

THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP VÀ ỨNG DỤNG PHÂN TÍCH ĐỒNG THỜI CÁC ĐỘC TỐ AFLATOXIN TRONG MẪU ĐẬU PHỘNG BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG GHÉP KHỐI PHỔ

Đến tòa soạn 01-03-2021

Lê Đình Vũ, Võ Thị Mộng Trinh

Khoa Công nghệ Hóa học, Trường Đại học Công nghiệp Thành phố Hồ Chí Minh

Võ Thị Mộng Trinh

Trung tâm Dịch vụ phân tích thí nghiệm Thành phố Hồ Chí Minh

SUMMARY

VALIDATION AND APPLICATION OF ULTRA PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY-TANDEM MASS SPECTROMETRY FOR DETERMINATION OF AFLATOXINS IN PEANUT SAMPLES

Aflatoxin is the high toxicity group of mycotoxins that can lead to fatal if acute poisoning or liver cancer if accumulating at low levels in the body. In this study, an ultra-performance liquid chromatography-tandem trip-quadrupole mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method has been validated for simultaneous determination of aflatoxins group B and G in produced peanut samples. Under optimal experimental conditions, the method detection limit (MDL) for aflatoxin B1 (AFB1) and aflatoxin G1 (AFG1) are 0,1 µg/kg. MDL for aflatoxin B2 (AFB2) and aflatoxin G2 (AFG2) are 0,03 µg/kg. The correlation coefficient (R^2) of all calibration lines are 0.999. The average method recovery (%) at three different levels and for all four aflatoxins range from 90,7 to 98%. At different concentrations of aflatoxins, the relative standard deviations (RSD%) of repeatability is lower than 1,1 %, and the intermediate precision is lower 3.8 %. Comparison with the requirements of the Viet Nam Ministry of Health, the validated method is very sensitive and accurate to determine the aflatoxin in peanut product sample, and can be used for quality control and food safety.

Keywords: aflatoxin, mycotoxin, UPLC-MS/MS, peanut mycotoxin, food safety.

1. GIỚI THIỆU

Aflatoxin là chất chuyển hóa được tạo ra bởi các chủng nấm mốc có độc tố chủ yếu là *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* và *Aspergillus nomius*. Những chủng nấm mốc này phát triển trong đất, cỏ khô, thực vật mục nát và ngũ cốc [1]. Aflatoxin được tạo ra trong quá trình sản xuất, thu hoạch, bảo quản và chế biến thực phẩm và thức ăn chăn nuôi. Có nhiều loại aflatoxin khác nhau, trong đó có bốn aflatoxin tự nhiên được biết đến do loài nấm mốc *Aspergillus* tạo ra bao gồm AFB1, AFB2,

AFG1 và AFG2. AFB1 có độc tố mạnh nhất trong số tất cả các aflatoxin [2]. Độc tính aflatoxin gây nên do tiếp xúc cấp tính hoặc mãn tính với aflatoxin và có thể gây độc cho cả người và động vật [2]. Các triệu chứng khi tiếp xúc với aflatoxin như đau bụng, nôn mửa, co giật. Nếu tiếp xúc mãn tính với aflatoxin có thể dẫn đến các biến chứng khác nhau như nhiễm độc gan, độc tính miễn dịch và quái thai [3]. Aflatoxin là một trong những nguyên nhân chính gây ung thư biểu mô tế bào gan [4].

Aflatoxin hiện diện trong nhiều loại thực phẩm

khác nhau, đặc biệt là ngũ cốc, hạt có dầu, gia vị như ngô, đậu phộng (lạc), ớt, hạt tiêu đen, trái cây khô v.v... Aflatoxin cũng được phát hiện trong sữa và các sản phẩm sữa. Do vậy việc kiểm soát hàm lượng các độc tố aflatoxin trong thực phẩm là việc làm cấp thiết, thường xuyên của quá trình lưu trữ, sản xuất và chế biến thực phẩm, của cơ quan quản lý nhà nước về vệ sinh an toàn thực phẩm và của cả xã hội [5].

