

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

VIỆN DƯỢC LIỆU

===o0o===



PHÙNG MINH DŨNG

**NGHIÊN CỨU PHÁT HIỆN VÀ
XÂY DỰNG QUY TRÌNH PHÂN LẬP
TETRODOTOXIN VÀ MỘT SỐ ĐỘC TỐ
THẦN KINH KHÁC TỪ CÁ NÓC**

LUẬN ÁN TIẾN SỸ DƯỢC HỌC

HÀ NỘI, 2017

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

VIỆN DƯỢC LIỆU

===o0o===

PHÙNG MINH DŨNG

**NGHIÊN CỨU PHÁT HIỆN VÀ
XÂY DỰNG QUY TRÌNH PHÂN LẬP
TETRODOTOXIN VÀ MỘT SỐ ĐỘC TỐ
THẦN KINH KHÁC TỪ CÁ NÓC**

LUẬN ÁN TIẾN SỸ DƯỢC HỌC

CHUYÊN NGÀNH : Dược học cổ truyền

MÃ SỐ : 62720406

Người hướng dẫn khoa học : **PGS. TS. Trần Việt Hùng**

PGS. TS. Nguyễn Tiến Vững

HÀ NỘI, 2017

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan Luận án này là công trình nghiên cứu của tôi, dưới sự hướng dẫn của PGS. TS. Trần Việt Hùng và PGS. TS. Nguyễn Tiến Vững.

Các số liệu và kết quả được trình bày trong Luận án là trung thực và chưa từng được ai công bố trong bất kỳ công trình nào khác.

Người cam đoan

Phùng Minh Dũng

LỜI CẢM ƠN

Trong quá trình nghiên cứu, thực hiện và hoàn thành luận án này, tôi đã nhận được rất nhiều sự giúp đỡ quý báu của các tập thể, thầy cô giáo, các nhà khoa học thuộc nhiều lĩnh vực, cùng đồng nghiệp, bạn bè và gia đình.

Trước hết, với lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc, tôi xin được bày tỏ lời cảm ơn chân thành tới: PGS. TS. Trần Việt Hùng, PGS. TS. Nguyễn Tiến Dũng những người thầy đã tận tình hướng dẫn, hết lòng chỉ bảo và tạo mọi điều kiện giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu và hoàn thành luận án.

Tôi xin trân trọng cảm ơn Ban Lãnh đạo, Phòng Quản lý Khoa học và Đào tạo – Viện Dược liệu đã tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt thời gian học tập và nghiên cứu

Tôi cũng xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành tới:

PGS. TS. Nguyễn Tiến Đạt - Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm KHCN Việt Nam

TS. Trần Minh Ngọc – Phó Viện trưởng, Viện Dược liệu

ThS. Dương Minh Tân – Khoa Nghiên cứu phát triển, Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

TS. Nguyễn Hoài Nam – Phó Viện trưởng, Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm KHCN Việt Nam

PGS. TS. Đỗ Thị Hà – Khoa Hóa thực vật, Viện Dược liệu

TS. Trịnh Thị Diệp – Khoa Hóa học, Trường Đại học Đà Lạt

đã tạo mọi điều kiện phối hợp, giúp đỡ và đóng góp ý kiến quý báu cho tôi hoàn thiện luận án này.

Cuối cùng, tôi xin cảm ơn gia đình, bạn bè, đồng nghiệp đã luôn bên tôi, động viên, khích lệ tôi giúp tôi học tập, làm việc và hoàn thành luận văn này.

Xin chân thành cảm ơn!

NCS. Phùng Minh Dũng

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN.....	0
LỜI CẢM ƠN	0
MỤC LỤC	0
DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT VÀ KÝ HIỆU	0
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	0
DANH MỤC CÁC HÌNH.....	0
MỞ ĐẦU.....	1
CHƯƠNG I. TỔNG QUAN.....	3
1.1. CÁ NÓC.....	3
1.1.1. Phân loại	3
1.1.2. Phân bố	3
1.1.3. Đặc điểm nhận dạng	2
1.2. <i>TETRODOTOXIN</i>	4
1.2.1. Cấu trúc <i>tetrodotoxin</i> và các độc tố tương tự <i>tetrodotoxin</i>	4
1.2.2. Phân bố và nguồn gốc của <i>tetrodotoxin</i> trong tự nhiên.....	7
1.2.3. Hàm lượng của <i>tetrodotoxin</i> và các dẫn chất trong cá nóc	13
1.2.4. Độc tính của <i>tetrodotoxin</i> và các dẫn chất.....	15
1.2.5. Tác dụng sinh học và cơ chế	17
1.2.6. Khả năng ứng dụng của <i>tetrodotoxin</i> trong y học	20
1.3. MỘT SỐ PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ <i>TETRODOTOXIN</i>	27
1.3.1. Một số phương pháp chiết xuất, phân lập <i>tetrodotoxin</i> từ tự nhiên	27
1.3.2. Một số phương pháp điều chế khác.....	30
1.4. MỘT SỐ PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH TÍNH, ĐỊNH LƯỢNG <i>TETRODOTOXIN</i> VÀ <i>DẪN CHẤT</i>	33
1.4.1. Phương pháp sinh hóa	33
1.4.2. Phương pháp quang phổ.....	34

1.4.3. Phương pháp sắc ký.....	35
1.4.4. Phương pháp phổ khối.....	38
1.4.5. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR)	41
1.5. CHẤT CHUẨN VÀ THIẾT LẬP CHẤT CHUẨN	43
1.5.1. Chất chuẩn đối chiếu hóa học.....	43
1.5.2. Phương pháp thiết lập chất chuẩn.....	43
1.5.3. Đánh giá liên phòng thí nghiệm	43
1.5.4. Chất chuẩn <i>tetrodotoxin</i>	44
CHƯƠNG II. ĐỐI TƯỢNG, NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	46
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU	46
2.2. PHƯƠNG TIỆN NGHIÊN CỨU.....	46
2.2.1. Hóa chất thuốc thử.....	46
2.2.2. Thiết bị, dụng cụ.....	46
2.2.3. Động vật thí nghiệm	48
2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	49
2.3.1. Thu mẫu, định danh, xử lý mẫu, bảo quản, vận chuyển cá nóc từ nơi thu mẫu đến phòng thí nghiệm	49
2.3.2. Nghiên cứu phát hiện, định tính, định lượng <i>tetrodotoxin</i>	51
2.3.3. Nghiên cứu thành phần hóa học, phân lập <i>tetrodotoxin</i> và dẫn chất từ một số loài cá nóc	55
2.3.4. Chiết xuất và tinh chế <i>tetrodotoxin</i> làm nguyên liệu thiết lập chất chuẩn	56
2.3.5. Thiết lập chất chuẩn <i>tetrodotoxin</i>	57
2.3.6. Bào chế và tiêu chuẩn hóa bột đông khô <i>tetrodotoxin</i> 0,1 %	59
CHƯƠNG III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	63
3.1. XÂY DỰNG CƠ SỞ DỮ LIỆU VỀ NGUỒN CÁ NÓC <i>TETRADONTIDAE</i> CÓ CHỨA <i>TETRODOTOXIN</i>	63
3.2. NGHIÊN CỨU PHÁT HIỆN ĐỘC TỐ THẦN KINH Ở MỘT SỐ LOÀI CÁ NÓC (<i>TETRAODONTIDAE</i>).....	64

3.2.1. Xác định nhanh độc tố của phủ tạng một số loài cá nóc	64
3.2.2. Xử lý mẫu, làm sạch qua cột chiết pha rắn.....	64
3.2.3. Định tính <i>tetrodotoxin</i> bằng sắc ký lớp mỏng	67
3.2.4. Nghiên cứu phát hiện <i>tetrodotoxin</i> và một số độc tố thần kinh khác từ một số loài cá nóc bằng các phương pháp hiện đại.....	69
3.2.5. Xây dựng phương pháp định tính, định lượng <i>tetrodotoxin</i> bằng sắc ký lỏng khối phổ (LC/MS)	72
3.2.6. Khảo sát hàm lượng <i>tetrodotoxin</i> trong một số bộ phận của một số loài cá nóc	75
3.3. NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC, PHÂN LẬP <i>TETRODOTOXIN</i> VÀ CÁC DẪN CHẤT TỪ MỘT SỐ LOÀI CÁ NÓC.....	80
3.3.1. Phát hiện <i>tetrodotoxin</i> và nhóm chất tương tự <i>tetrodotoxin</i> (<i>TTXs</i>) từ một số loài cá nóc độc	80
3.3.2. Xây dựng quy trình phân lập <i>tetrodotoxin</i> và một số độc tố thần kinh từ một số loài cá nóc	84
3.3.3. Phân tích xác định cấu trúc các độc tố phân lập được từ 5 loài cá nóc	84
3.4. NGHIÊN CỨU CHIẾT XUẤT VÀ TINH CHẾ <i>TETRODOTOXIN</i> Ở QUY MÔ PHÒNG THÍ NGHIỆM ĐỂ LÀM NGUYÊN LIỆU THIẾT LẬP CHẤT CHUẨN.....	92
3.4.1. Nghiên cứu chiết xuất, phân lập <i>tetrodotoxin</i> thô	92
3.4.2. Tinh chế <i>tetrodotoxin</i> bằng sắc ký lỏng điều chế	95
3.5. XÂY DỰNG TIÊU CHUẨN CƠ SỞ CỦA NGUYÊN LIỆU <i>TETRODOTOXIN</i>..	98
3.6. NGHIÊN CỨU THIẾT LẬP CHẤT CHUẨN <i>TETRODOTOXIN</i>.....	98
3.6.1. Nghiên cứu độ ổn định của <i>tetrodotoxin</i> trong một số dung môi.....	98
3.6.2. Nghiên cứu quy trình đóng ống chuẩn, 100 µg chất/lọ 1 ml, sử dụng dung môi thích hợp	99
3.6.3. Kiểm tra đánh giá chất lượng ống chuẩn.....	100
3.7. BÀO CHẾ BỘT ĐÔNG KHÔ <i>TETRODOTOXIN</i> 0,1 %	102
3.7.1. Bào chế bột đông khô	102
3.7.2. Xây dựng tiêu chuẩn cơ sở và kiểm nghiệm sản phẩm	103
3.7.3. Đánh giá độc tính cấp và bán trường diễn của bột đông khô 0,1%.....	103

CHƯƠNG IV. BÀN LUẬN	114
4.1. VỀ CƠ SỞ DỮ LIỆU NGUỒN CÁ NÓC VÀ ĐỘC TỔ CÁ NÓC	114
4.2. VỀ NGHIÊN CỨU PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN, ĐỊNH TÍNH VÀ ĐỊNH LƯỢNG ĐỘC TÍNH, ĐỘC TỔ THẦN KINH <i>TETRODOTOXIN</i> VÀ CÁC CHẤT TƯƠNG TỰ <i>TETRODOTOXIN</i>	115
4.2.1. Sàng lọc, phát hiện độc tính bằng phương pháp sinh hóa chuột	115
4.2.2. Các phương pháp định tính <i>tetrodotoxin</i> và <i>dẫn chất</i>	115
4.2.3. Các phương pháp định lượng <i>tetrodotoxin</i>	116
4.3. PHÂN LẬP <i>TETRODOTOXIN</i> VÀ NHÓM CHẤT TƯƠNG TỰ <i>TETRODOTOXIN</i> TỪ MỘT SỐ LOÀI CÁ NÓC THU ĐƯỢC TỪ VÙNG BIỂN VIỆT NAM.....	117
4.4. VỀ PHƯƠNG PHÁP CHIẾT XUẤT VÀ TINH CHẾ <i>TETRODOTOXIN</i> ĐẠT ĐỘ TINH KHIẾT LÀM NGUYÊN LIỆU THIẾT LẬP CHẤT CHUẨN	119
4.4.1. Chiết xuất.....	119
4.4.2. Tinh chế	121
4.5. THIẾT LẬP CHẤT CHUẨN <i>TETRODOTOXIN</i>	122
4.6. BỘT ĐÔNG KHÔ <i>TETRODOTOXIN</i> 0,1 %	122
4.7. ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN	123
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT	125
KẾT LUẬN.....	125
ĐỀ XUẤT	126
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ	127

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT VÀ KÝ HIỆU

ATCC	: Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Mỹ (American Type Culture Collection)
CI	: Kỹ thuật ion hoá hoá học (Chemical ionization)
COSY	: Correlation Spectroscopy
cs.	: Cộng sự
DEPT	: Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer
ĐVTN	: Động vật thử nghiệm
EI	: Kỹ thuật ion hoá điện tử (Electron Ionization)
ELISA	: Xét nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzyme (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
ESI	: Kỹ thuật ion hoá phun sương điện tử (Electric spray ionic)
ED ₅₀	: Liều của chất phơi nhiễm, trong cùng một thời điểm, gây ra ảnh hưởng sinh học khác nhau cho 50% (một nửa) của một nhóm động vật thử nghiệm (Effective Dose 50)
FAB	: Kỹ thuật bắn phá nguyên tử nhanh (Fast Atom Bombardment)
FLD	: Detector huỳnh quang (Fluorescence Detector)
FT ICR	: Phổ cộng hưởng từ gia tốc ion chuyển dạng Fourier (Fourier transform ion cyclotron resonance)
GC-MS	: Sắc ký khí khối phổ (Gas chromatography - Mass spectrum)
HMBC	: Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HPLC	: Sắc ký lỏng hiệu năng cao (High performance liquid chromatography)
HSQC	: Heteronuclear Single Quantum Coherence
LC MS	: Sắc ký lỏng khối phổ (Liquid Chromatography Mass spectrum)
LC MS/MS	: Sắc ký lỏng khối phổ ghép nối khối phổ (Liquid Chromatography tandem Mass spectrum)
LD ₁₀₀	: Liều tối thiểu của chất phơi nhiễm, trong cùng một thời điểm, gây ra cái chết cho toàn bộ một nhóm động vật thử nghiệm (Lethal Dose 100)
LD ₅₀	: Liều của chất phơi nhiễm, trong cùng một thời điểm, gây ra cái chết cho 50% (một nửa) của một nhóm động vật thử nghiệm (Lethal Dose 50)
LOD	: Giới hạn phát hiện (Limited of detection)
LOQ	: Giới hạn định lượng (Limited of quantification)
MLD	: Liều nhỏ nhất gây ra cái chết cá biệt ở động vật thí nghiệm khi thí nghiệm một nhóm động vật (minimum lethal dose)
MU	: Đơn vị chuột (mouse unit)
NMR	: Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (Nuclear Magnetic Resonance)
NOESY	: Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
PSP	: Paralytic Shellfish Poisoning (độc tố gây liệt cơ do động vật nhuyễn thể)
ROESY	: Rotating frame Overhauser Effect Spectroscopy
SPE	: Chiết pha rắn (solid phase extraction)
SRM	: Chế độ kiểm soát chuỗi phản ứng (Selected reaction monitoring)
STX	: <i>Saxitoxin</i>
TLC	: Sắc ký lớp mỏng (Thin layer chromatography)
TTX	: <i>Tetrodotoxin</i>
TTXs	: <i>Tetrodotoxin</i> và các dẫn chất (<i>Tetrodotoxin analogues</i>)
UV	: Tử ngoại (Ultra violet)
VGSC	: Điện thế màng kênh Na (Voltage-Gated Sodium Channel)
VKNTTW	: Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương
VSV	: Vi sinh vật

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1. 1. Hàm lượng TTXs trong một số loài động vật biển khu vực Nhật Bản và Australia [82].....	10
Bảng 1. 2. Các loài vi khuẩn có khả năng sản sinh tetrodotoxin [150].....	12
Bảng 1. 3. Sự thay đổi của độc tố ở buồng trứng của cá nóc hổ theo tháng [2].....	14
Bảng 1. 4. Phân bố TTXs trong một số bộ phận cá nóc F. Niphobles [68].....	14
Bảng 1. 5. Hàm lượng TTXs trong 2 loài cá nóc T. nigroviridis và T. Biocellatu [68].....	14
Bảng 1. 6. Tình hình ngộ độc do cá nóc ở Việt Nam từ năm 1999 – 2003 [3].....	17
Bảng 1. 7. Hoạt tính của TTX trong thử tác dụng giảm đau ở sinh vật [118].....	22
Bảng 1. 8. Tác dụng của TTX trên thời gian sống trung bình.....	25
Bảng 1. 9. Một số hãng cung cấp chuẩn TTX.....	44
Bảng 2. 1. Bảng chia mức độ độc của cá nóc theo phương pháp sinh hoá chuột [124].....	51
Bảng 2. 2. Cách pha dãy các dung dịch chuẩn.....	52
Bảng 3. 1. Mức độ độc của phủ tạng một số loài cá nóc.....	64
Bảng 3. 2. Khảo sát độ thu hồi của TTX qua cột chiết SCX.....	67
Bảng 3. 3. Khảo sát một số điều kiện sắc ký.....	72
Bảng 3. 4. Kết quả khảo sát độ thích hợp hệ thống.....	73
Bảng 3. 5. Kết quả khảo sát độ tuyến tính của phương pháp.....	73
Bảng 3. 6. Kết quả khảo sát độ lặp lại.....	74
Bảng 3. 7. Kết quả khảo sát độ thu hồi.....	75
Bảng 3. 8. Kết quả định lượng TTX trong gan cá nóc chuột vân bụng.....	77
Bảng 3. 9. Kết quả định lượng TTX trong trứng cá nóc chuột vân bụng.....	77
Bảng 3. 10. Kết quả định lượng TTX trong gan cá nóc tro.....	78
Bảng 3. 11. Kết quả định lượng TTX trong trứng cá nóc tro.....	78
Bảng 3. 12. Kết quả định lượng TTX trong gan cá nóc vằn.....	79
Bảng 3. 13. Kết quả định lượng TTX trong trứng cá nóc vằn.....	79

Bảng 3. 14. Hàm lượng TTX trong gan, trứng của một số loài cá nóc	80
Bảng 3. 15. Ký hiệu của các phân đoạn chất phân lập ra từ 05 loài cá nóc độc.....	84
Bảng 3. 16. Dữ liệu phổ của TTX và 5 chất phân lập được	85
Bảng 3. 17. Các chất độc tetrodotxin và tương tự tetrodotxin	91
Bảng 3. 18. Lượng TTX thu được và độ tinh khiết đạt được	94
Bảng 3. 19. Kết quả định lượng TTX trong mẫu sau khi tinh chế	98
Bảng 3. 20. Tóm tắt chỉ tiêu chất lượng trong TCCS nguyên liệu TTX	98
Bảng 3. 21. Hàm lượng TTX trong một số dung môi theo thời gian	99
Bảng 3. 22. Kết quả đánh giá đồng nhất lô	100
Bảng 3. 23. Các thông số của hệ sắc ký	100
Bảng 3. 24. Kết quả đánh giá liên phòng	101
Bảng 3. 25. Kết quả đánh giá theo ANOVA	101
Bảng 3. 26. Tập hợp kết quả của hai PTN.....	101
Bảng 3. 27. Tóm tắt chỉ tiêu chất lượng trong TCCS bột đông khô 0,1%	103
Bảng 3. 28. Mức liều thử nghiệm trên chuột.....	104
Bảng 3. 29. Kết quả thử nghiệm độc tính bột đông khô.....	105
Bảng 3. 30. Bảng ngoại suy liều.....	107
Bảng 3. 31. Bố trí thí nghiệm thử độc tính bán trường diễn.....	107
Bảng 3. 32. Kết quả theo dõi cân nặng thỏ.....	108
Bảng 3. 33. Bảng theo dõi các chỉ số huyết học trước thí nghiệm	108
Bảng 3. 34. Bảng theo dõi các chỉ số huyết học giữa thí nghiệm	108
Bảng 3. 35. Bảng theo dõi các chỉ số huyết học sau thí nghiệm	109
Bảng 3. 36. Bảng theo dõi các chỉ số sinh hoá trước thí nghiệm	109
Bảng 3. 37. Bảng theo dõi các chỉ số sinh hoá giữa thí nghiệm.....	109
Bảng 3. 38. Bảng theo dõi các chỉ số sinh hoá sau thí nghiệm	110

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1. 1. Hình ảnh hai trong số các loài cá nóc độc	3
Hình 1. 2. Công thức hoá học của TTX.....	4
Hình 1. 3. Một số dẫn chất của TTX	5
Hình 1. 4. Cấu trúc hoá học của các PSPs	6
Hình 1. 5. Cấu trúc hoá học của saxitoxin (STX)	6
Hình 1. 6. Phân bố độc tố TTX và PSP trong một số loài tự nhiên [80]	9
Hình 1. 7. Tetrodotoxin chặn kênh vận chuyển natri làm tê liệt thần kinh [120]	19
Hình 1. 8. Mô hình cơ chế hoạt động ức chế cảm giác đau của TTX	21
Hình 1. 9. Sự phát triển số lượng tế bào EAC ở chuột mang ung thư.....	26
Hình 1. 10. Sơ đồ quy trình phân lập TTX từ loài cá nóc <i>Spheroides rubripe</i> [53]	28
Hình 1. 11. Tóm tắt tổng hợp theo Kishi [79]	30
Hình 1. 12. Phân tích sự khác nhau trong sự ngắt mạch nhân cyclorhexan.....	32
Hình 1. 13. Tổng hợp TTX từ D-Glucose [138].....	32
Hình 1. 14. Phổ hồng ngoại của TTX [156]	34
Hình 1. 15. Phổ UV-VIS của tetrodotoxin [153].....	35
Hình 1. 16. Hình ảnh sắc ký lớp mỏng TTX, GTX, STX và mẫu chiết <i>T. nigroviridis</i> [90]	36
Hình 1. 17. Sắc ký đồ HPLC-FLD định lượng TTX trong huyết tương [96]	37
Hình 1. 18. Sắc ký đồ HPLC-FLD của TTXs và dịch chiết cá nóc <i>N. lineata</i> [38]	37
Hình 1. 19. Một số sắc ký đồ định lượng TTXs trong gan, trứng cá nóc bằng HPLC-FLD [7].....	38
Hình 1. 20. Phổ khối của dẫn xuất C9 base – trimethylsilyl của độc tố từ sâu bọ <i>Cephalothrix</i> sp. thu được ở vịnh Hiroshima [31].....	39
Hình 1. 21. Sắc ký đồ phân tích TTXs, mẫu chuẩn TTXs (A) và các mẫu thử <i>F. niphobles</i> (B), <i>T. nigroviridis</i> (C), <i>T. biocellatu</i> (D) [68].....	40
Hình 1. 22. Sắc ký đồ và phổ ESI-MS của TTX [154]	40
Hình 1. 23. Sắc ký đồ định lượng TTX, (A): mẫu huyết thanh trắng, (B): mẫu huyết thanh + TTX 10ng/mlml, (C): cá nóc <i>N. clathrata</i> , (D): mẫu huyết thanh người. [69].....	41

Hình 1. 24. TTX tinh khiết cung cấp bởi một số hãng: (a) Enzo – Mỹ;.....	45
Hình 1. 25. Cơ chế epimer hoá OH-C4 của TTX.....	119
Hình 2. 1. Thiết bị xay ngâm chiết, Viện Kiểm nghiệm thuốc TW	47
Hình 2. 2. Một số thiết bị sử dụng trong nghiên cứu.....	48
Hình 2. 3. Hai loài (1) Cá nóc vàng (<i>L. lunaris</i>) và (2) cá nóc chuột vân bụng (<i>A. hispidus</i>)	50
Hình 2. 4. Phủ tạng cá nóc được mổ lấy ra để đem đi xử lí	50
Hình 2. 5. Quy trình xác định độc tính bán trường diễn.....	62
Hình 3. 1. Tiêu bản 10 loài cá nóc độc	63
Hình 3. 2. Sắc ký lớp mỏng (A) và phổ MS (B) của dịch sau khi chiết qua SPE C18	65
Hình 3. 3. Sắc ký lớp mỏng (A) và phổ MS (B) của dịch sau khi chiết qua SPE cột Evidex	65
Hình 3. 4. Sắc ký lớp mỏng (A) và phổ MS (B) của dịch sau khi chiết qua SPE cột SCX	66
Hình 3. 5. (A): Sắc ký đồ bản mỏng hệ pha động A: n-butanol, acid acetic khan và nước (2:1:1); (B): Sắc ký đồ bản mỏng hệ pha động B: pyridin, ethyl acetate, acid acetic và nước (15:5:3:6); (C): sắc ký đồ khảo sát LOD theo hệ pha động B.....	68
Hình 3. 6. Phổ ESI MS (A) và phổ ESI MS ² (B) của TTX chuẩn (1 µg/ml)	69
Hình 3. 7. Phổ ESI MS (A) và ESI MS ² (B) của mẫu cá nóc.....	70
Hình 3. 8. Phổ HR ESI MS của dung dịch TTX chuẩn 1µg/mL và mẫu thử <i>A. hispidus</i> ..	71
Hình 3. 9. SKĐ phân tích TTX theo chương trình sắc ký (F)	72
Hình 3. 10. Sắc ký đồ dung dịch chuẩn TTX nồng độ 2,5µg/mL (a), dung dịch thử (b), dung dịch trắng (c) và mảnh phổ SRM m/z=320 -> 162 đặc trưng của TTX để định lượng (d)	73
Hình 3. 11. Đồ thị biểu mối tương quan nồng độ TTX và diện tích pic	74
Hình 3. 12. Quy trình chuẩn bị mẫu định lượng TTX từ cá nóc	76
Hình 3. 13. Sơ đồ quy trình chiết TTX và các chất tương tự	81
Hình 3. 14. Sơ đồ quy trình làm giàu và phân lập nhóm chất TTX và các dẫn chất.....	82

Hình 3. 15. Phổ khối ESI-MS của mẫu chuẩn TTX 1 $\mu\text{g/ml}$ (A) và của dịch chiết phân đoạn V2 của 5 loài cá nóc độc (B, C, D, E và F)	83
Hình 3. 16. Cấu trúc của TTX1 và các tương tác HMBC chính	86
Hình 3. 17. Cấu trúc và tương tác HMBC của TTX2.....	87
Hình 3. 18. Cấu trúc và tương tác HMBC của TTX4.....	89
Hình 3. 19. Quy trình chiết xuất TTX	93
Hình 3. 20. Quy trình sơ tinh chế	94
Hình 3. 21. Quy trình tinh chế TTX từ TTX thô	96
Hình 3. 22. Phổ khối phân giải cao (HR ESI MS) của hợp chất TTX tinh chế	97
Hình 3. 23. Sắc ký đồ định lượng TTX, (a) dung dịch chuẩn TTX nồng độ 2,5 $\mu\text{g/mL}$; (b) dung dịch thử	97
Hình 3. 24. Lọ chuẩn tetrodotoxin 0,1 mg trong 1 ml dung dịch đệm citrate	99
Hình 3. 25. Bột đông khô tetrodotoxin 0,1%	103
Hình 3. 26. Đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa liều thí nghiệm và tỷ lệ chết chuột ...	105
Hình 3. 27. Hình ảnh mô gan, thận đại diện của từng nhóm thử nghiệm	112
Hình 3. 28. Hình ảnh mô gan, thận đại diện của từng nhóm thử nghiệm	113
Hình 4. 1. Thiết bị xay, ngâm và chiết: Mô hình và thiết bị sử dụng trong nghiên cứu...	121
Hình 4. 2. Sơ đồ thiết kế phần ngâm, xay thô và motor điều tốc	121

MỞ ĐẦU

Đại dương với nguồn tài nguyên vô cùng lớn, chiếm tới 70% diện tích bề mặt trái đất. Đại dương cũng là nơi sinh sống của 34 trong 36 ngành sinh vật trên trái đất với hơn 500.000 loài thực - động vật và vi sinh vật (VSV) đã được biết đến. Đây chính là nguồn cung cấp vô số các sản phẩm tự nhiên quý giá từ các loài sinh vật biển như rong biển, chân rết, rêu biển (*bryozoan*), thân mềm và từ các loài vi khuẩn biển cũng như vi khuẩn lam. Trong đó, khu vực Ấn Độ Dương và Thái Bình Dương có một vùng đa dạng sinh vật biển nhiệt đới lớn nhất trên thế giới. Nguồn tài nguyên phong phú này gần đây đã thu hút được nhiều sự quan tâm của các nhà khoa học. Nghiên cứu, khai thác tài nguyên sinh vật biển, hiện đang là vấn đề cấp bách không chỉ ở nước ta mà trên toàn thế giới. Với sự phong phú và đa dạng sinh vật, đại dương hứa hẹn sẽ là nơi phát triển nhiều hợp chất chứa các hoạt tính quý báu, giúp ích cho những yêu cầu về phát triển và tìm kiếm các loại thuốc mới, hiệu quả, và đặc hiệu trong điều trị những căn bệnh hiểm nghèo hiện nay như ung thư, tim mạch, tiểu đường, HIV/AIDS...

Hiện nay, căn bệnh ung thư và nghiện ma túy đang là những gánh nặng cho các quốc gia. Việc tìm kiếm các hoạt chất có tác dụng hỗ trợ bệnh nhân ung thư hoặc giúp giảm cơn nghiện ma túy là mong muốn của nhiều quốc gia, đặc biệt là ngành y tế. *Tetrodotoxin (TTX)* là một độc tố thần kinh không protein (*neurotoxin nonprotein*), một trong những độc tố tự nhiên có độc tính cao nhất ($LD_{50} = 8-11 \mu\text{g/kg}$) với liều gây chết cho người 1 – 2 mg qua đường tiêu hóa [55], [157]. Do ái lực mạnh và có tác dụng chặn kênh natri một cách đặc hiệu, dẫn tới làm tê liệt dẫn truyền thần kinh, *TTX* thể hiện tác dụng giảm đau trung ương rất mạnh [157]. *TTX* được tìm thấy ở rất nhiều loài khác nhau, bao gồm cá nóc, cá bống bóng, sa giông, cóc (ếch độc) và bạch tuộc vòng lam. Cá nóc, đặc biệt trứng của nó, là nguồn *TTX* được biết tới nhiều nhất. *TTX* phân bố rất khác nhau ở các loài cá nóc khác nhau, và giữa các bộ phận của cùng một loài cũng rất khác nhau. Vì vậy, cần phải có các nghiên cứu phân biệt, đánh giá độc tố nhằm hạn chế các vụ ngộ độc, cũng như định hướng nghiên cứu.

