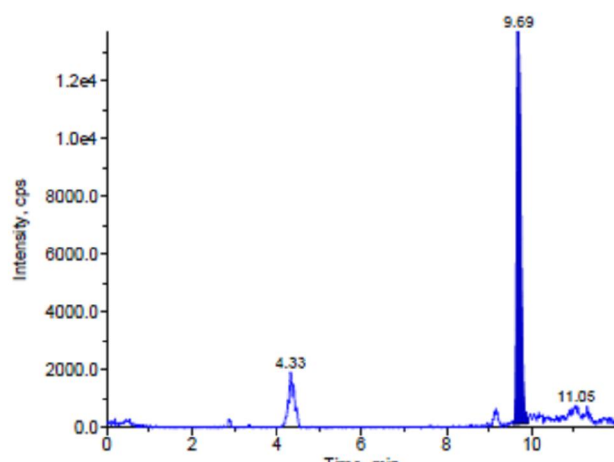
Ngô – Chuẩn FUB1 800 ng/mL



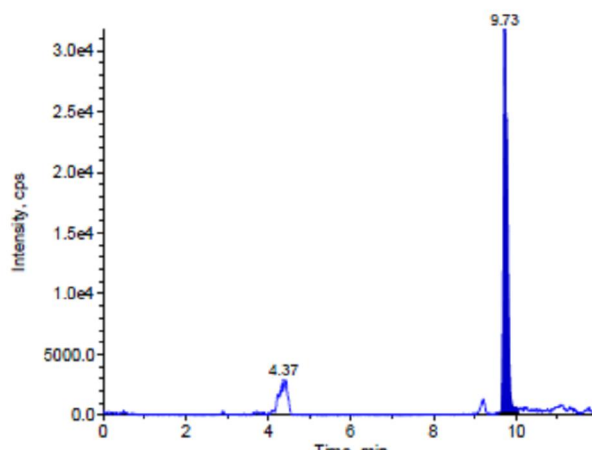
Ngô – Blank FUB1



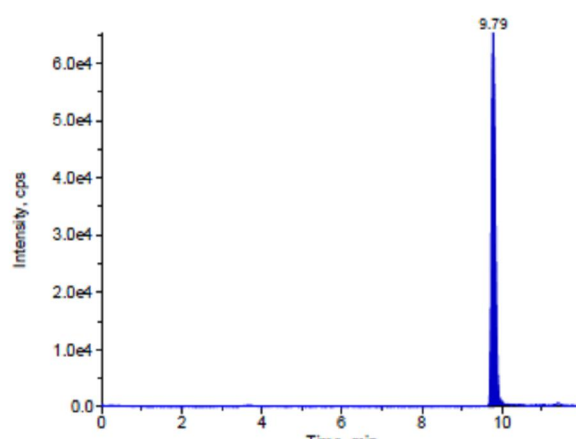
Ngô – Chuẩn OTA 1 ng/mL



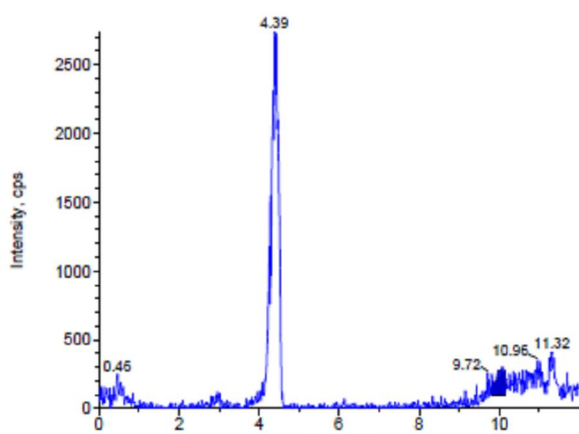
Ngô – Chuẩn OTA 2 ng/mL



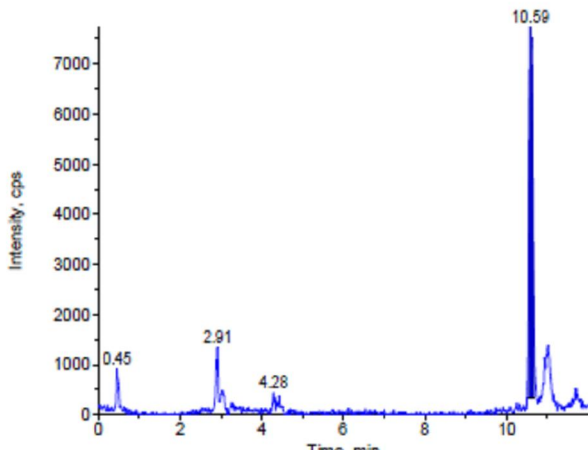
Ngô – Chuẩn OTA 4 ng/mL



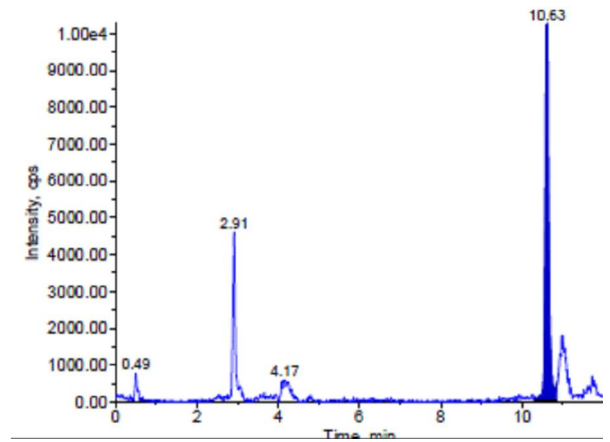
Ngô – Chuẩn OTA 8 ng/mL