Có nhiều phương pháp được áp dụng để phân tích hàm lượng các độc tố aflatoxin trong các nền thực phẩm khác nhau. Các phương pháp có thể kể tới như phương pháp phổ huỳnh quang [6], phương pháp phổ hồng ngoại [7], phương pháp điện hóa [8], phương pháp sắc ký bản mỏng [9]. Mặc dù đạt được những thành tựu nhất định, các phương pháp này còn hạn chế về độ nhạy và độ chính xác của phép phân tích trong khi yêu cầu xác định các độc tố aflatoxin ở nồng độ rất thấp tới $\mu\text{g/g}$ [10]. Gần đây, sắc ký lỏng đầu dò huỳnh quang được sử dụng phổ biến vì độ nhạy tốt của đầu dò huỳnh quang kết hợp sự phân tách bằng sắc ký lỏng [11]. Để làm tăng độ nhạy, phương pháp này cần quá trình tạo dẫn xuất huỳnh quang mạnh hơn so với tính chất huỳnh quang tự nhiên của các độc tố aflatoxin yêu cầu thực hiện các bước tinh chế mẫu nghiêm ngặt bằng cách sử dụng cột ái lực miễn dịch và quá trình tạo dẫn xuất đặc biệt trước và sau cột sắc ký [12]. Từ những hạn chế nói trên, trong đề tài nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành thẩm định phương pháp phân tích đồng thời các độc chất aflatoxin nhóm B và G bằng phương pháp sắc ký lỏng ghép hai lần khối phổ trên nền mẫu đậu phộng đã qua chế biến. Với đặc điểm của phép định lượng đồng thời các chất bằng hai lần khối phổ sau khi tách chiết từ cột sắc ký kết hợp với sử lý mẫu bằng cột chiết ái lực miễn dịch

aflatoxin. Phương pháp định lượng có thể cho độ nhạy và độ chính xác cao, tiết kiệm thời gian và có thể áp dụng trong thực tiễn kiểm soát chất lượng và vệ sinh an toàn thực phẩm.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Hóa chất và thiết bị

Tất cả các hóa chất được sử dụng đều đạt độ tinh khiết phân tích (PA). Acetonitril, acid formic, methanol, amoni acetate (độ tinh khiết $\geq 99\%$), dung dịch đệm PBS ($\text{pH}=7,4$) hãng Merck (Merck, Darmstadt, Đức). Chuẩn hỗn hợp các aflatoxin: AFB1 ($2 \mu\text{g/mL}$), AFB2 ($0,5 \mu\text{g/mL}$), AFG1 ($2 \mu\text{g/mL}$), AFG2 ($0,5 \mu\text{g/mL}$) hãng Trilogy (USA). Cột ái lực miễn dịch aflatoxin của hãng Vicam (USA). Nước sử dụng trong quy trình phân tích là loại nước siêu tinh khiết có điện trở $>18.3 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$.

2.2. Phương pháp xử lý mẫu và phân tích mẫu đậu phộng bằng UPLC-MS/MS

Cân 5 gam mẫu, thêm vào 20 mL ACN/ H_2O (tỉ lệ 6:4 về thể tích). Lắc đều hỗn hợp và đánh siêu âm trong 30 phút. Ly tâm hỗn hợp ở tốc độ 9000 vòng/phút trong 3 phút sau đó lọc lấy dịch lọc. Dùng 5 mL dịch lọc này thêm vào 20 mL nước tinh khiết lắc đều và ly tâm 9000 vòng/phút trong 3 phút, lọc bỏ hết cặn rắn. 20 mL dung dịch lọc được sử dụng để xử lý qua cột ái lực miễn dịch aflatoxin theo các bước sau: (i) chuyển 20 mL dịch lọc qua cột ái lực miễn dịch AF với tốc độ 1mL/phút ; (ii) Rửa cột để loại bỏ các tạp chất bằng 20mL nước siêu tinh khiết; (iii) Rửa giải cột bằng 3mL MeOH; (iv) Làm khô dung dịch rửa giải để loại bỏ MeOH bằng hệ thống cô mẫu miVac (USA); (v) Hòa tan mẫu thu được bằng 1mL dung dịch $\text{HCOOH } 0,2\%/ \text{ACN}$ tỉ lệ 1:1 về thể tích sau đó siêu lọc bằng PTFE $0,22\mu\text{m}$. Dung dịch sau khi lọc được phân tích trên thiết bị UPLC-MS/MS theo điều kiện như trong Bảng 1.