Gần đây, trên thế giới cũng như ở Việt Nam, *TTX* và những chất tương tự *TTX* (*TTX analogues*) như: *4-epi TTX*, *4-epi anhydro TTX*... đang được thử nghiệm như một chất dẫn đường (*lead compound*) tiềm năng hướng tới điều trị một số bệnh hiểm nghèo như bệnh tim mạch, giảm đau trong ung thư, cai nghiện ma túy,...[13], [56], [119]. Để phục vụ nghiên cứu định hướng ứng dụng trong y học, đánh giá được chất lượng và độ

an toàn các sản phẩm có chứa *TTX* từ cá nóc thì cần thiết phải có chất đối chiếu hóa học *TTX* đủ độ tinh khiết để làm chất chuẩn. Vì vậy, việc chiết xuất, phân lập và tinh chế *TTX* từ cá nóc làm chất chuẩn phục vụ kiểm nghiệm trở nên hết sức cần thiết, đặc biệt, việc mua chuẩn *TTX* từ nước ngoài là rất khó khăn và chi phí rất cao (khoảng 200\$/1mg *TTX*).

Mặc dù *tetrodotoxin* là một hợp chất đã biết từ lâu, có nhiều con đường, phương pháp điều chế, tuy nhiên, hiện nay, chủ yếu *TTX* vẫn được chiết xuất từ cá nóc. Trong khi Việt Nam với tiềm năng được liệu biển, trữ lượng cá nóc rất lớn, việc chiết xuất *TTX* và các dẫn chất từ cá nóc có ý nghĩa quan trọng. Vì vậy, luận án “***Nghiên cứu phát hiện và xây dựng quy trình phân lập tetrodotoxin và một số độc tố thần kinh khác từ cá nóc***” được thực hiện nhằm các mục tiêu:

- Sàng lọc và phát hiện *tetrodotoxin* ở một số loài cá nóc.
- Phân lập, xác định cấu trúc một số độc tố thần kinh khác (*tetrodotoxin analogues*) từ cá nóc.
- Xây dựng quy trình chiết xuất, phân lập và tinh chế *tetrodotoxin* có độ tinh khiết phù hợp để làm chất chuẩn và bước đầu bào chế bột đông khô định hướng sử dụng trong y học.

CHƯƠNG I. TỔNG QUAN

1.1. CÁ NÓC

1.1.1. Phân loại

Bộ cá nóc (tên khoa học là *Tetraodontiformes*) có 19 họ, trong đó 10 họ còn sinh tồn với khoảng 360 loài và 9 họ đã tuyệt chủng [137]. Các họ còn lại hiện nay bao gồm:

- *Aracanthidae*
- *Balistidae*
- *Diodontidae*
- *Molidae*
- *Monacanthidae*
- *Ostraciidae*
- *Tetraodontidae*
- *Triacanthidae*
- *Triacanthodidae*
- *Triodontidae*

Phần lớn các loài là cá nước mặn và sinh sống trong hay xung quanh các bãi đá san hô ngầm vùng nhiệt đới, nhưng có vài loài là cá nước ngọt, sinh sống trong sông suối hay cửa sông.

Họ cá nóc (*Tetraodontidae*) gồm ít nhất 120 loài thuộc 26 chi [51], bao gồm:

- | | | |
|--|---|---|
| - <i>Amblyrhynchotes</i> | - <i>Feroxodon</i> | - <i>Reicheltia</i> |
| - <i>Arothron</i> | - <i>Guentheridia</i> | - <i>Sphoeroides</i> (gồm cả <i>Liosaccus</i>) |
| - <i>Auriglobus</i> | - <i>Javichthys</i> | - <i>Takifugu</i> (gồm cả <i>Fugu</i>) |
| - <i>Canthigaster</i> | - <i>Lagocephalus</i> (gồm cả <i>Gastrophysus</i>) | - <i>Tetractenos</i> |
| - <i>Carinotetraodon</i> | - <i>Marilyna</i> | - <i>Tetraodon</i> |
| - <i>Chelonodon</i> | - <i>Monotrete</i> | - <i>Torquigener</i> |
| - <i>Chonerhinos</i> (gồm cả <i>Xenopterus</i>) | - <i>Omegaphora</i> | - <i>Tylerius</i> |
| - <i>Colomesus</i> | - <i>Pelagocephalus</i> | |
| - <i>Contusus</i> | - <i>Polyspina</i> | |
| - <i>Ephippion</i> | | |

1.1.2. Phân bố

Cá nóc phân bố rộng, chủ yếu ở các vùng nhiệt đới, không nhiều ở khu vực ôn đới và hoàn toàn không có trong các vùng nước lạnh [77]. Cá nóc có mặt ở nhiều quốc gia từ Đông Châu Phi, Biển Hồng Hải, Ấn Độ, Indonexia, Malayxia, Philippin, Việt Nam, Trung Quốc, Đài Loan, Nhật Bản, Triều Tiên, Australia, .v.v... Ở Việt Nam, cá nóc phân bố từ Bắc đến Nam, đặc biệt tập trung chủ yếu ở vùng biển miền Trung.

Tại Việt Nam, theo kết quả điều tra sơ bộ của Viện nghiên cứu Hải sản [6], có 49 loài thuộc 18 giống, nằm trong 4 họ: cá nóc nhím (*Diodontidae*), cá nóc hòm (*Ostraciidae*), cá nóc (*Tetraodontidae*), cá nóc ba răng (*Triodontidae*) sống ở biển, trong đó họ Cá nóc (*Tetraodontidae*) là chủ yếu, chiếm khoảng 85%. Vùng biển Đông Nam Bộ phong phú nhất về số lượng loài cá nóc, có 38 loài thuộc 15 giống, nằm trong 3 họ cá nóc. Vùng biển miền Trung cũng là nơi phân bố nhiều cá nóc, với 34 loài, thuộc 18 giống nằm cả trong 4 họ cá nóc. Khu vực Vịnh Bắc Bộ có khoảng 15 loài, trong khi vùng biển Tây Nam Bộ chỉ có khoảng 10 loài.

Tổng trữ lượng cá nóc trên toàn vùng biển Việt Nam (năm 2005) khoảng 37.400 tấn, trong đó ở vùng biển Trung Bộ khoảng 16.000 tấn, Tây Nam Bộ khoảng 7.800 tấn và vịnh Bắc Bộ khoảng 5.600 tấn [1]. Cá nóc khai thác chủ yếu là các loài: cá nóc tro (*L. lunaris*), cá nóc vàng (*L. spdiceus*), cá nóc chấm da cam (*T. pallimaculatus*) và cá nóc vây vàng (*Takifugu sp.*) [6].

1.1.3. Đặc điểm nhận dạng

Bộ cá này có các hình dạng kỳ dị như: hình vuông hay tam giác (các loài cá nóc hòm), hình cầu (các loài cá nóc) cho tới dẹp bên (các loài cá đầu).

Cá nóc phòng thủ bằng cách “hy sinh” tốc độ: ở loài này lớp vảy đã biến đổi thành các tấm hay các gai cứng. Các gai này đôi khi có thể thụt vào và có thể khóa tại chỗ (như ở các loài cá nóc gai), hay với lớp da dai như da thú (các loài cá đầu và cá bò giầy). Một đặc điểm phòng ngự đáng chú ý khác được thấy ở các loài cá nóc và cá nóc nhím là khả năng phình to cơ thể, để tăng các kích thước so với hình dáng thông thường. Nhiều loài của các họ *Tetraodontidae* (cá nóc bốn răng), *Triodontidae* (cá nóc ba răng) và *Diodontidae* (cá nóc nhím) còn có khả năng tự bảo vệ (thêm) chống kẻ ăn thịt nhờ *tetrodotoxin (TTX)*, một chất độc thần kinh cực mạnh hiện chưa có thuốc giải (*antidote*), tập trung chủ yếu trong các cơ quan nội tạng.

Về hình dạng: Nhìn chung, cá nóc có hình dạng đặc biệt, rất đặc trưng. Cơ thể thường có dạng hình trứng, dài ngắn tùy loài, hoặc dẹp hai bên với bắp đuôi cũng dẹp hai bên (cá nóc dẹp) hoặc là dạng hình quả đạn với bắp đuôi dài và có hình trụ tròn, có màu sắc khác nhau hoặc có các chấm màu đen trên thân, không có vây, một số loài vây thoái hóa thành các gai nhỏ. Vây nhỏ, mồm nhỏ. Kích thước trung bình khoảng 15 – 35 cm, có loài nhỏ hơn, và có loài lớn tới 150 cm [77].

Miệng và răng: Miệng tuy nhỏ, nhưng răng rất khỏe. Cá nóc có răng to, răng nhỏ gắn khít với nhau. Mỗi hàm có hai răng. Răng rất sắc, có màu trắng, màu đỏ hoặc màu khác.

Vây: Cá nóc có hai vây ngực, một vây lưng, một vây hậu môn và một vây đuôi (5 vây). Vây lưng và vây hậu môn thường giống nhau và ở vị trí dựng lên ở cuối thân, thường thì hai vây này ở vị trí đối xứng nhau qua thân. **Cá nóc không có vây bụng**, đây là đặc điểm quan trọng để nhận biết cá nóc với các loài cá khác. Cá nóc khi bơi, vây lưng và vây hậu môn đồng loạt quẫy sang trái, sang phải, thân cá không cử động mà lao về phía trước. Chính vì vậy mà phần thịt vận động ở vây lưng và vây hậu môn rất phát triển so với các loài cá khác.

Vảy: Cá nóc không có vảy. Một số có nhiều gai do vảy cá thoái hóa thành. Một số loài có các tấm vảy hình lục giác liên kết với nhau tạo thành lớp giáp cứng có 4 gờ dạng hình hộp. Nhờ có các gai làm cho da cá dày và khỏe để bảo vệ mình cá.

Xương: Xương cá nóc có đặc trưng rõ rệt. Cá nóc không có xương sườn và các xương dăm ở phần thịt như các loài cá khác.

Dạ dày: Dạ dày có thể co giãn, hút được nhiều nước và không khí để phồng lên

Mắt: Cá nóc có thể một mắt nhắm lại được.



Hình 1. 1. Hình ảnh hai trong số các loài cá nóc độc

Cá nóc được coi là loài độc thứ hai trong thế giới động vật có xương sống, chỉ đứng sau cóc độc vàng. Độc tố chủ yếu, nguy hiểm nhất đối với người trong cá nóc là *TTX*.

Tại Việt Nam, người ta đã tiến hành phân tích độc tố của 35 loài [6], [16], [17] trong đó:

- 10 loài có độc tính rất mạnh.
- 7 loài có độc tính mạnh.
- 4 loài có độc tính nhẹ.
- 14 loài chưa phát hiện thấy độc tố.

Các bộ phận của cá nóc có độc tính rất khác nhau. Độc tính của đa số các loài cá nóc có thể sắp xếp theo thứ tự giảm dần như sau: Trứng, tinh hoàn, gan, ruột, da, thịt. Độc tính của cá nóc thường tăng cao vào các tháng 2, 3 và 7 đến 9 trong năm, đây là mùa sinh sản của cá nóc [19]. Độc tính trong cá nóc và điều kiện đảm bảo an toàn trong khai thác, kinh doanh, tiêu thụ là vấn đề đang được nghiên cứu, nhằm sử dụng hợp lý nguồn lợi cá nóc, tránh lãng phí và tránh rủi ro cho người sử dụng.

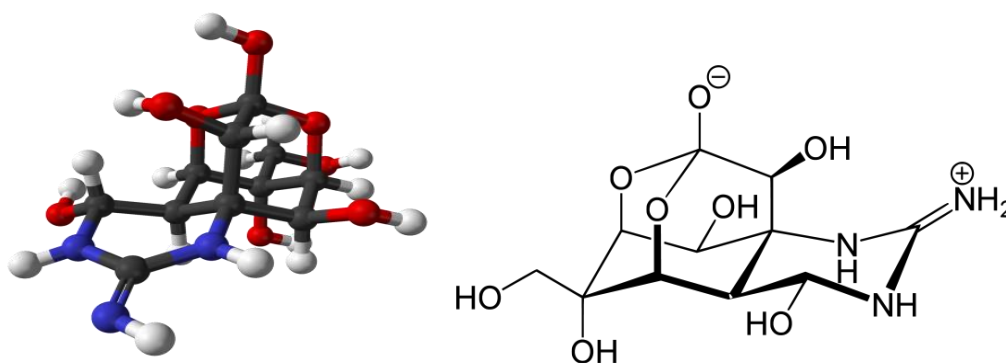
1.2. TETRODOTOXIN

1.2.1. Cấu trúc *tetrodotoxin* và các độc tố tương tự *tetrodotoxin*

1.2.1.1. *Tetrodotoxin* (TTX)

Goto và cs [55], Tsuda và cs [157] đã xác định được cấu trúc hoá học của TTX là dẫn suất của *aminoperhydroquinazoline* ($C_{11}H_{17}O_8N_3$; M=319).

TTX là (4*R*,4*aR*,5*R*,6*S*,7*S*,8*S*,8*aR*,10*S*,12*S*)-2-azaniumyliden-4,6,8,12-tetrahydroxy-6-(hydroxymethyl)-2,3,4,4*a*,5,6,7,8-octahydro-1*H*-8*a*,10-methano-5,7-(epoxymethanoxy)quinazolin-10-olat, có cấu trúc hóa học (hình 1.3), công thức phân tử và phân tử lượng như sau:



Hình 1. 2. Công thức hoá học của TTX

+ Công thức phân tử: $C_{11}H_{17}N_3O_8$

+ Phân tử lượng: 319,3

+ TTX tinh khiết là bột không màu. TTX sẫm màu ở khoảng 220°C không kèm phân hủy [42].

+ Nhiệt độ nóng chảy 225°C [44]

+ Độ tan: Trong phân tử TTX có một vài nhóm hydroxyl thân nước, khiến nó khó tan trong các dung môi hữu cơ thông thường. Khung phân tử của TTX tương tự như cấu trúc lồng của đá, khiến rất khó hydrat hóa, do vậy nó ít tan trong nước. Do trong phân tử có nhóm guanidin *perhydroquinazolin* (guanidin có tính kiềm mạnh), nên TTX tan

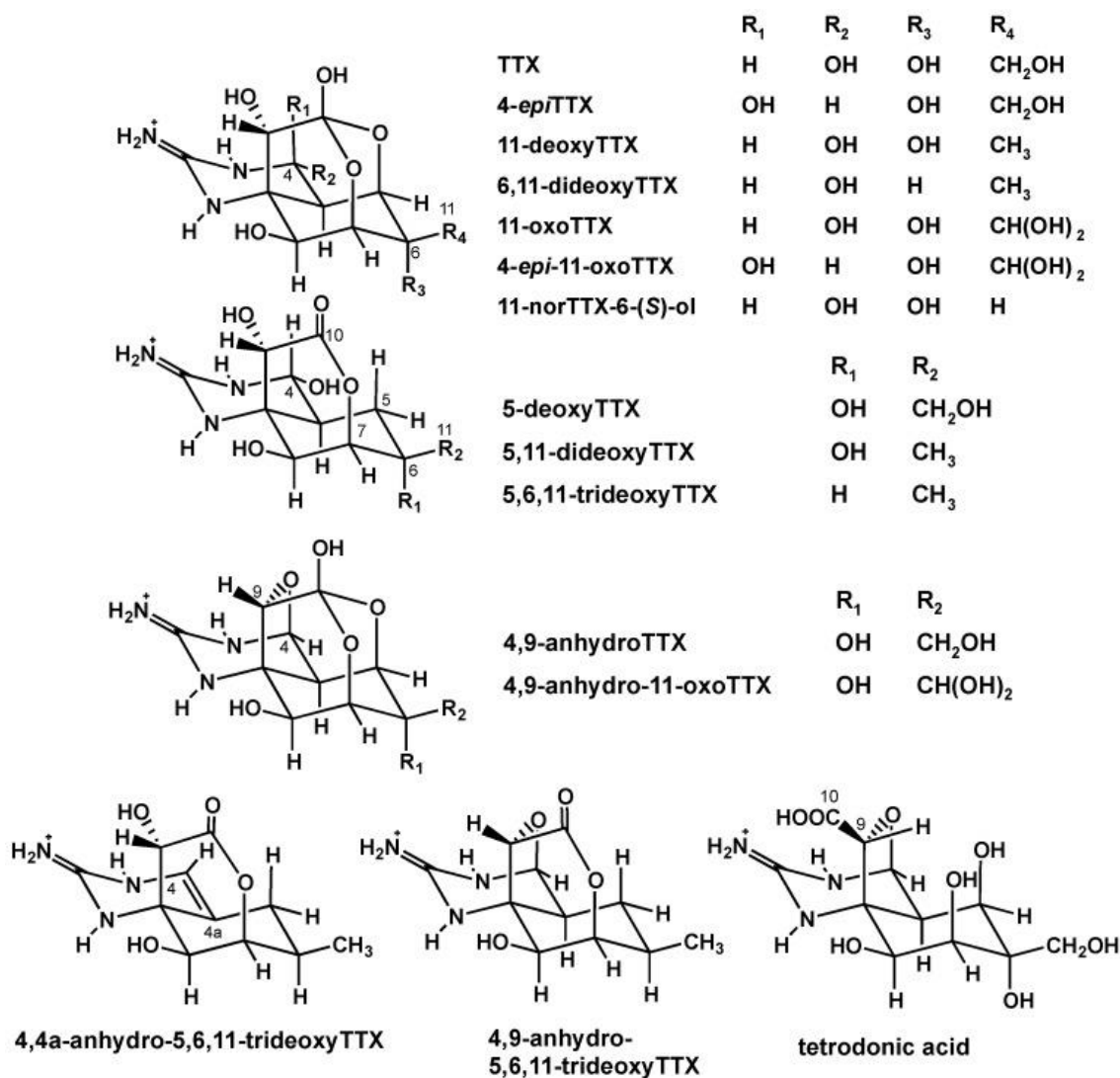
trong dung dịch acid. *TTX* cũng có cấu trúc ester nội phân tử, nên dễ bị thủy phân bởi các dung dịch acid mạnh, do đó cách duy nhất giữ *TTX* bền vững trong dung dịch là hòa tan trong acid hữu cơ yếu [92].

+ pKa (H₂O) = 8,76; pKa (50% alcol) = 9,4 [129]

+ Chất phân cực [89]

1.2.1.2. Một số dẫn chất của tetrodotoxin

Bên cạnh việc nghiên cứu *TTX* trong cá nóc, các nhà khoa học cũng tìm thấy các dẫn chất của *TTX* (*TTX analogues – TTXs*) như *4-epiTTX*; *4,9-anhydroTTX*; *5,6,11-trideoxyTTX* [177] được tìm thấy trong trứng loài cá nóc *Fugu poecilonotus* và *Fugu pardalis* [109]; *6-epiTTX* trong cá nóc *Spheroids Spengler* [55]. Ngoài cá nóc, các dẫn chất này cũng được phát hiện cùng với *TTX* ở các loài khác như loài sên *Cephalothrix simula* [30], sa giông *Cynops ensicauda* [171], ...



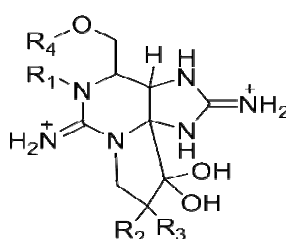
Hình 1. 3. Một số dẫn chất của *TTX*

Các *TTXs* này có thể được phân thành các nhóm [174]:

- Các dẫn chất *hemilactal*
- Các dẫn chất *5-deoxy-10,7-lacton*
- Các dẫn chất *4,9-* và *4,4a-anhydro*
- Các dẫn chất của *acid tetrodonic*

1.2.1.3. Các độc tố thần kinh khác tương tự tetrodotoxin

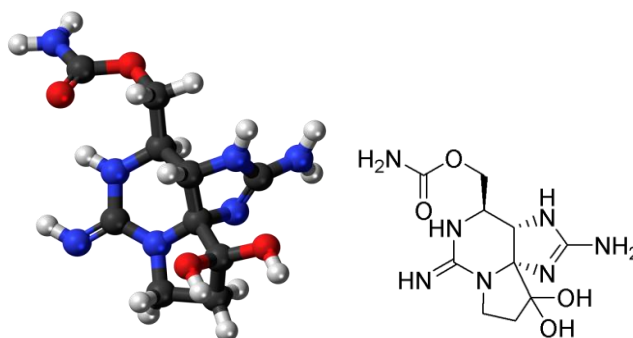
Sự xuất hiện của một lượng nhỏ các *PSPs* (độc tố gây liệt cơ do động vật nhuyễn thể - Paralytic Shellfish poisoning) cùng với *TTX*, hoặc một lượng lớn *PSPs* cùng với dấu vết của *TTX* đã được báo cáo ở nhiều loài cá nóc, cua và các loài chân bụng.



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Saxitoxin	H	H	H	CONH ₂
Dccarbamoylsaxitoxin	H	H	H	H
Neosaxitoxin	OH	H	H	CONH ₂
Gonyautoxin 1	OH	OSO ₃ ⁻	H	CONH ₂
Gonyautoxin 2	H	OSO ₃ ⁻	H	CONH ₂
Gonyautoxin 3	H	H	OSO ₃ ⁻	CONH ₂
Gonyautoxin 4	OH	H	OSO ₃ ⁻	CONH ₂

Hình 1. 4. Cấu trúc hoá học của các *PSPs*

Saxitoxin (*STX*) là cấu trúc chính của độc tố PSP, có cơ chế tác dụng, với biểu hiện ngộ độc tương tự như *TTX* [110], [112]. *STX* độc ngang với *TTX*, gấp 10 lần nọc rắn cạp nong ở đông nam châu Á, 10 - 100 lần loài nhện cái đen khi thử trên chuột và hơn 10000 lần cyanide.



Hình 1. 5. Cấu trúc hoá học của saxitoxin (*STX*)

Năm 1983, Kodama và cs. đã phát hiện thấy độc tố được tách chiết từ gan của loài cá nóc *Takifugu pardalis* là *Saxitoxin* [81] chứ không phải là *TTX*. Đây là phát hiện mới, hoàn toàn khác biệt với quan niệm từ trước đến nay cho rằng độc tố của các loài cá nóc luôn là *TTX*. Tiếp theo đó, hàng loạt các kết quả nghiên cứu khác được công bố về sự có mặt của độc tố *STX* cũng như các dẫn chất của *STX* (*STX analogues*) trong các loài cá nóc, là thành phần chính của độc tố hoặc là một phần trong hỗn hợp độc tố của các sinh vật này [84], [140], [141], [185]. Do đó, các tác giả này nhận định rằng các sinh vật mang độc tố *TTX* cũng có thể chứa độc tố *STX* và ngược lại. Điều này góp phần bổ sung cho việc lý giải nguồn gốc từ các vi sinh vật của độc tố trong một số loài sinh vật biển như cá nóc, bạch tuộc vòng lam, ... Tuy nhiên, cơ chế của hiện tượng này vẫn chưa được chứng minh một cách thật rõ ràng đối với một số sinh vật mang độc tố khác như ốc, sò, ếch... Phát hiện bản chất mới của độc tố cá nóc khá quan trọng, liên quan đến việc xây dựng phác đồ điều trị thích hợp đối với các ca ngộ độc từ cá nóc. Chính vì chúng chứa cả hai loại độc tố thần kinh nguy hiểm có hiệu ứng độc khác nhau, đều có khả năng gây tử vong cao nên việc chữa trị ngộ độc từ cá nóc sẽ phức tạp, khó khăn hơn; và nếu như sai lầm sẽ dẫn đến tử vong đáng tiếc. Ngoài ra, nếu độc tố cá nóc là hỗn hợp gồm hai thành phần *STX* và *TTX*, phương pháp tách chiết và tinh chế cũng cần phải phù hợp để có hiệu quả hơn.

1.2.2. Phân bố và nguồn gốc của *tetrodotoxin* trong tự nhiên

1.2.2.1. Phân bố của *TTX* trong tự nhiên

Nghiên cứu đầu tiên về độc tố cá nóc được bắt đầu tại Nhật Bản vào thập niên 1860. Lúc đó, các nhà khoa học đã điều tra, phát hiện sự có mặt của độc tố trong các loài cá cùng với tác động, ảnh hưởng của chúng đến các loài sinh vật khác. Năm 1948, nghiên cứu của Tani [152] về độc tính của cá nóc là cơ sở khoa học quan trọng cho việc thiết lập tiêu chuẩn an toàn cộng đồng đối với độc tố này.

Nghiên cứu hóa độc tố đầu tiên được tiến hành bởi nhà hóa học Tahara vào năm 1909 [149], ông đã tách chiết thành công độc tố thô từ cá nóc (0,2% độ tinh sạch) và đặt tên là *tetrodotoxin* (*TTX*) theo loài cá nóc đầu tiên phát hiện thấy có chứa độc tố này [89]. Nhiều nhà khoa học khác tiếp tục nghiên cứu và cho rằng bản chất của *Tetrodotoxin* có thể là một amin hoặc đường. Quá trình nghiên cứu này không có tiến triển gì khả quan cho đến tận năm 1950 (41 năm sau nghiên cứu đầu tiên của Tahara), Yokoo [173] đã tách được độc tố ở dạng kết tinh từ trứng của loài cá nóc *Fugu rubripes rubripes*, đặt

tên là spheroidine. Cuối cùng, Tsuda và Kawamura đã kết tinh được độc tố tinh bằng phương pháp sắc ký (1952), và sau đó là hàng loạt các kết quả tách chiết khác như của Arakawa và cs. [29] từ trứng của loài *F. stictonotum*, Goto và cs. [55] từ trứng của loài *F. vermiculare vermiculare*, và Kotake và cs. từ trứng của nhiều loài cá nóc [82].

Ngoài ra, sự phát hiện *TTX* được bài tiết từ da của một số loài cá nóc đã xếp *TTX* vào dạng độc tố có nguồn gốc từ da. Phát hiện sinh học này rất lý thú, nhưng dấu hiệu rõ ràng của dạng độc tố có nguồn gốc từ da cá nóc vẫn còn là điều chưa lý giải được.

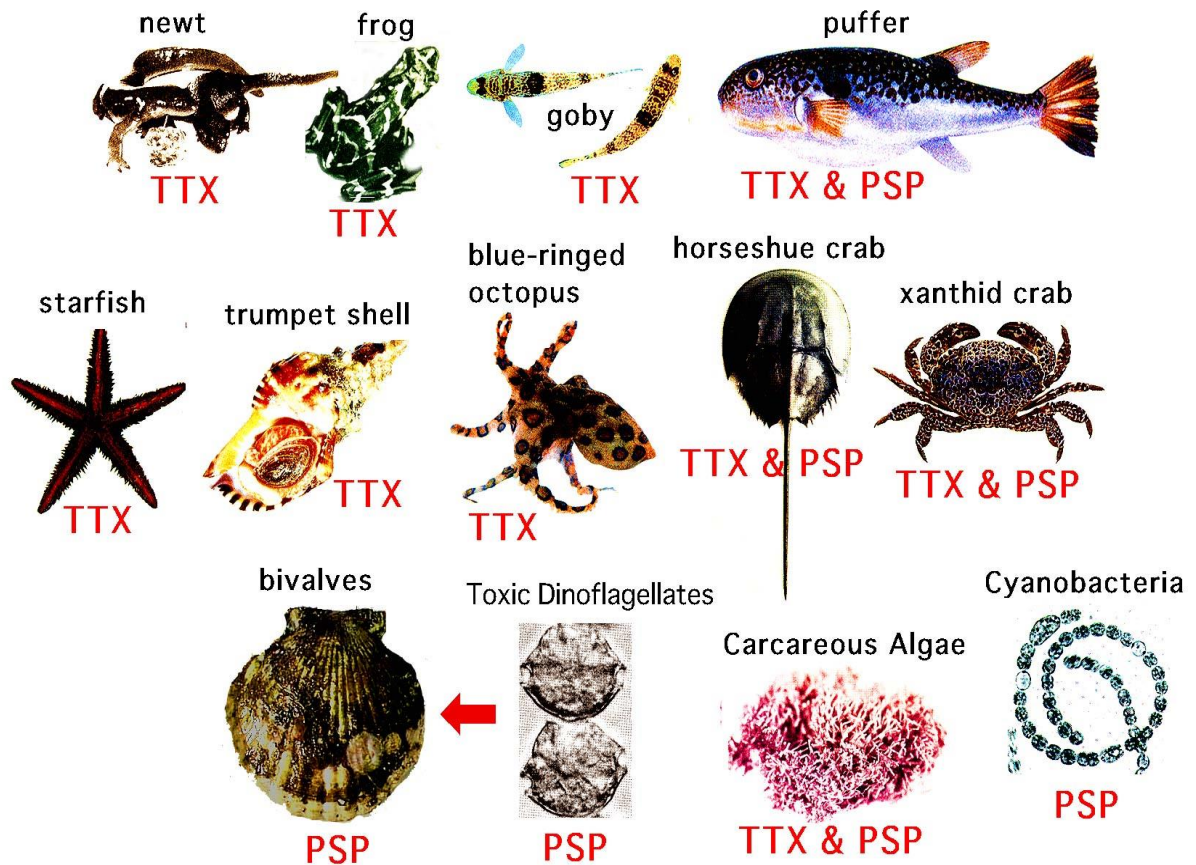
Tính đến năm 1978, số lượng bài báo công bố về độc tố *TTX* ước tính trên 500, với số lượng đề tài rất phong phú; tuy nhiên cho đến nay, cơ chế sinh tổng hợp và tính chất hóa học của *TTX* còn là tiêu đề của nhiều ý kiến tranh luận.