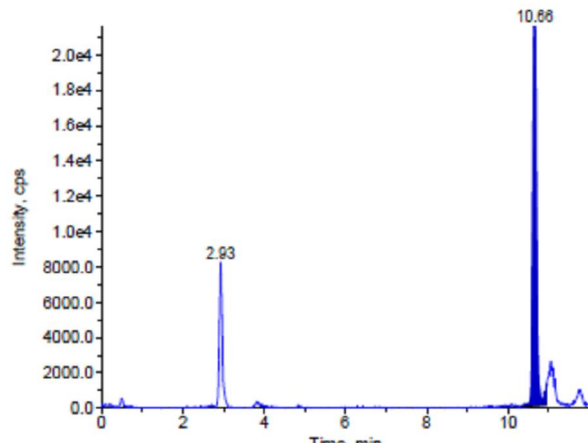
Ngô – Blank OTA



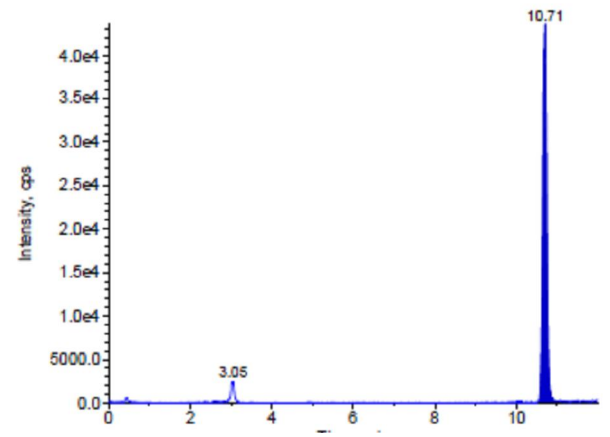
Ngô – Chuẩn ZEA 1 ng/mL



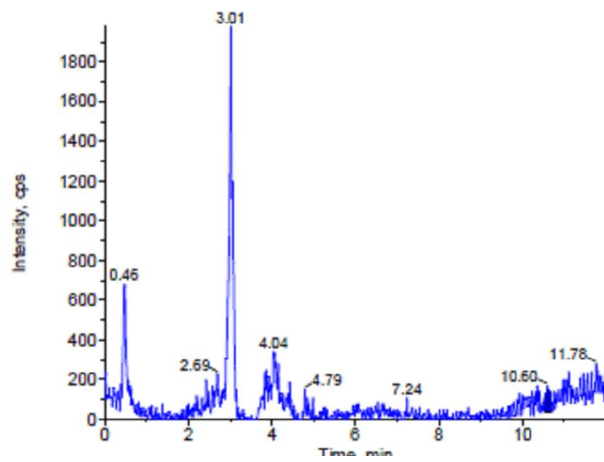
Ngô – Chuẩn ZEA 2 ng/mL



Ngô – Chuẩn ZEA 4 ng/mL

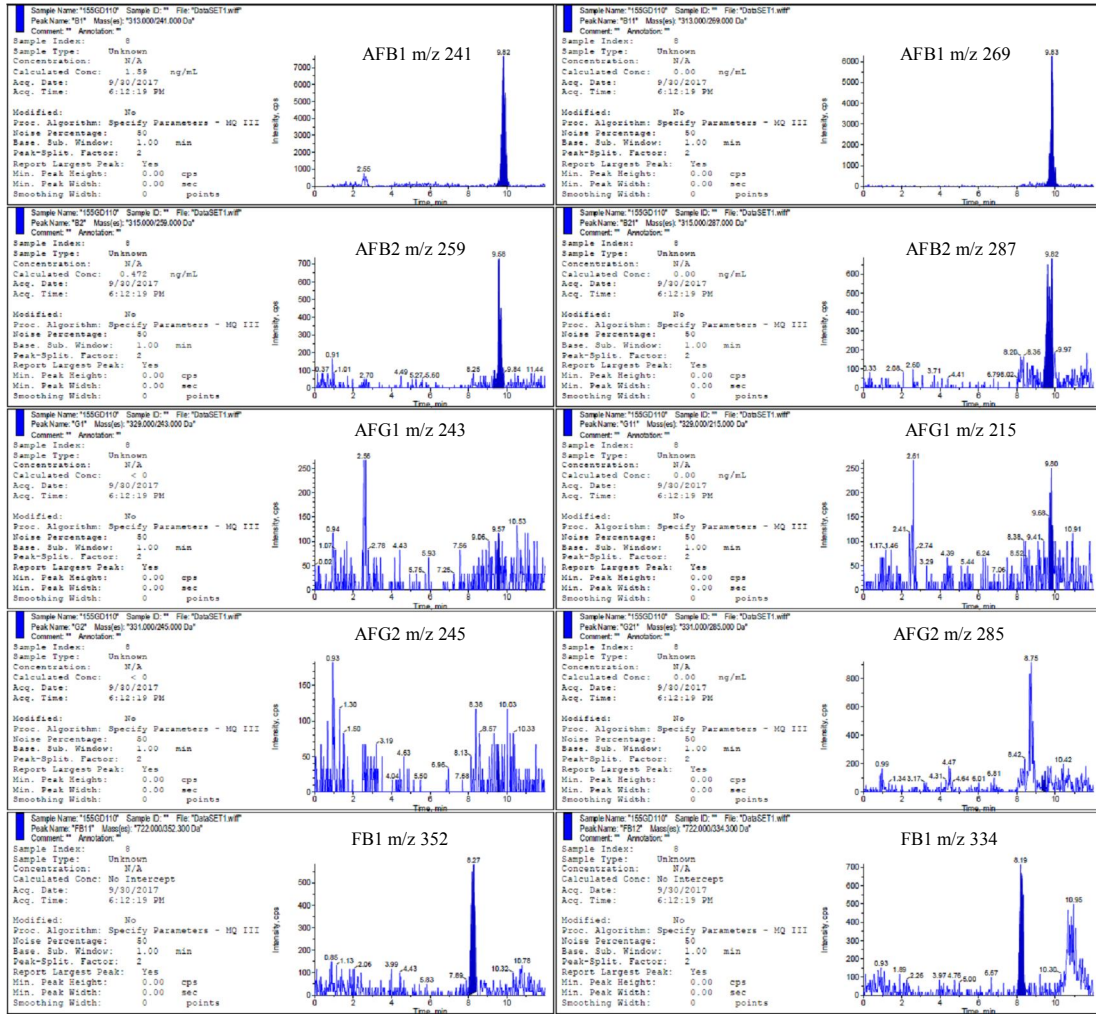


Ngô – Chuẩn ZEA 8 ng/mL

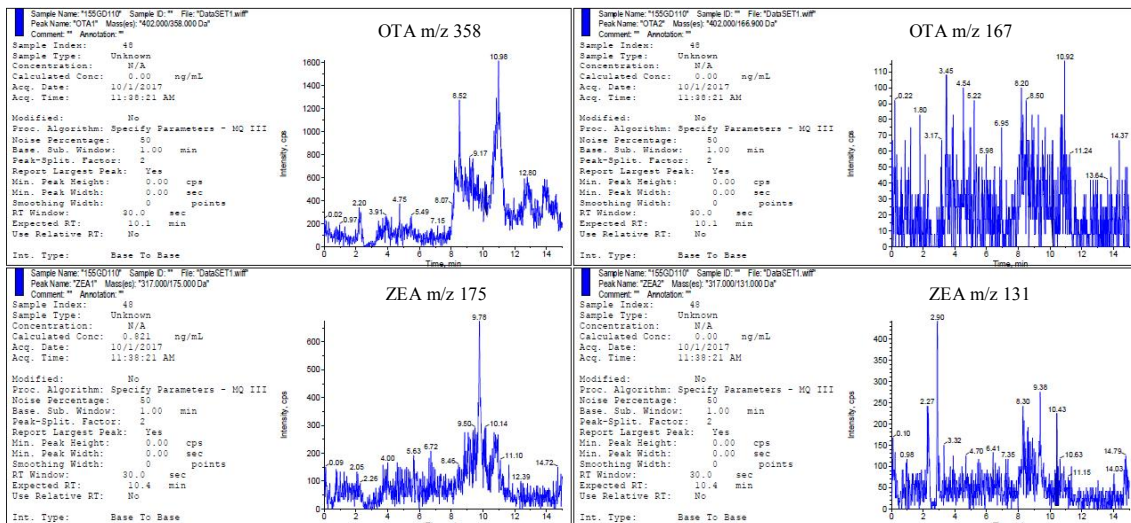


Ngô – Blank ZEA

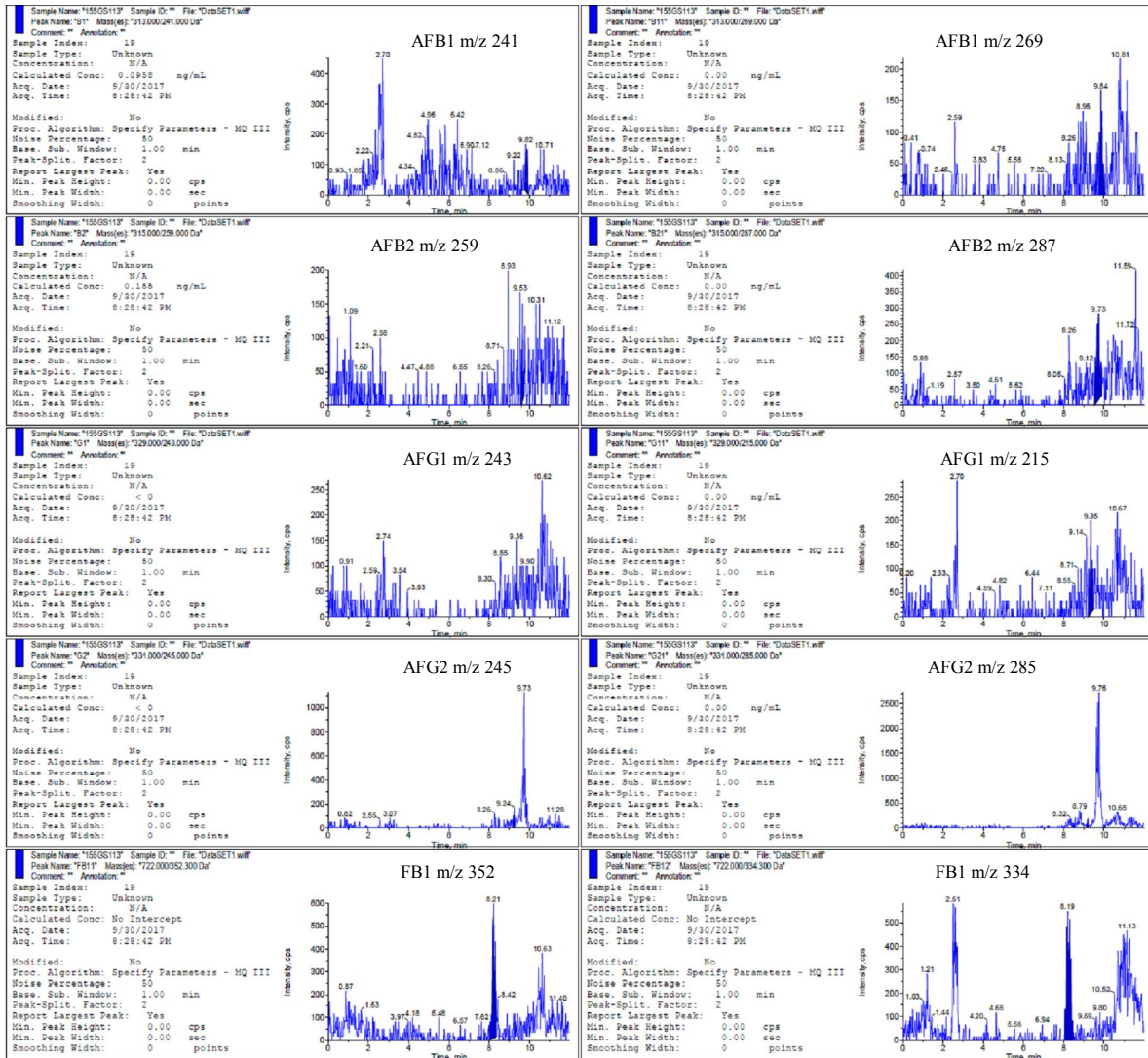
Phụ lục 5. Một số sắc ký đồ phân tích mẫu