Bảng 1. Thông số vận hành của hệ thống UPLC-MS/MS phân tích

Thông số	
HPLC- Agilent 1200 Infinity	
Cột tách	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 ($100 \text{ mm} \times 2,1 \text{ mm}$; $1,8 \mu\text{m}$)
Nhiệt độ cột	40°C
Tốc độ dòng	$0,3 \text{ mL/min}$
Pha động	MeOH (A), amoni acetat 10 mM (B)

Chương trình dung môi (%A)	0,0 phút, 80%; 2 phút, 100%; 6,0 phút, 100%; 9,0 phút, 80%; 14,0 phút, 80%
Thể tích mẫu tiêm	5 μ L
MS-Agilent 6410 Triple Quad	
Nguồn	ESI +
Capillary Voltage	4000 V
Gas Temp	350 °C
MS ₁ Heater	100 °C
MS ₂ Heater	100 °C
Gas flow	9,0 L/min
Nebulizer	45 psi
Scan type	MRM
MS ₁ Res	Unit
MS ₂ Res	Unit

2.3. Thẩm định phương pháp phân tích aflatoxin trong mẫu đậu phộng bằng UPLC-MS/MS

Để thẩm định độ chính xác của phương pháp phân tích hàm lượng aflatoxin nhóm B và G trong đậu phộng đã qua chế biến, các thông số như độ đặc hiệu, độ tuyến tính, giới hạn phát hiện, độ đúng và độ lặp được xác định theo hướng dẫn trong các tài liệu ISO 17025: 2017 và AOAC 2016 [13, 14].

Giới hạn phát hiện (MDL) và giới hạn định lượng phương pháp (MQL) được xác định bằng cách thêm chuẩn ở nồng độ thấp các độc tố cần phân tích. Nồng độ chất phân tích tương ứng với tỉ lệ tín hiệu trên nhiễu nền S/N = 3 là giới hạn phát hiện của phương pháp phân tích. Các thí nghiệm được thực hiện lặp lại 12 lần nhằm đảm bảo độ tin cậy của phép xác định MDL.

Độ thu hồi, độ lặp lại và độ tái lập trung gian của phương pháp được xác định dựa trên phân

tích các mẫu thêm chuẩn. Ba mức nồng độ của các độc tố aflatoxin là MQL, 5MQL và 10MQL được thêm vào nền mẫu trắng đậu phộng trước khi xử lý và phân tích mẫu. Thí nghiệm được làm lặp lại 6 lần bởi hai kiểm nghiệm viên khác nhau để tính độ lặp lại và độ tái lập trung gian của phương pháp.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Độ đặc hiệu của phương pháp

