

NGHIÊN CỨU SỬ DỤNG THIẾT BỊ SẮC KÝ LỎNG HPLC 1200 ĐỂ PHÂN TÍCH HÀM LƯỢNG AFLATOXIN TRONG MỘT SỐ LOẠI NÔNG SẢN THỰC PHẨM

TỔNG QUAN

Độc tố nấm (mycotoxin) là nhóm hợp chất có cấu trúc đa dạng, có khối lượng phân tử nhỏ, được tạo ra bằng trao đổi chất thứ cấp của các nấm mốc và gây ngộ độc với động vật có vú, cá, gia cầm. Cho đến nay, trên 300 loại độc tố nấm đã được phát hiện và nghiên cứu. Trong đó, một loại độc tố có thể do nhiều loài nấm khác nhau sản sinh và một loài nấm có thể đồng thời sản sinh nhiều loại độc tố. Điều đáng chú ý là có 20 loại mycotoxin có trong thực phẩm ở mức độ nghiêm trọng thường liên quan đến an toàn thực phẩm và được tạo bởi năm chi nấm: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Furarium*, *Alternaria* và *Claviceps*. Trong số các mycotoxin thì aflatoxin là độc tố được phát hiện sớm nhất và được nghiên cứu đầy đủ nhất về mọi phương diện (Bùi Xuân Đồng và cs, 2009).

Van Egmond (2005) cho biết aflatoxin được sinh ra từ nấm *Aspergillus flavus* và *Aspergillus parasiticus*, thuộc họ nấm cúc. Loài nấm này khá phổ biến, có thể tìm thấy trên khắp địa cầu, đặc biệt là ở các nước nhiệt đới. Aflatoxin được tích lũy trong cơ thể người và gia súc, là nguồn nguy cơ gây ung thư cao (nhất là ung thư gan) và tổn thương ở thận. Các loại nông sản thường bị nhiễm aflatoxin là ngũ cốc (ngô, kê, gạo, lúa mì), một vài loại hạt có chứa dầu (lạc, đậu tương, hạt hướng dương, hạt bông)... Thức ăn chăn nuôi và nguyên liệu chế biến thức ăn là những đối tượng thích hợp nhất cho sự phát triển và sản sinh độc tố aflatoxin.

Độc tính aflatoxin cao gấp 10 lần axit hydroxyanic (HCN) và gấp 68 lần Arsen (As). Những nghiên cứu trên động vật cho thấy con vật có thể chết do bị ngộ độc aflatoxin chỉ với liều 0,294mg/kg (Châu Vĩnh Thi, 2009). Trong đó, aflatoxin B1 là loại độc tố độc và phổ biến nhất. Aflatoxin B1 là phân tử ái mỡ, có trọng lượng phân tử thấp, dễ dàng được hấp thu sau khi ăn. Khi đến ruột non, aflatoxin B1 sẽ được nhanh chóng hấp thu vào máu tĩnh mạch mạc treo, sự hấp thu ở ruột non và tá tràng là nhiều nhất. Niêm mạc ống tiêu hóa có khả năng chuyển dạng sinh học aflatoxin B1 nhờ sự gắn kết với protein - đây là con đường chính để giải độc aflatoxin B1 cho gan. Từ ống tiêu hóa, theo tĩnh mạch cửa, aflatoxin được tập trung vào gan nhiều nhất (chiếm khoảng 17% lượng aflatoxin của cơ thể), tiếp theo là ở thận, cơ, mô mỡ, tụy, lách... Nhiễm độc các aflatoxin gây một loạt các triệu chứng cấp tính và mãn tính. Nhiễm độc cấp tính thường biểu hiện khi các động vật thí nghiệm chết với các triệu chứng thường gặp là hoại tử nhu mô gan, chảy máu ở gan và viêm cầu thận cấp. Nhiễm độc mạn tính thường có biểu hiện ăn kém ngon, chậm lớn, gan tụ máu, chảy máu và hoại tử nhu mô. Loại mạn tính tác động tới yếu tố di truyền tương ứng với ba kiểu gây ung thư, gây quái thai và gây đột biến.