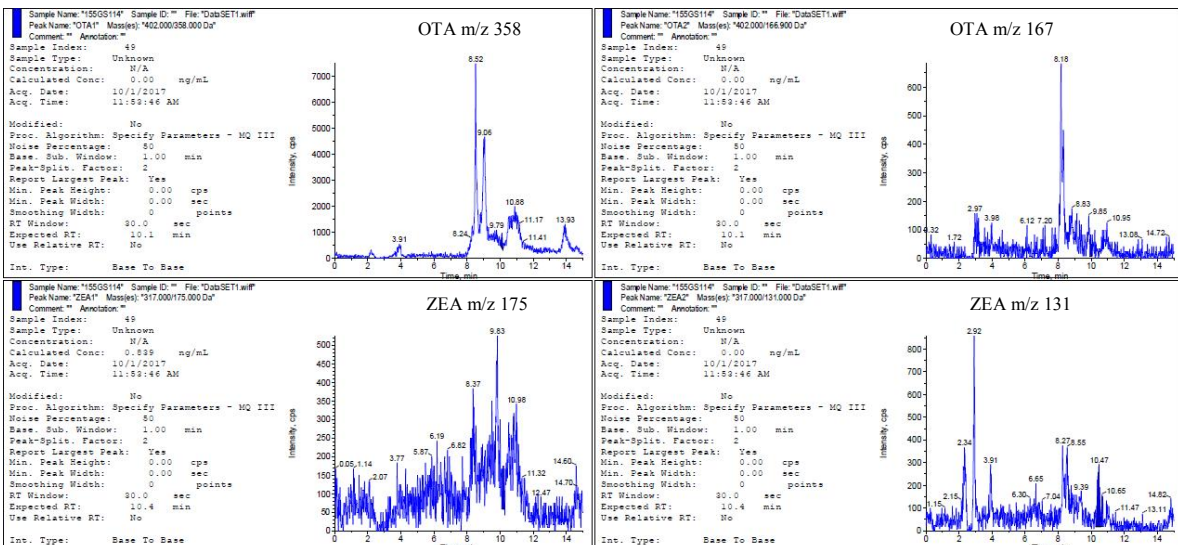
Mẫu ngô tại Bắc Giang phát hiện AFB1, AFB2 và FUB1



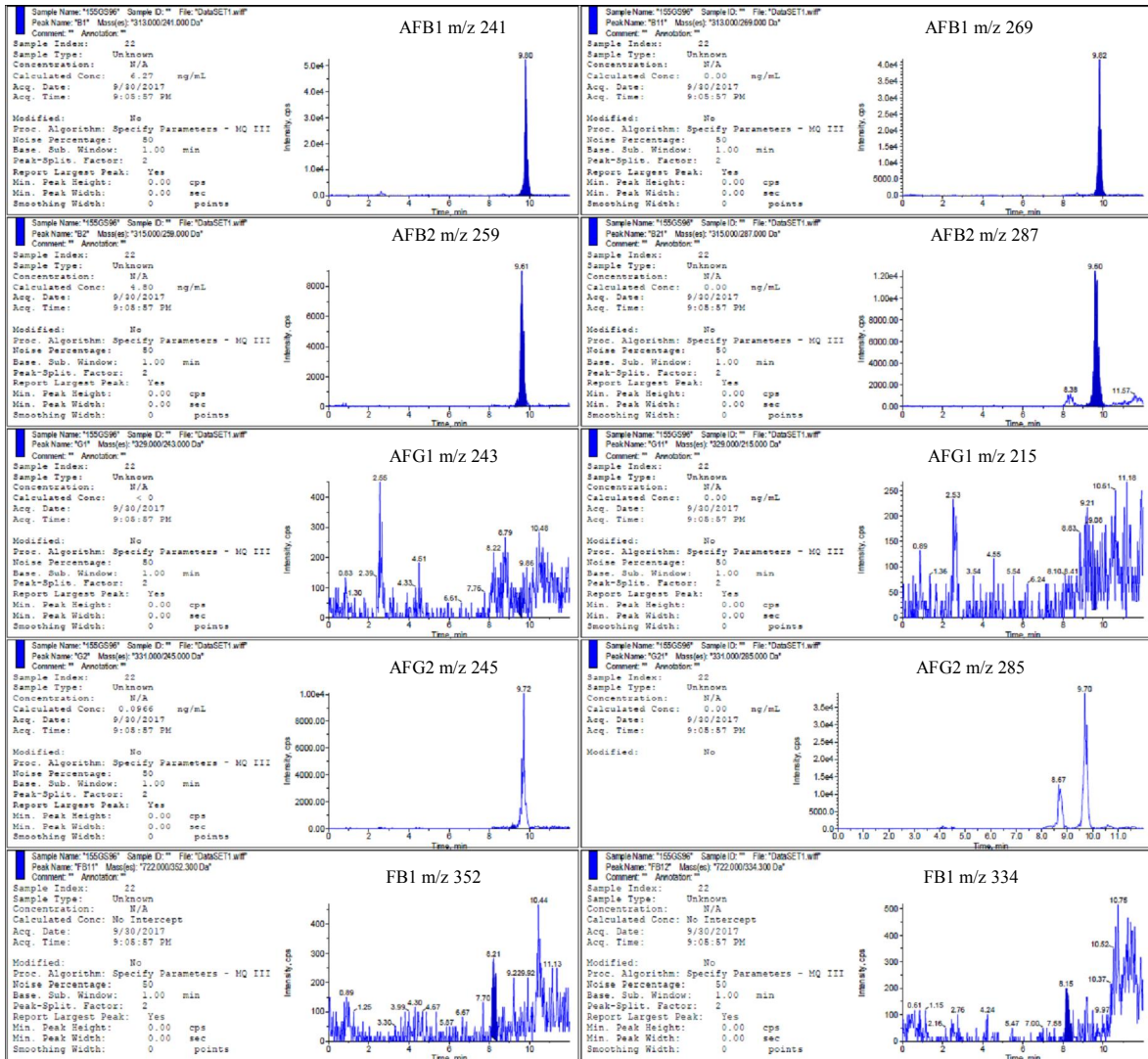
Mẫu ngô tại Bắc Giang không phát hiện OTA, ZEA



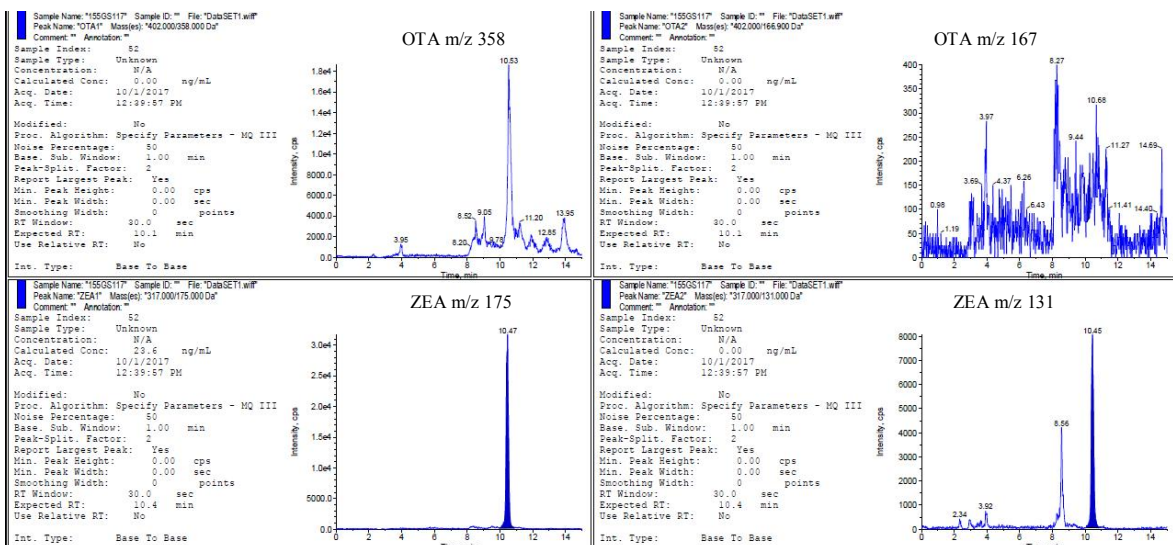
Mẫu ngô tại Hà Nội phát hiện FUB1, không phát hiện AF