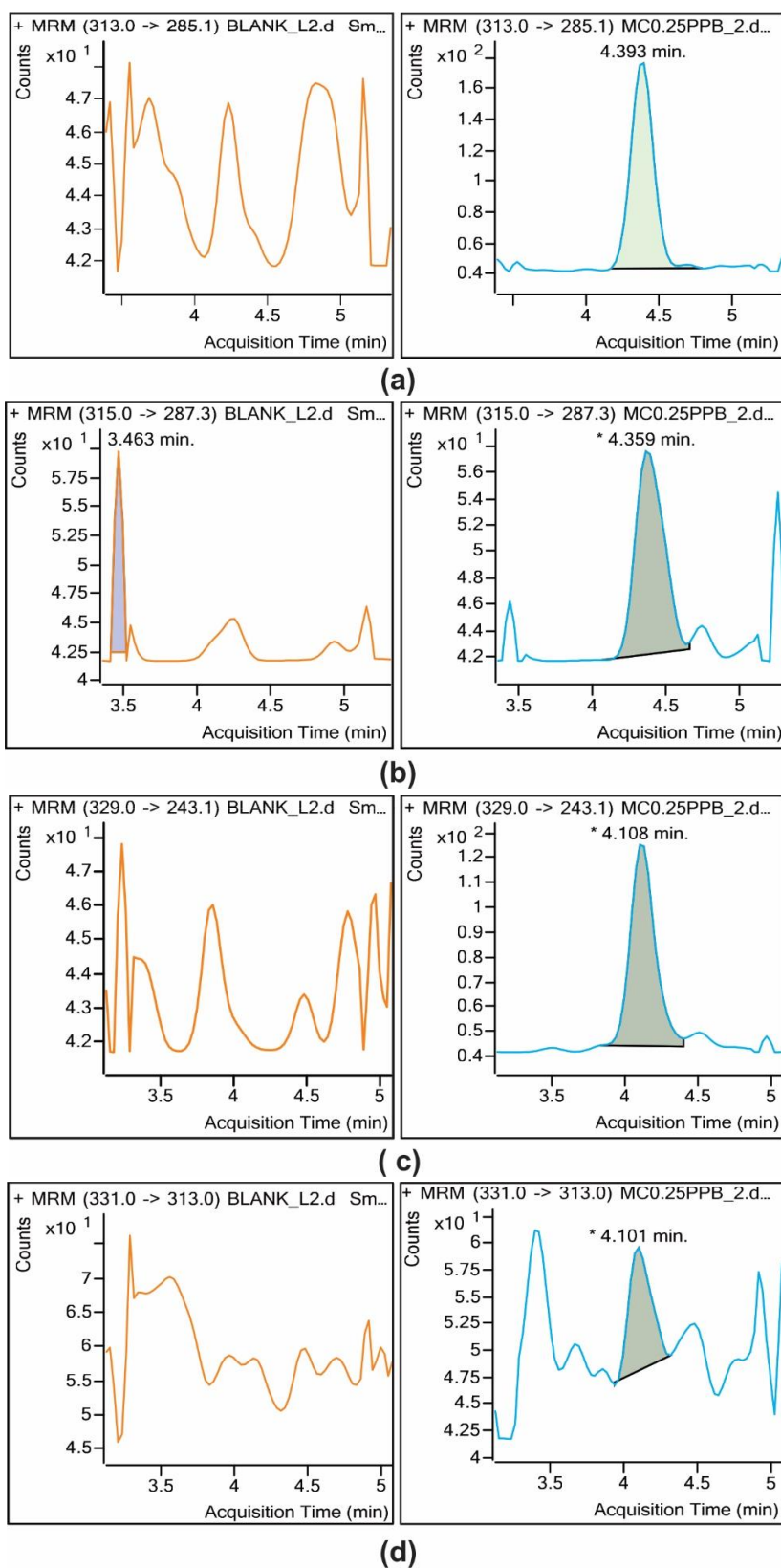
Đặc điểm khối phổ của các độc tố aflatoxin được xác định bằng cách phân tích trên chất chuẩn. Sắc ký đồ và các mảnh phổ thu được từ chế độ theo dõi phản ứng (MRM) với mảnh khối lượng sơ cấp và thứ cấp được thể hiện trong Bảng 2. Trong các mảnh thứ cấp của chất phân tích, mảnh có tín hiệu lớn nhất (nhạy nhất) được chọn làm mảnh định lượng. Đồng thời, một mảnh thứ cấp có độ nhạy thấp hơn được sử dụng làm mảnh xác nhận cho phép phân tích (mảnh định tính).