Trong những năm 90 trở về đây, nhóm nhà khoa học Nhật Bản, đứng đầu là Noguchi [124, 126, 179] đã phát hiện và chứng minh rằng *TTX* là sản phẩm cộng sinh giữa các nhóm vi sinh vật và cá nóc. Họ đã và đang nghiên cứu về cơ chế sản sinh độc tố *TTX* cũng như các yếu tố môi trường có liên quan đến quá trình này nhằm giải thích mối liên quan giữa sinh vật mang độc tố và môi trường sống.

Khi nghiên cứu tìm hiểu nguyên nhân dẫn đến hiện tượng chết hàng loạt của loài Cầu gai *Meoma ventricosa* tại vùng biển ven bờ Curacao (Hà Lan) vào năm 1997, Ritchie và cs [133] đã phát hiện ra rằng chủng vi sinh vật phân lập từ các cá thể cầu gai chết này sản sinh *TTX* trong quá trình được nuôi cấy. Chủng vi sinh vật này rất gần với loài *Pseudoalteromonas aloplanktis* spp. *Tetraodonis* đã được biết đến có mối liên hệ với các loài cá nóc [179]. Điều này chỉ ra rằng rất có thể các chủng vi khuẩn sản sinh ra *TTX* có thể có mối liên quan đến nguyên nhân gây ra bệnh dịch cho các sinh vật biển.

Trong hội thảo quốc tế lần thứ 3 về Hóa học các Hợp chất Tự nhiên tổ chức vào tháng 5 năm 1964 tại Kyoto, Mosher và cs. đã công bố ghi nhận của mình về sự tương đồng giữa độc tố *Tarichatoxin* tách từ loài sa giông *Taricha torosa* với *TTX* [105]. Phát hiện này đã phủ nhận giả thuyết trước đó là độc tố *TTX* chỉ được phát hiện trong họ cá nóc *Tetraodontidae*. Điều ngạc nhiên là *TTX* cũng được tìm thấy trong bộ ếch nhái, một lớp động vật có một khoảng cách phỏ hệ rất xa với cá nóc. Hội thảo năm 1964 đánh dấu một bước ngoặt quan trọng trong lịch sử nghiên cứu độc tố cá nóc. Tiếp theo đó, năm 1973, Noguchi và Hashimoto đã tách chiết độc tố *TTX* từ loài cá bống *Gobius criniger* [59], [126]; năm 1975, Kim và cs. [79], [132] cũng tách được *TTX* từ ếch *atelopid*; Độc tố của bạch tuộc vòng lam *Hapalochaena maculosa* cũng được xác định có bản chất là

TTX bởi các nhà khoa học người Úc. Sheumack và cs. [144] cũng đã phân lập được 1,8 mg độc tố từ 500 tuyến nước bọt sau của bạch tuộc này và định danh là *TTX*. Năm 1981, *TTX* cũng đã được phát hiện ở một số loài sò như *Charonia sauliae* [98], [115], ivory shell *Babylonia japonica* [172] hay một số loại chân rết *Zeuxis siquijorensis* [114], *Tutufa lissostoma* [123], *Niotha clathrata* [71], sao biển *Astropecten latespinosus* [99], ...



Hình 1. 6. Phân bố độc tố *TTX* và *PSP* trong một số loài tự nhiên [81]

Như vậy, giả thuyết đặt ra là các loài VSV biển từ thời gian rất lâu trước đây đã sống cộng sinh với các sinh vật biển khác. Hàng triệu năm trước đây, cá nóc đã có được đặc tính ưu việt từ sự đột biến gen của kênh trao đổi ion Na, khiến cho chúng có thể chống lại tác động của độc tố *TTX*. Tương tự, các sinh vật chứa độc tố *saxitoxin*, *ciguatera* ... cũng có sự thích nghi riêng đối với độc tố của chúng. Môi liên hệ cộng sinh giữa các VSV sản sinh độc tố *TTX* và các sinh vật cao hơn nhằm mục đích có lợi cho cả hai bên, VSV có được nơi an toàn để sinh sống, dinh dưỡng và sinh sản; trong khi đó, sinh vật chủ sử dụng độc tố để săn mồi, tự vệ hoặc cả hai mục tiêu trên. Một số loài giun biển (giun dải, giun mũi tên) và bạch tuộc vòng lam sử dụng *TTX* làm nọc độc để tấn công

con mồi, nhưng ở bạch tuộc vòng lam, độc tố này còn là một vũ khí tự bảo vệ rất hiệu quả chống lại kẻ thù trong tự nhiên. Một số loài cá nóc không thể bơi nhanh để trốn chạy kẻ thù, và hầu như không có khả năng tự bảo vệ; tuy nhiên, trong thực tế, các loài này rất ít khi bị kẻ thù tấn công vì các sinh vật ăn thịt khác dường như hiểu rằng chúng là những loài độc, không thể ăn được. Khi bị tấn công, những loài sa giông phương Đông có khả năng cong phần sau đen bóng của chúng, phơi bề mặt bụng đỏ vàng rực rỡ nhằm cảnh báo cho kẻ thù biết chúng là những loài sinh vật nguy hiểm (trong đời sống tự nhiên, đỏ pha đen là màu sắc phổ biến, đặc trưng của sinh vật độc). Cá nóc sư tử ở Nhật Bản, *Fugu rubripes*, là loài rất được quan tâm nghiên cứu về trình tự gen. Sự đột biến điểm đơn trong trình tự *amino acid* của kênh ion *natri* trong loài này làm cho nó miễn dịch không bị *TTX* gắn vào và phóng tỏa. Sự thay đổi trình tự *amino acid* của bất kỳ protein nào sẽ thay đổi cấu trúc của chúng, và vì vậy chức năng của chúng cũng sẽ bị thay đổi. Những đột biến ngẫu nhiên như vậy luôn xảy ra trong quần thể động vật. Phần lớn những thay đổi này là vô tính hoặc không có lợi cho sự sống sót của cơ thể, nhưng đôi khi một đột biến làm cho động vật có lợi thế trong chọn lọc tự nhiên. Trong trường hợp của *Fugu rubripes*, một thay đổi nhỏ làm cho cá có thể kết hợp chặt chẽ với vi khuẩn sinh *TTX* trong mô của chúng và sử dụng độc tố cho ích lợi của chúng. Phân bố của *TTX* và một số dẫn chất đã được Kudo và cs. [83] phân tích trong một số loài động vật biển như cá nóc *T. pardalis*, ốc Nhật Bản *Nassarius glans*, bạch tuộc vòng lam Nhật Bản *Hapalochlaena sp.*, bạch tuộc vòng lam Australia *H. maculosa*. Kết quả được thể hiện trong bảng

Bảng 1. 1. Hàm lượng *TTXs* trong một số loài động vật biển khu vực Nhật Bản và Australia [83]

Thành phần	Hàm lượng ($\mu\text{g/g}$)				
	<i>T. pardalis</i>	<i>N. glans</i>	<i>N. glans</i>	<i>H. sp.</i>	<i>H. maculosa</i>
	Buồng trứng	Nội tạng	cơ	Tuyến nước bọt	Tuyến nước bọt sau
<i>TTX</i>	25	42	19	53	160
<i>4-epiTTX</i>	3,1	7.2	3.6	10	18
<i>4,9-anhydroTTX</i>	11	30	11	6.9	42
<i>5-deoxyTTX</i>	0,87	0.89	<0.076	2.3	<0.15
<i>6-deoxyTTX</i>	0.39	4.2	1.3	1.1	25
<i>11-deoxyTTX</i>	2.3	4.9	1.4	4.4	9.4
<i>5,11-dideoxyTTX</i>	0.33	0.58	0.21	<0.12	<0.15
<i>6,11-dideoxyTTX</i>	5.8	<0.12	<0.076	0.40	2.0
<i>5,6,11-trideoxyTTX</i>	25	23	3.2	<0.12	0.19
<i>11-norTTX-6(S)-ol</i>	1.9	28	8.1	2.8	<0.15
<i>11-oxoTTX</i>	<0.080	13	23	16	<0.15

Như vậy, *TTX* tồn tại trong các động vật tự nhiên không chỉ ở loài cá nóc mà còn một số loài khác như bạch tuộc vòng lam *H. spp.*, sa giông, ..., ở nhiều khu vực khác nhau. Ngoài *TTX*, các dẫn chất của *TTX* cũng xuất hiện, với tỷ lệ khác nhau, tùy từng loài, khu vực.

1.2.2.2. Nguồn gốc của *TTX* trong tự nhiên

Để chứng minh giả thuyết *TTX* do VSV cộng sinh sinh ra, nhiều thí nghiệm đã được tiến hành. Takashi Matsui (1981) [101] đã nuôi thử nghiệm loài cá nóc không độc *Takifugu rubripes* nhưng có bổ sung thêm độc tố *TTX* vào thức ăn. Kết quả cho thấy độc tố *TTX* không phải do chính cá nóc tiết ra mà là do tích tụ được qua nguồn thức ăn. Trong một số công bố gần đây có đề cập tới nguồn gốc của độc tố cá nóc, có tác giả cho rằng cá nóc không có gen mã hóa *tetrodotoxin (TTX)* hoặc các tiền chất của nó mà thay vào đó, vi sinh vật sống cộng sinh trong cá nóc đã thực hiện quá trình sinh tổng hợp *TTX*. Vi khuẩn sản sinh *TTX* lần đầu tiên được Yasumoto và cs (1986) báo cáo [169], người đã chứng minh *TTX* trong dịch nuôi cấy của *Pseudomonas sp.* Năm 1986, Noguchi và cs [124] cũng phát hiện *TTX* trong tế bào *Vibrio sp.* Tiếp theo, Shimizu và cs (1987) [145] đã kiểm tra khả năng tạo *TTX* của một số chủng vi khuẩn biển đặc trưng từ các bộ sưu tập chủng, phần lớn là từ ATCC và Ngân hàng vi khuẩn biển Quốc gia Aberdeen, Scotland. Kết quả nhận được cho thấy 10/15 chủng *Vibrionaceae* cùng với *Photobacterium phosphoreum* có khả năng tạo dạng *tetrodotoxin* khan là *anhydrotetrodotoxin* ít độc, nhưng nó có thể dễ dàng chuyển thành *tetrodotoxin* trong dung dịch, đặc biệt khi ở pH thấp. *A.salmonicida* là nguồn bệnh đặc trưng của cá và *Plesiomonas shigelloides*, nhóm vi khuẩn đường ruột của cá nước ngọt cũng sinh *anhydrotetrodotoxin*, trong khi đó *E. coli* và 05 chủng *Alteromonas* được nghiên cứu giả thiết là *tetrodotoxin* hoặc *tetrodotoxin* dạng khan. Những kết quả nhận được cùng với kết quả nghiên cứu của các tác giả khác cho phép nhóm nghiên cứu giả thiết là *tetrodotoxin* trong các cơ quan của động vật là sản phẩm của vi sinh vật biển. Nếu động vật tích lũy sản phẩm vi khuẩn trong cơ thể của chúng điều đó có nghĩa đây là mối quan hệ cộng sinh. Năm 1990, để khẳng định lại giả thuyết nguồn gốc sinh học của *TTX*, Matsui và cộng sự [102] đã tiến hành nuôi 2 loài cá nóc, một không độc *Takifugu rubripes* và một có hàm lượng độc cao *Takifugu niphobles*, mỗi nhóm 10 con, bằng loại thức ăn có bổ sung thêm vi khuẩn sản sinh *TTX*, *Shewanella putrefaciens*. Kết quả cho thấy sau một tháng nuôi, mẫu gan cá nóc không độc *Takifugu rubripes* trở nên có độc

tổ TTX. Đây là minh chứng đầu tiên khẳng định vi khuẩn *Shewanella putrefaciens* là nguyên nhân khiến cá nóc trở lên độc.

Vi khuẩn sản sinh TTX phần lớn được phân lập và định loại từ các cơ thể có TTX và các môi trường sống khác nhau ở Nhật Bản từ khi phát hiện đầu tiên được công bố năm 1986 (bảng 1.3). Kết quả các chi *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Pasteuralla*, *Aeromonas* và *Plesiomonas* chiếm đa số. Chi *Vibrio* chiếm hơn 35% trong đó *V. alginolyticus* là loài chính và cũng là vi khuẩn chủ yếu sinh TTX.

Bảng 1. 2. Các loài vi khuẩn có khả năng sản sinh tetrodotoxin [151]

Vi khuẩn sản sinh TTX	Nguồn phân lập (sinh vật/môi trường)
<i>Vibrio</i> spp.	Ruột cua Rạn (<i>Atergatis floridus</i>) [124]
<i>Pseudomonas</i> spp.	Tảo biển đá vôi đỏ (<i>Jania</i> sp.) [170]
<i>Pseudomonas</i> spp.	Da cá nóc (<i>Takifugu poecilonotus</i>) [170], [179]
<i>Vibrio alginolyticus</i>	Ruột cá nóc (<i>Takifugu vermicularis vermicularis</i>) [122]
<i>Vibrio alginolyticus</i>	Ruột sao biển (<i>Astropecten polyacanthus</i>) [113]
<i>Shewanella putrefaciens</i>	Ruột cá nóc (<i>Takifugu niphobles</i>) [103]
<i>Alteromonas</i> , <i>Bacillus Pseudomonas</i> và <i>Vibrio</i>	Tuyến nước bọt sau và các phần mềm khác của bạch tuộc vòng lam (<i>Octopus maculosus</i>) [64]
<i>Vibrio alginolyticus</i>	Chất độc của 4 loài phù du <i>chaetognaths</i>
Các loài của chi <i>Acinetobacter</i> , <i>Aeromonas</i> , <i>Alcaligenes</i> , <i>Alteromonas</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Moraxella</i> , <i>Pseudomonas</i> , và <i>Vibrio</i>	Trầm tích sâu dưới biển
<i>Actinomycetes</i>	Trầm tích biển
Các loài của chi <i>Alcaligenes</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Caulobacter</i> , <i>Flavobacterium</i> , và <i>Micrococcus</i>	Trầm tích nước ngọt
Vi khuẩn định cư trên các mảnh nhỏ trong biển	Các mảnh vụn nhỏ trong biển
<i>Aeromonas</i> spp. , <i>Plesiomonas</i> , <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Vibrio alginolyticus</i> , và <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Tuyến tiêu hóa của loài chân bụng (<i>Niotha clathrata</i>) từ Đài Loan
<i>Vibrio</i> spp.	Ruột cá nóc (<i>Takifugu vermicularis radiatus</i>) từ Hàn Quốc [87]
<i>Pseudoalteromonas</i> spp.	Nhím biển gai (<i>Meoma ventricosa</i>) từ biển Caribe
<i>Microbacterium arabinogalactanolyticum</i> , <i>Serratia marcescens</i> và <i>Vibrio alginolyticus</i>	Buồng trứng, da và ruột cá nóc [181]

Việc phát hiện vi khuẩn sản sinh *TTX* trong gần hai thập kỷ qua củng cố quan điểm là *TTX* có nguồn gốc từ vi sinh vật cộng sinh tìm thấy trong cơ thể có *TTX* và quan điểm này ngày càng được công nhận rộng rãi trên toàn thế giới. Sự có mặt của vi khuẩn sản sinh *TTX* trong cá nóc cũng chứng minh đặc tính biến động mùa vụ hàng năm của độc tính trong cá nóc [59] và hiện tượng cá nóc nói chung không độc hơn trong mùa đẻ trứng như trước đây vẫn nghĩ mà nó phụ thuộc vào hoạt tính của vi khuẩn *TTX* cộng sinh sống trong cơ thể vật chủ.

Ở Việt Nam, để tìm hiểu thêm về khả năng tích lũy độc tố *TTX* ở một số sinh vật, Đào Việt Hà và cs. [5] đã tìm hiểu khả năng tích lũy độc tố *tetrodotoxin* ở nhuyễn thể, ốc hương *Babylonia areolata* khoảng một tháng tuổi được nuôi bằng thức ăn chế biến từ gan và cơ cá nóc chám cam *Torquigener gloerfelti* với liều độc 33,4 MU/g trong thời gian 05 tháng. Lô ốc hương được cung cấp thức ăn chế biến từ cá nóc độc có tốc độ sinh trưởng thấp hơn so với lô đối chứng được cho ăn bằng thức ăn công nghiệp. Độc tính *TTX* trong ốc hương gia tăng liên tục theo thời gian nuôi. Sau 02 tháng thí nghiệm, *TTX* trong ốc hương đạt giá trị độc tính tương đương ngưỡng an toàn thực phẩm đối với độc tố này (10 MU/g) và gấp khoảng 2,3 lần ở thời điểm kết thúc thí nghiệm (sau 05 tháng nuôi). Mặt khác, sau khoảng thời gian này, có đến 57,1% số cá thể ốc hương chứa độc tính *TTX* vượt ngưỡng an toàn và đặc biệt có những cá thể biểu hiện độc tính khá cao (>50 MU/g). Những kết quả đạt được cho thấy ốc hương có khả năng tích lũy độc tố *TTX* cao từ nguồn thức ăn có chứa *TTX*. Năm 2015, nhóm nghiên cứu Nguyễn Tú Hoàng Khuê và cs. [116] cũng đã phân lập được vi sinh vật *Enterococcus faecium AD1* sản sinh *TTX* từ cá nóc ở biển Việt Nam.

1.2.3. Hàm lượng của *tetrodotoxin* và các dẫn chất trong cá nóc

Tùy theo bộ phận của cá mà hàm lượng *TTX* trong cá nóc rất khác nhau, tùy theo loài cá, bộ phận và thời điểm sinh trưởng cũng như sinh sản, thường thay đổi từ vài microgam đến vài chục microgam/gam [19]. Độc tính theo các bộ phận cá nóc tỷ lệ thuận với hàm lượng *TTX*, thường phân bố như sau: trứng cá, gan cá, lòng cá và thịt cá. Nồng độ *TTX* trong trứng sau khi thụ tinh thay đổi và tăng 13 µg/g đến 67,6 µg/g sau 2 ngày và sau đó giảm từ từ xuống còn 0,3 µg/g sau 98 ngày [107]. Ở Việt Nam, Trần Đáng [2] đã khảo sát sự thay đổi độc tố ở buồng trứng của cá nóc hổ theo thời gian:

Bảng 1. 3. Sự thay đổi của độc tố ở buồng trứng của cá nóc hổ theo tháng [2]

Tháng	Độc tố mạnh (cá thể)	Độc tố yếu (cá thể)	Không có độc (cá thể)	Tổng số (cá thể)	Tỷ lệ có độc tố (%)	Trọng lượng trung bình buồng trứng (g)
10			7	7	0	4,7
11		1	9	10	10	6,9
12	9	7	6	22	73	125,8
1	9	6	4	19	79	132
2	8	12	2	22	91	260
3	3	6	5	14	64	567
4	5	6	1	12	92	559
5	4	3	7	14	50	154,5
6	1	2	4	7	43	54

Ya-Jung Wu và cộng sự [167] định lượng TTX trong gan loài cá nóc *T. rubripes* bằng LC – MS cho thấy, hàm lượng TTX tích lũy tăng dần trong gan từ 3 – 153 µg/g trong 2 ngày. Cũng có một số nghiên cứu và đánh giá hàm lượng TTX trong một số loài cá nóc ở Việt Nam, thời điểm tích lũy cao nhất có thể trên 100 µg/g [17], [20].

Jun-Ho Jang tại Đại học Tohoku, Nhật Bản và cộng sự [69] phân tích một số TTXs từ loài cá nóc *F. niphobles* ở vùng biển nam Hàn Quốc và 2 loài cá nóc *T. nigroviridis* và *T. biocellatu* ở biển Đông Nam Á

Bảng 1. 4. Phân bố TTXs trong một số bộ phận cá nóc *F. Niphobles* [69]

Mô	Giới	Hàm lượng độc tố (nmol/g)						
		TTX	4-epi TTX	4,9-anhydro TTX	5-deoxy TTX	11-deoxy TTX	6,11-dideoxy TTX	5,6,11-trideoxy TTX
Buồng trứng	Cái	129-263	10-26	30-83	4-22	8-39	77-310	289-603
Tinh hoàn	Đực	1-11	<0,5-1	<0,5-3	<0,5	<0,5	<0,5-9	1-13
Gan	Cái	4-24	<0,5-6	5-39	<0,5-3	<0,5-1	1-24	3-16
	Đực	9-31	1-3	9-15	<0,5-2	<0,5-1	<0,5-59	10-18
Da	Cái	78-93	8-10	21-30	3-10	3-8	6-13	110-155
	Đực	38-197	2-9	6-26	1-7	1-9	2-28	39-153
Cơ	Cái	3-8	<0,5-1	<0,5-1	<0,5	<0,5	1-6	5-7
	Đực	8-16	1-3	<0,5-1	<0,5	<0,5	<0,5-5	<0,5-14
Ruột	Cái	8-67	1-16	7-110	1-4	<0,5-12	11-145	25-71
	Đực	3-7	<0,5-1	2-6	<0,5	<0,5	2-28	5-7

Bảng 1. 5. Hàm lượng TTXs trong 2 loài cá nóc *T. nigroviridis* và *T. Biocellatu* [69]

Loài	Hàm lượng độc tố (nmol/g)						
	TTX	4-epi TTX	4,9-anhydro TTX	5-deoxy TTX	11-deoxy TTX	6,11-dideoxy TTX	5,6,11-trideoxy TTX
<i>T. nigroviridis</i>	0,6-294	<0,5-5	<0,5-47	<0,5-7	<0,5-7	<0,5-8	<0,5-151
<i>T. biocellatus</i>	27-190	2-16	4-41	<0,5-2	<0,5-17	<0,5-18	21-202

1.2.4. Độc tính của *tetrodotoxin* và các dẫn chất

1.2.4.1. Độc tính của *tetrodotoxin*

Tetrodotoxin là độc tố được phát hiện từ rất sớm và là độc tố thần kinh cực mạnh, mạnh hơn *cyanid* 10.000 lần, thậm chí được coi là một trong những chất độc nhất.

Độc tính của *tetrodotoxin* trên chuột nhắt LD₅₀: Tiêm tĩnh mạch: 8,7 µg/kg; tiêm ổ bụng: 8 - 10 µg/kg; tiêm dưới da: 11,5 µg/kg

Trên động vật *TTX* là một chất cực độc. Liều gây chết của *TTX* gấp 10 lần nọc rắn hổ mang và từ 10-100 lần liều gây chết của độc tố nhện cái đen, gấp 10.000 lần liều chết của *cyanid* khi thử nghiệm trên chuột. Liều gây chết tối thiểu của *tetrodotoxin* trên một số loài động vật qua đường tiêm dưới da [72]: chim bồ câu: 2,7 µg/kg; chim sẻ: 4 µg/kg; chuột cống: 2,7 µg/kg; chuột lang: 4,5 µg/kg; thỏ: 8 µg/kg; chuột nhắt: 8 µg/kg; chó: 9 µg/kg; mèo: 10 µg/kg; gà mái: 6 µg/kg; ếch: 5 µg/kg.

Chưa có chất giải độc đặc hiệu (*antidote*) [138].

1.2.4.2. Độc tính của các dẫn chất *tetrodotoxin*

Độc chất chiết từ cá nóc là hỗn hợp của hơn 10 analog, chủ yếu là *TTX*, (chiếm tới 70% - 80% khối lượng chiết) và ba analog chính khác là *acid tetrodonic*, *4-epi TTX* và *4-epi anhydro tetrodotoxin*. So với *TTX*, ba chất này không khác nhiều về cấu trúc hóa học, nhưng khác nhau đáng kể về đặc tính sinh học (độc tố tính). Ví dụ, độc tính của *TTX* là 4500 MU/mg; của *4-epiTTX* là 710 MU/mg và của *4-epi anhydro tetrodotoxin* chỉ là 92 MU/mg [109].

Các dẫn chất khác của *TTX* cũng có độc tính rất khác nhau. LD₅₀ của *TTX*, *11-deoxyTTX*, *6,11-dideoxyTTX* qua đường tiêm phúc mạc ổ bụng chuột lần lượt là 10 µg/kg [73], 70 µg/kg [171] và 420 µg/kg [68]. MLD của *TTX* khi tiêm phúc mạc bụng chuột là 8 µg/kg, trong khi giá trị này ở *11-oxyTTX* và *5,6,11-trideoxyTTX* cao hơn rất nhiều lần (lần lượt là 120 µg/kg [78] và 750 µg/kg [177])

Tuy nhiên, một số tác giả chứng minh *11-oxoTTX* độc hơn cả *TTX* khi thí nghiệm trên sợi cơ xương của chuột cho thấy ED₅₀ của *11-oxoTTX* chỉ bằng 0,7 nM trong khi giá trị này của *TTX* là 4,1 nM [166], hay khi so sánh ái lực với màng não chuột, được phản ánh trong giá trị hằng số phân ly *K₀* của *11-oxoTTX* nhỏ hơn so với *TTX* [175].

1.2.4.3. Triệu chứng ngộ độc tetrodotoxin và các dẫn chất

Theo Tani [152] triệu chứng ngộ độc chính là sự tê liệt. Hiện tượng ngộ độc bắt đầu từ 20 phút đến 3 giờ. Tử vong xảy đến trong vòng khoảng 1h30 đối với trường hợp nặng, phần lớn từ 4- 6 giờ. Đầu tiên, nạn nhân tê môi và đầu lưỡi sau đó lan đến tứ chi, đau đầu, đau bụng, đau nhức chân tay. Nạn nhân có dáng đi lảo đảo (do mất thăng bằng vận động) và đôi khi nôn mửa dữ dội (nếu không nôn mửa, rất khó chẩn đoán bệnh). Sau khi nôn mửa, nạn nhân mất điều hoà và chỉ muốn nằm, trạng thái ngẫn ngờ và mất ngôn ngữ trở nên nghiêm trọng, sự khó thở tăng, áp suất máu giảm rõ nét, nạn nhân trở nên tím tái, khó nuốt, khó phát âm, mất phản xạ và sau đó là hôn mê.

Trường hợp ngộ độc nghiêm trọng, nạn nhân trở nên tím tái và tê liệt hoàn toàn, mắt trở nên bất động, đồng tử giãn và đờ đẫn, nạn nhân không thể di chuyển hay nói. Những dấu hiệu của tử vong có thể rất rõ rệt, nên ngay cả với thầy thuốc có kinh nghiệm cũng phán đoán nhầm. Nạn nhân có thể như đã chết vì nhịp tim tối thiểu bị giảm đến mức không thể đo được - Halstead mô tả đây là hiện tượng giống “gấu ngủ đông”. Ví dụ, một trường hợp xảy ra vào năm 1983, nạn nhân bị ngộ độc cá nóc nằm mê man nhiều ngày, chỉ sống lại khi ông ta sắp sửa được đưa vào lò hoả táng. Sự co giật và trụy hô hấp theo sau trong vòng 6-24 giờ ở giai đoạn cuối của sự ngộ độc. Độc tố tấn công thần kinh ngoại biên được bao myelin hay được bọc ngoài nhưng không qua hàng rào máu- não. Như vậy, mặc dù những tế bào thần kinh ở tim và phổi bị ảnh hưởng, ý thức và chức năng tinh thần không bị suy yếu. Lợi dụng tính chất này, *TTX* được thầy phù thủy ở Haiti sử dụng như là thành phần chính trong tà thuật để làm thầy ma sống lại. Sau khi đã cân nhắc tính toán, chất bột ma thuật này được đưa trực tiếp vào máu qua vết cắt hay chỗ trầy da sẽ gây tê liệt.

Từ năm 1974 đến 1984, tại Nhật Bản đã có 646 trường hợp ngộ độc với 179 người chết. Trung bình hàng năm tại quốc gia này có khoảng 200 ca ngộ độc với tỉ lệ tử vong ước tính khoảng 50%. Ngoài ra, rải rác một số trường hợp ngộ độc cá nóc cũng như các sinh vật khác có chứa *TTX* và dẫn chất cũng được ghi nhận tại Mỹ, Châu Âu và các nước nằm ngoài vùng Ấn Độ – Thái Bình Dương. [47]

Ở Việt Nam, từ năm 1999 – 2003 đã có tổng số 176 vụ ngộ độc thực phẩm liên quan đến cá nóc [3], cụ thể:

Bảng 1. 6. Tình hình ngộ độc do cá nóc ở Việt Nam từ năm 1999 – 2003 [3]

Năm	Số vụ	Số người mắc	Số tử vong
1999	30	105	16
2000	27	129	29
2001	48	211	29
2002	49	210	29
2003	22	82	24
Tổng	176	737	127

Năm 2002, Bộ Y tế đã ra Quyết định 354/2002/QĐ-BYT ban hành bản hướng dẫn chẩn đoán, xử trí và phòng ngộ độc cá nóc để nhằm giảm bớt nguy cơ tử vong do ngộ độc cá nóc. Tình hình ngộ độc cá nóc có suy giảm đáng kể, tuy nhiên vẫn giải rác xảy ra ở các địa phương ven biển khu vực Đà Nẵng, Quảng Nam, Bình Thuận, ...