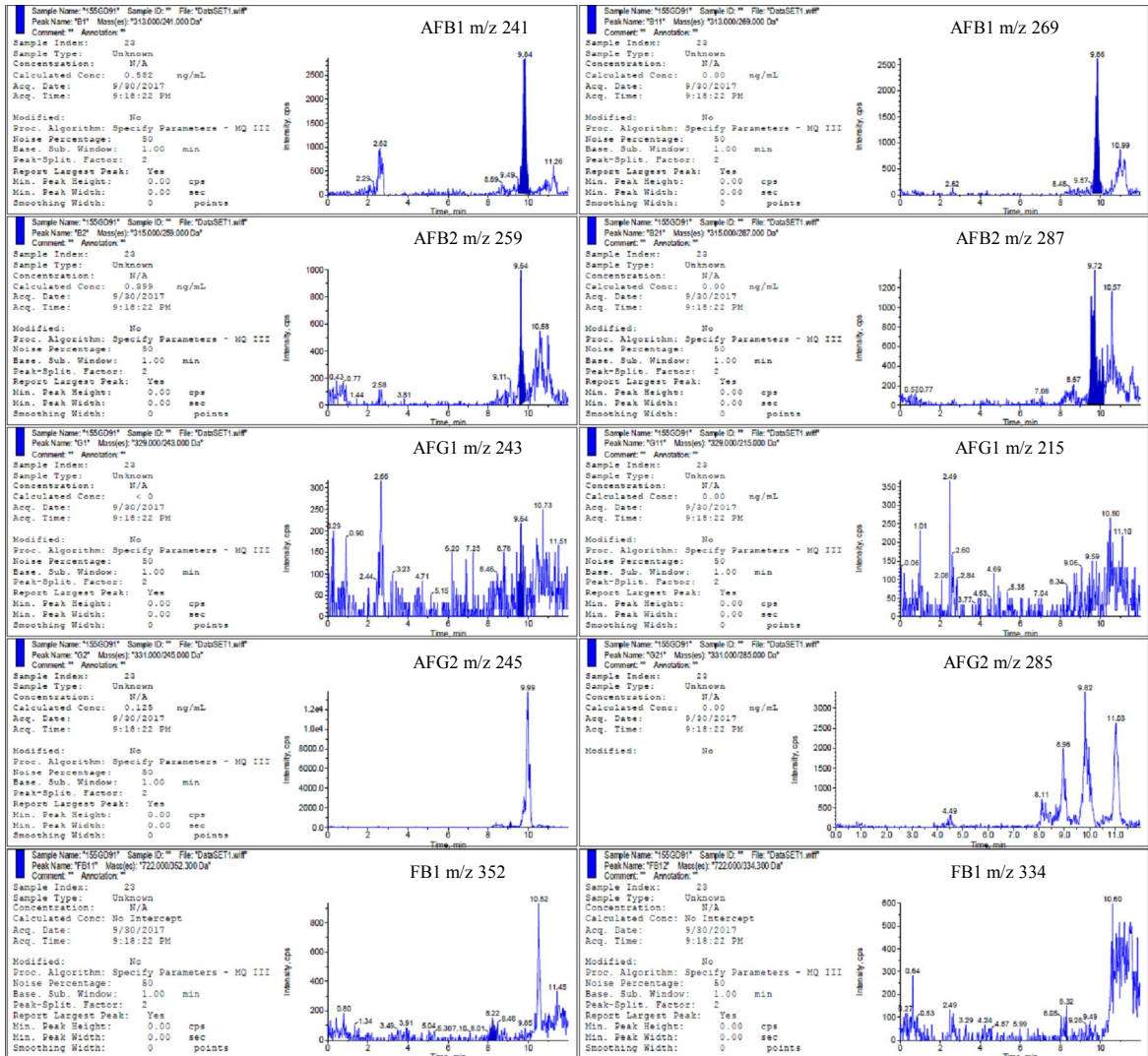
Mẫu vùng tại Hà Nội không phát hiện OTA, ZEA



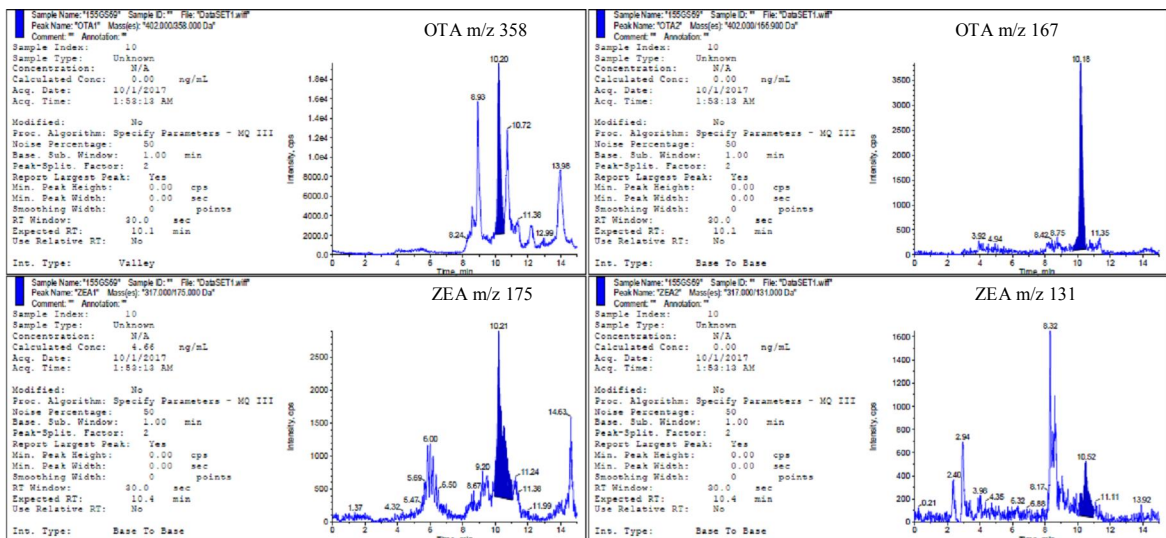
Mẫu ngô tại Hà Giang phát hiện AFB1, AFB2 và FUB1