Bảng 2. Đặc điểm khối phổ của các độc tố aflatoxin

Aflatoxin	Dwell (ms)	Frag (V)	Ion sơ cấp (m/z)	Chuyển MRM, m/z (thế va đập, V)	
				Mảnh định lượng	Mảnh định tính
AFB1	200	120	313	313 > 285 (20)	313 > 241 (35)
AFB2	200	120	315	315 > 287 (25)	315 > 259 (30)
AFG1	200	100	329	329 > 243 (25)	329 > 311 (20)
AFG2	200	120	331	331 > 313 (20)	150 > 245 (25)

Độ đặc hiệu của phép phân tích được xác nhận bằng việc phân tích mẫu trắng và mẫu thêm chuẩn. Trên cơ sở đối chiếu tín hiệu và nhiễu nền của mảnh phổ ion thứ cấp (định tính hoặc

định lượng). Kết quả thu được về tính đặc hiệu đối với AFB1, AFB2, AFG1 và AFG2 như thể hiện trong Hình 1.



Hình 1. Khối phổ trong xác định độ đặc hiệu của phép phân tích: Sắc ký đồ của mẫu trắng (vàng cam) và mẫu thêm chuẩn (xanh) đối với AFB1 (a), AFB2 (b), AFG1 (c), và AFG2 (d). Nồng độ thêm chuẩn các chất là 0,25 $\mu\text{g/kg}$.

Sắc ký đồ mạnh định lượng của các aflatoxin có sự khác biệt rất rõ ràng giữa mẫu trắng và mẫu thêm chuẩn ở nồng độ rất thấp (0,25 µg/kg). Peak tín hiệu xuất hiện tại thời gian lưu 4,4 phút đối với AFB1 và AFB2. AFG1, AFG2 có peak tại thời gian lưu 4,1 phút. Sắc ký đồ thu được tương tự đối với các mảnh thứ cấp định tính. Kết quả trên xác nhận độ đặc hiệu cao của phương pháp phân tích các độc tố aflatoxin nhóm B và G trong nền mẫu đậu phộng bằng UPLC-MS/MS.

3.2. Khoảng định lượng của phương pháp

Để loại bỏ sự ảnh hưởng của nền mẫu, khoảng tuyến tính dùng để định lượng các độc tố aflatoxin được khảo sát dựa trên phương pháp đường chuẩn. Tất cả các điểm chuẩn được chuẩn bị bằng cách thêm các nồng độ tương ứng vào nền mẫu trắng. Phương trình hồi quy được xây dựng là mối tương quan giữa diện tích peak của chất chuẩn với nồng độ của chúng. Kết quả thu được về khoảng tuyến tính, phương trình đường chuẩn và hệ số tương quan được trình bày trong Bảng 3.

Bảng 3. Khoảng tuyến tính trong phép định lượng các aflatoxin trong nền mẫu đậu phộng

Aflatoxin	Khoảng nồng độ (µg/kg)	Diện tích peak = $a \cdot C_{AF} + b$		Hệ số tương quan (R^2)
		a	b	
AFB1	0,2 - 20	18772,8	-1347,6	0,999
AFB2	0,05 - 5	11914,9	-18,6	0,999
AFG1	0,2 - 20	14855,2	-496,3	0,999
AFG2	0,05 - 5	7218,4	329,4	0,999

Khoảng tuyến tính sử dụng để định lượng đối với AFB1 và AFG1 là 0,2-20 µg/kg, đối với AFB2 và AFG2 là 0,05-5 µg/kg. Tất cả các đường chuẩn đều có hệ số tương quan R^2 lớn

hơn 0,999. Giá trị hệ số tương quan cao hơn nhiều so với yêu cầu cần thiết ($R^2 > 0,995$) cho phương pháp phân tích định lượng sử dụng được trong thực tiễn.