* Tình hình nghiên cứu thực trạng nhiễm aflatoxin trong nông sản thực phẩm

Trong lịch sử đã từng xảy ra rất nhiều vụ ngộ độc thức ăn do độc tố nấm mốc gây tử vong cho hàng loạt người và gia súc. Những nghiên cứu về nấm mốc mới chỉ phát triển trong mấy chục năm gần đây nhưng nhờ đó đã làm cho sự hiểu biết về aflatoxin ngày càng sáng tỏ. Theo FAO có khoảng 25% lượng ngũ cốc trên thế giới có chứa độc tố từ nấm mốc. Ở châu Á, tỷ lệ này còn cao hơn do các yếu tố về khí hậu, phương thức thu hoạch, chế biến và bảo quản. Như ở Thái Lan, nhóm nghiên cứu của Shank (1997) cho biết các mẫu lương thực, thực phẩm bị mốc thì 50-60% số mẫu đó có aflatoxin. Ở Indonesia đậu có tỉ lệ nhiễm aflatoxin từ 60 - 80%, hàm lượng aflatoxin dao động từ 40 - 4100ppb, trong ngô từ 5,3 - 291,11ppb (Sudjadi, 1999). Ai Cập có 32% số ngũ cốc và 6% số loại bột cá bị nhiễm aflatoxin với hàm lượng 1 - 50ppb; 8% số ngũ cốc và 16%

số loại bột cá bị nhiễm từ 201 - 2.000ppb (Diab, 2000). Theo EC (Tổ chức Y tế và bảo vệ người tiêu dùng Châu Âu), tiêu chuẩn tối đa cho phép của aflatoxin trong đậu phộng 15 ppb (8 ppb cho B1), trong các loại hạt khác và quả khô để chế biến tiếp là 10 ppb (5 ppb cho B1). Đối với ngũ cốc, quả khô và các loại hạt dùng để ăn ngay cho người, tiêu chuẩn nghiêm ngặt hơn và quy định ở mức 4 ppb (2 ppb cho B1).

Ở Việt Nam, với đặc điểm khí hậu nhiệt đới nóng ẩm là điều kiện thích hợp cho độc tố nấm mốc phát triển. Hiện nay những công trình nghiên cứu về vấn đề này vẫn chưa nhiều song cũng đạt được một số kết quả đáng khích lệ, như kết quả nghiên cứu của Viện Vệ sinh dịch tễ đã nghiên cứu trên 29.381 mẫu lương thực thực phẩm thấy có 30 loại nấm mốc khác nhau, trong đó nấm *Aspergillus* chiếm tỉ lệ cao nhất từ 5,2 đến 80,39%, bao gồm 12 chủng loại *Aspergillus* khác nhau, trong số đó có 11 chủng có khả năng sinh độc tố. Viện Dinh dưỡng Quốc gia đã thông báo có 7/55 số mẫu lạc nhiễm aflatoxin B1, chiếm tỷ lệ 13%; 2/6 mẫu xì dầu nhiễm, chiếm tỷ lệ 33%. Bộ Y tế Việt Nam đã đưa ra giới hạn tối đa cho phép hàm lượng aflatoxin trong lương thực, thực phẩm nhằm đảm bảo sức khỏe cho vật nuôi và con người như sau: Aflatoxin B1 trong thực phẩm nói chung giới hạn cho phép tối đa 5ppb; aflatoxin B2, G1, G2 là 15 ppb.

MỤC TIÊU

Nghiên cứu ứng dụng thiết bị HPLC 1200 để định lượng aflatoxin trong nông sản thực phẩm góp phần vào công tác kiểm soát chất lượng và vệ sinh an toàn thực phẩm.

NỘI DUNG

1. Nghiên cứu xây dựng quy trình phân tích hàm lượng aflatoxin trên thiết bị sắc ký lỏng HPLC 1200 tại Viện Khoa học sự sống - Đại học Thái Nguyên
2. Đánh giá hệ số thu hồi của quy trình đạt các tiêu chuẩn theo TCVN 6910 -1: 2001
3. So sánh thử nghiệm tham chiếu qua kiểm tra liên phòng
4. Ứng dụng quy trình để phân tích hàm lượng aflatoxin trong nông sản thực phẩm

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Các phương pháp phân tích hàm lượng aflatoxin trong nông sản thực phẩm:

- Phương pháp sắc ký lớp mỏng (Thin layer chromatography-TLC): Phương pháp này được sử dụng lần đầu tiên vào những năm 1960. Người ta sử dụng các bản mỏng được tráng bởi silica gel để xác định aflatoxin. Dung môi sử dụng cho dung dịch chạy bản mỏng là chloroform: methanol và chloroform: aceton. Việc thêm nước vào hệ thống dung môi sẽ làm tăng khả năng hòa tan aflatoxin. Nhược điểm của phương pháp là phụ thuộc vào người phân tích. Khi so sánh giữa mẫu thực và mẫu chuẩn có thể có sự sai lệch kết quả từ 20 - 30%.

