

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC DƯỢC – HÀ NỘI

-----oOo-----

NGUYỄN THỊ NGUYỆT THU

**TÁCH CHIẾT, PHÂN TÍCH AFLATOXIN
TRONG THỰC PHẨM VÀ DƯỢC LIỆU
BẰNG CỘT SẮC KÝ ÁI LỰC MIỄN DỊCH
KẾT HỢP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

HÀ NỘI - 2011

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC DƯỢC – HÀ NỘI

NGUYỄN THỊ NGUYỆT THU

**TÁCH CHIẾT, PHÂN TÍCH AFLATOXIN
TRONG THỰC PHẨM VÀ DƯỢC LIỆU
BẰNG CỘT SẮC KÝ ÁI LỰC MIỄN DỊCH
KẾT HỢP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO**

Chuyên ngành: Kiểm nghiệm thuốc

Mã số: 62.73.15.01

LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

Người hướng dẫn khoa học:

1. PGS.TS. Trịnh Văn Quỳnh

2. PGS.TSKH. Nguyễn Lê Trang

HÀ NỘI - 2011

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi. 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.

Nguyễn Thị Nguyệt Thu

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới:

PGS.TS. Trịnh Văn Quỳ, nguyên Viện Trưởng Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương và **PGS.TSKH. Nguyễn Lê Trang**, nguyên Trưởng phòng Hóa Miễn dịch Viện Pasteur TP.HCM, đã tận tình hướng dẫn, giúp đỡ và cho tôi nhiều kiến thức quý báu để tôi hoàn thành luận án.

Ban Giám đốc Viện Pasteur TP.HCM đã tạo điều kiện thuận lợi cho tôi hoàn thành luận án đúng thời gian quy định.

PGS.TS. Trương Thị Xuân Liên, nguyên Viện phó Viện Pasteur TP.HCM đã đóng góp ý kiến, chỉ dẫn và động viên tôi trong suốt thời gian thực hiện luận án.

Các anh chị Viện Vệ sinh Y tế Công cộng, Khoa Y học cổ truyền trường Đại học Y Dược, và Trung tâm Kiểm nghiệm Dược phẩm TP.HCM đã cung cấp các mẫu thực phẩm, dược liệu và thuốc đông dược để tôi thực hiện đề tài.

Các thầy, và các anh chị Bộ môn Hóa phân tích Trường Đại học Dược Hà Nội đã giúp đỡ tôi trong quá trình học tập tại trường.

Và cuối cùng, tôi xin chân thành cảm ơn **các anh chị** phòng Hóa lý và phòng Hóa Miễn Dịch - Viện Pasteur TP.HCM đã động viên, giúp đỡ và chia sẻ những khó khăn với tôi trong công việc.

Nguyễn Thị Nguyệt Thu

MỤC LỤC

| | <i>Trang</i> |
|---|--------------|
| Lời cam đoan | i |
| Lời cảm ơn | ii |
| Mục lục..... | iii |
| Danh mục các chữ viết tắt..... | viii |
| Danh mục hình | x |
| Danh mục bảng..... | xiv |
| ĐẶT VẤN ĐỀ | 1 |
| CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU | 4 |
| 1.1. TỔNG QUAN VỀ AFLATOXIN | 4 |
| 1.1.1. Phát hiện aflatoxin..... | 4 |
| 1.1.2. <i>Aspergillus flavus</i> và aflatoxin..... | 4 |
| 1.1.3. Tính chất hóa, lý của aflatoxin..... | 5 |
| 1.1.4. Độc tính của aflatoxin..... | 8 |
| 1.1.5. Giới hạn của aflatoxin trong thực phẩm | 10 |
| 1.1.6. Giới hạn aflatoxin trong dược liệu..... | 12 |
| 1.2. PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG AFLATOXIN..... | 12 |
| 1.2.1. Lấy mẫu | 12 |
| 1.2.2. Chuẩn bị mẫu | 12 |
| 1.2.3. Phân tích mẫu..... | 16 |