3.3. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của phương pháp

MDL của phương pháp phân tích AFB1, AFB2, AFG1 và AFG2 lần lượt là 0,1; 0,03; 0,1 và 0,03 (Bảng 4). Theo quy chuẩn của Bộ Y Tế cho phép hàm lượng các độc tố này trong đậu phộng đã chế biến đối với AFB1 là nhỏ hơn 2 µg/kg, và tổng số các AF nhỏ hơn 4 µg/kg [15], phương pháp phân tích đáp ứng tốt về độ nhạy để đánh giá chất lượng của sản phẩm đậu phộng đã chế biến trên thị trường.

Bảng 4. MDL, MQL của phương pháp phân tích định lượng các aflatoxin

Aflatoxin	Nồng độ thêm chuẩn (µg/kg)	S/N trung bình (n=12)	RSD (%)	MDL (µg/kg)	MQL (µg/kg)
AFB1	0,100	3,99	1,74	0,10	0,3
AFB2	0,025	6,59	1,68	0,03	0,1
AFG1	0,100	3,10	2,06	0,10	0,3
AFG2	0,025	6,59	1,21	0,03	0,1

3.4. Độ đúng, độ chính xác của phương pháp

Từ kết quả phân tích các mẫu thêm chuẩn như trình bày ở mục 2.3, hiệu suất thu hồi ở các mức nồng độ tính được lần lượt cho AFB1 là 94,9 – 98,1 %; AFB2 từ 91,7 – 98,6 %; AFG1 từ 97–99,8 %; và AFG2 từ 76,5 – 96,0 % (Bảng 5). Đối chiếu với yêu cầu kỹ thuật theo AOAC tại hàm lượng chất phân tích là 1 µg/kg, hiệu suất thu hồi phải đạt từ 40 – 120 %. Độ đúng của phương pháp đạt được cao hơn rất nhiều để ứng dụng phương pháp phân tích các độc tố aflatoxin nhóm B và G trong nền mẫu đậu phộng.

Bảng 5. Hiệu suất thu hồi, độ lặp và tái lặp của phương pháp định lượng

Aflatoxin	Nồng độ thêm chuẩn (µg/kg)	Hiệu suất thu hồi trung bình (%) (n=12)	Độ lặp lại (RSD _r , %) (n=6)	Độ tái lặp (RSD _R , %) (n=12)
AFB1	0,3	98,1	1,1	1,09
AFB2	0,1	98,6	0,4	0,85
AFG1	0,3	99,8	0,4	0,90
AFG2	0,1	96,0	0,2	0,18
AFB1	1,5	94,9	0,4	0,32
AFB2	0,5	91,7	0,2	0,25
AFG1	1,5	95,5	0,2	0,31
AFG2	0,5	84,6	0,1	0,45
AFB1	3,0	97,3	0,7	1,88
AFB2	1,0	92,3	0,9	3,94
AFG1	3,0	97,0	0,6	1,48
AFG2	1,0	86,5	0,6	2,98

Từ Bảng 5 cho thấy, độ lặp lại của phép phân tích là rất tốt với độ lệch chuẩn tương đối (RSD_r %) cho tất cả các nồng độ nhỏ hơn 1,1 %, nhỏ hơn rất nhiều so với mức giới hạn tối đa theo AOAC (30%). Kết quả cũng thể hiện sự ổn định tốt của phương pháp thông qua độ tái lập trung gian thay đổi trên ba mức nồng độ và hai kiểm nghiệm viên với lệch chuẩn tương đối (RSD_R %) thu được nhỏ hơn 3,8 %. Kết quả này tốt hơn nhiều so với quy định của AOAC (< 45 %).

Độ chính xác của phương pháp phân tích (độ không đảm bảo đo, MU%) được tính toán dựa trên phương pháp “Top-down” [16]. Các nguồn chính gây nên độ không đảm bảo đo của phương pháp như độ đúng (độ thu hồi), độ tái lập và đường hiệu chuẩn. Kết quả độ không

đảm bảo đo mở rộng ở độ tin cậy 95% ($k=2$) lần lượt cho AFB1, AFB2, AFG1 và AFG2 là 3,2 %; 6,0%; 2,7% và 10,1%. MU thu được tốt hơn nhiều so với giá trị có thể chấp nhận đối với phương pháp phân tích định lượng ở nồng độ nhỏ hơn 100 $\mu\text{g/kg}$ ($MU < 44\%$). Điều này chứng minh phương pháp có độ chính xác cao trong phân tích định lượng các độc tố aflatoxin trong mẫu đậu phộng.