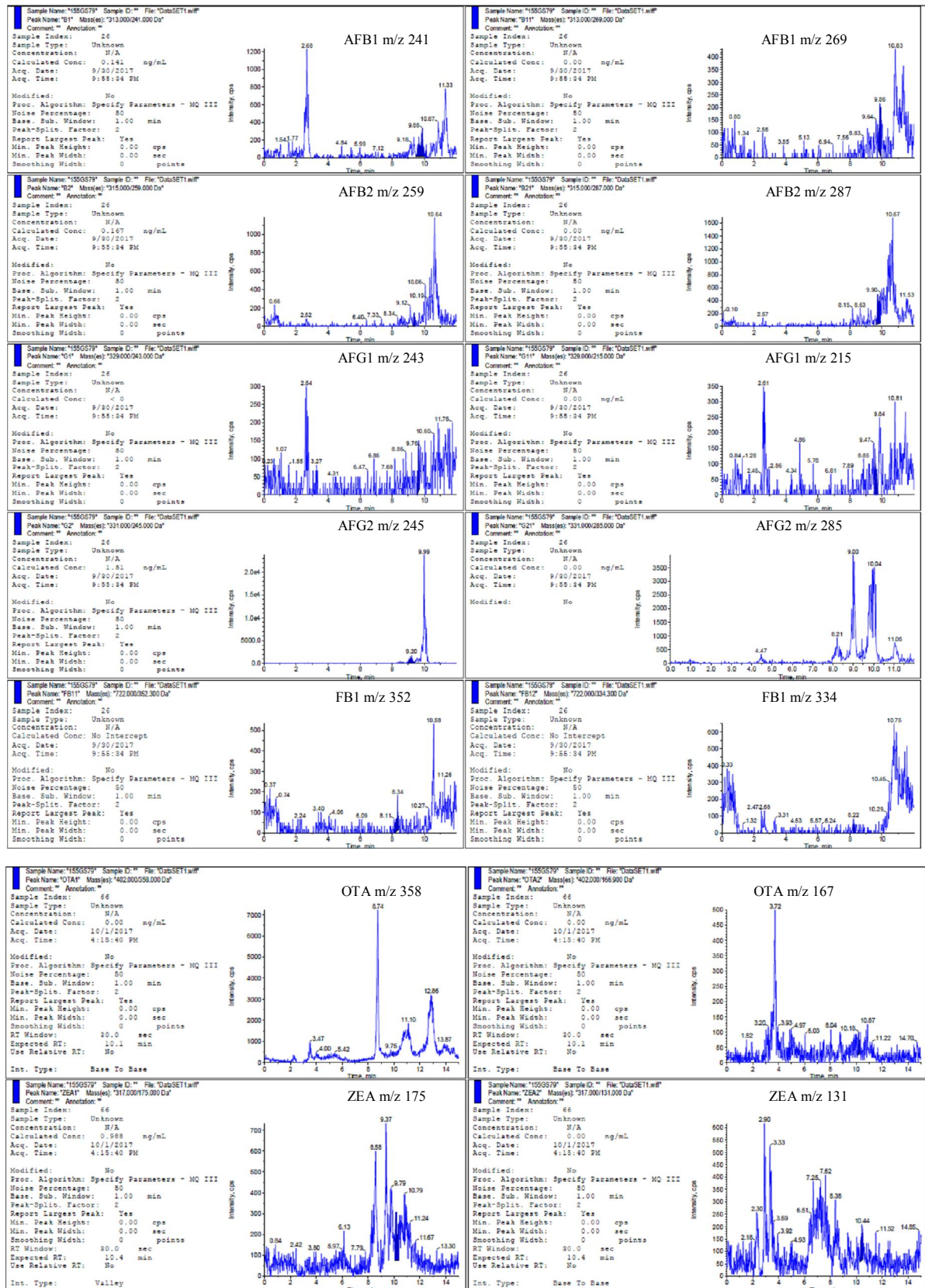
Mẫu lạc tại Hà Giang phát hiện ZEA



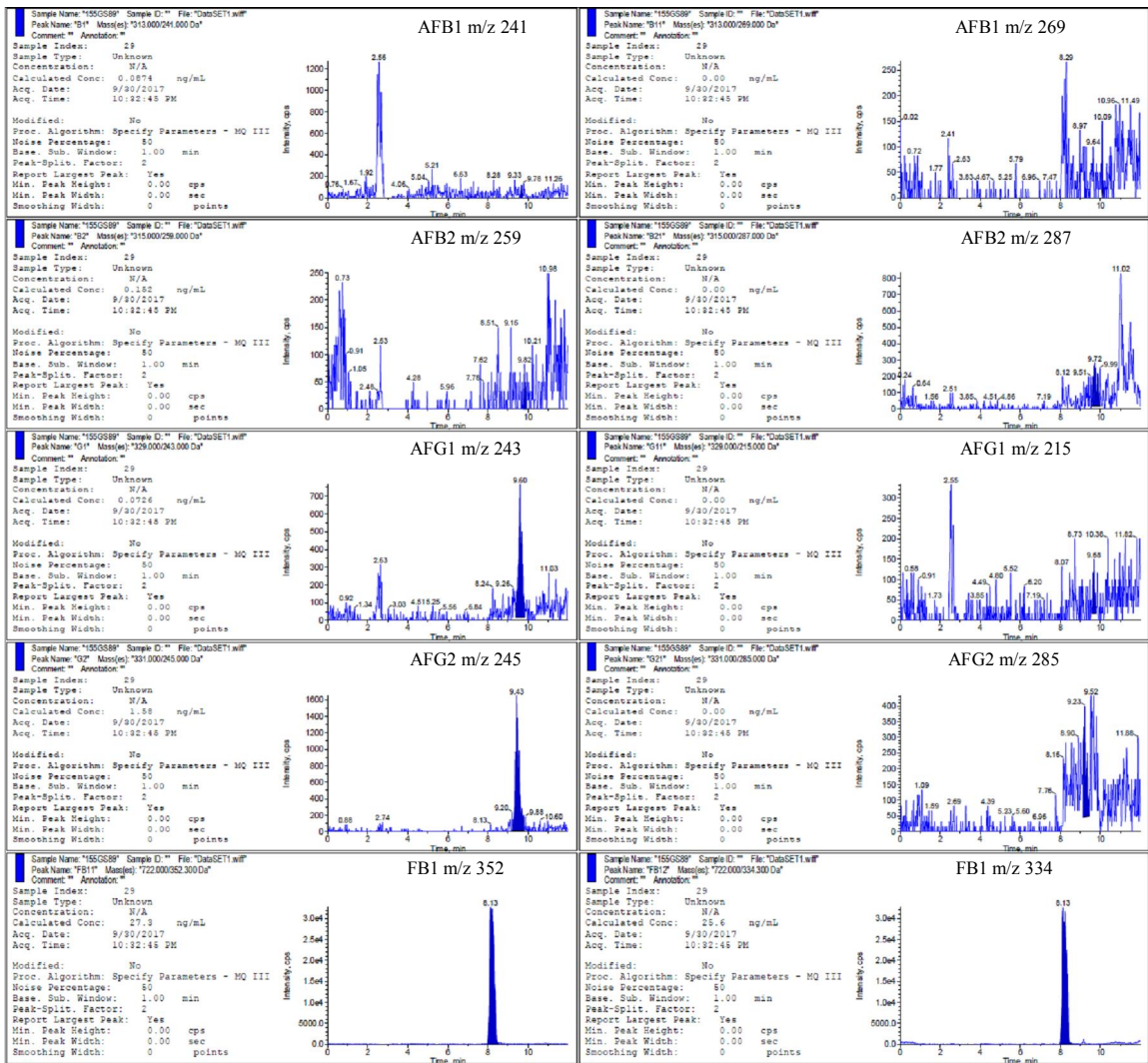
Mẫu gạo tại Thái Bình phát hiện AFB1



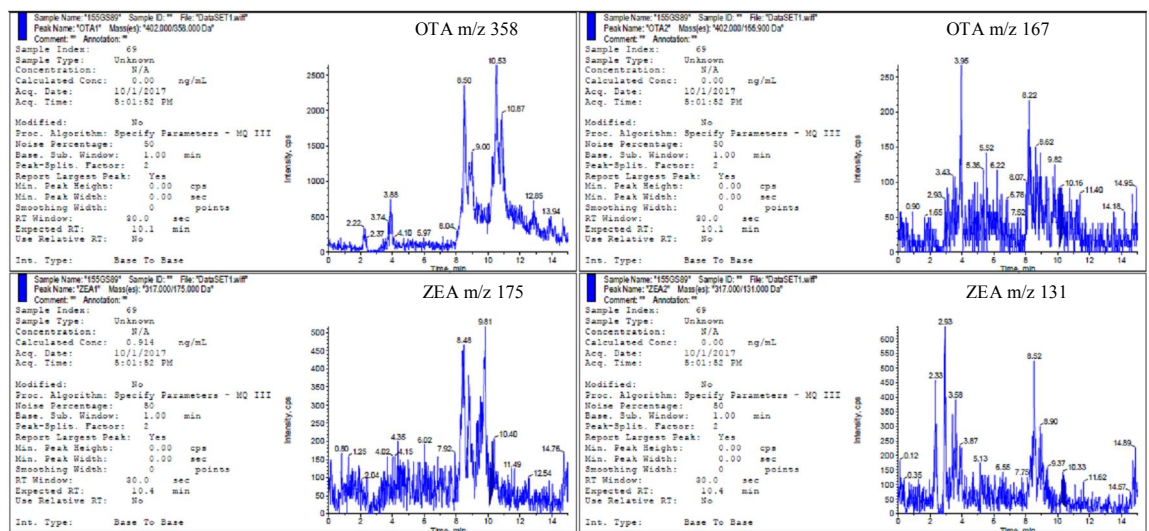
Mẫu ngô tại Thái Bình phát hiện OTA, ZEA



Mẫu vùng tại Thanh Hóa không phát hiện ĐTVN



Mẫu ngô tại Hà Nội phát hiện FUB1



Mẫu ngô tại Hà Nội không phát hiện OTA, ZEA

Phụ lục 6. Liều phơi nhiễm của các độc tố vi nấm

Bảng PL6.1. Liều phơi nhiễm của AFB1 và FUB1 (ng/kg bw/ngày)

<i>Thực phẩm</i>	<i>Địa điểm</i>	<i>Nhóm tuổi</i>	<i>AFB1</i>				<i>FUB1</i>			
			<i>Trung bình</i>		<i>P95</i>		<i>Trung bình</i>		<i>P95</i>	
			<i>LB</i>	<i>UB</i>	<i>LB</i>	<i>UB</i>	<i>LB</i>	<i>UB</i>	<i>LB</i>	<i>UB</i>
Gạo	Bắc Giang	3-6	2,9	3,8	4,5	5,8	0	226,0	0	342,9
		7-11	2,4	3,1	5,2	6,8	0	184,7	0	400,3
		12-18	1,8	2,3	3,0	3,9	0	137,6	0	228,7
		>18	1,6	2,1	2,8	3,7	0	125,9	0	217,4
		Nam >18	1,6	2,1	3,4	3,7	0	121,2	0	217,2
		Nữ > 18	1,6	2,1	2,8	3,7	0	121,8	0	216,8
	Thái Bình	3-6	3,1	4,0	5,5	7,0	0	225,0	0	392,2
		7-11	2,6	3,4	4,9	6,2	0	189,7	0	348,8
		12-18	2,5	3,2	3,8	4,9	0	178,7	0	274,6
		>18	2,2	2,8	3,8	4,9	0	156,5	0	274,7
		Nam >18	2,4	3,1	4,1	5,2	0	175,3	0	293,1
		Nữ > 18	1,9	2,5	3,2	4,0	0	138,0	0	226,2
	Hà Nội	3-6	3,5	4,6	4,7	6,1	0,0	271,9	0,0	361,3
		7-11	2,8	3,7	4,9	6,3	0,0	215,9	0,0	374,2
		12-18	1,8	2,3	3,7	4,8	0,0	138,6	0,0	282,2
		>18	1,7	2,2	3,0	3,9	0,0	129,8	0,0	233,0
		Nam >18	1,6	2,1	2,9	3,7	0,0	122,9	0,0	220,6
		Nữ > 18	1,8	2,3	3,2	4,2	0,0	137,8	0,0	247,4
	Thanh Hóa	3-6	23,6	24,8	34,2	36,0	0,0	303,7	0,0	441,2
		7-11	20,5	21,6	30,9	32,5	0,0	264,2	0,0	398,7
		12-18	12,5	13,2	20,9	21,9	0,0	161,2	0,0	268,7
		>18	10,4	10,9	16,6	17,5	0,0	134,2	0,0	214,3
		Nam >18	10,5	11,0	16,2	17,0	0,0	135,1	0,0	208,2
		Nữ > 18	10,3	10,9	17,5	18,4	0,0	133,2	0,0	225,4
Hà Giang	3-6	10,3	11,5	20,5	22,8	170,5	439,9	338,5	873,4	