- Phương pháp đo mật độ huỳnh quang trên máy Fluorodensitometer: Có nhiều tiến bộ hơn, chính xác hơn so với nhìn bằng mắt thường. Tuy nhiên, có nhiều phòng thí nghiệm hiện đại vẫn sử dụng phương pháp nhìn để so sánh trực tiếp các vết trên bản mỏng vì dễ hơn nhiều khi sử dụng qua máy Densitometer. Hội Hóa học phân tích (O.A.O.C) đã lưu ý tới phương pháp phân tích định lượng sử dụng TLC. Phương pháp này được mở rộng thành chương trình phân tích mẫu của Tổ chức nghiên cứu ung thư thế giới (International Agency for Research on Cancer). Các kết quả của chương trình phân tích trên đã chứng nhận sự chính xác của phương pháp phân tích bằng TLC.

- Sắc ký lớp mỏng hiệu suất cao (High performance thin layer chromatography - HPTLC): Do những khiếm khuyết trong phương pháp sắc ký lớp mỏng đơn thuần ở các khâu như chiết tách mẫu phân tích, chạy mẫu trong dung môi, phương pháp HPTLC có tính thuyết phục cao hơn ở 3 khía cạnh sau: đưa mẫu lên bản mỏng một cách tự động, cải thiện được sự đồng nhất cả lớp hấp phụ, chạy bản mỏng trong dung môi có kiểm soát. Quá trình đưa mẫu vào bản mỏng được tự động hóa, do

đó các vết được định đúng vị trí và đo lường độ huỳnh quang của vết cũng bằng máy densitometers.

- Phương pháp sắc kí cột (Column chromatography methods):: Nhằm xác định nhanh hàm lượng aflatoxin. Phương pháp này đơn giản, ít tốn kém nhưng chỉ xác định định tính. Kỹ thuật nhồi cột mini là cột sắc kí bằng thủy tinh hay chất dẻo có kích thước khoảng 3 - 6mm chiều rộng và 20cm chiều dài. Dung dịch chiết tách được làm sạch bằng dung môi, dung môi và hòa tan trong một lượng nhỏ benzen hay chloroform. Cột được nhồi silicagel như một chất hấp thụ và quan sát dưới ánh sáng tử ngoại (UV) để xác định màu huỳnh quang xanh chỉ ra sự có mặt của aflatoxin.

- Phương pháp hóa sinh học (Immunochemical methods): Phương pháp này mang tính đặc hiệu cao, dựa trên nguyên lý kết hợp giữa kháng nguyên và kháng thể đặc hiệu. Hai phương pháp hiện dùng là: Aflatoxin đánh dấu phóng xạ (radio - labeled aflatoxin) và aflatoxin gắn men. Do sự tiến bộ của kỹ thuật miễn dịch trong những năm qua, đã phát triển nhiều hệ thống ELISA khác nhau để xác định aflatoxin và kháng thể đơn - đa dòng. Phương pháp ELISA gồm ELISA trực tiếp và ELISA gián tiếp. ELISA trực tiếp: Dựa trên nguyên lý kháng thể đặc hiệu được phủ trên các đĩa chuẩn độ. Dung dịch tách từ mẫu hay aflatoxin chuẩn được ủ cùng nhau hay tách thành hai bước. Sau đó rửa bằng dung dịch thích hợp. Lượng men gắn vào đĩa được xác định bằng dung dịch đặc biệt. Phản ứng màu được đo bằng quang phổ hoặc so sánh bằng mắt thường với các đĩa tiêu chuẩn. ELISA gián tiếp: Trong phương pháp này aflatoxin gắn vào protein được phủ các đĩa chuẩn độ (microtiter). Mẫu tách hay aflatoxin chuẩn được đưa vào đĩa, tiếp theo là kháng thể thứ cấp. Lượng kháng thể gắn vào đĩa được xác định do thêm IgG kháng thể gắn với photphataza kiềm và phản ứng màu xảy ra với P-nitrophenyl photphat. Lượng độc tố được xác định bằng cách so sánh với đường độc tố chuẩn. Toàn bộ quá trình chiếm khoảng 5 giờ. So sánh với phương pháp ELISA trực tiếp, phương pháp ELISA gián tiếp trải qua nhiều bước hơn và cần một kháng thể thứ cấp, vì vậy khả năng sai số cao hơn và chiếm nhiều thời gian.