3.5. Ứng dụng phương pháp phân tích mẫu thực tế

Phương pháp sau khi thẩm định được ứng dụng để phân tích 09 mẫu đậu phộng đã chế biến (sản phẩm ăn liền), các mẫu này được bán trên thị trường Thành phố Hồ Chí Minh. Kết quả phân tích thu được như Bảng 6.

Bảng 6. Kết quả phân tích mẫu thực tế

Kí hiệu mẫu	AFB1 ($\mu\text{g/kg}$)	AFB2 ($\mu\text{g/kg}$)	AFG1 ($\mu\text{g/kg}$)	AFG2 ($\mu\text{g/kg}$)
M1	$0,227 \pm 0,007$	$0,084 \pm 0,005$	$0,240 \pm 0,006$	$0,089 \pm 0,009$
M2	$0,197 \pm 0,006$	$0,055 \pm 0,003$	—	—
M3	—	—	—	$0,025 \pm 0,003$
M4	$0,469 \pm 0,015$	$0,116 \pm 0,007$	—	—
M5	$186,467 \pm 5,667$	$66,284 \pm 3,977$	$0,640 \pm 0,017$	—
M6	$1,097 \pm 0,035$	$0,391 \pm 0,023$	—	—
M7	$4,036 \pm 0,129$	$1,006 \pm 0,060$	$4,057 \pm 0,110$	$1,006 \pm 0,102$
M8	$151,993 \pm 4,864$	$17,175 \pm 1,031$	$0,766 \pm 0,021$	—
M9	$1,310 \pm 0,009$	$0,157 \pm 0,009$	—	—

Kết quả phân tích cho thấy 8/9 mẫu có sự hiện diện của AFB1 và AFB2, tương đương với 88,9% tổng số mẫu. Trong đó, số mẫu có mặt AFG2 là ít nhất (3/9 mẫu). Xét về hàm lượng, AFB1 có hàm lượng cao nhất (1,31 – 186,467 $\mu\text{g/kg}$). Đối chiếu với quy chuẩn của Bộ Y Tế, có tới 3/9 mẫu (M5, M7 và M8) không đạt tiêu chuẩn về an toàn vệ sinh thực phẩm tương đương với 33,3%. Tuy số lượng mẫu khảo sát còn hạn chế, kết quả thu được cho thấy mức độ nghiêm trọng của nấm mốc aflatoxin trong mẫu đậu phộng đã qua chế biến có trên thị trường hiện nay.

4. KẾT LUẬN

Phương pháp phân tích định lượng có độ chính xác cao đã được thẩm định để phân tích hàm lượng các độc tố aflatoxin nhóm B và G trong mẫu đậu phộng đã qua chế biến bằng UPLC-

MS/MS. Đường hiệu chuẩn thu được có hệ số tương quan rất cao ($R^2 = 0,999$), giới hạn phát hiện phương pháp của tất cả các độc tố aflatoxin đều thấp hơn 0,1 $\mu\text{g/kg}$. Những thông số này cho phép phương pháp ứng dụng được trong phạm vi nồng độ rộng với độ nhạy cao. Độ đúng và độ tái lập của phương pháp tốt hơn nhiều so với yêu cầu cần thiết đối với một phương pháp định lượng ở mức nồng độ $\mu\text{g/kg}$. Phương pháp đã được áp dụng để phân tích độc tố aflatoxin nhóm B và G trong các mẫu đậu phộng đã qua chế biến đang bán trên thị trường và có thể áp dụng trong thực tiễn về kiểm soát chất lượng và vệ sinh an toàn thực phẩm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] W. T. E. Ting, C.H. Chang, B. Szonyi, D. Gizachew, “Growth and Aflatoxin B1, B2, G1,