Ngày 14/4/2016, tại TP Hồ Chí Minh, Bộ NN& PTNT tổ chức Hội nghị đánh giá kết quả triển khai Đề án thí điểm khai thác, thu mua sơ chế, chế biến và xuất khẩu cá nóc đảm bảo an toàn thực phẩm giai đoạn 2013-2015. Tại Hội nghị, Thứ trưởng Bộ NN& PTNT Vũ Văn Tám đề nghị Ủy ban nhân dân, Sở Bộ NN& PTNT các tỉnh/thành phố trực thuộc Trung ương tiếp tục tuyên truyền phổ biến để người dân hiểu rõ về tác hại của cá nóc, độc tố cá nóc và không để xảy ra các vụ ngộ độc cá nóc gây tử vong trên địa bàn.

1.2.5. Tác dụng sinh học và cơ chế

1.2.5.1. Tác dụng sinh học

TTX tác động lên những hệ thống [187]:

- Hệ thống thần kinh cơ [49]: *TTX* làm suy yếu nhanh và rõ nét tất cả cơ chủ động như cơ hô hấp. *TTX* làm gián đoạn sự dẫn truyền thần kinh cơ ở trên trục thần kinh vận động và trên màng cơ. Trong sự phong bế hoàn toàn bởi *TTX*, sẽ không có sự kích thích thần kinh nào có hiệu quả đối với sự co cơ tetanic và sự khử cực acetylcholine của màng cơ.
- Hệ thống cơ tim: *TTX* gây tụt giảm chất lỏng trong áp suất máu động mạch.
- Hệ thống hô hấp: *TTX* có tác động ức chế đặc hiệu vào trung khu hô hấp như kích thích thần kinh hướng tâm, tê liệt thần kinh và cơ hô hấp.
- Hệ thống thần kinh trung tâm: Thường gây nôn mửa ở người và vật thí nghiệm. Tụt huyết áp là dấu hiệu của những trường hợp ngộ độc *TTX* ở người.

- Cơ trơn và các tuyến: *TTX* phong bế hoạt động tiết của tuyến nước bọt và mồ hôi. *TTX* tác động trực tiếp lên trục thần kinh, hạch tự động, chỗ nối thần kinh cơ hay chính cơ ấy [72].

TTX tác dụng cả lên hệ thần kinh trung ương lẫn thần kinh ngoại vi, với các biểu hiện sau [4], [89]:

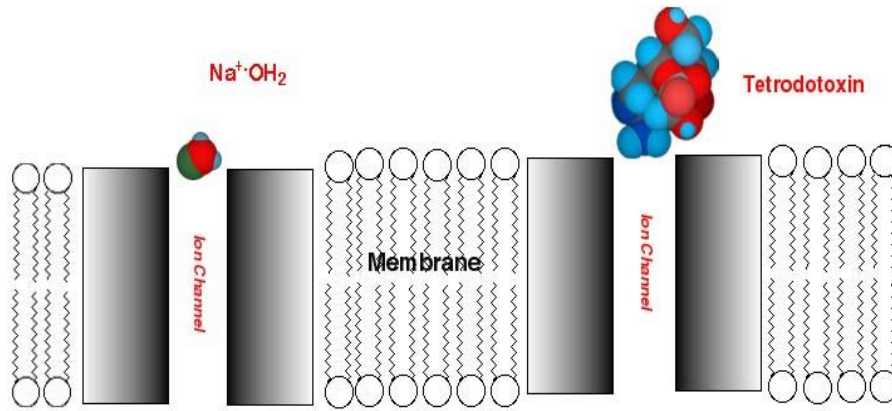
- Tim mạch: Mạch nhanh, huyết áp hạ, rối loạn nhịp tim.
- Hô hấp: Khó thở do liệt cơ hô hấp và liệt trung khu hô hấp, da và niêm mạc xanh tím.
- Thần kinh :
 - + Thần kinh trung ương: Choáng váng, đau đầu, co giật, không có rối loạn ý thức.
 - + Thần kinh ngoại vi: Liệt đa dây thần kinh, rối loạn cảm giác (dị cảm) ở lưỡi, môi, mặt, ngón tay, ngón chân, rối loạn lời nói, khó nuốt.
 - + Thần kinh cơ vân và cơ trơn: Liệt, rung giật các cơ, cử động hỗn độn, yếu cơ và liệt chi dưới, liệt vận động nhãn cầu, đặc biệt nguy hiểm là liệt cơ liên sườn, cơ ngực và cơ hoành.
 - + Mất phản xạ tủy và phản xạ gân xương.

Ngoài ra độc với: Gan, tiết niệu, nội tiết và hệ sinh sản, da và vận mạch (ra nhiều mồ hôi, mắt, mũi, họng, tai (tăng tiết nước bọt, rối loạn vị giác), máu (bạch cầu tăng), miễn dịch, rối loạn chuyển hoá nước và điện giải, dị ứng và các rối loạn khác...

1.2.5.2. Cơ chế tác dụng

Hợp chất này có tác động phong tỏa đặc hiệu kênh trao đổi Natri trên bề mặt màng tế bào thần kinh với LD₅₀ 9 µg/kg (tiêm phúc mạc).

TTX có tác động đặc hiệu với bề mặt màng tế bào, sau thời gian rất ngắn, *TTX* phong bế kênh trao đổi ion Na⁺ [110], [112] tại vị trí bên ngoài kênh, vào bất kỳ giai đoạn nào của điện thế hoạt động hoạt hoá màng, kể cả pha hoạt hoá, nghỉ hay bất hoạt. *TTX* chặn kênh ion Na⁺, ngăn cản quá trình dẫn truyền xung thần kinh và phản xạ cơ cơ. Tuy nhiên, hiện tượng này sẽ chấm dứt khi *TTX* bị phân hủy hay được tách rời khỏi kênh trao đổi ion Na⁺.



Hình 1. 7. Tetrodotoxin chặn kênh vận chuyển natri làm tê liệt thần kinh [121]

Nhóm *guanidin* trong phân tử của *TTX* liên kết chọn lọc với *protein* của kênh natri ngoài màng tế bào thần kinh, ngăn không cho ion *natri* đi vào trong tế bào, gây mất điện thế khử trên màng, dẫn đến làm mất sự lan truyền điện thế hoạt động, do đó tín hiệu thần kinh không được dẫn truyền đến các tổ chức [46]. Khi vào cơ thể *tetrodotoxin* gắn vào kênh bơm Na^+ thành phức hợp “*tetrodotoxin* - kênh Na^+ ” [40] bền vững một thời gian và chặn kênh vận chuyển Na^+ trên bề mặt màng tế bào thần kinh, làm giảm tính thấm đối với dòng ion Na^+ , tuy nhiên, không làm thay đổi tính thấm của ion K^+ [121].

Theo Kao [72], *TTX* liên kết đặc hiệu và thuận nghịch với 1 receptor mặt ngoài của kênh ion Na^+ trong tế bào thần kinh ngoại biên để phong bế kênh ion Na^+ không cho dòng ion đi vào tế bào. Hiện tượng này ngăn cản sự hoán vị phân cực để hình thành thế năng tác động và chấm dứt sự truyền xung động thần kinh. Ở sinh vật bậc cao, độc tố tác động chủ yếu lên thần kinh ngoại biên đã được myelin hoá (có bọc) và không vượt qua hàng rào máu- não. Theo nghiên cứu của Fuhrman [52] *TTX* ảnh hưởng đầu tiên lên trục của thần kinh vận động và sau đó sẽ ảnh hưởng tới cơ theo nhiều cách.

Hiệu ứng sinh lý quan trọng nhất của *TTX* có thể quan sát trực tiếp khi một lượng nhỏ được tiêm vào con vật, theo dõi huyết áp, tình trạng hô hấp và sự đáp ứng của cơ chân khi thần kinh đến đó bị kích thích. Sau khi khoảng $10\mu g$ *TTX* được đưa vào trong mạch máu, sinh vật thử nghiệm biểu hiện giảm nhanh áp suất máu và sự hô hấp sâu. Cơ không co mặc dù thần kinh bị kích thích liên tục. Thực hiện theo cách này, *TTX* có thể có hiệu quả nhanh đến nỗi con vật thay đổi sự hô hấp từ bình thường sang ngừng hoàn toàn.

Hiệu ứng của độc tố lên chức năng thần kinh và cơ đặc biệt có ích trong việc làm rõ cách tác động của *TTX*. Khi cơ bị kích thích trực tiếp bởi *TTX*, đầu tiên cơ co, nhưng sau đó ít phút ngừng co. Ngày nay, chúng ta biết rằng *TTX* trước hết ảnh hưởng đến trục của thần kinh vận động và sau đó, chậm hơn một chút, sẽ ảnh hưởng sợi cơ. Khi thần

kinh trì hoãn một xung động từ não đến cơ, một dấu hiệu được mang bởi trục có thể được đo như là một sự thay đổi trong hiệu điện thế. Thần kinh bị kích thích dưới những điều kiện này không có sự thay đổi về điện thế bên ngoài nơi độc tố được đưa vào. Sự điều khiển của xung lực đã bị phong bế. *TTX* có hiệu ứng đặc hiệu lên sự chuyển động của ion Na^+ và K^+ , do đó, nó là một công cụ mới để nghiên cứu chức năng thần kinh. Fuhrman [52] đã giải thích cơ chế khiến *TTX* thực hiện hiệu ứng chọn lọc của nó lên dòng ion. Hiệu ứng chọn lọc của độc tố không ở trên những ion mà ở trên màng qua đó những ion di chuyển để mang dòng hướng vào trong. Khi sự điều khiển trong sợi trục thần kinh bị phong bế, những dấu hiệu đến và đi từ hệ thần kinh trung ương không được truyền; nếu sự phong bế xuất hiện trong thần kinh cảm giác, thuốc mê cục bộ có hiệu quả. Đa số thuốc gây mê cục bộ thông thường như *cocain* phong bế sự điều khiển bởi những cơ chế ít đặc hiệu hơn cơ chế của *TTX*. Tuy nhiên, *TTX* không phải là thuốc gây mê cục bộ vì khi *TTX* được tiêm vào vùng phụ cận của thần kinh, nó không chỉ tiếp xúc với mô thần kinh mà khuếch tán đi. Hơn nữa, nó được máu vận chuyển đến mô khác, có thể gây độc và gây chết.

1.2.6. Khả năng ứng dụng của *tetrodotoxin* trong y học

1.2.6.1. Một số khả năng ứng dụng của *TTX*

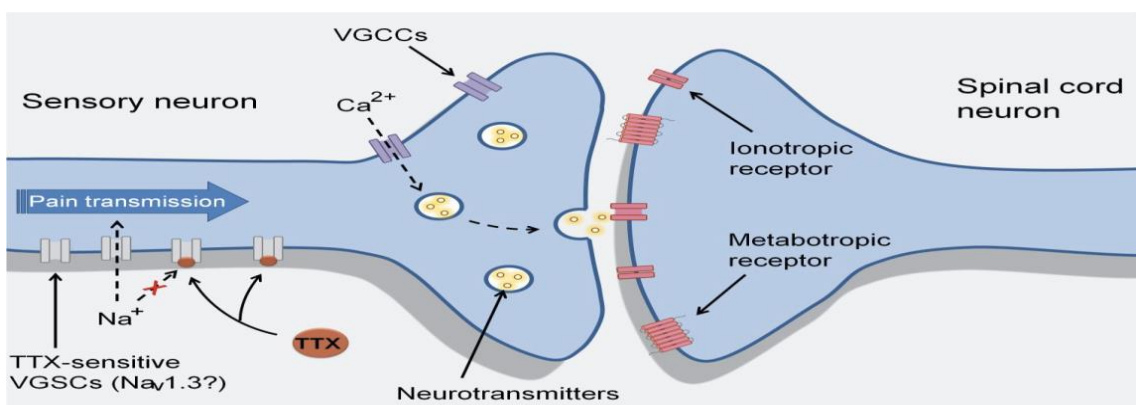
a. Ứng dụng làm thuốc điều trị các bệnh về tim mạch

Một trong những tác dụng của *TTX* là kích thích hoạt động của hệ tuần hoàn, làm thay đổi nhịp tim, thay đổi trương lực của thành mạch, dẫn đến sự thay đổi huyết áp [106] nên *TTX* có thể gợi ý hoặc làm chất dẫn đường để bào chế các loại thuốc đặc trị chữa bệnh huyết áp, rối loạn nhịp tim. *TTX* với liều khoảng 2-31 $\mu\text{g}/\text{kg}$ khi tiêm vào cơ thể người sau khoảng 2-3 phút gây ra hiện tượng hạ huyết áp [1]. Duff và cộng sự [45] đã sử dụng *TTX* với liều lượng 1,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ trong việc phòng ngừa có hiệu quả các trạng thái xơ cứng động mạch.

TTX còn làm giảm tính thấm của màng tế bào đối với việc vận chuyển ion Na^+ mà không ảnh hưởng đến quá trình vận chuyển ion K^+ , trong khi đó, các thuốc gây tê khác lại có tác dụng đến cả 2 kênh vận chuyển này. Điều này hết sức có ý nghĩa trong việc nghiên cứu sinh lý màng tế bào. [65]

b. Ứng dụng làm thuốc giảm đau

Những nghiên cứu gần đây cho thấy, kênh đặc hiệu với *TTX* tồn tại ở điểm tiếp nhận của màng các tế bào thần kinh ngoại biên, một số sợi trục thần kinh vận động và dọc màng cơ của sinh vật bậc cao [163]. Chúng được phân bố dọc theo các sợi trục thần kinh tại các hạch Ranvier với mật độ lên tới 1000 kênh/1 μm^2 - lớn hơn rất nhiều so với các vùng không có các hạch này (25 kênh/1 μm^2), đóng vai trò trong quá trình truyền xung thần kinh. Do đó, sự thay đổi của các kênh này do tác động của *TTX* có thể góp phần vào quá trình tái mô hình hóa, nguy cơ làm sai lệch các tác động, hoặc làm giảm cơn đau bằng cách ức chế thần kinh. Khá nhiều dược phẩm ứng dụng mô hình hoạt động tương tự như các thuốc: *lidocain*, *mexiletin*, *carbamazepin*, *oxcarbazepin*, *phenytoin*, *lamotrigin*, *topiramate*, *zonisamid*, và chống trầm cảm 3 vòng (*tricyclic antidepressant*). Chính vì sự tồn tại rộng rãi của các kênh đặc hiệu với *TTX* trong cơ thể sinh vật bậc cao, vì vậy có thể sử dụng *TTX* trong y học. Một số nhóm nghiên cứu đã chứng minh được ở nồng độ thấp (12,5-50 nM), *TTX* có thể làm giảm cảm giác đau của động vật bậc cao [90], nó không đối kháng với các thuốc giảm đau khác. So với *morphin*, *TTX* có hoạt lực mạnh hơn gấp 3000 lần, ít tác dụng phụ hơn và đặc biệt là ít gây nghiện [27], [147]. Dựa vào tính chất này, hiện nay hướng nghiên cứu mới được một số phòng thí nghiệm dược phẩm trên thế giới là thử nghiệm sử dụng *TTX* làm thuốc giảm đau cho các trường hợp bệnh nhân ung thư [35], [62], [111]. Mục đích của nghiên cứu này là nghiên cứu liều an toàn và hiệu quả đối với cảm giác đau do hoá trị liệu. Mặt khác, thời điểm bắt đầu có tác dụng và thời gian duy trì tác dụng giảm đau của *TTX*, khả năng thay thế các loại thuốc giảm đau khác của *TTX* là những mục tiêu chính của các nghiên cứu.



Hình 1. 8. Mô hình cơ chế hoạt động ức chế cảm giác đau của *TTX* ở tế bào thần kinh cảm giác [119]

Theo Nieto và cs. [118], [119] những tế bào thần kinh cảm giác có khả năng tạo ra những hoạt động điện thế ngoại biên nhằm tái lập lại cổng điện thế kênh Na^+ (VGSC) *Nav 1.3*.

Bảng 1. 7. Hoạt tính của TTX trong thử tác dụng giảm đau ở sinh vật [119]

Đau đau	Tác dụng của TTX	Liều TTX	Hoạt tính (+, +/-, -)	Thử nghiệm	TL TK
Đau cấp tính	Gây ức chế dây thần kinh hông	Bơm thấm thấu TTX	+	Kích thích cơ học và nhiệt	[168]
		Tiêm cục bộ (10mM/4μL)	+/-	Đau được gây ra bởi ET-1	[61]
	Lên mạng thần kinh tủy sống	0,2-0,6 pM/20 μL	+ (2-6 pM)	Kích thích nhiệt	[67]
		0,3-6 μg s.c.	-	Formalin 1 ^o	[96]
		0,3-6 μg s.c.	+ (3-6 μg)	Đau quần quai	[96]
	Toàn bộ cơ thể	1-6 μg s.c.	-	Kích thích cơ học, nóng và lạnh	[118]
		6 μg s.c.	-	Đau do tác động cơ học	[48]
		Dùng TTX cấp và lặp lại liên tục (1-6 μg s.c)	-	Kích thích cơ học và nhiệt	[75]
Đau do viêm	Gây ức chế dây thần kinh hông	50 μM/0.2 mL	+	Carrageenan gây đau do viêm, phù nề các chi và với kích thích cơ học, nhiệt	[33]
	Lên mạng thần kinh tủy sống	0,2-6 pmM/20 μL	+(0,2-6 pM)	Mẫn cảm với kích thích nhiệt bằng CFA	[67]
	Toàn bộ cơ thể	0,3-6 μg s.c.	+(6 μg)	Formalin 2 ^o	[96]
		50 μM/0.2 mL s.c.	-	Carrageenan gây đau do viêm, phù nề các chi và mẫn cảm với kích thích cơ học, nhiệt	[33]
		2,5 μg s.c.	+(2,5μg)	Carrageenan gây đau do quá mẫn cảm với kích thích cơ học	[26]
Đau thần kinh	Gây ức chế dây thần kinh hông	Bơm thấm thấu TTX	+	Mẫn cảm với kích thích cơ học, nhiệt và hành động tự phát gây ra bởi SNI và CCI	[168]
	Cục bộ ngoài da DRG	12,5-50 nM/5 μL	+(12,5-50 μg)	Hội chứng allodynia cơ học gây ra bởi SNL	[90]
	Gây tê ngoài màng cứng	25 nM/5 μL	+(25μg)	Hội chứng allodynia cơ học gây ra bởi SNL	[90]
	Gây tê cục bộ dây thần kinh động mạch giữa	Miếng gel dán TTX	+	Mẫn cảm cơ học và tăng cường hoạt động trong nhân chêm sau khi sử dụng CCI của dây thần kinh động mạch giữa	[39]
	Toàn bộ cơ thể	25 nM/5 μL i.p.	-	Hội chứng allodynia cơ học gây ra bởi SNL	[90]
		0,3-6 μg s.c.	+(1-6 μg)	Hội chứng allodynia cơ học và mẫn cảm với kích thích nhiệt gây ra bởi SNL	[96]
		Dùng TTX cấp và lặp lại liên tục (1-6 μg s.c)	+/-	Mẫn cảm với kích thích cơ học và nhiệt, sự hoạt động quá mức của gen c-fog bởi CCI lên dây thần kinh hông	[75]
		Dùng TTX cấp và lặp lại liên tục (1-6 μg s.c)	-	Mẫn cảm với kích thích cơ học và nhiệt gây ra bởi CCI lên dây thần kinh dưới ổ mắt	[75]
		8 μg i.p	-	Hội chứng allodynia được gây ra bởi chất vincristine	[127]
		1-6 μg s.c.	+	Mẫn cảm với kích thích cơ học, nóng và lạnh gây ra bởi chất paclitaxel	[118]
		6 μg s.c.	+	Mẫn cảm cơ học gây ra bởi chất capsaicin	[48]

(+): có tác dụng; (+/-): tác dụng trung bình; (-): không có tác dụng; TLTK: Tài liệu tham khảo

Hoạt động điện thế này là xung điện được truyền dọc theo trục của tế bào thần kinh đến kích hoạt cổng điện thế của các kênh Ca (VGCCs), và xung điện này cứ thế dẫn truyền qua các synap thần kinh để cuối cùng kích hoạt các thụ thể ở tế bào thần kinh sừng lưng của tủy sống. Bằng cách làm bất hoạt các kênh Na^+ nhạy cảm như Nav1.3, *TTX* có thể ngăn chặn hoạt động của các tế bào thần kinh ngoại biên.

Trong thử nghiệm các liều sử dụng *TTX* để giảm đau cho bệnh nhân ung thư, 24 bệnh nhân đã trải qua 31 chế độ điều trị với các liều *TTX* 15-90 $\mu\text{g}/\text{ngày}$ (tiêm bắp) trong vòng 04 ngày. 17 trong số 31 trị liệu này biểu hiện tác dụng giảm đau rõ rệt cho bệnh nhân, và tác dụng này kéo dài được 02 tuần kể từ khi bắt đầu tiến hành trị liệu. Nghiên cứu cho thấy liều tiêm *TTX* 30 $\mu\text{g}/\text{lần}$, 02 lần trong ngày trong vòng 04 ngày có hiệu quả giảm đau với liều độc tính được chấp nhận (không gây tử vong, phản ứng phụ) [57]. Trong một thử nghiệm đa trung tâm, ngẫu nhiên, mù đôi, được kiểm soát placebo và thiết kế thử nghiệm song song, việc sử dụng *TTX* dưới da không đem lại hiệu quả trong việc giảm đau lâm sàng cho bệnh nhân ung thư ở mức độ vừa đến đau nặng khi đánh giá trên chỉ số đau, mặc dù khi phân tích dữ liệu, hiệu quả giảm đau mạnh vẫn được thể hiện [56]. Vào giai đoạn cuối của nghiên cứu, tất cả các bệnh nhân được chuyển sang nghiên cứu không mù, mở rộng và thử nghiệm an toàn. Trong liệu trình thử nghiệm, các bệnh nhân đau mãn tính do ung thư được tiêm 30 μg *TTX* dưới da hai lần mỗi ngày trong 4 ngày. Các kết quả cho thấy có thể chấp nhận sự dung nạp *TTX*, thậm chí trong một thời gian dài, với những tác dụng không mong muốn thường nhẹ, chủ yếu là cảm giác thoáng qua, tê hoặc ngứa ran quanh miệng [58]. Đánh giá qua 41 bệnh nhân, tác dụng giảm đau được duy trì ở 21 bệnh nhân, có bệnh nhân ung thư vẫn đau như trước mặc dù đã điều trị theo đúng chu kỳ và quá 12 tháng, không có bằng chứng rõ rệt của đáp ứng thuốc và tác dụng kháng chất độc lạ trong thời gian trung bình 3 tuần, lý do tại sao chỉ có 50% bệnh nhân đáp ứng với *TTX* vẫn chưa rõ. Các tác giả cho rằng cần các nghiên cứu sâu hơn để đảm bảo về việc sử dụng của *TTX* để giảm đau do ung thư từ trung bình đến nặng. Buschmann và cộng sự [34] đã nghiên cứu phát triển thuốc giảm đau là dạng phối hợp giữa một chất đối kháng opiat như *Naloxon* và một chất chặn kênh Na^+ (đặc biệt là *TTX*) ứng dụng điều trị một số bệnh, đặc biệt là đau (gồm đau thần kinh, đau do ung thư, ...)

c. Ứng dụng làm thuốc hỗ trợ cai nghiện ma túy

Cơ chế của *morphin* và nhóm opiat giảm đau có liên quan đến kênh vận chuyển Na^+ vì có hay không có Na^+ mà chúng có thể gắn hoặc không gắn với thụ thể của chúng. *TTX* chặn kênh Na^+ , ức chế sự vận chuyển Na^+ nên chúng có thể phong bế trực tiếp các vị trí hoạt động của opiat làm thay đổi cấu trúc không gian lập thể dẫn đến mất tác dụng của opiat. Ngoài ra, chúng còn cạnh tranh vị trí bám vào thụ thể kênh vận chuyển Na^+ của opiat, làm mất khả năng bám vào các kênh này của opiat hoặc bị cạnh tranh khỏi thụ thể [1], [13], [14]. Do đó, dùng liều thấp sẽ dẫn đến ngăn chặn sự dẫn truyền trên các sợi thần kinh cả cảm giác và vận động, giảm, cắt được các triệu chứng “thèm khát, thoải mãn” của ma túy, tính gây nghiện của *morphin*.

d. Ứng dụng làm thuốc gây tê

TTX còn đang được nghiên cứu để sử dụng làm thuốc gây tê, gây mê trong phẫu thuật [159]. Một số thuốc tê đang sử dụng như *lidocain*, *cocain*, *procaïn*, *novocain*, ... Cơ chế tác dụng của các thuốc tê là ngăn chặn sự dẫn truyền xung động thần kinh tại mô thần kinh tiếp xúc, chúng ức chế, giảm thiểu khả năng thấm Na^+ qua kênh vận chuyển Na^+ . *TTX* có khả năng ức chế mạnh mẽ kênh vận chuyển Na^+ . Ngoài ra, *TTX* khác với các thuốc gây tê khác, *TTX* gắn vào mặt ngoài, tiếp giáp với vùng chọn lọc hẹp của kênh Na^+ [161] nên có khả năng gây tê tại chỗ và tác dụng mạnh hơn nhiều lần các thuốc gây tê khác. Ví dụ, để kìm hãm hoạt động của hệ thần kinh bằng *cocain* phải cần đến hàm lượng 500 μg , trong khi đó, với *TTX* thì chỉ cần khoảng 0,03 μg (hiệu quả tác dụng của *TTX* mạnh gấp 60.000 lần *cocain*) [85]. Schwartz và cs. [142] nghiên cứu khả năng gây tê của *TTX* trên thỏ với các nồng độ khác nhau. Kết quả cho thấy, ở liều 10 mM, *tetrodotoxin* có tác dụng gây tê kéo dài đến 8 giờ. Tại nồng độ 1 mM, *tetrodotoxin* cũng thể hiện là một chất gây tê hiệu quả nhưng ngắn hơn. Còn ở nồng độ 0.1 mM, *tetrodotoxin* không có tác dụng gây tê đáng kể. ở thỏ đã tiêm *proparacaine* cũng bị gây tê, nhưng chỉ có tác dụng hơn 1 giờ và mất tác dụng hoàn toàn sau 3 giờ. Khi tiến hành gây tê tại chỗ bằng cách bôi *TTX* với các nồng độ khác nhau (1 mM; 0,1 mM; 0,01 mM) lên tế bào giác mạc thỏ đã loại biểu mô [143], kết quả thu được sau 4 giờ, mất được bôi *TTX* nồng độ 1 mM và 0,1 mM vẫn còn tê. Sau 6 giờ, 5 trên 6 mắt thỏ vẫn chưa hết cảm giác tê và sau 8 giờ, mắt mới về bình thường. Với liều điều trị đa liều, tất cả mắt thỏ vẫn bị tê trong suốt thời gian thí nghiệm (30 giờ). Nhóm tác giả cũng nhận thấy không có sự khác biệt đáng kể nào về sự tái tạo biểu mô giữa nhóm được điều trị bằng *TTX* và nhóm

không, không thu được bằng chứng nào về nhiễm độc cục bộ hay toàn thân khi bôi *TTX*. Cũng nghiên cứu nhằm kéo dài thời gian gây tê, một số nhà khoa học Mỹ [36] đã nghiên cứu hỗn hợp *tetrodotoxin-bupivacaine-epinephrine* nhằm kéo dài tác dụng gây tê tại chỗ, đưa thời gian tác dụng gây tê lên đến 18 – 48 giờ.

e. Ứng dụng làm thuốc điều trị HIV

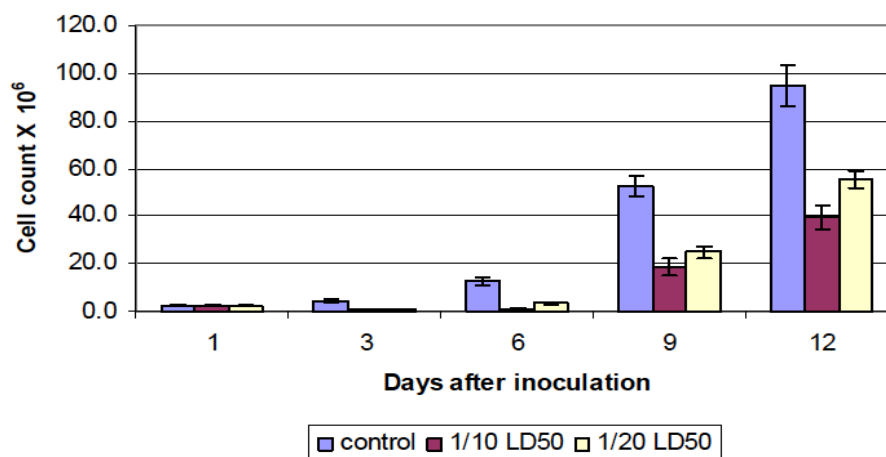
Theo nghiên cứu của Lesort và cộng sự [88] cho thấy *TTX* có khả năng liên kết với protein của virus HIV, đặc biệt là *gp-120*, do đó làm cho *genom* của HIV không thể gắn vào *genom* của người. Vì vậy, HIV không thể phát triển thành AIDS được. Đây là tín hiệu đáng mừng cho quá trình đi tìm thuốc điều trị căn bệnh thế kỷ HIV-AIDS.

f. Ứng dụng làm thuốc hỗ trợ điều trị ung thư

Các nhà khoa học đã chứng minh được sự tham gia của các kênh ion trong sự tăng sinh của tế bào cũng như của các khối u xâm lấn trong một số bệnh ung thư. Roger [134] nhận thấy sự thay đổi đáng kể trong các đặc tính điện sinh lý của 3 dòng tế bào ung thư ví khi tiếp xúc với các nồng độ *TTX* khác nhau. Kết quả cho thấy, ở nồng độ 30 μ M, kênh vận chuyển Na^+ vào tế bào bị ức chế hoàn toàn, giảm sự tăng sinh, di cư và xâm lấn của các dòng tế bào khoảng 30%. Fouda [50] đã thử nghiệm hoạt tính chống ung thư của *TTX* chiết từ cá nóc *Arothron diadematus* thu được ở vùng biển Đỏ trên mô hình gây ung thư biểu mô kháng Ehrlich EAC (*Ehrlich Ascites Carcinoma*) trên chuột nhắt trắng trưởng thành giống cái. Kết quả cho thấy *TTX* giúp gia tăng thời gian sống chuột một cách đáng kể, 28-42% tùy theo liều, thời gian sống trung bình tăng và số lượng tế bào ung thư giảm.