- Phương pháp sắc ký lỏng HPLC (High performance liquid chromatography): Sắc ký lỏng là một trong những lĩnh vực quan trọng và hiện đại của hoá học. Nó được ứng dụng rất rộng rãi trong hầu hết các ngành khoa học và công nghiệp liên quan tới hoá học: Phân tích định tính và định lượng, điều chế các chất tinh khiết, xác định hằng số hoá lý, nghiên cứu các quá trình động học và xúc tác; Trong luyện kim, địa chất, điện, than, dầu mỏ, y dược, nông nghiệp, thực phẩm, bảo vệ môi trường.... Chính vì thế, hiện nay hàng năm trên thế giới công bố tới vài ba nghìn công trình liên quan tới sắc ký. Đối với nước ta, phương pháp sắc ký đã xâm nhập hàng chục năm nay và được áp dụng khá rộng rãi. Phương pháp này sử dụng hai pha là pha động và pha tĩnh, dựa trên sự hấp thụ tia tím (UV) và xác định cường độ huỳnh quang. Các chất có bản chất khác nhau sẽ bị tách theo thời gian khác nhau trong cột tách. Mẫu phân tích được tách bằng Chloroform và nước, ly tâm chất tách và làm sạch qua silicagel, pha tĩnh thường sử dụng cột nhồi silicagel 5 micromet và pha động sử dụng bezen: Acetonitril: axitformic. Sau đó aflatoxin được phát hiện nhờ đầu dò huỳnh quang, giới hạn phát hiện của phương pháp là 0,3 ppb cho mỗi aflatoxin.

HIỆU QUẢ KTXH

- Hiệu quả giáo dục và đào tạo: Đại học Thái Nguyên có số lượng sinh viên đứng thứ ba trong cả nước về quy mô đào tạo. Mỗi năm đã đào tạo hàng ngàn sinh viên ra trường phục vụ phát triển kinh tế của các tỉnh trung du miền núi nói riêng và cả nước nói chung. Đề tài nghiên cứu được triển khai sẽ góp phần đào tạo các đội ngũ tri thức trẻ gắn lý thuyết với thực nghiệm. Các nhà nghiên cứu khoa học, các giảng viên và sinh viên có môi trường tốt để áp dụng những tiến bộ kỹ thuật vào thực tiễn sản xuất, nâng cao kinh nghiệm thực tế qua đó nâng cao chất lượng đào tạo

của Nhà trường nói riêng và toàn Đại học nói chung.

- Hiệu quả kinh tế - xã hội: Vệ sinh an toàn thực phẩm đóng vai trò quan trọng trong chiến lược bảo vệ sức khoẻ con người. Chương trình vệ sinh an toàn thực phẩm Quốc gia được tiến hành thông qua hoạt động của các phòng thí nghiệm, kiểm tra chất lượng vệ sinh an toàn thực phẩm. Đề tài được triển khai sẽ góp phần thực hiện chương trình Quốc gia đó. Đồng thời kết quả nghiên cứu của đề tài thông báo kịp thời các thực phẩm có nguy cơ ô nhiễm độc tố nấm mốc cao để có biện pháp can thiệp đề phòng ngộ độc thực phẩm và bảo vệ sức khoẻ cộng đồng.

ĐƠN VỊ SỬ DỤNG

- Các phòng phân tích Hoá sinh
- Các Phòng Nông nghiệp, Sở Nông Nghiệp và Phát triển nông thôn.
- Các trang trại chăn nuôi, các Công ty sản xuất và kinh doanh thức ăn chăn nuôi.
- Các cơ sở đào tạo, nghiên cứu trong và ngoài tỉnh.