<i>Thực phẩm</i>	<i>Địa điểm</i>	<i>Nhóm tuổi</i>	<i>AFB1</i>				<i>FUB1</i>				
			<i>Trung bình</i>		<i>P95</i>		<i>Trung bình</i>		<i>P95</i>		
			<i>LB</i>	<i>UB</i>	<i>LB</i>	<i>UB</i>	<i>LB</i>	<i>UB</i>	<i>LB</i>	<i>UB</i>	
		7-11	7,1	7,8	14,5	16,1	116,5	300,5	239,1	616,9	
		12-18	4,8	5,3	13,0	14,5	79,1	204,1	214,7	553,8	
		>18	4,4	4,9	12,5	13,8	72,6	187,3	205,5	530,1	
		Nam >18	4,2	4,6	12,9	14,3	68,5	176,8	212,7	548,7	
		Nữ > 18	4,5	5,0	12,0	13,3	73,7	190,2	197,5	509,6	
Ngô	Bắc Giang	3-6	4,2	4,3	21,7	21,9	15,1	29,6	77,6	151,8	
		7-11	3,5	3,5	18,5	18,6	12,4	24,2	66,0	129,0	
		12-18	3,3	3,4	5,9	5,9	11,9	23,2	20,9	40,9	
		>18	3,5	3,5	7,1	7,2	12,4	24,2	25,6	50	
		Nam >18	2,7	2,7	6,3	6,4	9,7	19,0	22,5	44,0	
		Nữ > 18	4,0	4,0	7,5	7,6	14,1	27,6	26,8	52,4	
	Thái Bình	3-6	1,5	1,5	4,5	4,6	10,1	21,1	30,2	62,8	
		7-11	1,2	1,3	4,2	4,3	8,3	17,1	28,1	58,4	
		12-18	1,2	1,2	4,2	4,3	7,8	16,2	28,2	58,5	
		>18	1,0	1,1	3,4	3,4	6,9	14,4	22,5	46,8	
		Nam >18	1,0	1,1	3,1	3,2	7,0	14,4	21,0	43,6	
		Nữ > 18	1,0	1,0	3,6	3,7	6,8	14,0	24,1	50,1	
Hà Nội	Hà Nội	3-6	1,3	1,3	2,9	3,0	6,5	18,0	14,6	40,3	
		7-11	2,6	2,6	7,4	7,6	12,8	35,4	37,0	101,9	
		12-18	1,9	1,9	4,2	4,3	9,3	25,6	21,2	58,5	
		>18	2,5	2,5	6,9	7,0	12,3	34,0	34,3	94,5	
		Nam >18	2,3	2,4	6,5	6,6	11,7	32,2	32,5	89,5	
		Nữ > 18	2,6	2,7	7,3	7,4	13,1	36,1	36,4	100,3	
	Thanh Hóa	Thanh Hóa	3-6	3,1	3,2	15,6	15,9	74,7	75,9	373,5	379,4
			7-11	3,7	3,8	14,1	14,3	88,6	90,0	337,3	342,6
			12-18	3,7	3,8	11,2	11,3	89,2	90,6	267,4	271,6
			>18	2,9	3,0	8,1	8,2	70,3	71,4	194,4	197,4

<i>Thực phẩm</i>	<i>Địa điểm</i>	<i>Nhóm tuổi</i>	<i>AFB1</i>				<i>FUB1</i>				
			<i>Trung bình</i>		<i>P95</i>		<i>Trung bình</i>		<i>P95</i>		
			<i>LB</i>	<i>UB</i>	<i>LB</i>	<i>UB</i>	<i>LB</i>	<i>UB</i>	<i>LB</i>	<i>UB</i>	
		Nam >18	2,6	2,7	7,2	7,4	62,9	63,9	267,4	176,0	
		Nữ > 18	3,3	3,4	9,2	9,3	79,2	80,5	267,4	222,4	
	Hà Giang	3-6	291,5	291,9	1128,0	1129,7	680,2	746,4	2631,9	2888,3	
		7-11	381,5	382,1	1048,0	1049,6	890,2	976,9	2445,3	2683,5	
		12-18	386,8	387,4	924,0	925,4	902,6	990,5	2156,0	2366,0	
		>18	442,5	443,2	849,5	850,8	1032,6	1133,1	1982,2	2175,2	
		Nam >18	421,2	421,8	814,2	815,5	982,7	1078,4	1899,9	2085,0	
		Nữ > 18	445,6	446,2	875,5	876,8	1039,7	1140,9	2042,9	2241,8	
	Lạc	Bắc Giang	3-6	1,6	1,6	5,9	6,0	0	2,1	0	7,7
			7-11	2,1	2,2	9,6	9,7	0	2,8	0	12,5
			12-18	1,7	1,7	8,1	8,1	0	2,3	0	10,5
			>18	1,7	1,7	5,0	5,0	0	2,2	0	6,5
Nam >18			1,6	1,6	6,1	6,2	0	2,1	0	8,0	
Nữ > 18			1,6	1,7	5,3	5,3	0	2,1	0	6,8	
Thái Bình		3-6	0,3	0,3	1,7	1,8	0	1,5	0	8,7	
		7-11	0,4	0,4	2,6	2,6	0	1,9	0	13,0	
		12-18	0,4	0,4	2,3	2,3	0	1,8	0	11,4	
		>18	0,3	0,3	1,1	1,1	0	1,4	0	5,4	
		Nam >18	0,4	0,4	1,3	1,4	0	1,9	0	6,7	
		Nữ > 18	0,3	0,3	0,9	0,9	0	1,4	0	4,3	
Hà Nội	3-6	1,3	1,3	2,4	2,5	0,0	3,5	0,0	6,6		
	7-11	1,3	1,3	2,2	2,2	0,0	3,6	0,0	5,9		
	12-18	0,8	0,8	1,5	1,5	0,0	2,3	0,0	4,0		
	>18	0,8	0,8	1,6	1,6	0,0	2,2	0,0	4,3		
	Nam >18	0,8	0,8	1,5	1,5	0,0	2,1	0,0	4,1		
	Nữ > 18	0,8	0,9	1,7	1,7	0,0	2,3	0,0	4,6		
Thanh Hóa	3-6	0,4	0,4	1,5	1,6	0,0	2,0	0,0	7,9		

<i>Thực phẩm</i>	<i>Địa điểm</i>	<i>Nhóm tuổi</i>	<i>AFB1</i>				<i>FUB1</i>			
			<i>Trung bình</i>		<i>P95</i>		<i>Trung bình</i>		<i>P95</i>	
			<i>LB</i>	<i>UB</i>	<i>LB</i>	<i>UB</i>	<i>LB</i>	<i>UB</i>	<i>LB</i>	<i>UB</i>
		7-11	0,5	0,5	1,3	1,3	0,0	2,4	0,0	6,6
		12-18	0,4	0,4	1,0	1,0	0,0	2,1	0,0	5,3
		>18	0,3	0,3	1,1	1,1	0,0	1,7	0,0	5,8
		Nam >18	0,4	0,4	1,1	1,1	0,0	1,8	0,0	5,7
		Nữ > 18	0,3	0,3	1,0	1,0	0,0	1,6	0,0	5,0
		3-6	2,1	2,1	7,7	7,7	1,2	4,3	4,4	15,8
	Hà Giang	7-11	1,4	1,4	5,2	5,2	0,8	2,8	3,0	10,7
		12-18	1,2	1,3	3,9	3,9	0,7	2,6	2,2	8,0
		>18	1,3	1,3	4,1	4,1	0,7	2,6	2,3	8,4
		Nam >18	1,2	1,2	2,7	2,7	0,7	2,4	1,6	5,6
		Nữ > 18	1,4	1,4	4,7	4,7	0,8	2,8	2,7	9,6
		Vùng	Bắc Giang	3-6	0	0	0,1	0,2	0	2,1
7-11	0,1			0,1	0,2	0,3	0	2,8	0	12,5
12-18	0			0	0,2	0,2	0	2,3	0	10,5
>18	0			0	0,1	0,1	0	2,2	0	6,5
Nam >18	0			0	0,1	0,2	0	2,1	0	8,0
Nữ > 18	0			0	0,1	0,1	0	2,1	0	6,8
Thái Bình	3-6		0,2	0,2	1,0	1,0	0	1,5	0	8,7
	7-11		0,2	0,2	1,4	1,5	0	1,9	0	13,0
	12-18		0,2	0,2	1,3	1,3	0	1,8	0	11,4
	>18		0,2	0,2	0,6	0,6	0	1,4	0	5,4
	Nam >18		0,2	0,2	0,7	0,8	0	1,9	0	6,7
	Nữ > 18		0,2	0,2	0,5	0,5	0	1,4	0	4,3
Hà Nội	3-6	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	3,5	0,0	6,6	
	7-11	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	3,6	0,0	5,9	
	12-18	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	2,3	0,0	4,0	
	>18	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	2,2	0,0	4,3	