Bảng 1. 8. Tác dụng của TTX trên thời gian sống trung bình và tỷ lệ tăng thời gian sống trên chuột nhắt mang khối u EAC [50].

Nhóm	Thời gian sống trung bình (ngày)	Tỷ lệ tuổi thọ tăng (%)
EAC	14 \pm 1	-
EAC + 1/10 LD ₅₀	20 \pm 2	46,6 \pm 4,2
EAC + 1/20 LD ₅₀	18 \pm 1	26,7 \pm 2,6



Hình 1. 9. Sự phát triển số lượng tế bào EAC ở chuột mang ung thư sau khi điều trị với những liều TTX khác nhau [50].

Nghiên cứu trên đã mở ra hướng ứng dụng mới của TTX để điều trị ung thư trên người. Tuy nhiên cần nghiên cứu thêm để đưa ra liều thích hợp, cũng như phác đồ điều trị tối ưu để hạn chế độc tính của TTX.

1.2.6.2. Triển vọng sử dụng TTX ở Việt Nam

TTX đang được nghiên cứu ứng dụng và rất có triển vọng trong các liệu pháp giảm đau, đặc biệt là đau do ung thư, gây tê, cai nghiện, hay chống HIV/AIDS. Những nhóm liệu pháp này tạo ra nhu cầu sử dụng TTX rất lớn ở Việt Nam và đòi hỏi nguồn cung cấp TTX dồi dào.

Theo thống kê, năm 1994, cả nước ta có 55.445 người nghiện ma túy, tăng lên đến 131.000 người tính đến tháng 9 năm 2002. Đến năm 2008 Bộ Lao động, Thương binh & Xã hội báo cáo có không dưới 173.000 người nghiện ma túy. Con số này tăng lên 204.377 người tính đến tháng 9 năm 2014. Năm 2014, cả nước ta có 142 trung tâm cai nghiện ma túy trên khắp các tỉnh thành và đang điều trị cai nghiện cho trên 32.000 người. Liệu pháp điều trị cho người nghiện dạng thuốc phiện hiện nay chủ yếu là dùng *Methadone* để điều trị thay thế. Tuy nhiên, chỉ có hơn 20.000 người được điều trị bằng liệu pháp này và phần lớn *methadone* là được viện trợ bởi các Tổ chức Y tế Thế giới.

Theo Tổ chức nghiên cứu ung thư quốc tế Globocan, năm 2008, Việt Nam có 111.600 ca mắc bệnh ung thư mới trong đó có 82.000 bệnh nhân tử vong. Theo số liệu thống kê của Hiệp hội Ung thư Việt Nam, năm 2012, cả nước có hơn 150.000 ngàn ca mắc mới, trong đó tỷ lệ phát hiện bệnh ở giai đoạn I và II chiếm khoảng 50,52%, giai đoạn muộn (\geq giai đoạn III) là 49,48%. Thậm chí, có những ung thư, như ung thư vú, tỷ lệ phát hiện

ở giai đoạn I chỉ chiếm 10%. Đến năm 2014, số ca mắc mới lên đến gần 200.000, trong đó có khoảng 70.000 người tử vong.

Với những triển vọng làm thuốc giảm đau do ung thư, hỗ trợ điều trị cai nghiện của *TTX* thì tất cả những người này đều cần đến liệu pháp điều trị *TTX* đang được nghiên cứu. Nếu nghiên cứu thành công và đưa vào ứng dụng, *TTX* sẽ mang lại hi vọng cho hàng triệu bệnh nhân và gia đình người bệnh.

Trong khi đó, trữ lượng cá nóc ở biển Việt Nam (theo ước tính năm 2005) vào khoảng trên 37.000 tấn, trong đó họ cá nóc *Tetraodontidae* chiếm khoảng 84,7% tổng trữ lượng. Đây là nguồn nguyên liệu tiềm tàng để chiết tách thu được *TTX*, hứa hẹn một tiềm năng mới cho ngành Y Dược Việt Nam.

1.3. MỘT SỐ PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ *TETRODOTOXIN*

1.3.1. Một số phương pháp chiết xuất, phân lập *tetrodotoxin* từ tự nhiên

1.3.1.1. Một số nghiên cứu trên thế giới

Tetrodotoxin được tìm thấy nhiều nhất ở các loài cá nóc thuộc họ *Tetraodontidae*. Ngoài ra *TTX* còn chứa ở những loài sinh vật biển khác nhau như bạch tuộc tua xanh Úc (*Haplocladia maculosa*); cá mỏ vẹt, cá thân tiên (*Ostracion spp*), cá mặt tròn đại dương,...., một số loài ghẹ như ghẹ Philippin, ghẹ mắt đỏ (*Eriphia spp*, *Carcinoscorpius rotundicauda...*), ốc sên biển, loài ếch độc (*Harlequin*) [32]. Tuy nhiên, cá nóc vẫn là nguyên liệu chính để tách chiết và nghiên cứu về *TTX* [17], [32].

Vào đầu thế kỷ XX, Tahara ở Nhật đã bắt đầu chiết *TTX* [149], [150]. Ông đã sử dụng chì acetat và dung dịch amoniac trong nước để kết tủa đồng thời độc tố và chì, sau đó loại chì bằng cách xử lý với *hydro sulfid*. Tiếp theo, thêm *methanol* và *diethyl ether* vào dịch lọc sau khi loại chì, cuối cùng kết tủa độc tố. Tahara xác định độc tính của độc tố thô là $4,1\gamma$ (γ : đơn vị độc, liều gây chết trung bình cho 1 g chuột) và gọi độc tố đó là “*tetrodoxin*”, như tên gọi hiện nay. Mấy chục năm tiếp theo, nhiều phương pháp chiết đã được xây dựng. Sau đây là một số phương pháp đại diện.

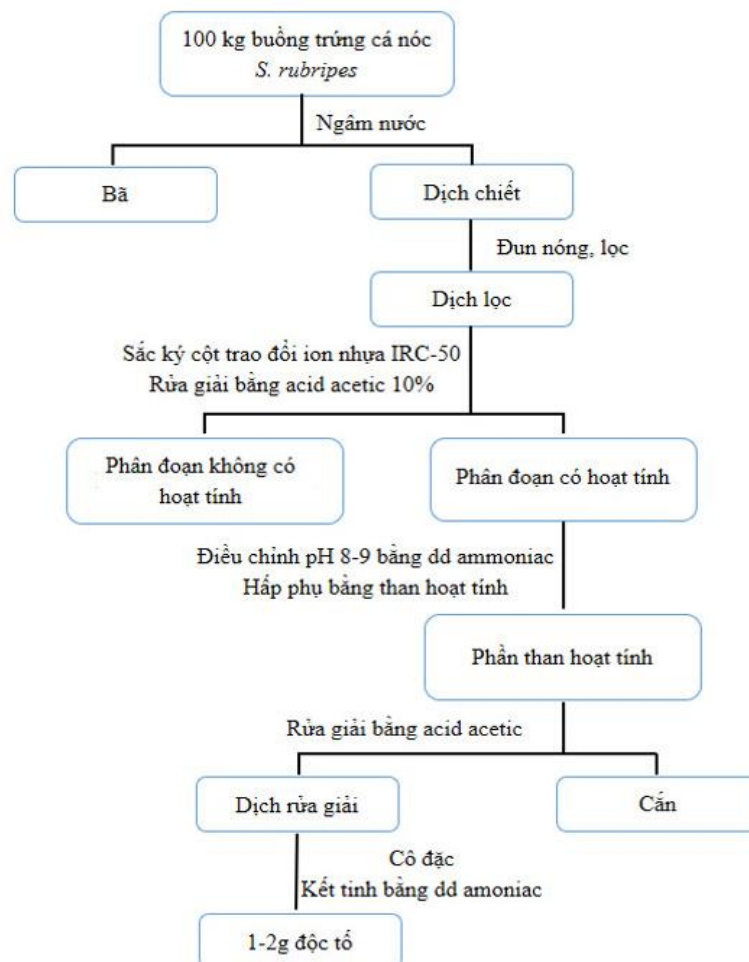
Năm 1950, Yokoo nghiên cứu chiết xuất, phân lập thành công độc tố tinh thể và xác định liều gây chết tới $0,01\gamma$ [173]. Nghiên cứu này sử dụng buồng trứng cá nóc bắt được gần Shimomi (Nhật) vào cuối tháng giêng, ngâm chiết chúng trong nước và bốc hơi đến khô. Kết quả thu được một chất thô có độc tính là 40γ . Sau đó, chì acetat và ammoniac được sử dụng để kết tủa độc tố và chì cùng lúc, rồi loại tạp bằng *acid phosphor-tungstic* và thủy ngân picrat, loại bỏ đường bằng *phenyl hydrazin*. Tủa được xử lý bằng thủy

ngân picrat, sau đó xử lý tiếp bằng *acid picrolonic*, *methanol* và *acid picrolonic* sao cho thu được độc tố kết tinh có độc tính là 0,8γ. Tuy nhiên, từ 20 kg trứng cá, Yokoo chỉ thu được 13 mg độc tố tinh thể.

Năm 1951, Nagai [93] sử dụng nhựa trao đổi ion (*Amberlite IRC-50*) để hấp phụ độc tố, rửa giải với *acid hydrochloric*, rồi xử lý nước rửa giải với *Amberlite IR-40* để loại *acid hydrochloric*. Sau khi cô đặc, *ethanol khan* được sử dụng để chiết độc tố. Cuối cùng, thu được 2,5 mg tinh thể độc tố có độc tính 0,08γ từ 20 kg trứng cá nóc.

Năm 1952, Tsuda và Kawamura sử dụng sắc ký giấy vòng [156] để phân lập, tinh chế và thu được độc tố có MLD 10μ/kg. Sau đó, họ xây dựng phương pháp sản xuất số lượng lớn bằng sắc ký cột than hoạt [158]. Phương pháp này có khả năng xử lý 1000 buồng kg trứng cá và thu được 10 g độc tố với MLD 10 μ/kg. Nghiên cứu khác của Woodward [165] cũng thu được kết quả tương tự.

Năm 1964, Goto và cộng sự [54] đã đơn giản hóa qui trình công nghệ bằng cách sử dụng nhựa trao đổi ion và loại tạp bằng than hoạt. Họ thu được 1-2 g độc tố thô từ 100 kg buồng trứng cá *S. rubripe* [54]. Quy trình được tóm tắt trong hình 1.10



Hình 1. 10. Sơ đồ quy trình phân lập TTX từ loài cá nóc *Spheroides rubripe* [54]

Sau năm 1980, một số phương pháp lần lượt được báo cáo, nhưng chúng chủ yếu theo phương pháp của Goto, tuy nhiên không tăng hiệu suất chiết.

Năm 2003, Maoqing Zhou và cộng sự [93] tiến hành chiết xuất, phân lập *TTX* như sau: từ 20kg trứng cá nóc chiết bằng *acid acetic*, đun nóng, làm lạnh, lọc; tách *TTX* sử dụng cột trao đổi ion chứa nhựa D-152, *diatomaceous silica-than hoạt*, cô đặc và kết tinh thu được 1,2g độc tố toàn phần có chứa *TTX*. Độc tố *TTX* tiếp tục được làm tinh khiết bằng cách tinh chế nhiều lần [94].

1.3.1.2. Một số nghiên cứu ở Việt Nam

Năm 1993, Lê Xuân Tú và cs. đã tiến hành tách chiết độc tố từ 04 loài cá nóc *L. lunaris*, *F. chrysops*, *F. lagocephalus lunaris* và *D. holocanthus* thu tại vùng biển miền Trung Việt Nam. Ông cho rằng loài *L. lunaris* là loài độc, độc tố cao nhất chủ yếu ở trứng (1,46%) và gan (1,43%), loài *F. chrysops* cũng chứa độc tố, còn 02 loài còn lại không chứa độc tố.

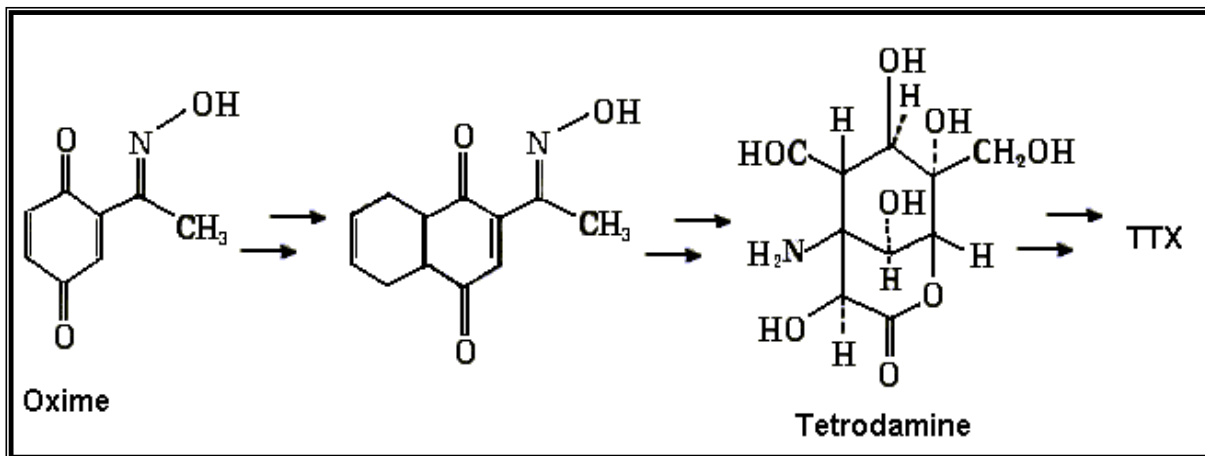
Năm 1994, Lê Quang Huân và cộng sự đã chiết xuất *TTX* từ 03 loài cá nóc *Fugu sceleratus*, *F. xanthopterus*, *L. lunaris* của biển miền Trung Việt Nam. Phương pháp này sử dụng dung môi hữu cơ *chloroform*, *ether* để chiết với quy trình còn phức tạp, nhiều giai đoạn. Tuy nhiên nhóm tác giả mới chỉ tinh chế được ở dạng thô, số lượng ít và chưa đánh giá chính xác được độ tinh khiết [12], [15].

Năm 2007, để sản xuất huyết thanh kháng độc tố *TTX*, nhóm nghiên cứu của tác giả Lê Văn Hiệp [7], [11] thuộc Viện Vắcxin và Sinh phẩm y tế Nha Trang (IVAC) cũng đã phân lập được *TTX* từ phủ tạng cá nóc. Nghiên cứu sử dụng hỗn hợp dung môi *methanol* – *acid acetic 1%* (tỷ lệ 4 – 0,5) để chiết, loại mỡ bằng *chloroform*, loại tạp bằng cột than hoạt tính, làm giàu qua sắc ký cột *BioGel P2* (3x100 cm), rửa giải bằng *acid acetic 0,03M*, sắc ký cột lần 2 qua cột *CM-Trisacry* (3x50 cm), rửa giải bằng *amoni acetat 0,02M – 1M*, sau đó tiếp tục qua sắc ký cột lần 3 với cột *TSK* (3x100 cm), rửa giải bằng *TFA 0,1%*, cô cạn được cặn thô với độ tinh khiết >75%, sau đó kết tinh lạnh trong dung môi *acid acetic 1% - methanol – ether* (0,5 – 2 – 5) ở 4°C thu được 19,21mg tinh thể *TTX* có độ tinh khiết 80-85%, với hiệu suất 35-50%. Tuy nhiên nghiên cứu mới chỉ dừng lại ở quy mô nhỏ phục vụ công việc điều chế huyết thanh kháng *TTX*.

1.3.2. Một số phương pháp điều chế khác

1.3.2.1. Tổng hợp hoá học

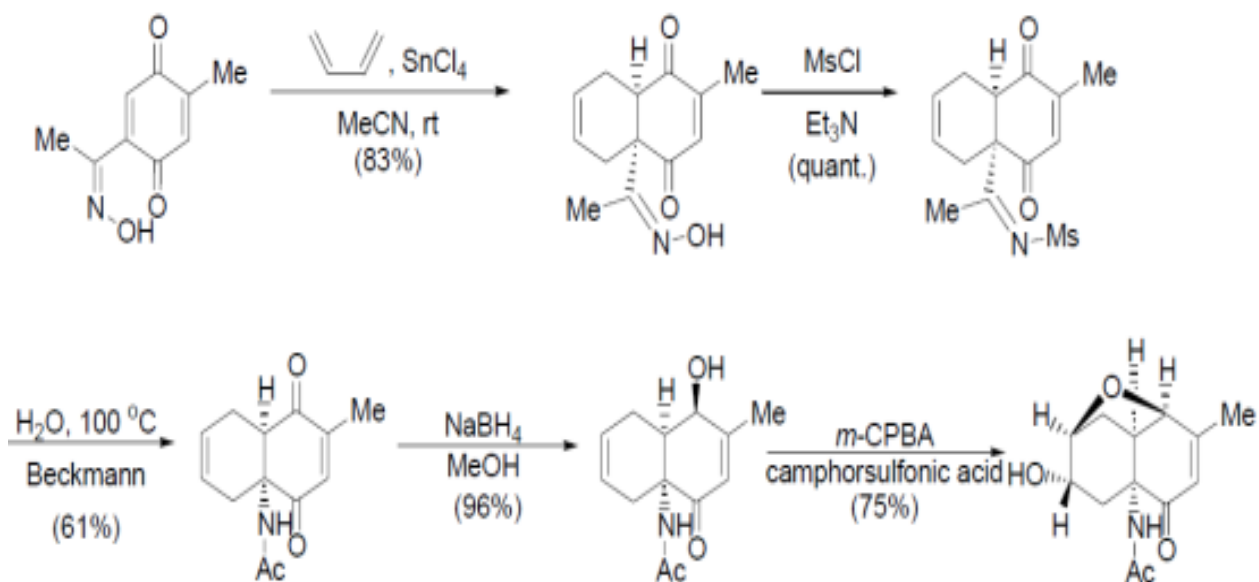
Năm 1972, Y. Kishi và cộng sự thành công trong việc tổng hợp hoàn chỉnh TTX. Quy trình tổng hợp TTX theo Kishi [80] được tóm tắt như sau:



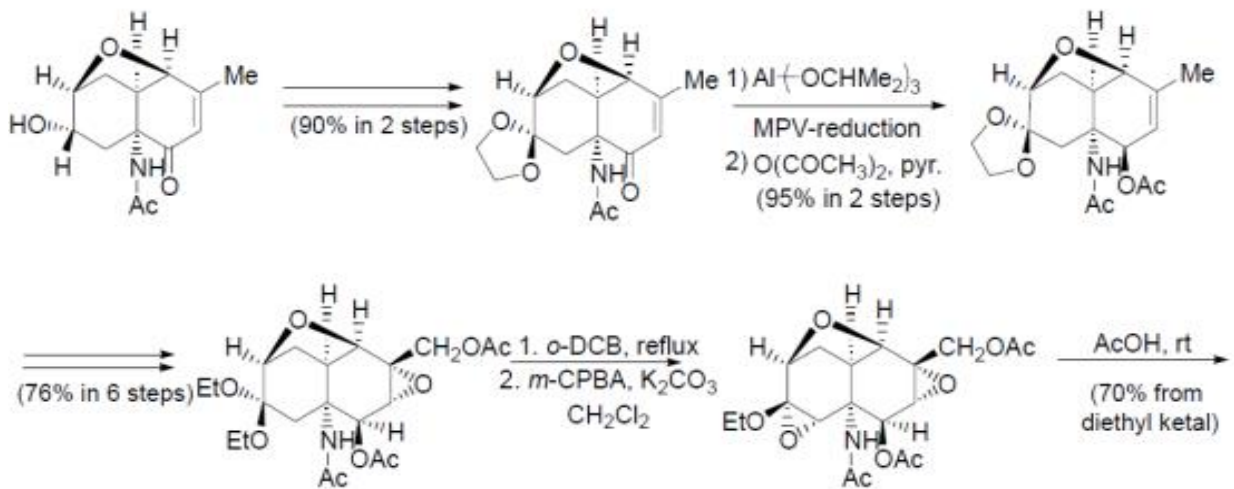
Hình 1. 11. Tóm tắt tổng hợp theo Kishi [80]

Quá trình tổng hợp này gồm 3 giai đoạn chính:

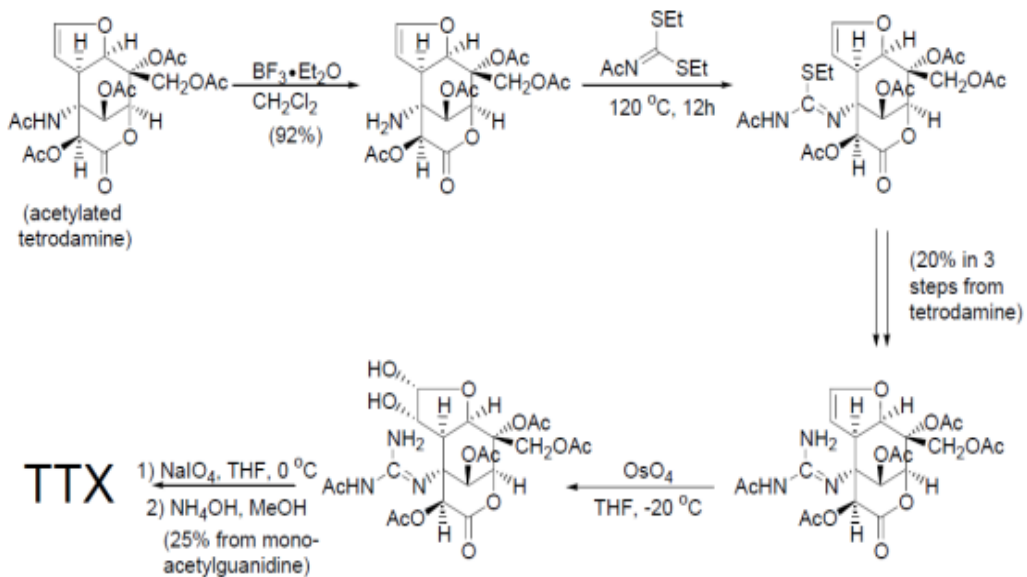
- Tổng hợp nhân bất đối cyclohexan



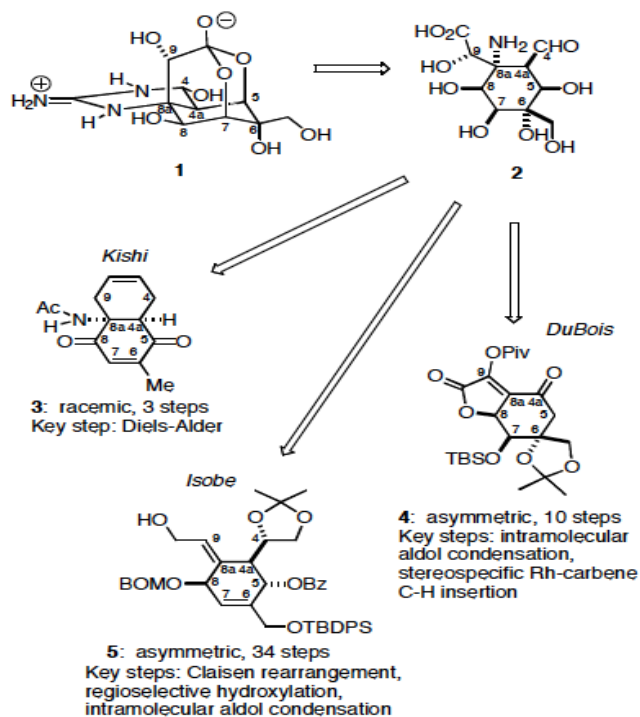
- Tổng hợp tetrodamin



- Tổng hợp tetrodotoxin

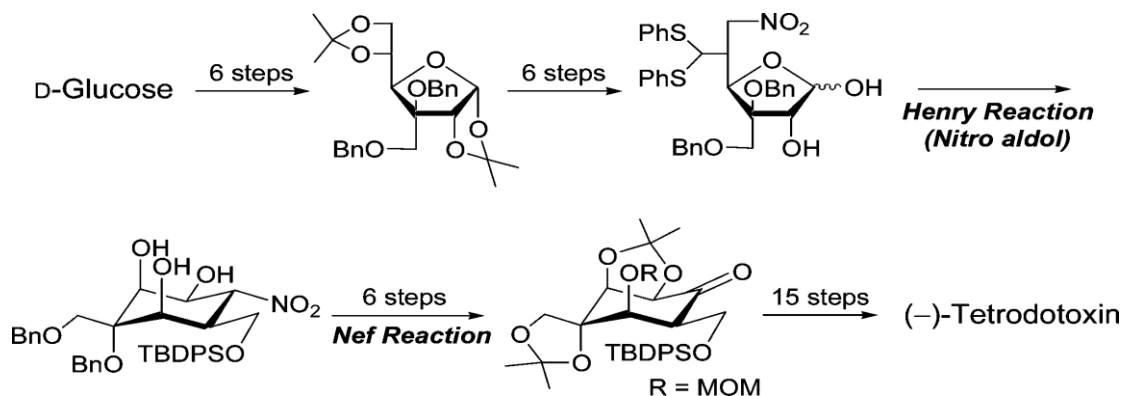


Năm 2003, Isobe và Dubois [28], [63], [120], [130] cũng đưa ra quy trình tổng hợp tetrodotoxin. Các quy trình này khác nhau cơ bản ở sự ngắt mạch nhân cyclohexan. Quy trình của Kishi là cộng *cis-decalin* thu được sản phẩm dạng *diastereoselectivity*. Isobe và Du Bois hướng tới tổng hợp TTX bất đối. Isobe tập trung vào các trung tâm bất đối C4a, C5, C7 với sự đảo ngược của C5 sau quá trình tổng hợp. Trong khi đó, Du Bois lại thiết lập các trung tâm *stereogenic* khác ngay từ đầu, cụ thể là C6 và C8.



Hình 1. 12. Phân tích sự khác nhau trong sự ngắt mạch nhân cyclohexan giữa các quy trình của Kishi, Isobe và DuBois.

Năm 2007, Ken-ichi Sato cùng cộng sự [139] đã nghiên cứu tổng hợp TTX từ *D*-glucose qua 34 bước, giai đoạn chính là phản ứng Henry. Quy trình này được tóm tắt như sau:



Hình 1. 13. Tổng hợp TTX từ *D*-Glucose [139]

1.3.2.2. Tổng hợp TTX từ vi sinh vật

Gần đây, việc phát hiện ra TTX có nguồn gốc vi sinh vật đã mở ra hướng nghiên cứu mới, đó là tổng hợp TTX từ vi sinh vật [10], [183]. Năm 1995, Kendo Matsumura [104] đã nghiên cứu tìm kiếm môi trường thích hợp để vi khuẩn *Vibrio alginolyticus* phân lập từ cá nóc *Fugu niphobles* có khả năng sản sinh TTX với hàm lượng cao. Kết quả phân tích cho thấy hàm lượng TTX là khá cao: 27,2 MU/ml. Năm 2007, Venmathi Maran [95] đã phân lập được hai chủng *Shewanella woodyi* và *Roseobacter sp.* từ một loài chân khớp sống ký sinh trên da cá nóc *Takifugu pardalis*. Tác giả cho rằng các chủng vi sinh

vật tổng hợp *TTX* với một hàm lượng rất nhỏ, do vậy, đòi hỏi cần phải nghiên cứu, sàng lọc chủng vi khuẩn nào có khả năng sinh sản *TTX* với hàm lượng cao. Xiao-Jie Wang và cộng sự (2008) [162] đã nuôi cấy thử nghiệm một số chủng vi sinh vật sinh *TTX* phân lập từ động vật biển chân bụng. Kết quả là có một số vi sinh vật phân lập trên môi trường ORI, TCBS sinh độc tố *TTX* với hàm lượng khác nhau. Chủng sinh hàm lượng *TTX* thấp nhất là 5 ng/g, chủng sinh cao nhất là 184 ng/g. Cũng trong năm 2008, Peter Hoi-fu Yu và cộng sự [184] đã sử dụng một số chủng *Vibrios* sinh *TTX* đã được các nghiên cứu trước tìm ra, nuôi trong điều kiện thích hợp để thu sinh khối có hàm lượng *TTX* cao. Kết quả thật bất ngờ khi nhóm nghiên cứu cho rằng có thể thu được 0,5 g – 1,5 g *TTX* trên một lít sinh khối vi sinh vật nuôi trong 10 ngày. Điều này cho thấy triển vọng mới, một hướng đi mới cho ngành công nghiệp sản xuất *TTX* phục vụ y học. Tuy nhiên cần phải tìm điều kiện tối ưu như nhiệt độ, pH, chế độ dinh dưỡng, thời gian nuôi ủ để vi khuẩn đó tạo ra *TTX* theo ý muốn.