| | |
|--|-----------|
| 1.3. NHỮNG NGHIÊN CỨU CHẾ TẠO CỘT SẮC KÝ ÁI LỰC MIỄN DỊCH CHO AFLATOXIN | 23 |
| 1.3.1. Kháng thể..... | 23 |
| 1.3.2. Cộng hợp kháng nguyên aflatoxin – BSA | 24 |
| 1.3.3. Tạo kháng thể kháng aflatoxin | 26 |
| 1.3.4. Tinh chế kháng thể..... | 30 |
| 1.3.5. Cố định kháng thể vào pha rắn..... | 31 |
| 1.3.6. Các đặc tính chiết xuất pha rắn của chất hấp thụ ái lực miễn dịch | 34 |
| CHƯƠNG 2: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP | 38 |
| 2.1. VẬT LIỆU..... | 38 |
| 2.1.1. Thiết bị..... | 38 |
| 2.1.2. Hóa chất | 38 |
| 2.2. PHƯƠNG PHÁP..... | 40 |
| 2.2.1. Phương pháp gây miễn dịch tạo kháng thể kháng aflatoxin | 40 |
| 2.2.2. Phương pháp khuếch tán kép trên thạch | 41 |
| 2.2.3. Phương pháp tinh chế kháng thể dùng muối amoni sulfat..... | 42 |
| 2.2.4. Phương pháp thẩm tích (đưa protein ở dạng tủa trở lại dạng dung dịch)..... | 42 |
| 2.2.5. Phương pháp điện di trên gel polyacrylamid có natri dodecyl sulfat | 43 |
| 2.2.6. Xác định nồng độ protein bằng phương pháp Bradford | 45 |
| 2.2.7. Cộng hợp protein vào gel sepharose CL-4B hoạt hóa với CNBr..... | 45 |

| | |
|--|----|
| 2.2.8. Phương pháp nén cột..... | 45 |
| 2.2.9. Phương pháp sắc ký ái lực miễn dịch..... | 46 |
| 2.2.11. Phương pháp chiết aflatoxin từ mẫu cần phân tích bằng cột IAC..... | 47 |
| 2.2.12. Phương pháp chiết aflatoxin từ mẫu cần phân tích bằng cột SPE C ₁₈ . | 47 |
| 2.2.13. Phương pháp làm giả mẫu nhiễm aflatoxin | 48 |
| 2.2.14. Phương pháp tạo dẫn xuất các aflatoxin | 48 |
| 2.2.15. Phương pháp sắc ký lỏng pha đảo phân tích aflatoxin | 48 |
| 2.2.16. Phương pháp khảo sát các thông số kỹ thuật của cột sắc ký ái lực bắt aflatoxin | 48 |
| 2.2.16.1. Độ lặp lại của các cột..... | 48 |
| 2.2.16.2. Dung lượng cột..... | 49 |
| 2.2.16.3. Giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng | 49 |
| 2.2.16.4. Xác định độ tuyến tính..... | 50 |
| 2.2.16.5. Xác định hiệu suất thu hồi..... | 50 |
| 2.2.16.6. Theo dõi độ ổn định của cột..... | 51 |
| CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ | 52 |
| 3.1. CHẾ TẠO CỘT SẮC KÍ ÁI LỰC CHO AFLATOXIN | 52 |
| 3.1.1. Sản xuất kháng thể kháng aflatoxin | 52 |
| 3.1.1.1. Gây miễn dịch trên thỏ..... | 53 |
| 3.1.1.2. Kiểm tra đáp ứng miễn dịch | 54 |
| 3.1.2. Chế tạo cột sắc ký ái lực bắt aflatoxin..... | 59 |

| | |
|--|------------|
| 3.1.2.1. Chọn nồng độ kháng thể liên kết với gel ái lực | 59 |
| 3.1.2.2. Khảo sát các thông số kỹ thuật của cột IAC Pasteur | 63 |
| 3.2. ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG ỨNG DỤNG CỘT IAC-PASTEUR CHO PHÂN TÍCH AFLATOXIN TRONG THỰC PHẨM VÀ DƯỢC LIỆU..... | 68 |
| 3.2.1. Khảo sát trên mẫu thực phẩm | 68 |
| 3.2.1.1. Khảo sát trên mẫu ngô..... | 68 |
| 3.2.1.2. Khảo sát trên mẫu lạc | 76 |
| 3.2.2. Khảo sát trên mẫu dược liệu..... | 81 |
| 3.2.2.1. Khảo sát trên mẫu cam thảo | 81 |
| 3.2.2.2. Khảo sát trên mẫu gừng..... | 87 |
| 3.3. SO SÁNH CÁC PHƯƠNG PHÁP XỬ LÝ MẪU KHÁC | 92 |
| 3.3.1. So sánh với phương pháp xử lý mẫu bằng cột SPE C ₁₈ | 92 |
| 3.3.1.1. Trên nền mẫu thực phẩm | 92 |
| 3.3.1.2. Trên nền mẫu dược liệu..... | 96 |
| 3.3.2. So sánh với phương pháp xử lý mẫu bằng cột sắc ký ái lực của hãng Vicam..... | 99 |
| 3.3.2.1. So sánh trên mẫu cộng chuẩn | 99 |
| 3.3.2.2. So sánh trên mẫu thực | 103 |
| 3.4. ÁP DỤNG CỘT IAC-PASTEUR LÀM SẠCH MẪU ĐỊNH LƯỢNG AFLATOXIN TRÊN MỘT SỐ NỀN MẪU THỰC PHẨM VÀ DƯỢC LIỆU.... | 105 |
| 3.4.1. Trên một số nền mẫu thực phẩm..... | 105 |