<i>Thực phẩm</i>	<i>Địa điểm</i>	<i>Nhóm tuổi</i>	<i>AFB1</i>				<i>FUB1</i>			
			<i>Trung bình</i>		<i>P95</i>		<i>Trung bình</i>		<i>P95</i>	
			<i>LB</i>	<i>UB</i>	<i>LB</i>	<i>UB</i>	<i>LB</i>	<i>UB</i>	<i>LB</i>	<i>UB</i>
		Nam >18	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	2,1	0,0	4,1
		Nữ > 18	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	2,3	0,0	4,6
	Thanh Hóa	3-6	0,1	0,1	0,5	0,6	0,0	2,0	0,0	7,9
		7-11	0,2	0,2	0,4	0,5	0,0	2,4	0,0	6,6
		12-18	0,1	0,1	0,3	0,4	0,0	2,1	0,0	5,3
		>18	0,1	0,1	0,4	0,4	0,0	1,7	0,0	5,8
		Nam >18	0,1	0,1	0,4	0,4	0,0	1,8	0,0	5,7
		Nữ > 18	0,1	0,1	0,3	0,3	0,0	1,6	0,0	5,0
	Hà Giang	3-6	0,1	0,1	0,2	0,4	0,0	3,1	0,0	11,6
		7-11	0,1	0,1	0,1	0,3	0,0	2,1	0,0	7,9
		12-18	0,1	0,1	0,1	0,2	0,0	1,9	0,0	5,9
		>18	0,1	0,1	0,1	0,2	0,0	1,9	0,0	6,2
		Nam >18	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	1,7	0,0	4,1
		Nữ > 18	0,1	0,1	0,1	0,2	0,0	2,1	0,0	7,1
Tổng	Bắc Giang	3-6	8,8	9,8	32,2	33,9	15,1	259,8	77,6	510,1
		7-11	8,1	8,8	33,5	35,3	12,4	214,4	66,0	554,4
		12-18	6,9	7,5	17,1	18,1	11,9	165,3	20,9	290,6
		>18	6,8	7,3	15,1	16,1	12,4	154,4	25,6	280,4
		Nam >18	6,0	6,5	15,9	16,4	9,7	144,5	22,5	277,1
		Nữ > 18	7,2	7,8	15,7	16,7	14,1	153,7	26,8	282,9
	Thái Bình	3-6	5,1	6,0	12,7	14,4	10,1	249,0	30,2	472,3
		7-11	4,5	5,3	13,1	14,6	8,3	210,7	28,1	433,1
		12-18	4,2	4,9	11,6	12,8	7,8	198,4	28,2	356,0
		>18	3,7	4,3	8,9	10,0	6,9	173,8	22,5	332,2
		Nam >18	4,1	4,8	9,3	10,6	7,0	193,6	21,0	350,1
		Nữ > 18	3,4	3,9	8,1	9,1	6,8	154,9	24,1	285,0
	Hà Nội	3-6	6,2	7,3	10,2	11,7	6,5	297,0	14,6	414,8

<i>Thực phẩm</i>	<i>Địa điểm</i>	<i>Nhóm tuổi</i>	<i>AFB1</i>				<i>FUB1</i>			
			<i>Trung bình</i>		<i>P95</i>		<i>Trung bình</i>		<i>P95</i>	
			<i>LB</i>	<i>UB</i>	<i>LB</i>	<i>UB</i>	<i>LB</i>	<i>UB</i>	<i>LB</i>	<i>UB</i>
		7-11	6,7	7,7	14,5	16,2	12,8	258,5	37,0	488,0
		12-18	4,5	5,1	9,5	10,7	9,3	168,7	21,2	348,7
		>18	5,0	5,6	11,5	12,7	12,3	168,2	34,3	336,2
		Nam >18	4,7	5,3	10,9	12,0	11,7	159,2	32,5	318,4
		Nữ > 18	5,3	5,9	12,3	13,4	13,1	178,5	36,4	356,9
	Thanh Hóa	3-6	27,2	28,5	51,9	54,0	74,7	383,6	373,5	836,4
		7-11	24,8	26,0	46,8	48,6	88,6	359,1	337,3	754,6
		12-18	16,8	17,5	33,4	34,7	89,2	256,0	267,4	550,9
		>18	13,8	14,4	26,3	27,3	70,3	209,0	194,4	423,2
		Nam >18	13,6	14,2	24,9	25,9	62,9	202,6	267,4	395,6
		Nữ > 18	14,1	14,7	27,9	29,0	79,2	216,9	267,4	457,8
	Hà Giang	3-6	304,0	305,6	1156,3	1160,6	851,9	1193,7	2974,8	3789,1
		7-11	390,0	391,4	1067,8	1071,2	1007,4	1282,3	2687,4	3318,9
		12-18	392,9	394,1	941,0	943,9	982,4	1199,1	2372,9	2933,7
		>18	448,3	449,4	866,1	868,9	1105,9	1325,0	2190,0	2719,9
		Nam >18	426,5	427,6	829,9	832,7	1051,9	1259,4	2114,1	2643,4
		Nữ > 18	451,5	452,7	892,3	895,1	1114,2	1336,0	2243,0	2768,1

Bảng PL6.2. Liều phơi nhiễm của OTA và ZEA (ng/kg bw/ngày)

Thực phẩm	Địa điểm	Nhóm tuổi	OTA				ZEA			
			Trung bình		P95		Trung bình		P95	
			LB	UB	LB	UB	LB	UB	LB	UB
Gạo	Bắc Giang	3-6	0	4,5	0	6,9	0	4,5	0	6,9
		7-11	0	3,7	0	8,0	0	3,7	0	8,0
		12-18	0	2,8	0	4,6	0	2,8	0	4,6
		>18	0	2,5	0	4,3	0	2,5	0	4,3
		Nam >18	0	2,4	0	4,3	0	2,4	0	4,3
		Nữ > 18	0	2,4	0	4,3	0	2,4	0	4,3
	Thái Bình	3-6	0	4,5	0	7,8	0	4,5	0	7,8
		7-11	0	3,8	0	7,0	0	3,8	0	7,0
		12-18	0	3,6	0	5,5	0	3,6	0	5,5
		>18	0	3,1	0	5,5	0	3,1	0	5,5
		Nam >18	0	3,5	0	5,9	0	3,5	0	5,9
		Nữ > 18	0	2,8	0	4,5	0	2,8	0	4,5
	Hà Nội	3-6	0,0	5,4	0,0	7,2	0,0	5,4	0,0	7,2
		7-11	0,0	4,3	0,0	7,5	0,0	4,3	0,0	7,5
		12-18	0,0	2,8	0,0	5,6	0,0	2,8	0,0	5,6
		>18	0,0	2,6	0,0	4,7	0,0	2,6	0,0	4,7
		Nam >18	0,0	2,5	0,0	4,4	0,0	2,5	0,0	4,4
		Nữ > 18	0,0	2,8	0,0	4,9	0,0	2,8	0,0	4,9
	Thanh Hóa	3-6	0,0	6,1	0,0	8,8	0,0	6,1	0,0	8,8
		7-11	0,0	5,3	0,0	8,0	0,0	5,3	0,0	8,0
		12-18	0,0	3,2	0,0	5,4	0,0	3,2	0,0	5,4
		>18	0,0	2,7	0,0	4,3	0,0	2,7	0,0	4,3
		Nam >18	0,0	2,7	0,0	4,2	0,0	2,7	0,0	4,2
		Nữ > 18	0,0	2,7	0,0	4,5	0,0	2,7	0,0	4,5
Hà Giang	3-6	0,0	5,7	0,0	11,3	0,0	5,7	0,0	11,3	
	7-11	0,0	3,9	0,0	8,0	0,0	3,9	0,0	8,0	
	12-18	0,0	2,6	0,0	7,2	0,0	2,6	0,0	7,2	

<i>Thực phẩm</i>	<i>Địa điểm</i>	<i>Nhóm tuổi</i>	<i>OTA</i>				<i>ZEA</i>			
			<i>Trung bình</i>		<i>P95</i>		<i>Trung bình</i>		<i>P95</i>	
			<i>LB</i>	<i>UB</i>	<i>LB</i>	<i>UB</i>	<i>LB</i>	<i>UB</i>	<i>LB</i>	<i>UB</i>
		>18	0,0	2,4	0,0	6,8	0,0	2,4	0,0	6,8
		Nam >18	0,0	2,3	0,0	7,1	0,0	2,3	0,0	7,1
		Nữ > 18	0,0	2,5	0,0	6,6	0,0	2,5	0,0	6,6
Ngô	Bắc Giang	3-6	1,8	2,1	9,2	10,6	0,1	0,4	0,4	2,0
		7-11	1,5	1,7	7,8	9,0	0,1	0,3	0,4	1,7
		12-18	1,4	1,6	2,5	2,9	0,1	0,3	0,1	0,5
		>18	1,5	1,7	3,0	3,5	0,1	0,3	0,1	0,6
		Nam >18	1,2	1,3	2,7	3,1	0,1	0,2	0,1	0,6
		Nữ > 18	1,7	1,9	3,2	3,7	0,1	0,4	0,1	0,7
	Thái Bình	3-6	0,2	0,4	0,7	1,3	1,6	1,9	4,9	5,6
		7-11	0,2	0,4	0,6	1,2	1,3	1,5	4,6	5,2
		12-18	0,2	0,3	0,6	1,2	1,3	1,4	4,6	5,2
		>18	0,2	0,3	0,5	1,0	1,1	1,3	3,7	4,2
		Nam >18	0,2	0,3	0,5	0,9	1,1	1,3	3,4	3,9
		Nữ > 18	0,1	0,3	0,5	1,0	1,1	1,2	3,9	4,5
	Hà Nội	3-6	0,5	0,7	1,0	1,6	0,3	0,6	0,7	1,2
		7-11	0,9	1,4	2,6	3,9	0,6	1,1	1,8	3,1
		12-18	0,7	1,0	1,5	2,3	0,4	0,8	1,0	1,8
		>18	0,9	1,3	2,4	3,6	0,6	1,1	1,6	2,9
		Nam >18	0,8	1,2	2,3	3,4	0,6	1,0	1,6	2,8
		Nữ > 18	0,9	1,4	2,6	3,9	0,6	1,1	1,7	3,1
	Thanh Hóa	3-6	1,1	1,4	5,7	7,0	37,9	38,2	189,7	190,9
		7-11	1,4	1,7	5,2	6,3	45,0	45,3	171,3	172,4
		12-18	1,4	1,7	4,1	5,0	45,3	45,6	135,8	136,7
		>18	1,1	1,3	3,0	3,6	35,7	35,9	98,7	99,3
		Nam >18	1,0	1,2	2,7	3,2	31,9	32,1	88,0	88,6
		Nữ > 18	1,2	1,5	3,4	4,1	40,2	40,5	111,2	111,9
	Hà Giang	3-6	32,9	34,8	127,2	134,5	92,3	94,1	357,2	364,0