Ở Việt Nam, nhóm nghiên cứu của tác giả Nguyễn Hữu Hoàng [7] ở Viện Nghiên cứu Hải Sản đã thực hiện đề tài nuôi cấy chủng vi sinh sản sinh *TTX* lên cá nóc sau đó chiết xuất và phân lập đã thu được nhiều kết quả khả quan. Bùi Thị Thu Hiền và cộng sự [8], [9] đã tiến hành nghiên cứu sinh khối 2 chủng vi khuẩn *Pseudoalteromonas antartica* và *Shewanella baltica* sinh *TTX* thu được *TTX* có hàm lượng 0,168 µg/ml. Sau khi tinh sạch qua than hoạt đạt (0,1799 µg/ml), sắc ký lọc gel Bio-Gel P2 (0,2014 µg/ml) và qua sắc ký ái lực Bio-Rex 70 (0,2528 µg/ml).

1.4. MỘT SỐ PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH TÍNH, ĐỊNH LƯỢNG TETRODOTOXIN VÀ DẪN CHẤT

1.4.1. Phương pháp sinh hóa

1.4.1.1. Phương pháp sinh hóa chuột

Phương pháp sinh hoá chuột [16], [43], [135] được sử dụng tương đối phổ biến, để định lượng sơ bộ độ độc của *TTXs* qua đơn vị chuột. Đơn vị chuột (MU) được quy định như là lượng *TTX* gây chết cho chuột có trọng lượng 18 – 20 g trong vòng 30 phút với liều độc tố tối thiểu.

Ở Việt Nam, đa phần các nghiên cứu khảo sát độc tố hay định lượng *TTX* chiết xuất được đều sử dụng phương pháp sinh hoá trên chuột, đánh giá bằng độ độc chuột, như nghiên cứu của nhóm Lê Quang Huấn, hay nhóm Viện Hải Dương học Nha Trang [16], [17]

1.4.1.2. Phương pháp ELISA

Phương pháp ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay- xét nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzyme) được thiết kế cho việc phát hiện và định lượng vật chất như peptides, protein, antibodies, hormone, ... Đôi khi nó còn được gọi bởi một tên gọi khác là EIA (Enzyme Immuno Assay)

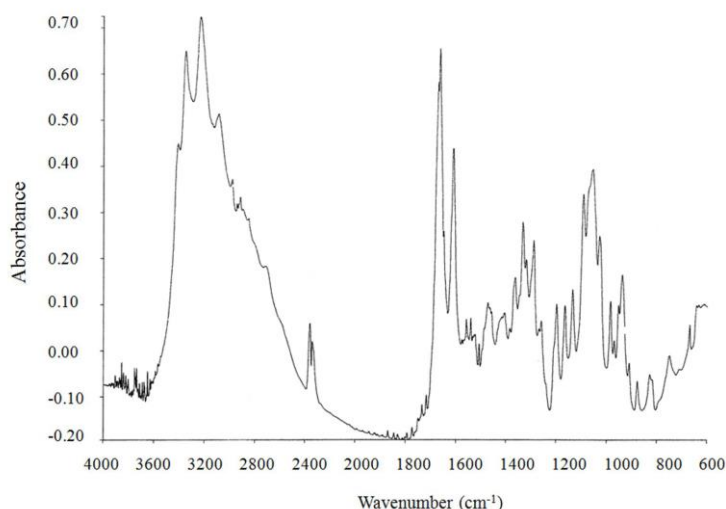
Islam và cs. [66] đo nồng độ *TTX* trong nước tiểu và máu từ 38 bệnh nhân trong các vụ ngộ độc *TTX* ở Bangladesh sử dụng phương pháp *ELISA* theo phương pháp của Ngy và cs. [117] bằng cách sử dụng một kháng thể đơn dòng chống *TTX* phát triển bởi Kawatsu và cs. [74].

Phương pháp này có độ nhạy khá cao, độ đặc hiệu tương đối tốt, thời gian phân tích nhanh (khoảng 30 phút) nhưng giá của các kháng thể đơn dòng rất đắt, nên chi phí phân tích cao, khả năng ứng dụng bị hạn chế.

1.4.2. Phương pháp quang phổ

1.4.2.1. Phương pháp quang phổ hồng ngoại

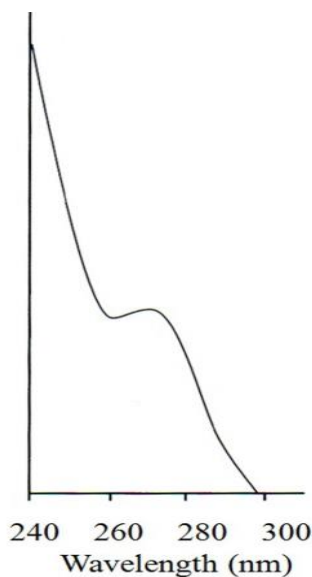
Quang phổ hồng ngoại hiện là một trong những kỹ thuật hữu ích để xác định các nhóm chức, góp phần định tính, định danh các chất. Phổ hồng ngoại được Onoue [131] sử dụng để định tính độc tố cá nóc. Tsuda [157] cũng sử dụng phổ FT-IR để xác định tinh thể *TTX-HCL* được phân lập từ loài sứa băng *Cephalothrix sp.* ở vịnh Hiroshima. Kết quả cũng cho các đỉnh hấp thụ tại 3353, 3235, 1666, 1612 và 1076 cm^{-1} , ứng với các nhóm chức OH, guanidin, COO^- của *TTX*.



Hình 1. 14. Phổ hồng ngoại của *TTX* [157]

1.4.2.2. Phương pháp quang phổ UV-VIS

Cấu trúc của *TTX* không có nối đôi liên hợp, nên khả năng hấp thụ UV-VIS kém, tuy nhiên phương pháp này vẫn được sử dụng để phân tích *TTX*. Một lượng nhỏ *TTX* hòa tan trong 2 ml *NaOH* 2 M và đun nóng trong cách thủy trong 45 phút, để nguội về nhiệt độ phòng. *TTX* và các dẫn chất tạo thành dạng *C9 base* (2-amino-6-hydroxymethyl-8-hydroxyquinazoline) cho phổ hấp thụ UV-VIS có đỉnh 276 nm [154] (hình 1.15). Saito và cộng sự [136] đã sử dụng phương pháp này để phân tích *TTX* và dẫn chất từ cá nóc.

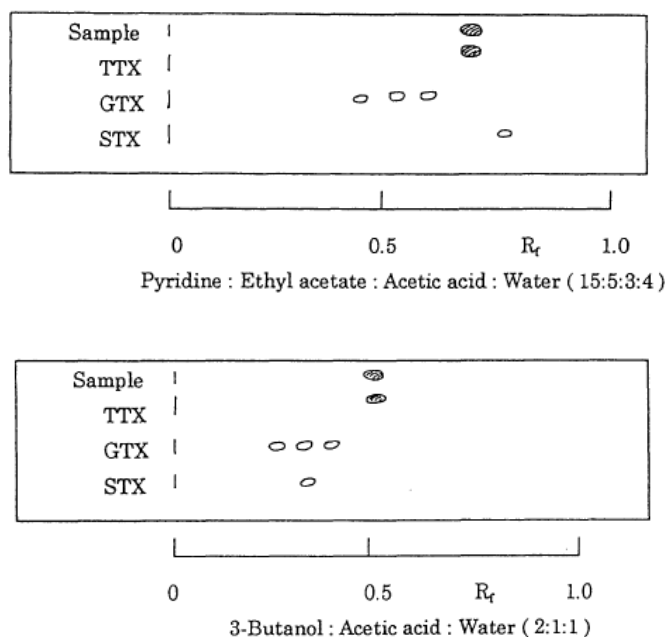


Hình 1. 15. Phổ UV-VIS của tetrodotoxin [154]

1.4.3. Phương pháp sắc ký

1.4.3.1. Phương pháp sắc ký lớp mỏng

Trên thế giới, một số tác giả [91], [153], [180] sử dụng phương pháp TLC này để định tính *TTX*, sử dụng bản mỏng silica gel 60 với 2 hệ dung môi *pyridin – ethyl acetat – acid acetic – nước* (15-5-3-4) và hệ dung môi *n-butanol – acid acetic – nước* (2-1-1). Thuốc thử hiện màu là dung dịch KOH 10% phun lên bản mỏng, sấy ở 100°C trong 10 phút, độc tố sẽ phát huỳnh quang ở bước sóng 365 nm. *TTX* cho vết có *R_f* khoảng 0,7 và 0,5 ứng với 2 hệ dung môi. Ngoài ra, có thể phát hiện vết *TTX* bằng thuốc thử *Weber* cho vết màu hồng. Giới hạn phát hiện của phương pháp khoảng 2 µg.



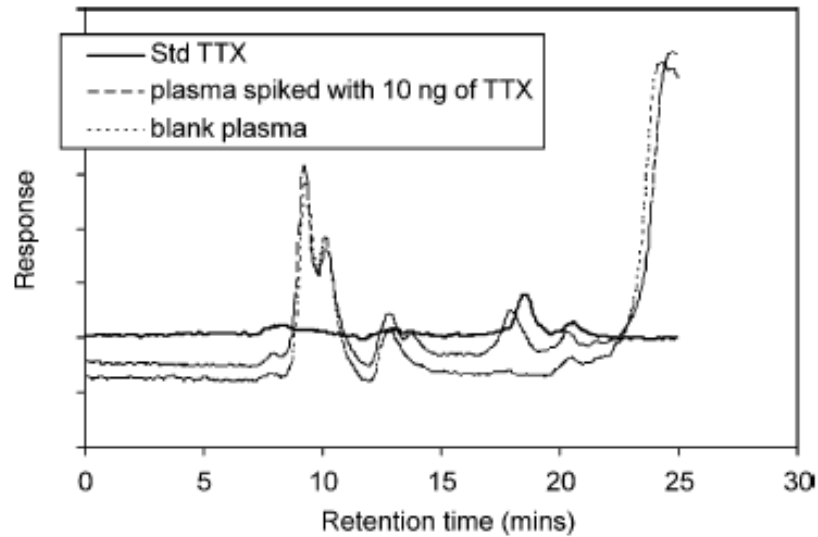
Hình 1. 16. Hình ảnh sắc ký lớp mỏng TTX, GTX, STX và mẫu chiết *T. nigroviridis* [91]

1.4.3.2. Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao

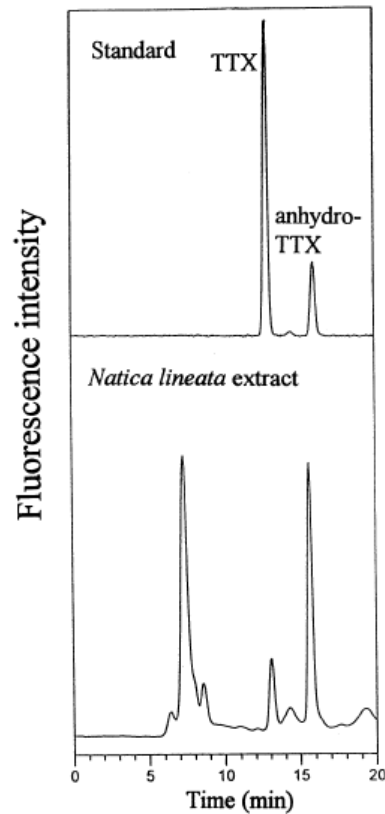
Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao với đặc trưng là sự phân tách giữa pha động và pha tĩnh, có thể ứng dụng để phân tích TTX và dẫn chất. Tuy nhiên, với các detector khác nhau thì phương pháp chuẩn bị, phân tích khác nhau, qua đó độ nhạy cũng khác nhau, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng cũng khác nhau.

Trong phân tử TTX không có liên kết đôi liên hợp, do đó nếu định tính và định lượng TTX bằng HPLC với detector UV, bước sóng phát hiện thường phải sử dụng là 201 nm, phương pháp độ nhạy thấp, độ chọn lọc thường không cao bởi trong cá nóc có rất nhiều dẫn xuất của TTX. Yu và cs. [182] thu được LOD là 10 ng/mL khi sử dụng HPLC-DAD, cột Allsphere ODS-2 (5 μ m; 250 x 4,6 mm) để định lượng TTX trong huyết tương và nước tiểu người.

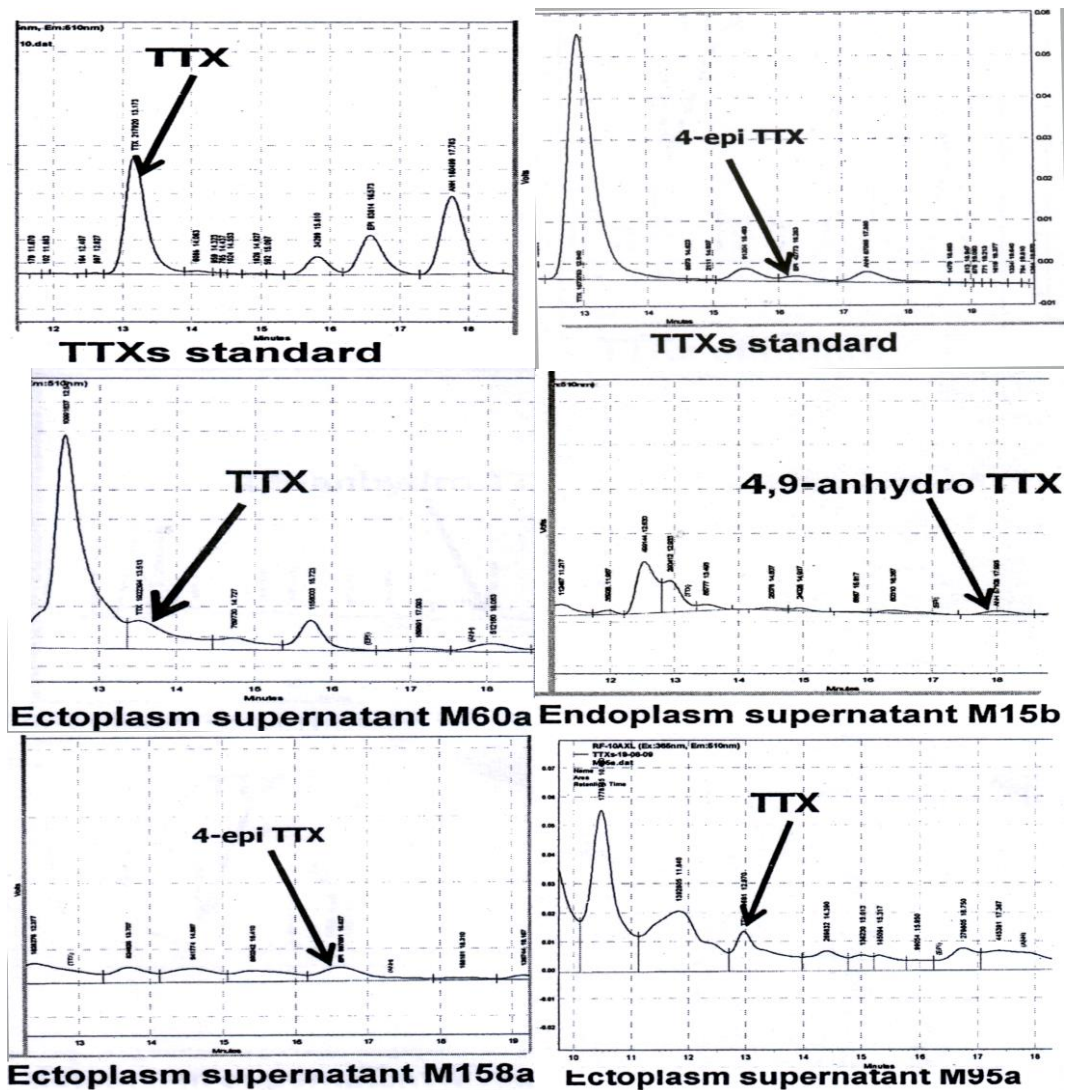
Định tính và định lượng TTX bằng HPLC - detector huỳnh quang (FLD), bước sóng kích thích 381 nm và bước sóng phát xạ 505 nm cho độ nhạy rất tốt với nồng độ định lượng trong huyết thanh và nước tiểu lần lượt là 5 ng/mL và 20 ng/mL [97].



Hình 1. 17. Sắc ký đồ HPLC-FLD định lượng TTX trong huyết tương [97]
 Chih-Yu Chen và cs. [38] định lượng TTX trong cá nóc *N. lineatai* sử dụng HPLC-FLD cho giới hạn phát hiện là 10 ng, khoảng tuyến tính rộng từ 10 – 2000 ng. (hình 1.19)



Hình 1. 18. Sắc ký đồ HPLC-FLD của TTXs và dịch chiết cá nóc *N. lineata* [38]
 Ở Việt Nam, một số tác giả cũng dùng HPLC-FLD để định lượng TTXs trong trứng và gan cá nóc cũng cho kết quả khả quan [7] (hình 1.19).



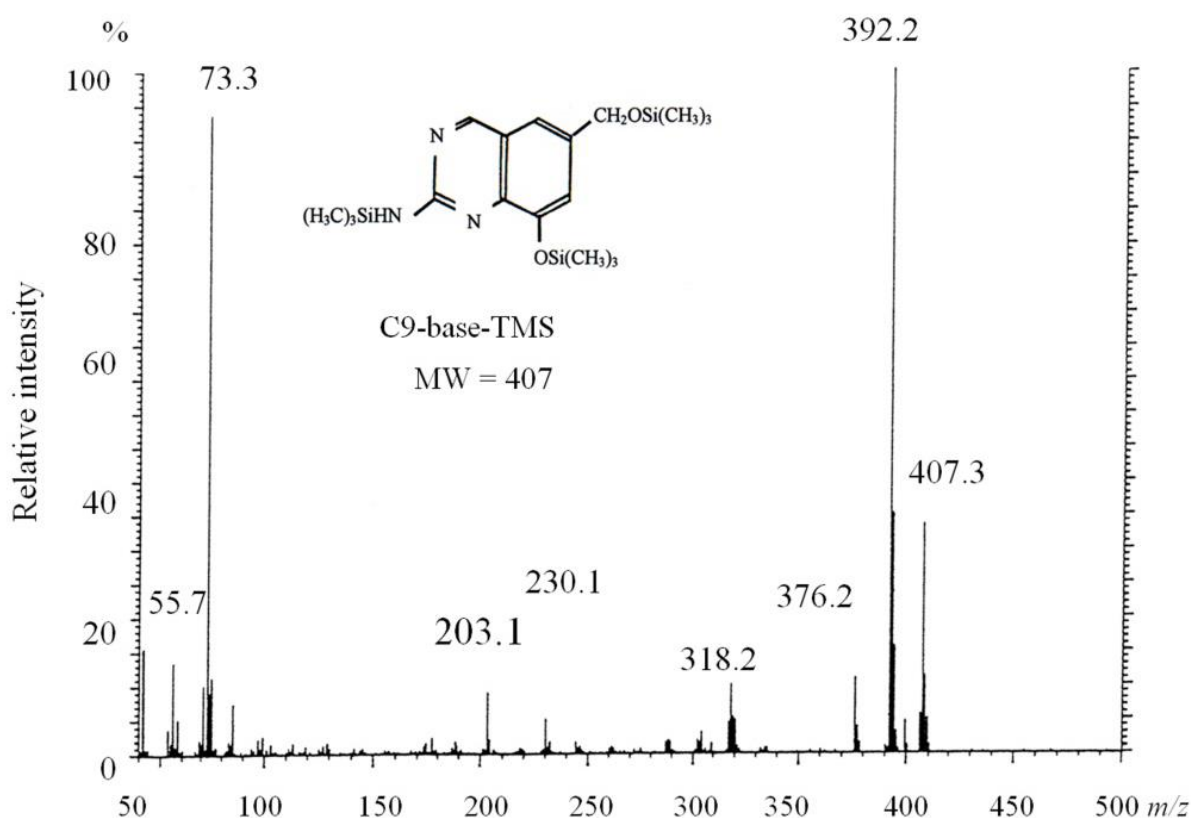
Hình 1. 19. Một số sắc ký đồ định lượng TTXs trong gan, trứng cá nóc bằng HPLC-FLD [7]

1.4.4. Phương pháp phổ khối

1.4.4.1. Phương pháp sắc ký khí khối phổ GS-MS

GC-MS là phương pháp gián tiếp để phân tích TTX và các dẫn chất [148], [178]: TTX và các dẫn chất được hòa tan trong 2 mL NaOH 3 M, đun nóng 30 phút. Sau khi để nguội ở nhiệt độ phòng, điều chỉnh pH về 4,0 bằng HCL IN và chạy qua cột chiết pha rắn Seppak C18. Sau khi rửa lần lượt bằng nước, MeOH 10%, rửa giải bằng MeOH 100%, thu dịch rửa giải, cô cạn ở chân không. Cặn thu được hòa với hỗn hợp N,O-bis acetamid - trimethylchlorosilan - pyridin (2- 1- 1) để tạo thành dạng C9 base - trimethylsilyl. Dẫn xuất này được chạy qua hệ thống sắc ký khí khối phổ với điều kiện sắc ký: cột (\varnothing 0.25 mm \times 250 cm), nhiệt độ cột từ 180 – 250°C với tốc độ gia nhiệt 5-8°C/phút, tốc độ khí heli 20mL/phút, thế ion hóa 70eV, nhiệt độ ion hóa 200°C. Phổ khối thu được các đỉnh đặc trưng $m/z = 407$ và 392 ứng với M^+ và $[M-CH_3]^+$ của dạng

C9 base – trimethylsilyl [31]. Các mảnh $m/z = 407$; 392 và 376 thể hiện khung *quinazolin* của *TTX* (hình 1.25).

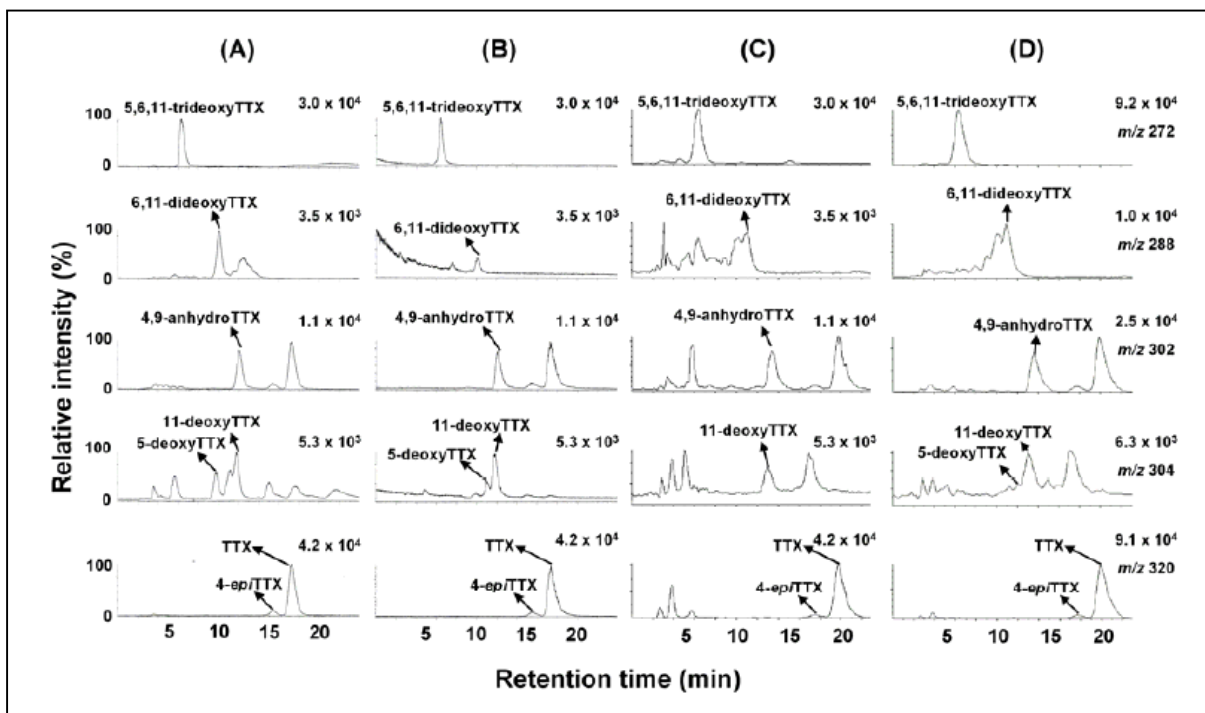


Hình 1. 20. Phổ khối của dẫn xuất *C9 base – trimethylsilyl* của độc tố từ sâu bọ *Cephalothrix sp.* thu được ở vịnh Hiroshima [31]

1.4.4.2. Phương pháp sắc ký lỏng khối phổ LC/MS

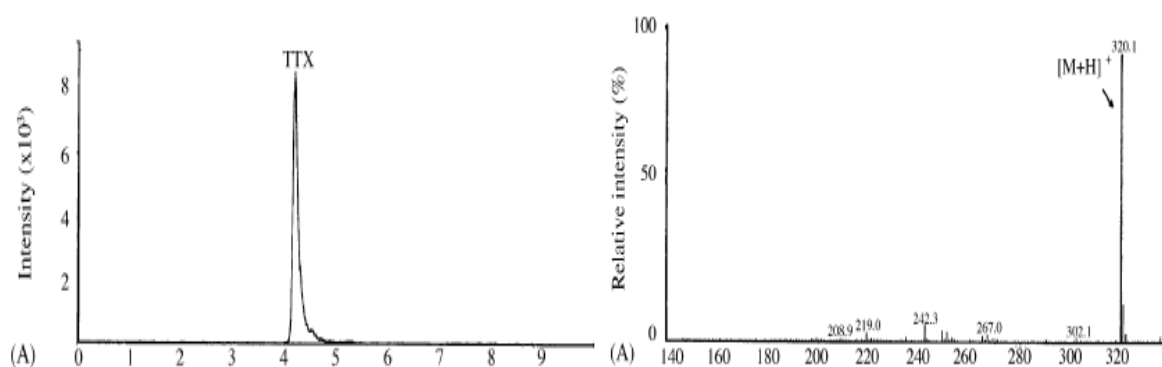
Đây là phương pháp hiện đại [22], [160], [164], có khả năng ứng dụng cao và đang dần trở nên phổ biến trong phân tích. Đối với HPLC-FLD, *TTX* và các dẫn chất có cường độ huỳnh quang khác nhau, như: cường độ huỳnh quang của *5-deoxyTTX* và *11-deoxyTTX* chỉ bằng 1/20 và 1/100 của *TTX*, trong khi *6-epiTTX* và *11-norTTX-6(R)-ol* có cường độ huỳnh quang cao gấp 20 lần và 10 lần so với *TTX* [146]. Điều này làm ảnh hưởng đến độ nhạy, giới hạn phát hiện *TTX* và các dẫn chất của phương pháp. LC-MS có thể giải quyết vấn đề này, nó làm tăng khả năng phát hiện *TTX* và các dẫn chất với độ chính xác, độ nhạy tốt hơn.