- and G2 Production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* on Ground Flax Seeds (*Linum usitatissimum*),” *Journal of food protection*, vol. 83, no. 6, pp. 975-983, 2020. DOI: 10.4315/jfp-19-539
- [2] W. Bennett, M. Klich, “Mycotoxins,” *Clinical Microbiology Reviews*, vol.16, no.3, pp. 497–516, 2003. DOI: 10.1128/CMR.16.3.497-516.2003
- [3] P. Kumar, D. K. Mahato, M. Kamle, T. K. Mohanta, S. G. Kang, “Aflatoxins: A Global Concern for Food Safety, Human Health and Their Management,” *Frontiers in microbiology*, vol. 7, pp. 2170, 2016. DOI: 10.3389/fmicb.2016.02170
- [4] S. Marchese, A. Polo, A. Ariano, S. Velotto, S. Costantini, L. Severino, “Aflatoxin B1 and M1: Biological Properties and Their Involvement in Cancer Development,” *Toxins (Basel)*, vol. 10, no. 6, 2018. doi: 10.3390/toxins10060214
- [5] A. Nazhand, A. Durazzo, M. Lucarini, E. B. Souto, A. Santini, “Review: Characteristics, Occurrence, Detection and Detoxification of Aflatoxins in Foods and Feeds,” *Food*, vol. 9, no. 644, 2020. <https://doi.org/10.3390/foods9050644>
- [6] B. R. Malone, C. W. Humphrey, T. R. Romer, J. L. Richard, “Determination of aflatoxins in grains and raw peanuts by a rapid procedure with fluorometric analysis,” *Journal of AOAC International*, vol. 83, no. 1, pp. 95–98, 2000. PMID: 10693009
- [7] T. Pearson, D. Wicklow, E. Maghirang, F. Xie, F. Dowell, “Detecting aflatoxin in single corn kernels by transmittance and reflectance spectroscopy,” *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers*, vol. 44, no. 5, pp. 1247–1254, 2001.
- [8] L. Masoomi, O. Sadeghi, M. H. Banitaba, A. Shahrjerdi, S. S. H. Davarani, “A non-enzymatic nanomagnetic electro-immunosensor for determination of Aflatoxin B1 as a model antigen,” *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 177, pp. 1122–1127, 2013.
- [9] D. L. Park, M. W. Trucksess, S. Nesheim, M. Stack, R. F. Newell, “Solvent-efficient thin-layer chromatographic method for the determination of aflatoxins B1, B2, G1, and G2 in corn and peanut products: collaborative study,” *Journal of AOAC International*, vol. 77, no. 3, pp. 637–646, 1994. PMID: 8012213
- [10] Commission Regulation (EC) No 1881/2006, “Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs, Section 2: Mycotoxins,” 19 December 2006. <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2006/1881/2014-07-01#E0051>
- [11] A. Rahmani, S. Jinap, and F. Soleimany, “Qualitative and quantitative analysis of mycotoxins,” *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, vol. 8, no. 3, pp. 202–251, 2009.
- [12] P. Li, Q. Zhang, D. Zhang et al., “Aflatoxin measurement and analysis”, in *Aflatoxins—Detection, Measurement and Control*, I. Torres-Pacheco, Ed., pp. 183–208, Intech, Shanghai, China, 2011.
- [13] International Standard, “General requirements for the competence of testing and calibration laboratories,” ISO/IEC 17025, 2017. <https://www.iso.org/standard/66912.html>
- [14] AOAC International, “Guidelines for standard method performance requirements,” *AOAC Official Methods of Analysis*, Appendix F, 2016. http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf
- [15] QCVN 8-1:2011/BYT, “Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia đối với giới hạn ô nhiễm độc tố vi nấm trong thực phẩm,” 2011.
- [16] EURACHEM/CITAC Guide CG4, “Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement,” 3th Ed., 2012. <https://www.eurachem.org/index.php/publications/guides/quam>