<i>Thực phẩm</i>	<i>Địa điểm</i>	<i>Nhóm tuổi</i>	<i>OTA</i>				<i>ZEA</i>			
			<i>Trung bình</i>		<i>P95</i>		<i>Trung bình</i>		<i>P95</i>	
			<i>LB</i>	<i>UB</i>	<i>LB</i>	<i>UB</i>	<i>LB</i>	<i>UB</i>	<i>LB</i>	<i>UB</i>
Lạc		7-11	43,0	45,5	118,1	125,0	120,8	123,1	331,9	338,2
		12-18	43,6	46,1	104,2	110,2	122,5	124,8	292,6	298,2
		>18	49,9	52,8	95,8	101,3	140,1	142,8	269,0	274,2
		Nam >18	47,5	50,2	91,8	97,1	133,4	135,9	257,8	262,8
		Nữ > 18	50,2	53,1	98,7	104,4	141,1	143,8	277,2	282,6
	Bắc Giang	3-6	0	0,1	0,2	0,3	0	0	0	0,2
		7-11	0,1	0,1	0,3	0,5	0	0,1	0	0,3
		12-18	0,1	0,1	0,2	0,4	0	0	0	0,2
		>18	0	0,1	0,1	0,3	0	0	0	0,1
		Nam >18	0	0,1	0,2	0,3	0	0	0	0,2
		Nữ > 18	0	0,1	0,2	0,3	0	0	0	0,1
	Thái Bình	3-6	0	0	0	0,2	0	0	0	0,2
		7-11	0	0	0	0,3	0	0	0	0,3
		12-18	0	0	0	0,2	0	0	0	0,2
		>18	0	0	0	0,1	0	0	0	0,1
		Nam >18	0	0	0	0,1	0	0	0	0,1
		Nữ > 18	0	0	0	0,1	0	0	0	0,1
	Hà Nội	3-6	0,0	0,1	0,0	0,2	0,0	0,1	0,0	0,1
		7-11	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1
		12-18	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1
>18		0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	
Nam >18		0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	
Nữ > 18		0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	
Thanh Hóa	3-6	0,0	0,1	0,2	0,3	0,0	0,0	0,0	0,2	
	7-11	0,1	0,1	0,1	0,3	0,0	0,0	0,0	0,1	
	12-18	0,0	0,1	0,1	0,2	0,0	0,0	0,0	0,1	
	>18	0,0	0,1	0,1	0,2	0,0	0,0	0,0	0,1	
	Nam >18	0,0	0,1	0,1	0,2	0,0	0,0	0,0	0,1	

<i>Thực phẩm</i>	<i>Địa điểm</i>	<i>Nhóm tuổi</i>	<i>OTA</i>				<i>ZEA</i>			
			<i>Trung bình</i>		<i>P95</i>		<i>Trung bình</i>		<i>P95</i>	
			<i>LB</i>	<i>UB</i>	<i>LB</i>	<i>UB</i>	<i>LB</i>	<i>UB</i>	<i>LB</i>	<i>UB</i>
		Nữ > 18	0,0	0,1	0,1	0,2	0,0	0,0	0,0	0,1
	Hà Giang	3-6	0,2	0,3	0,8	1,0	0,2	0,2	0,7	0,9
		7-11	0,1	0,2	0,6	0,7	0,1	0,2	0,4	0,6
		12-18	0,1	0,2	0,4	0,5	0,1	0,1	0,3	0,4
		>18	0,1	0,2	0,4	0,6	0,1	0,1	0,3	0,5
		Nam >18	0,1	0,2	0,3	0,4	0,1	0,1	0,2	0,3
		Nữ > 18	0,1	0,2	0,5	0,6	0,1	0,2	0,4	0,5
Vùng		Bắc Giang	3-6	0	0	0	0,2	0	0	0
	7-11		0	0,1	0	0,3	0	0,1	0	0,3
	12-18		0	0	0	0,2	0	0	0	0,2
	>18		0	0	0	0,1	0	0	0	0,1
	Nam >18		0	0	0	0,2	0	0	0	0,2
	Nữ > 18		0	0	0	0,1	0	0	0	0,1
	Thái Bình	3-6	0	0,1	0,1	0,3	0	0	0	0,2
		7-11	0	0,1	0,2	0,5	0	0	0	0,3
		12-18	0	0,1	0,2	0,4	0	0	0	0,2
		>18	0	0	0,1	0,2	0	0	0	0,1
		Nam >18	0	0,1	0,1	0,2	0	0	0	0,1
		Nữ > 18	0	0	0,1	0,2	0	0	0	0,1
	Hà Nội	3-6	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1
		7-11	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1
		12-18	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1
		>18	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1
		Nam >18	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1
		Nữ > 18	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1
	Thanh Hóa	3-6	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,2
		7-11	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1
		12-18	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1

<i>Thực phẩm</i>	<i>Địa điểm</i>	<i>Nhóm tuổi</i>	<i>OTA</i>				<i>ZEA</i>				
			<i>Trung bình</i>		<i>P95</i>		<i>Trung bình</i>		<i>P95</i>		
			<i>LB</i>	<i>UB</i>	<i>LB</i>	<i>UB</i>	<i>LB</i>	<i>UB</i>	<i>LB</i>	<i>UB</i>	
		>18	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	
		Nam >18	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	
		Nữ > 18	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	
	Hà Giang	3-6	0,0	0,1	0,0	0,2	0,0	0,1	0,0	0,2	
		7-11	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,2	
		12-18	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	
		>18	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	
		Nam >18	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	
		Nữ > 18	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	
	Tổng	Bắc Giang	3-6	1,8	6,7	9,4	17,9	0,1	5,0	0,4	9,1
			7-11	1,5	5,5	8,1	17,8	0,1	4,1	0,4	10,2
			12-18	1,5	4,5	2,7	8,1	0,1	3,1	0,1	5,5
>18			1,5	4,3	3,2	8,2	0,1	2,9	0,1	5,3	
Nam >18			1,2	3,9	2,8	7,9	0,1	2,8	0,1	5,2	
Nữ > 18			1,7	4,5	3,3	8,4	0,1	2,9	0,1	5,3	
Thái Bình		3-6	0,3	5,0	0,8	9,6	1,6	6,4	4,9	13,8	
		7-11	0,2	4,3	0,9	8,9	1,3	5,4	4,6	12,7	
		12-18	0,2	4,0	0,8	7,4	1,3	5,1	4,6	11,2	
		>18	0,2	3,5	0,6	6,8	1,1	4,5	3,7	9,9	
		Nam >18	0,2	3,9	0,6	7,1	1,1	4,9	3,4	10,0	
		Nữ > 18	0,2	3,1	0,6	5,8	1,1	4,1	3,9	9,2	
Hà Nội	3-6	0,5	6,3	1,1	9,1	0,3	6,1	0,7	8,7		
	7-11	0,9	5,8	2,7	11,7	0,6	5,6	1,8	10,9		
	12-18	0,7	3,9	1,5	8,1	0,4	3,7	1,0	7,6		
	>18	0,9	4,0	2,5	8,5	0,6	3,7	1,6	7,8		
	Nam >18	0,8	3,8	2,3	8,0	0,6	3,5	1,6	7,3		
	Nữ > 18	0,9	4,3	2,6	9,0	0,6	4,0	1,7	8,2		
Thanh Hóa	3-6	1,2	7,6	5,9	16,3	37,9	44,3	189,7	200,0		

<i>Thực phẩm</i>	<i>Địa điểm</i>	<i>Nhóm tuổi</i>	<i>OTA</i>				<i>ZEA</i>			
			<i>Trung bình</i>		<i>P95</i>		<i>Trung bình</i>		<i>P95</i>	
			<i>LB</i>	<i>UB</i>	<i>LB</i>	<i>UB</i>	<i>LB</i>	<i>UB</i>	<i>LB</i>	<i>UB</i>
		7-11	1,4	7,1	5,3	14,7	45,0	50,7	171,3	180,6
		12-18	1,4	5,0	4,2	10,7	45,3	48,9	135,8	142,2
		>18	1,1	4,1	3,1	8,3	35,7	38,7	98,7	103,8
		Nam >18	1,0	4,0	2,8	7,8	31,9	34,9	88,0	93,0
		Nữ > 18	1,3	4,2	3,5	8,9	40,2	43,2	111,2	116,6
	Hà Giang	3-6	33,1	40,8	128,0	147,1	92,5	100,1	357,8	376,4
		7-11	43,2	49,6	118,7	133,8	120,9	127,2	332,3	346,9
		12-18	43,7	49,0	104,6	118,0	122,6	127,7	292,9	305,9
		>18	50,0	55,4	96,2	108,8	140,2	145,4	269,4	281,6
		Nam >18	47,6	52,7	92,1	104,6	133,5	138,4	258,1	270,3
		Nữ > 18	50,4	55,8	99,2	111,8	141,2	146,5	277,6	289,8