Jun-Ho Jang và cộng sự tại Đại học Tohoku, Nhật Bản [69] sử dụng phương pháp LC/MS để phân tích định tính và định lượng *TTX* và các dẫn chất deoxy của *TTX* từ loài cá nóc *F. niphobles* ở vùng biển nam Hàn Quốc và 2 loài cá nóc *T. nigroviridis* và *T. biocellatu* ở biển Đông Nam Á (hình 1.21)



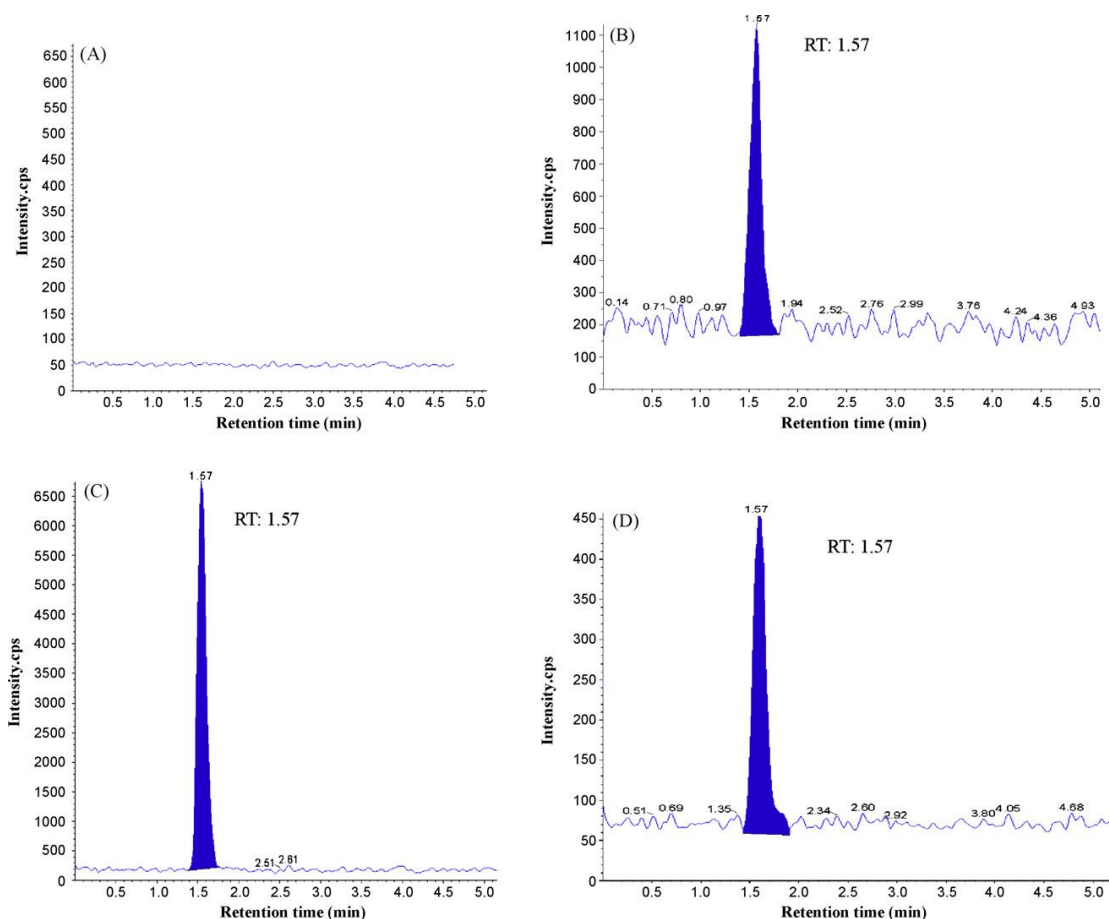
Hình 1. 21. Sắc ký đồ phân tích TTXs, mẫu chuẩn TTXs (A) và các mẫu thử *F. niphobles* (B), *T. nigroviridis* (C), *T. biocellatu* (D) [69]

Y.H. Tsai và cs. [155] sử dụng LC/MS với cột *Zorax 300SB-C3*, pha động là hỗn hợp 1% acetonitril, 10 mM trimethylamin, 10 mM amoniformat, tốc độ dòng 0,4 ml/phút để định lượng TTX trong nước tiểu và máu của bệnh nhân bị ngộ độc cá nóc. (hình 1.22)



Hình 1. 22. Sắc ký đồ và phổ ESI-MS của TTX [155]

Năm 2008, Hsiao-Chin Jen và cs. [70] sử dụng sắc ký lỏng khối phổ với cột *Cosmosil HILIC 150 x 4,6 mm*, pha động gradient acid formic 0,1 % và methanol để định lượng TTX trong huyết thanh người (hình 1.23).



Hình 1. 23. Sắc ký đồ định lượng TTX, (A): mẫu huyết thanh trắng, (B): mẫu huyết thanh + TTX 10ng/mlml, (C): cá nóc *N. clathrata*, (D): mẫu huyết thanh người. [70]

Năm 2014, Kudo và cs. [83] sử dụng LC-MS với cột TSK gel Amide-80 (2,0 x 150 mm; 5 μ m), pha động là hỗn hợp *acetonitrile* – *đệm ammoni format 16mM* (pH 4,5) với tỷ lệ 7- 3, tốc độ dòng 0,2 mL/phút, nhiệt độ cột 28°C để so sánh hàm lượng TTXs trong cá nóc *T. pardalis* với một số loài động vật biển ở vùng biển Nhật Bản (ốc *Nassarius glans*, bạch tuộc vòng lam *Hapalochlaena sp.*) và vùng biển Australia (bạch tuộc vòng lam *H. maculosa*.)

1.4.5. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR)

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân [21], [76] là một phương pháp phổ hiện đại và hữu hiệu nhất hiện nay được dùng để xác định cấu trúc hóa học các hợp chất hữu cơ nói chung và hợp chất thiên nhiên nói riêng. Với việc sử dụng kết hợp các kỹ thuật phổ NMR một chiều và hai chiều, người ta có thể xác định chính xác cấu trúc của hợp chất, kể cả cấu trúc lập thể của phân tử. Nguyên lý chung của các phương pháp phổ NMR (phổ proton và phổ cacbon) là sự cộng hưởng của các tần số khác nhau của các hạt nhân từ (^1H , ^{13}C) dưới tác dụng của từ trường. Các tần số cộng hưởng khác nhau này được biểu diễn bằng

độ dịch chuyển hóa học. Ngoài ra đặc trưng của phân tử còn được xác định dựa vào tương tác spin giữa các hạt nhân từ với nhau.

Phổ $^1\text{H-NMR}$: Trong phổ $^1\text{H-NMR}$, độ dịch chuyển hóa học (δ) của các proton được xác định trong thang từ 0-14 $\mu\text{g/ml}$ tùy thuộc vào mức độ lai hóa của nguyên tử cũng như đặc trưng riêng của từng phân tử. Mỗi loại proton cộng hưởng ở một trường khác nhau vì vậy chúng được biểu diễn bằng một độ dịch chuyển khác nhau. Dựa vào những đặc trưng của độ dịch chuyển hóa học cũng như tương tác spin giữa các hạt nhân từ với nhau mà người ta có thể xác định được cấu trúc hóa học của hợp chất.

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$: Phổ này cho tín hiệu vạch phổ của cacbon, mỗi nguyên tử cacbon sẽ cộng hưởng ở một trường khác nhau và cho một tín hiệu phổ khác nhau. Thang đo phổ $^{13}\text{C-NMR}$ cũng được tính bằng $\mu\text{g/ml}$ và với dải thang đo rộng hơn so với phổ proton (từ 0 đến 240 $\mu\text{g/ml}$).

Phổ DEPT: Phổ này cho những tín hiệu phổ phân loại các loại cacbon khác nhau. Trên phổ DEPT, tín hiệu của cacbon bậc 4 biến mất. Tín hiệu phổ của CH và CH_3 nằm về một phía và của CH_2 thì nằm về phía đối diện trên phổ DEPT 135° . Còn trên phổ DEPT 90° thì chỉ xuất hiện tín hiệu phổ của các CH.

Phổ 2D-NMR: Đây là các kỹ thuật phổ hai chiều, cho phép xác định các tương tác của các hạt nhân từ của phân tử trong không gian hai chiều. Một số kỹ thuật thường được dùng chủ yếu như sau:

Phổ HSQC: Các tương tác trực tiếp C-H được xác định nhờ vào các pic giao nhau trên phổ HSQC. Trên phổ này, một trục là phổ $^1\text{H-NMR}$ còn trục kia là $^{13}\text{C-NMR}$.

Phổ $^1\text{H-}^1\text{H COSY}$: Phổ này biểu diễn các tương tác H-H, chủ yếu của các proton đính với cacbon liền kề nhau. Chính nhờ phổ này mà các phần của phân tử được nối ghép lại với nhau.

Phổ HMBC: Đây là phổ biểu diễn các tương tác xa của C và H trong phân tử. Nhờ vào các tương tác trên phổ này mà từng phần của phân tử cũng như toàn bộ phân tử được xác định về cấu trúc.

Phổ NOESY: Phổ này biểu diễn các tương tác gần trong không gian của các proton không kể đến các liên kết mà chỉ tính đến khoảng cách nhất định trong không gian. Dựa vào kết quả phổ này, có thể xác định được cấu trúc không gian của phân tử.

Phổ ROESY: Phổ này xác định quan hệ không gian giữa các proton.

1.5. CHẤT CHUẨN VÀ THIẾT LẬP CHẤT CHUẨN

1.5.1. Chất chuẩn đối chiếu hóa học

Theo ĐĐVN IV [18], chất đối chiếu được định nghĩa là chất đồng nhất đã được xác định là đúng để dùng trong các phép thử đã được quy định về hoá học, vật lý và sinh học. Trong các phép thử đó, các tính chất của chất đối chiếu được so sánh với các tính chất của chất cần thử. Chất đối chiếu phải có độ tinh khiết phù hợp với mục đích sử dụng.

1.5.2. Phương pháp thiết lập chất chuẩn

1.5.2.1. Lựa chọn nguyên liệu

Để đáp ứng mục đích sử dụng trong các phép thử hoá học, vật lý hay vi sinh, yêu cầu nguyên liệu làm chất đối chiếu phải là một khối đồng nhất (không được lẫn tá dược hay chất bảo quản) được lựa chọn từ các lô nguyên liệu sản xuất thuốc có chất lượng tốt nhất và được cung cấp bởi các nhà sản xuất dược phẩm. Nguyên liệu *TTX* hiện nay là chất cấm mua bán trên thế giới, chưa được coi là thuốc hay dược phẩm, vì vậy khó có thể mua được. Do đó nguyên liệu này sẽ được cung cấp từ sản phẩm của luận án này.

1.5.2.2. Xây dựng quy trình phân tích

Các phương pháp hoá lý được sử dụng để đánh giá chất lượng nguyên liệu thiết lập chất đối chiếu, phải phản ánh được đúng tính chất của chất đó, có độ chính xác và độ lặp lại, gồm có các phương pháp sử dụng để định tính, định lượng, cũng như để đánh giá độ tinh khiết

1.5.2.3. Quy trình đóng gói, bảo quản

Quá trình sản xuất chất chuẩn [23], [24] được thực hiện theo quy trình thao tác chuẩn (SOP) và được kiểm soát nghiêm ngặt. Chất chuẩn đối chiếu hóa học được cân bằng cân phân tích có độ chính xác cao, được thực hiện trong buồng đóng chất chuẩn (*Glove-Box*) và được bảo quản trong tủ bảo quản chất chuẩn được kiểm soát môi trường (thường bảo quản từ 2 – 8°C). Tùy theo đặc tính, chất chuẩn đối chiếu hóa học thường đóng từ vài miligam đến vài trăm miligam/lọ. Chất chuẩn *TTX* có hoạt lực cao, có giá trị lớn, trên thế giới thường đóng 1mg/lọ và được bảo quản ở nhiệt độ rất thấp (-20°C). Các chất chuẩn thông thường định kỳ được đánh giá và bảo quản sử dụng dài lâu.

1.5.3. Đánh giá liên phòng thí nghiệm

Để đảm bảo kết quả đánh giá chất chuẩn được khách quan, chất chuẩn sau khi được thiết lập và đóng gói phải được đánh giá tối thiểu tại 2 phòng thí nghiệm khác nhau, đều đạt

yêu cầu là phòng thí nghiệm đạt tiêu chuẩn quốc tế *ISO IEC 17025* hoặc tiêu chuẩn thực hành tốt phòng thí nghiệm *GLP*, theo protocol phù hợp đã được phê duyệt.

1.5.4. Chất chuẩn *tetrodotoxin*

Để nghiên cứu về độc tính cá nóc cũng như ứng dụng *TTX* trong y học, cần thiết phải có chất chuẩn *TTX*. Trong những năm qua, ở Việt Nam có nhiều nghiên cứu về cá nóc cũng như về *TTX* nhưng vẫn chưa thiết lập được chất chuẩn *TTX* biết chính xác nồng độ.

Hiện nay ít có nhà cung cấp bán *TTX* tinh khiết và giá chất càng tinh khiết thì càng cao. Giá của *TTX* tinh khiết 99,8 % do một số công ty Nhật Bản cung cấp là 300 USD /1 mg. Một công ty ở Anh cũng báo giá *TTX* tinh khiết 98 % là 80 bảng Anh/1mg.

Ngoài ra việc mua *TTX* cũng rất khó và thủ tục rất phức tạp, thậm chí không mua được. Tuy nhiên có thể tận dụng phế phẩm của ngành thủy hải sản là gan và lòng cá nóc để chiết xuất và tinh chế lấy *TTX* sạch phục vụ cho nghiên cứu y học.

Bảng 1. 9. Một số hãng cung cấp chuẩn *TTX*

Tên hãng	Quy cách	Nguồn gốc	Độ tinh khiết	Đơn giá
Enzo (Mỹ)	Lọ	Tổng hợp	≥98% (TLC)	-
Abcam (Anh)	Lọ	Fugu	≥ 96% (HPLC)	148\$/1mg
Sigma-Aldrich (Mỹ)	1mg/lọ	-	-	-
eBioChem (Trung Quốc)	1mg/lọ	-	≥99% (HPLC)	156\$
Affix scientific (Mỹ)	1mg/lọ	-	≥98% (HPLC)	115\$
VWR (Mỹ)	1mg/lọ	-	≥98% (HPLC)	198\$

PRODUCT DATA SHEET

PRODUCT: Tetrodotoxin (TTX) CAS NO.: 4368-28-0
 CATALOG NO.: NA-120 LOT#: temp
 STRUCTURE:

PHYSICAL APPEARANCE: Clear film (vial may appear empty)
 MOLECULAR FORMULA: C₁₁H₁₆N₂O₈ MOLECULAR WEIGHT: 310.3
 PURITY: 98%(TLC)
 SOLUBILITY: Soluble in dilute acetic acid (e.g. 1mg/ml in 10 mM HOAc or 10 mg/ml in 0.1 M HOAc); May also be dissolved in citric acid/sodium citrate buffer, pH 4.8 (e.g. 1 mg/ml in 20 mM buffer)
 STORAGE: Store, as supplied, at -20°C for up to 1 year. Store solutions at -20°C for up to 3 months.

APPLICATION NOTES: **Highly Toxic!** Use with extreme care! Avoid strongly acidic or alkaline solutions. Potent, reversible inhibitor of the voltage dependent Na⁺ channel.^{1,2} In CHO cells transfected with cDNA encoding the Na⁺ channel α -subunit from rat brain, TTX completely blocked the voltage-activated Na⁺ current at 200nM.³

REFERENCES: 1. W.A. Catterall *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1980 20 15
 2. W.A. Catterall *Annu Rev Biochem* 1985 55 953
 3. W.A. Catterall *Science* 1983 222 25
 4. T. Schöberl et al. *Science* 1990 247 854

HIGHLY TOXIC! USE EXTREME CAUTION! MAY CAUSE DEATH! Avoid all forms of contact with this product by wearing appropriate protective clothing (gloves, mask, lab coat). The Material Safety Data Sheet (MSDS), is available on request. This product is for research use only.

www.enzofsciences.com

Home > Ion Channels > Sodium > Tetrodotoxin

Tetrodotoxin Na⁺ channel blocker

Other names: TTX
Product Code: Asc-054 **Purity:** >98%

Pack Size	Price	Availability	Quantity
1mg	£58	IN STOCK	ADD

Biological Description:
 Potent, selective and reversible, use-dependent inhibitor of voltage-dependent Na⁺ channels.

Key References:
 Kao (1972) *Pharmacology of tetrodotoxin and saxitoxin*, Fed.Proc. 31:1117
 Narahashi et al (1994) Recent advances in the study of mechanism of action of marine neurotoxins, *Neurotoxicol.* 15: 545
 Trigo et al (2007) Enhancement of Ca²⁺ release through endogenous activation of axonal GABA(A) receptors in juvenile cerebellum, *J Neurosci.* 27:12452-63.

Our products in action...
 Milstein et al. (2007) TARPs subtypes differentially and dose-dependently control synaptic AMPA receptor gating, *Neuron* 55: 905-18. doi:10.1016/j.neuron.2007.08.011
 Trigo et al. (2007) Enhancement of Ca²⁺ release through endogenous activation of axonal GABA(A) receptors in juvenile cerebellum, *J Neurosci.* 27:12452-63. doi:10.1016/j.neuron.2007.08.011

Chemical Information:
 Octahydro-12-(hydroxymethyl)-2-imino-5,9,7,10a-dimethano-10aH-[1,3]dioxo[6,5-d]pyrimidine-4,7,10,11,12-pentol

Desiccate at -20°C
 MW: 310.27
 Soluble in acidic buffer (pH 4.8)
 C₁₁H₁₆N₂O₈
 4368-28-9

Asc-054 APN09032-1-1 COA
 Asc-054 APN09032-1-1 MSDS

Additional Information:
 Country restrictions and/or license requirements may apply. Please contact customer services for further details.

Home > Ion Channels > Sodium > Tetrodotoxin

T8024 Tetrodotoxin

Price and Availability: **MSDS** | **MSDS** | **MSDS** | **MSDS**

Biological Description:
 Potent, selective and reversible, use-dependent inhibitor of voltage-dependent Na⁺ channels.

Our products in action...
 Milstein et al. (2007) TARPs subtypes differentially and dose-dependently control synaptic AMPA receptor gating, *Neuron* 55: 905-18. doi:10.1016/j.neuron.2007.08.011
 Trigo et al. (2007) Enhancement of Ca²⁺ release through endogenous activation of axonal GABA(A) receptors in juvenile cerebellum, *J Neurosci.* 27:12452-63. doi:10.1016/j.neuron.2007.08.011

Chemical Information:
 Octahydro-12-(hydroxymethyl)-2-imino-5,9,7,10a-dimethano-10aH-[1,3]dioxo[6,5-d]pyrimidine-4,7,10,11,12-pentol

Desiccate at -20°C
 MW: 310.27
 Soluble in acidic buffer (pH 4.8)
 C₁₁H₁₆N₂O₈
 4368-28-9

Asc-054 APN09032-1-1 COA
 Asc-054 APN09032-1-1 MSDS

Additional Information:
 Country restrictions and/or license requirements may apply. Please contact customer services for further details.

Home > Ion Channels > Sodium Channels > Voltage-gated Sodium (Na^v) Channels > Tetrodotoxin

Tetrodotoxin
 Cat. No. 9978

Biological Description:
 Potent, selective and reversible, use-dependent inhibitor of voltage-dependent Na⁺ channels.

Our products in action...
 Milstein et al. (2007) TARPs subtypes differentially and dose-dependently control synaptic AMPA receptor gating, *Neuron* 55: 905-18. doi:10.1016/j.neuron.2007.08.011
 Trigo et al. (2007) Enhancement of Ca²⁺ release through endogenous activation of axonal GABA(A) receptors in juvenile cerebellum, *J Neurosci.* 27:12452-63. doi:10.1016/j.neuron.2007.08.011

Chemical Information:
 Octahydro-12-(hydroxymethyl)-2-imino-5,9,7,10a-dimethano-10aH-[1,3]dioxo[6,5-d]pyrimidine-4,7,10,11,12-pentol

Desiccate at -20°C
 MW: 310.27
 Soluble in acidic buffer (pH 4.8)
 C₁₁H₁₆N₂O₈
 4368-28-9

Asc-054 APN09032-1-1 COA
 Asc-054 APN09032-1-1 MSDS

Additional Information:
 Country restrictions and/or license requirements may apply. Please contact customer services for further details.

Hình 1. 24. TTX tinh khiết cung cấp bởi một số hãng: (a) Enzo – Mỹ; (b) Ascent Scientific – UK; (c) Sigma-Aldrich – Mỹ; (d) Tocris Biosciences – Mỹ.

CHƯƠNG II. ĐỐI TƯỢNG, NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

Một số loài cá nóc độc thu mẫu vào các tháng 2, 3, 7 và 8 các năm 2011, 2012 và 2013 tại vùng biển tỉnh Khánh Hòa và Vũng Tàu, Việt Nam, được định danh làm tiêu bản và lấy phần nội tạng (trứng, gan, ruột) làm mẫu nghiên cứu. Mẫu được bảo quản ở nhiệt độ dưới -10°C , tại Khoa Nghiên cứu Phát triển, Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương.

2.2. PHƯƠNG TIỆN NGHIÊN CỨU

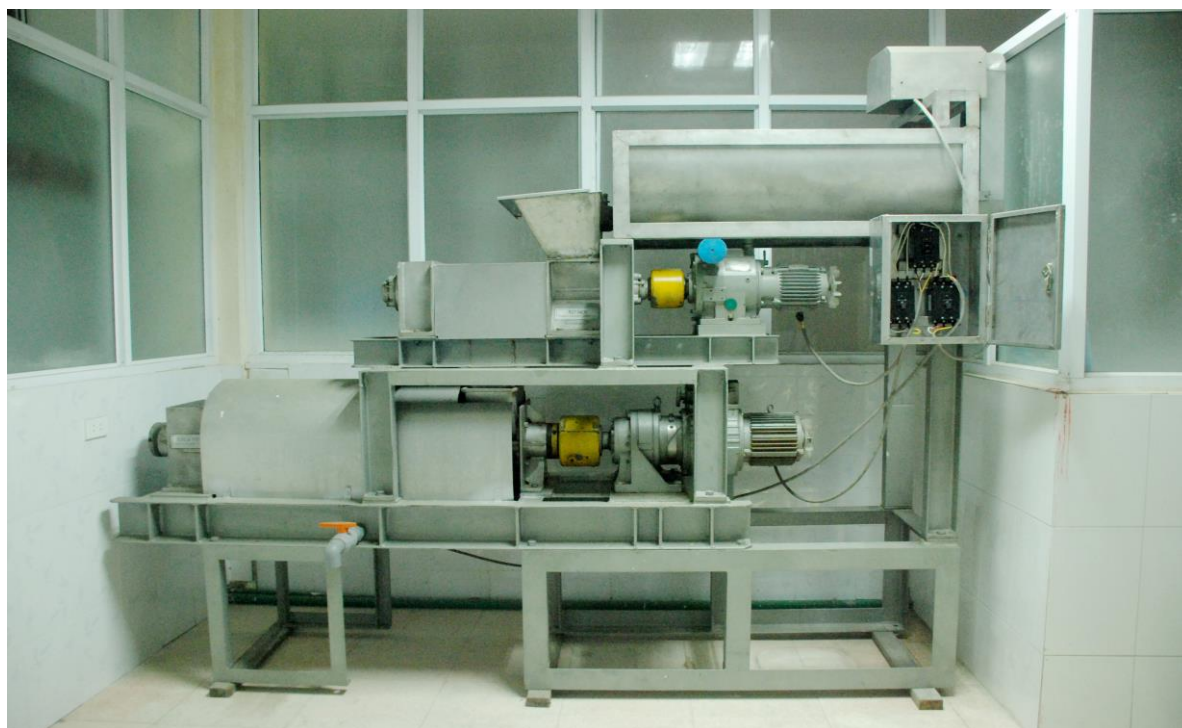
2.2.1. Hóa chất thuốc thử

- *Chất chuẩn Tetrodotoxin* 1 mg/lọ (Sigma Aldrich, 1mg Tetrodotoxin và 5 mg đệm citrat pH 4,8/lọ, hàm lượng: 99,0 %, Lot. N^o: 038K1804. Khi thêm 1 ml nước sẽ có dung dịch Tetrodotoxin trong đệm pH 4,8 nồng độ 1mg/ml);
- *Nước khử ion, ethanol; acid acetic khan, acid acetic loãng (1%, 3%, 5%, 10%, tt/tt), dung dịch acid acetic 0,2% (tt/tt) trong ethanol; amoniac đậm đặc (13,5M), amoniac 10% (tt/tt); natri hydroxyd, natri hydroxyd loãng (0,1 M; 1 M), pyridin, n-butanol, dung dịch đệm acetat (dung dịch trong nước cất chứa 15 mM amoni acetat và 15 mM acid acetic), dung dịch đệm phosphat pH 7 (0,5 g kali dihydrophosphat (TT) và 1,1 g dikali hydrophosphat (TT) trong 900 ml nước. Điều chỉnh pH tới 7,0 bằng dung dịch acid phosphoric 1 M (TT) hoặc dung dịch natri hydroxyd 1 M (TT) và thêm nước vừa đủ 1000 ml), dung dịch đệm citrat 100 mM điều chỉnh pH = 4,8; dung dịch acid sulfuric loãng 2%; dung dịch acid citric 2%; methanol dùng cho HPLC, natri heptansulfonat, nước cất siêu tinh khiết;*
- *Than hoạt tính, nhựa trao đổi cation Amberlit IRC-60*

2.2.2. Thiết bị, dụng cụ

- Lò vi sóng, máy khuấy trộn siêu tốc, máy đo pH (Metler Toledo), cân phân tích, cân phân tích Mettler MS105 có độ nhạy 0,01 mg
- Micro pipette Eppendoff 100 μL – 1000 μL ;
- Bản mỏng silica gel GF₂₄₅ – Merck
- Dụng cụ thủy tinh các loại (ống đong, cốc có mỏ, bình định mức...)
- Cột trao đổi cation *Bio-Gel-P2* và *Bio-Rex 70* (Bio Rad), cột thủy tinh dùng cho sắc ký cột với các kích thước khác nhau (20 cm x 10 cm, 50 cm x 10 cm, 50 cm x 4 cm, 60 x 3 cm)

- Cột chiết SPE: Cột C18 (Accubond 500mg, 3mL); cột trao đổi ion Strata SCX (500mg, 3mL); Cột Evidex (200mg, 3mL)
- Hệ thống cô quay áp suất giảm Buchi.
- Thiết bị cộng hưởng từ hạt nhân (NMR, Bruker Advance, 500MHz), dung môi $\text{CF}_3\text{COOD} - \text{D}_2\text{O}$ (1:99, v/v) và $\text{CF}_3\text{COOD} - \text{D}_2\text{O}$ (4:96, v/v) làm dung môi;
- Thiết bị sắc ký lỏng khối phổ phân giải cao (LC – FT ICR MS, Varian 900 MS);
- Máy sắc ký lỏng khối phổ (LC – MS/MS) Thermo Finnigan LCQ Advantage Max, detector PDA và MS/MS
- Máy sắc ký lỏng khối phổ LC ESI Orbitrap (Thermo LTQ Orbitrap XL);
- Máy sắc ký lỏng khối phổ (LC-MS, Thermo Finnigan TSQ Quantum);
- Thiết bị sắc ký lỏng bán điều chế Agilent 1060 (Agilent Technologies), detector UV.
- Thiết bị xay ngâm chiết (có thể xay 20 kg/mẻ) do Viện Kiểm nghiệm thuốc TW đặt hàng chế tạo gồm có: (1) thùng chứa với cánh khuấy, (2) phần xay thô và (3) phần xay mịn dựa trên nguyên tắc trục nghiền với hệ thống lưới lọc, van khóa. Toàn bộ hệ thống được đặt trong khu vực đảm bảo an toàn.



Hình 2. 1. Thiết bị xay ngâm chiết, Viện Kiểm nghiệm thuốc TW

- Máy sinh khí ni tơ



Máy sắc ký lỏng khối phổ (LC – MS/MS) Thermo Finigan LCQ Advantage Max, detector PDA và MS/MS, V.KNT.TU



Máy sắc ký lỏng khối phổ (LC – MS/MS) Thermo Finigan TSQ Quantum, V.KNT.TU



Máy sắc ký lỏng khối phổ LC ESI Orbitrap (Thermo LTQ Orbitrap XL), Phòng NC Trọng điểm hóa học, ĐHQG HN



Thiết bị cộng hưởng từ hạt nhân Bruker Avance AM500FT- NMR BioSpin NMR, Viện Hóa học, V.KH&CN VN



Sắc ký lỏng điều chế, Agilent 1060 (Agilent Technologies), detector UV



Thiết bị đông khô Modulyod (Thermo), Viện Hóa học, Viện Hàn lâm KHCN VN

Hình 2. 2. Một số thiết bị sử dụng trong nghiên cứu

2.2.3. Động vật thí nghiệm

- Chuột nhắt trắng chủng Swiss, cả hai giống, cân nặng từ 18 – 22 g, khỏe mạnh do Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương cung cấp. Động vật được nuôi dưỡng theo chế độ tiêu chuẩn tại phòng thí nghiệm ít nhất trong 5 ngày trước khi thực hiện các nghiên cứu, được nuôi

bằng thức ăn tiêu chuẩn do Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương cung cấp, uống nước tự do. Tất cả động vật thí nghiệm được để ổn định trước khi tiến hành thử nghiệm và theo dõi cân nặng khi tiến hành thử nghiệm.

- Thỏ trắng thuần chủng, cả hai giống, khỏe mạnh, cân nặng từ 2 đến 2,5 kg do Trung tâm Động vật thí nghiệm G1 của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương cung cấp. Thỏ được chia ngẫu nhiên thành 3 nhóm thử nghiệm (1 nhóm chứng và 2 nhóm uống thuốc), mỗi nhóm 7 con. Động vật được nuôi dưỡng theo chế độ tiêu chuẩn tại phòng thí nghiệm ít nhất trong 7 ngày trước khi thực hiện các nghiên cứu, được nuôi bằng thức ăn tiêu chuẩn do Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương cung cấp, uống nước tự do. Động vật khác giống được nuôi riêng.