| | |
|--|------------|
| 3.4.2. Trên một số nền mẫu dược liệu | 106 |
| CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN | 107 |
| 4.1. BÀN LUẬN VỀ CHẾ TẠO CỘT SẮC KÝ ÁI LỰC CHO AFLATOXIN.. | 107 |
| 4.1.1. Về sản xuất kháng thể kháng aflatoxin | 107 |
| 4.1.1.1. Về gây miễn dịch trên thỏ..... | 107 |
| 4.1.1.2. Về kiểm tra đáp ứng miễn dịch | 109 |
| 4.1.2. Về chế tạo cột sắc ký ái lực bắt aflatoxin..... | 111 |
| 4.1.2.1. Về chọn nồng độ kháng thể liên kết vào gel ái lực | 111 |
| 4.1.2.2. Về khảo sát các thông số kỹ thuật của cột IAC Pasteur | 112 |
| 4.2. BÀN LUẬN VỀ KHẢ NĂNG ỨNG DỤNG CỘT IAC-PASTEUR CHO PHÂN TÍCH AFLATOXIN TRONG THỰC PHẨM VÀ DƯỢC LIỆU | 114 |
| 4.3. BÀN LUẬN VỀ SO SÁNH CÁC PHƯƠNG PHÁP XỬ LÝ MẪU KHÁC | 118 |
| 4.3.1. Với phương pháp xử lý mẫu bằng cột SPE C ₁₈ | 118 |
| 4.3.2. Với phương pháp xử lý mẫu bằng cột IAC của hãng Vicam..... | 121 |
| 4.4. BÀN LUẬN VỀ ÁP DỤNG CỘT IAC-PASTEUR ĐỂ XÁC ĐỊNH AFLATOXIN TRONG MỘT SỐ THỰC PHẨM VÀ DƯỢC LIỆU | 122 |
| KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT | 125 |
| DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ | 127 |
| TÀI LIỆU THAM KHẢO | |
| PHỤ LỤC | |

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

| | |
|------------------|--|
| AFB ₁ | Aflatoxin B ₁ |
| AFB ₂ | Aflatoxin B ₂ |
| AFG ₁ | Aflatoxin G ₁ |
| AFG ₂ | Aflatoxin G ₂ |
| AFM ₁ | Aflatoxin M ₁ |
| AOAC | Association of Official Analytical Chemists |
| BSA | Bovine serum albumin (Albumin huyết thanh bò) |
| CD | Cyclodextrin |
| CNBr | Cyanogen bromide |
| EU | European Union (Liên minh châu Âu) |
| FDA | US Food and Drug Administration (Cơ quan quản lý thuốc và thực phẩm Hoa Kỳ) |
| Fab | Antigen binding fragment (Mảnh gắn kháng nguyên) |
| Fc | Crystalizable fragment |
| ELISA | Enzyme-linked immunosorbent assay |
| HPLC | High-performance liquid chromatography |
| HCC | Hepatocellular carcinoma |
| HBV | Hepatitis B virus |
| HCV | Hepatitis C virus |
| HBsAg | Hepatitis B surface Antigen |
| IAC | Immuno Affinity Chromatography (Sắc ký ái lực miễn dịch) |
| IARC | International Agency for Research on Cancer (Cơ quan nghiên cứu ung thư quốc tế) |
| IUPAC | International Union of Pure and Applied Chemistry (Liên đoàn quốc tế về hoá học thuần túy và ứng dụng) |