2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.3.1. Thu mẫu, định danh, xử lý mẫu, bảo quản, vận chuyển cá nóc từ nơi thu mẫu đến phòng thí nghiệm

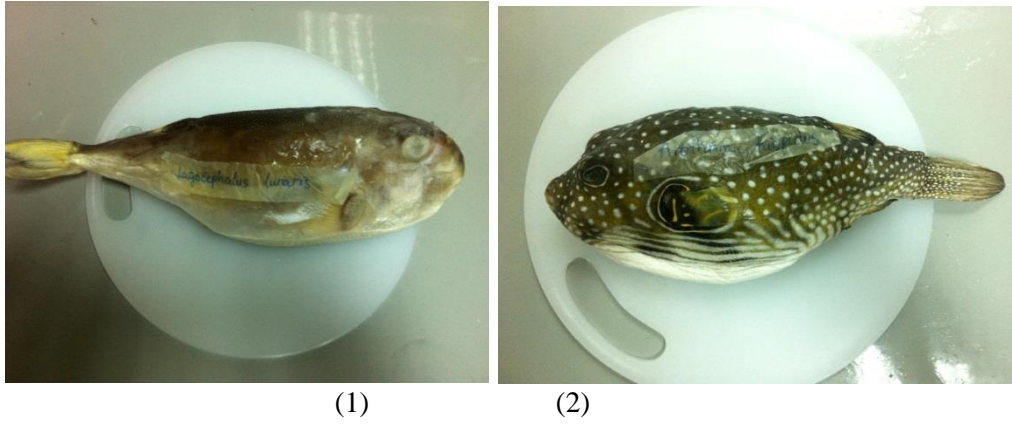
Thu mẫu

Mười loài cá nóc độc được định hướng, kết hợp với Viện Hải dương học Nha Trang (Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam), và thu mẫu ở vùng biển Nha Trang, tỉnh Khánh Hòa, được định danh và làm tiêu bản, gồm có: (1) *Arothron hispidus* (cá nóc chuột vân bụng), (2) *Arothron immaculatus* (cá nóc viền đuôi đen), (3) *Arothron stellatus* (cá nóc chuột chấm sao), (4) *Lagocephalus inermis* (cá nóc răng mỏ chim), (5) *Lagocephalus lunaris* (cá nóc tro), (6) *Lagocephalus sceleratus* (cá nóc thu), (7) *Lagocephalus spadiceus* (cá nóc vàng), (8) *Takifugu oblongus* (cá nóc vằn), (9) *Torquigener brevipinnis* (cá nóc vằn mắt), (10) *Torquigener gloerfelti* (cá nóc chấm cam). Các loài này đều phân bố ở khu vực biển từ tỉnh Khánh Hòa đến tỉnh Bà Rịa - Vũng Tàu.

Phân loại cá nóc

Họ và họ phụ các nóc được phân loại và được định danh đến loài tại Viện Hải dương học Nha Trang.

Bảo quản mẫu và làm tiêu bản



Hình 2. 3. Hai loài (1) Cá nóc vàng (*L. lunaris*) và (2) cá nóc chuột vân bụng (*A. hispidus*)



Hình 2. 4. Phủ tạng cá nóc được mổ lấy ra để đem đi xử lí

10 mẫu cá sau khi định danh một phần được loại bỏ phủ tạng, ngâm trong dung dịch *formol*, đựng trong bình thủy tinh, nắp kín, ghi đủ thông tin ngày thu, nơi thu mẫu, loài, họ; phần còn lại (mỗi loài ít nhất 2 cá thể) được để nguyên con, bảo quản trong tủ cấp đông (-10°C) để phục vụ các nghiên cứu định hướng độc chất.

Một số lượng lớn cá được lấy riêng phủ tạng, phần còn lại tiêu hủy. Phủ tạng cá (khoảng 200 kg) được cấp đông chuyển về phòng thí nghiệm, tiếp tục được bảo quản trong tủ cấp đông (-10°C) trong suốt quá trình nghiên cứu. Phủ tạng cá nóc được sử dụng làm nguyên liệu chiết xuất và tinh chế *TTX* làm chất đối chiếu.

2.3.2. Nghiên cứu phát hiện, định tính, định lượng tetrodotoxin

2.3.2.1. Xác định nhanh độ độc của phũ tạng các loài cá nóc

Để xác định nhanh độ độc của phũ tạng một số loài cá nóc, sử dụng phương pháp sinh hoá chuột.

Đơn vị chuột (MU) được qui định như là lượng TTX gây chết cho chuột có trọng lượng 18 – 20 g trong vòng 30 phút với liều độc tối thiểu.

Chuột thử nghiệm được lựa chọn là chuột khỏe mạnh, cùng loài, cùng giới tính, cùng trọng lượng, cùng điều kiện và chế độ nuôi.

Xử lý mẫu:

- Mẫu nội tạng cá nóc được cắt nhỏ, đồng nhất, cho vào cốc có mở
- Thêm dung dịch acid acetic 0,02%, đun nóng đến 90 °C trong 10 phút.
- Dịch chiết đem ly tâm ở 11.000 vòng/phút trong 10 phút.
- Dịch trong thu được đem đi tiêm phúc mạc chuột.
- Nồng độ độc tố TTX được tiêm lần đầu là 1 mg mẫu TTX thô đã chiết/1ml acid acetic 0,02%. Tùy theo độc tính, liều tiêm sẽ được pha loãng thế nào cho thời gian chết của chuột thử nghiệm trong vòng 30 phút.
- Song song, tiêm 1 ml acid acetic 0,02% vào phúc mạc của 3 con chuột để đối chứng. Kết quả sẽ không được chấp nhận nếu 2/3 số chuột đối chứng bị chết.

Độc tính của cá nóc được chia thành 4 mức [125], dựa trên liều gây tử vong của TTX trên người (khoảng 10.000MU)

Bảng 2. 1. Bảng chia mức độ độc của cá nóc theo phương pháp sinh hoá chuột [125]

Mức độ độc	Độc tính (MU/g)
Độc rất mạnh	≥ 1000 MU/g
Độc mạnh	100 – 999 MU/g
Độc nhẹ	10 – 99 MU/g
Không độc	dưới 10 MU/g

2.3.2.2. Định tính, định lượng tetrodotoxin

a. Pha dãy dung dịch chuẩn từ lọ chuẩn 1mg/lọ

Pha dung dịch chuẩn gốc 100 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ (C0): Thêm 1,0 ml nước vào lọ chuẩn 1mg TTX/lọ; Dùng micropipette với đầu cole 0,5 ml hút toàn bộ dung dịch chuẩn này vào bình định mức 5,0 ml, tráng lọ chuẩn và chuyển vào bình định mức nhiều lần bằng nước, và thêm nước vừa đủ 5,0 ml thu được dung dịch chuẩn gốc C0. Bảo quản dung dịch chuẩn gốc ở nhiệt độ $\leq 4^{\circ}\text{C}$. Từ dung dịch chuẩn gốc C0, pha dãy các dung dịch chuẩn 10,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 5,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 1,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ và 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ trong pha động, trong quá trình

thực nghiệm, các dung dịch chuẩn này được bảo quản trong tủ lạnh nhiệt độ $\leq 4^{\circ}\text{C}$. Cách pha dãy dung dịch chuẩn được ghi trong *bảng 2.2*

Bảng 2. 2. Cách pha dãy các dung dịch chuẩn

Tóm tắt cách pha	C1	C2	C3	C4	C5	C6
<i>Dung dịch chuẩn trung gian</i>	C0	C0	C1	C1	C1	C1
<i>Số ml chuẩn trung gian</i>	0,5	0,25	1,25	0,5	0,25	0,05
<i>V bình định mức (ml)</i>	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
<i>Nồng độ thu được ($\mu\text{g/ml}$)</i>	10	5	2,5	1,0	0,5	0,1

b. Mẫu thử là mẫu phủ tạng cá nóc

Xử lý mẫu

- Mẫu thử:

- (a). Cắt nhỏ khoảng 5g phủ tạng (trứng, gan, ruột) cá nóc, cho vào cốc có mỏ 50mL.
- (b). Chiết TTX bằng *acid acetic 2%* trong *MeOH*.
- (c). Cô dịch chiết tới cạn, hoà lại trong khoảng 2 ml dung dịch *acid acetic 0,5%* thu được dịch A1
- (d). Khảo sát một số cột chiết pha rắn (SPE) như cột C18, cột Evidex, cột trao đổi ion SCX, ... để làm sạch, làm giàu mẫu.

- Mẫu trắng: phủ tạng cá thu, tiến hành làm tương tự, song song với mẫu thử

- Mẫu spike: phủ tạng cá thu đã được thêm 1 lượng chuẩn TTX, tiến hành tương tự, song song với mẫu thử.

Làm sạch và làm giàu mẫu bằng chiết pha rắn (Solide Phase Extraction, SPE)

Khảo sát loại cột chiết SPE

- Cột C18

- (a) Dịch A1 được trung hòa về $\text{pH} = 7$ bằng *KOH 10%* trước khi chạy qua cột.
- (b) Hoạt hoá cột với 3 ml *MeOH* và 3 ml nước cất
- (c) Chạy mẫu qua cột
- (d) Rửa cột bằng 2 x 2 ml nước cất
- (e) Gộp dịch qua cột và dịch sau rửa giải thu được dịch A1.1

- Cột Evidex

- (a) Hoạt hoá cột với 3 ml *MeOH* và 3 ml nước cất
- (b) Chạy mẫu qua cột
- (c) Rửa cột bằng 2 x 2 ml nước cất
- (d) Thôi khô cột, rửa giải bằng 3 ml dung dịch *acid acetic* trong *MeOH*
- (e) Gộp dịch sau rửa giải thu được dịch A1.2

- Cột SCX

- (a) Hoạt hoá cột với 3 ml MeOH, 3 ml nước cất và 3 ml dung dịch *acid acetic* 0,1%.
- (b) Chạy mẫu qua cột.
- (c) Rửa cột bằng 3ml dung dịch *acid acetic* 0,1% - 3 ml *methanol* – 3 ml nước cất
- (d) Thổi khô cột, rửa giải bằng 3 ml dung dịch đệm *phosphate*.
- (e) Gộp dịch sau rửa giải thu được dịch A1.3

c. Mẫu thử là mẫu TTX thô chiết được, mẫu nguyên liệu TTX

- *Mẫu thử*: Cân chính xác khoảng 2,50 mg nguyên liệu TTX cho vào bình định mức 10,0 ml, thêm khoảng 7 ml *dung môi pha mẫu* (hỗn hợp 20% đệm acetat và 80% MeOH), lắc kỹ trong 10 phút, thêm dung môi vừa đủ đến vạch, lắc đều. Hút 1,0 ml dung dịch này vào bình định mức 10,0 ml, pha loãng vừa đủ với pha động, lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,45 µm, thu được *dung dịch thử A*. Từ dung dịch này, sử dụng micropipette pha loãng đến khoảng nồng độ định lượng.

- *Mẫu trắng*: dung môi pha mẫu

- *Mẫu thử thêm chuẩn*: sử dụng một lượng mẫu thử, thêm chính xác một lượng mẫu chuẩn đã biết để tạo thành mẫu đánh giá độ thu hồi của phương pháp định lượng.

d. Định tính TTX bằng TLC

- *Hoạt hóa bản mỏng*: Hoạt hóa bản mỏng silica gel 60 GF₂₅₄ trắng sẵn ở 110°C trong 30 phút

- *Dung dịch đối chiếu*: Dung dịch TTX trong dung dịch acid acetic 5% (tt/tt) có nồng độ khoảng 50 µg/ml.

- *Pha động*: Khảo sát 2 pha động

+ Pha động A: Hỗn hợp *n-butanol*, *acid acetic khan* và nước (2:1:1)

+ Pha động B: Hỗn hợp *pyridin*, *ethyl acetate*, *acid acetic* và nước (15:5:3:6)

- *Thuốc thử hiện màu*: Khảo sát thuốc thử hiện màu là các dung dịch KOH 10% - 30%, dung dịch NaOH 10% - 30%, sấy ở 90 - 110°C trong khoảng thời gian 30 phút, soi huỳnh quang ở bước sóng 365nm

- *Cách thử*: Chấm riêng biệt lên bản mỏng 10 µl mỗi dung dịch, làm khô các vết chấm bằng luồng không khí mát. Triển khai cho đến khi dung môi đi được khoảng 10 cm. Lấy bản mỏng ra, làm khô bằng luồng không khí mát. Phun thuốc thử hiện màu, soi huỳnh quang ở bước sóng 365nm.

- Yêu cầu: sắc ký đồ dung dịch thử phải cho vết huỳnh quang có R_f tương ứng với vết huỳnh quang trên sắc ký đồ dung dịch chuẩn.

e. Định tính và định lượng bằng LC/MS

Định tính trên thiết bị phổ khối hiện đại: ESI MS Iontrap, thiết bị ESI MS Orbitrap, và thiết bị FT ICR MS

- Tiến hành tiêm trực tiếp dịch thu được từ chiết pha rắn vào detector khối phổ, lựa chọn chế độ quét toàn thang để xác định mảnh mẹ đặc trưng $m/z = 320$, lựa chọn chế độ SRM để xác định các mảnh con đặc trưng phân mảnh từ mảnh mẹ $m/z = 320$ với các chế độ bắn phá (collision energy) khác nhau

Định tính và định lượng trên thiết bị khối phổ kiểu 3 tứ cực nối tiếp (triple quadrupoles)

Khảo sát để tìm điều kiện sắc ký để định tính, định lượng TTX như

- Cột sắc ký: cột C3, C8
- Pha động: thay đổi tỷ lệ pha động để lựa chọn tỷ lệ phù hợp
- Tốc độ dòng: điều chỉnh tốc độ dòng để thời gian lưu phù hợp, đảm bảo mức áp suất qua cột.
- Điều kiện khối phổ cho chương trình sắc ký LC-MS định lượng TTX: (Nguồn ion hóa (+ESI), khí thổi Sheath Gas (SG), khí hỗ trợ Auxiliary Gas (AG), nhiệt độ hóa hơi, nhiệt độ mao quản, thế ion hóa) để tín hiệu thu được tốt, đảm bảo độ nhạy, độ ổn định trong quá trình định lượng

Đánh giá phương pháp

Đánh giá, thẩm định phương pháp phân tích dựa trên các tiêu chí:

- Độ đặc hiệu
- Độ thích hợp hệ thống
- Độ tuyến tính
- Độ lặp lại
- Độ đúng
- Giới hạn phát hiện LOD và giới hạn định lượng LOQ.

Xử lý số liệu

Các đặc trưng thống kê được tính dựa vào các công thức hoặc dựa vào các hàm số trong *Microsoft Excel*.

Phương trình hồi qui tuyến tính bậc nhất thể hiện quan hệ giữa diện tích pic sắc ký và nồng độ chất phân tích: $Y = ax + b$

Trong đó:

+ Hệ số góc a được tính dựa vào hàm **Slope** trong Microsoft Excel.

+ Hệ số b được tính dựa vào hàm **Intercept** trong Microsoft Excel.

+ Hệ số tương quan r được tính dựa vào hàm **Correl** trong Microsoft Excel.

Tính toán kết quả định lượng

Tiến hành tiêm lần lượt dung dịch trắng, chuẩn, thử, ghi lại sắc ký đồ, diện tích pic, thời gian lưu của dung dịch chuẩn, thử

Công thức:

Lượng TTX được tính theo công thức

$$X_{\mu g/g} = \frac{S_t}{S_c} \times C_c \times \frac{V_t}{m_t} \times \frac{1}{h}$$

Trong đó:

S_c, S_t : Diện tích pic trong sắc ký đồ cho bởi dung dịch chuẩn, thử

C_c : Nồng độ dung dịch chuẩn ($\mu\text{g/mL}$)

V_t : Thể tích pha mẫu thử (mL)

m_t : Khối lượng mẫu thử (g)

h : Hiệu suất chiết qua cột SPE (với những mẫu không chiết qua cột SPE như mẫu TTX thô, mẫu nguyên liệu TTX để thiết lập chuẩn thì cho giá trị $h = 1$)

2.3.3. Nghiên cứu thành phần hóa học, phân lập tetrodotoxin và dẫn chất từ một số loài cá nóc

2.3.3.1. Phát hiện tetrodotoxin và các chất tương tự từ một số loài cá nóc độc

Sử dụng các phương pháp định tính, định lượng để phát hiện tetrodotoxin và các dẫn chất từ một số loài cá nóc độc. Từ đó lựa chọn 5 loài cá nóc độc, chiết xuất phân đoạn nhóm chất độc, phân lập các nhóm chất từ các phân đoạn, xác định độc tính và cấu trúc hóa học, đánh giá liên quan độc tính giữa các bộ phận khác nhau của cá và thành phần hóa học, trong đó có hàm lượng TTX.

2.3.3.2. Phân lập tetrodotoxin và dẫn chất từ một số loài cá nóc

Phân lập tetrodotoxin và một số độc tố thần kinh từ phủ tạng cá nóc của một số loài cá nóc độc, xác định cấu trúc của chúng.

a. Chiết xuất, phân lập

- Phũ tạng cá nóc (trứng, gan, ruột, ...) được rửa đông trong lò vi sóng, cắt nhỏ, cho khoảng 0,5 kg cho vào các cốc có mở
- Ngâm chiết bằng dung dịch acid acetic loãng, loại tạp, loại lipid bằng *dichloro methan*.
- Làm giàu nhóm chất *TTX* qua cột than hoạt, định tính bằng sắc ký lỏng khối phổ
- Phân lập *TTX* và các dẫn chất qua cột trao đổi cation *Bio-Gel P2*, *Bio-Rex 70* và cột sắc ký gel (Sephadex LH20), định tính bằng sắc ký lỏng khối phổ
- Phân tích xác định cấu trúc: Các phân đoạn được bay hơi dung môi tới cạn và được phân tích định danh bằng phổ khối, phổ khối phân giải cao và phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT, HMBC, COSY).

b. Xây dựng bộ dữ liệu phổ của các chất phân lập được, xác định cấu trúc

Các chất sau khi phân lập được, xác định cấu trúc bằng cộng hưởng từ hạt nhân (NMR, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT, HMBC, COSY): (NMR, Bruker Advance, 500MHz), dung môi $\text{CF}_3\text{COOD} - \text{D}_2\text{O}$ (1:99, v/v) và $\text{CF}_3\text{COOD} - \text{D}_2\text{O}$ (4:96, v/v) và phổ khối phân giải cao HR FTICR MS

2.3.4. Chiết xuất và tinh chế *tetrodotoxin* làm nguyên liệu thiết lập chất chuẩn

2.3.4.1. Chiết và làm giàu mẫu (dịch chiết toàn phần có chứa *TTX*)

- Phũ tạng cá nóc (trứng, gan, ruột, ...) được rửa đông trong lò vi sóng, cắt nhỏ, cho khoảng 10 kg vào thiết bị xay ngâm chiết.
- Ngâm chiết bằng dung dịch acid acetic loãng, loại tạp lipid, protein hoà tan bằng nhiệt độ
- Phân lập *TTX* sử dụng cột trao đổi cation acid yếu (nhựa *Amberlit IRC-60*), cột nhồi hỗn hợp than hoạt và đất tảo cát diatomis (*silica diatomaceous*) để loại muối vô cơ muối acid amin kiềm. Định tính bằng phương pháp sắc ký lỏng khối phổ.

2.3.4.2. Tinh chế bằng kết tinh cho sản phẩm *TTX* thô.

- Tinh chế bằng phương pháp kết tinh dung môi trong môi trường nước, pH kiềm.
- Định lượng *TTX* thô bằng phương pháp LC/MS. Yêu cầu *TTX* thô chiết xuất qua giai đoạn này phải có hàm lượng $\geq 80\%$. Định tính, định lượng bằng phương pháp sắc ký lỏng khối phổ.

Nếu sản phẩm không đạt hàm lượng theo yêu cầu, cần phải tiến hành sơ tinh chế, kết tinh lại

2.3.4.3. Tinh chế TTX thô bằng sắc ký điều chế để thu được TTX có độ tinh khiết cao

- Hoà TTX thô trong dung dịch acid acetic loãng
- Tinh chế bằng sắc ký điều chế, sử dụng cột sắc ký bán điều chế ODS (HIQ Sil, 250 x 21,2 mm, 5µm hoặc 10 µm); detector UV bước sóng 201 nm
- Gộp các phân đoạn, cô quay dưới áp suất giảm
- Kết tinh TTX trong môi trường kiềm, rửa tủa bằng nước khử ion
- Sấy dưới áp suất giảm, thu được TTX tinh khiết.
- Định tính, định lượng bằng phương pháp sắc ký lỏng khối phổ.

2.3.5. Thiết lập chất chuẩn tetrodotoxin

2.3.5.1. Nghiên cứu độ ổn định của tetrodotoxin trong một số dung môi

Khảo sát khoảng 5 dung môi (methanol, đệm citrat pH 4-5, dung dịch acid acetic loãng 2%, đệm phosphat pH 4-5, đệm acetat pH 4-5), theo dõi, phân tích đánh giá chất lượng hàng tháng hoặc định kỳ mỗi 3 tháng

TTX được hoà tan riêng biệt trong các dung dịch đệm với hàm lượng 0,1 mg/ml: cân chính xác x mg TTX vào bình định mức 25,0 ml, thêm dung môi hòa tan và pha loãng vừa đủ tới vạch. x được tính theo công thức sau:

$$x = 2,5 \times 100 / P$$

trong đó: P là hàm lượng (%) của $C_{11}H_{17}N_3O_8$ trong nguyên liệu tetrodotoxin.

Dùng burret chia vạch đóng dung dịch vào lọ thủy tinh màu nâu dung tích 2 ml, lượng đóng chính xác 1,0 ml/ống.

Điều kiện nghiên cứu độ ổn định: nhiệt độ - 20°C ± 2°C trong tủ đông.

Định kỳ đánh giá chất lượng: Lấy mẫu đánh giá tại các thời điểm 0, 3, 6 tháng.

Đánh giá chất lượng dựa trên các chỉ tiêu như:

- Cảm quan: Dung dịch trong suốt không màu
- Định tính: Thể hiện đúng phép thử định tính của TTX
- Định lượng: Hàm lượng tetrodotoxin trong mỗi ống phải đạt từ 99,5% đến 100,5 % của $C_{11}H_{17}N_3O_8$, so với lượng ghi trên nhãn (0,1mg/mL).

2.3.5.2. Quy trình đóng ống chuẩn, 100 µg chất/lọ 1 ml

Xây dựng quy trình đóng ống chuẩn đúng quy định đối với chất độc, sử dụng thiết bị Glove - Box Labonco

- Đóng 0,1 mg /ống dưới dạng dung dịch hòa tan trong dung môi phù hợp
- Cách tiến hành: Hòa tan nguyên liệu *tetrodotoxin* trong dung môi phù hợp để có nồng độ 0,1 mg/ml bằng cách: Cân chính xác x g *TTX* vào bình định mức 100 ml, thêm dung môi hòa tan và pha loãng vừa đủ tới vạch. x được tính theo công thức sau:

$$x = 10.100/P$$

trong đó: p là hàm lượng (%) của $C_{11}H_{17}N_3O_8$ trong nguyên liệu *tetrodotoxin*.

- Dùng burret chia vạch đóng dung dịch vào lọ thủy tinh màu nâu dung tích 2 ml, lượng đóng chính xác 1,0 ml/lọ.
- Hàn kín
- Dán nhãn.

2.3.5.3. Kiểm tra, đánh giá chất lượng

- Xây dựng tiêu chuẩn chất lượng cho lọ chuẩn

Xây dựng tiêu chuẩn chất lượng với các chỉ tiêu:

- + Cảm quan
- + Định tính
- + Định lượng

- Kiểm tra đánh giá đồng nhất lô

Yêu cầu:

Lô sản xuất được coi là đồng nhất khi giá trị RSD của kết quả hàm lượng giữa các ống được kiểm tra $\leq 0,5\%$ \Rightarrow điều kiện đóng gói ổn định.

Tiến hành:

- + Lấy ngẫu nhiên ít nhất 10 ống để kiểm tra đồng nhất quá trình đóng gói chỉ tiêu hàm lượng.
- + Áp dụng phương pháp định lượng trong tiêu chuẩn ống chuẩn *TTX* để tiến hành xác định hàm lượng.

- Đánh giá liên phòng thí nghiệm về chất chuẩn

Áp dụng phương pháp định lượng trong tiêu chuẩn chất lượng lọ chuẩn *TTX*.

Đánh giá liên phòng thí nghiệm, ít nhất là 2 phòng thí nghiệm, mỗi PTN nhận được chất chuẩn gốc và 06 lọ chuẩn bán thành phẩm

So sánh kết quả giữa các phòng thí nghiệm, đánh giá kết quả theo phân tích ANOVA, so sánh 2 giá trị 2 giá trị F_{tn} và F_{tc}

Trường hợp 1: $F_{tn} \leq F_{tc} \Rightarrow$ Kết quả trung bình của các phòng thử nghiệm giống nhau, phương pháp phân tích có độ tái lập và độ lặp lại tốt.

Trường hợp 2: $F_{tn} > F_{tc} \Rightarrow$ Kết quả trung bình của các phòng thử nghiệm khác nhau, phương pháp phân tích không có độ tái lập và độ lặp lại.

- Xác định giá trị công bố trên nhãn và chứng chỉ phân tích

Tập hợp kết quả phân tích đánh giá liên phòng thí nghiệm, trong trường hợp $F_{tn} \leq F_{tc}$, nếu tất cả các kết quả thu được của 2 PTN nằm trong khoảng 99,5 % đến 100,5 % so với hàm lượng nhãn thì kết quả ghi trên nhãn và chứng chỉ: Mỗi lọ chất chuẩn *tetrodotoxin* có chứa 0,1 mg *tetrodotoxin* ($C_{11}H_{17}N_3O_8$). Nếu có bất cứ kết quả nào nằm ngoài khoảng 99,5 % đến 100,5 % so với hàm lượng nhãn thì phải xem xét lại toàn bộ quá trình thử nghiệm và/hoặc quá trình đóng lọ.

2.3.6. Bào chế và tiêu chuẩn hóa bột đông khô *tetrodotoxin* 0,1 %

2.3.6.1. Bào chế

Công thức bào chế cho 1 lọ

TTX thô (hàm lượng TTX ≥ 80 %)...tương ứng với.... 1 mg TTX
Dung dịch lactose 20% (kl/tt) 5 mL
Đệm citratevừa đủ.....10 mL

Pha chế

*TTX thô có hàm lượng ≥ 80 % thu được theo quy trình chiết xuất trên để làm nguyên liệu bào chế bột đông khô. Cân chính xác khoảng 25 mg TTX thô đã được định lượng xác định chính xác hàm lượng (tương ứng với 20 mg TTX) vào bình định mức 200 ml, thêm dung 50 ml dịch đệm *citrat pH 4-5* để hòa tan. Thêm chính xác 100 ml dung dịch *lactose 20% (kl/tt)*, lắc kỹ, thêm dung dịch *đệm citrat* vừa đủ, lắc đều.*

Hút 10 ml dung dịch trên vào lọ thủy tinh nâu dung tích 10 ml, đem đông khô.

Chương trình đông khô:

- Nhiệt độ đông lạnh -30°C ;
- Thời gian đông lạnh 90 phút;
- Thời gian đông khô 22 giờ;
- Nhiệt sấy khô từ: -25°C đến 0°C ;
- Nhiệt độ condensor – 60°C ;
- Áp suất 0,1 mbar;
- Thời gian sấy khô 19 giờ;

- Nhiệt sấy khô từ: 4°C đến 27°C.

2.3.6.2. Xây dựng tiêu chuẩn cơ sở của bột đông khô tetrodotoxin 0,1 %

- Cảm quan: khối sản phẩm màu trắng ngà vàng, xốp.
- Độ ẩm: xác định mất khối lượng do làm khô, thử theo ĐĐVN IV, phụ lục 10.3, (cân khoảng 1g chế phẩm)
(Yêu cầu độ ẩm $\leq 1,5$ %)
- Hàm lượng TTX trong sản phẩm được định lượng bằng sắc ký lỏng khối phổ
(Yêu cầu: Hàm lượng TTX trong sản phẩm phải đạt từ 0,09 đến 0,11% (kl/kl).)

2.3.6.3. Xác định độc tính cấp và bán trường diễn của bột đông khô tetrodotoxin nồng độ 0,1 %

Xác định độc tính cấp

Phương pháp xác định

- Cho từng lô chuột nhất trắng uống chế phẩm thử với liều tăng dần. Thể tích cho uống là 0,2 – 0,4 ml/10 g chuột.
- Theo dõi tình trạng chung của động vật thực nghiệm và tỷ lệ chết trong 72 giờ. Xác định LD₅₀ (nếu có) theo phương pháp Litchfield – Wilcoxon

Thử sơ bộ

- Cách xử lý và chuẩn bị mẫu thử: Pha loãng dịch chiết gốc với nước cất thành các dung dịch có độ pha loãng cách xa nhau để thử sơ bộ.
- Thăm dò ở mức liều không làm chết chuột thí nghiệm
- Thăm dò mức liều làm chết 100% số chuột thí nghiệm

Thử nghiệm chính thức

- Các mức liều thử nghiệm: Dựa vào kết quả thử nghiệm sơ bộ để lựa chọn 5 mức liều cho thử nghiệm chính thức (từ liều LD₀ đến LD₁₀₀)

Tiến hành

- Chuột được nhịn ăn 15 giờ trước khi thí nghiệm, nước uống theo nhu cầu. Kiểm tra cân nặng trước khi thử nghiệm. Chuột đạt các yêu cầu về cân nặng được đưa vào thử nghiệm.
- Cách dùng: Lấy thể tích mẫu thử theo quy định đưa thẳng vào dạ dày chuột bằng kim cong đầu tù.

- Lịch theo dõi: Theo dõi biểu hiện của chuột sau khi uống trong 24 giờ đầu và theo dõi hoạt động của ĐVTN trong thời gian 7 ngày sau khi uống.

Đánh giá độc tính bán trường diễn

Nguyên lý thử nghiệm

Thử độc tính dài ngày của chế phẩm nhằm xác định khả năng dung nạp của động vật thí nghiệm khi dùng mẫu thử nhiều lần. Thông tin cần xác định là những biểu hiện độc tính sau khi dùng dài ngày bao gồm:

+ Mức liều không hoặc có gây thay đổi đáng kể tới chức năng, cơ quan hoặc một số biểu hiện sống có thể quan sát được trên động vật thí nghiệm.

+ Những độc tính có thể quan sát được trên động vật thực nghiệm và khả năng phục hồi nếu có.

Bố trí thí nghiệm:

Động vật thí nghiệm được chia thành các lô:

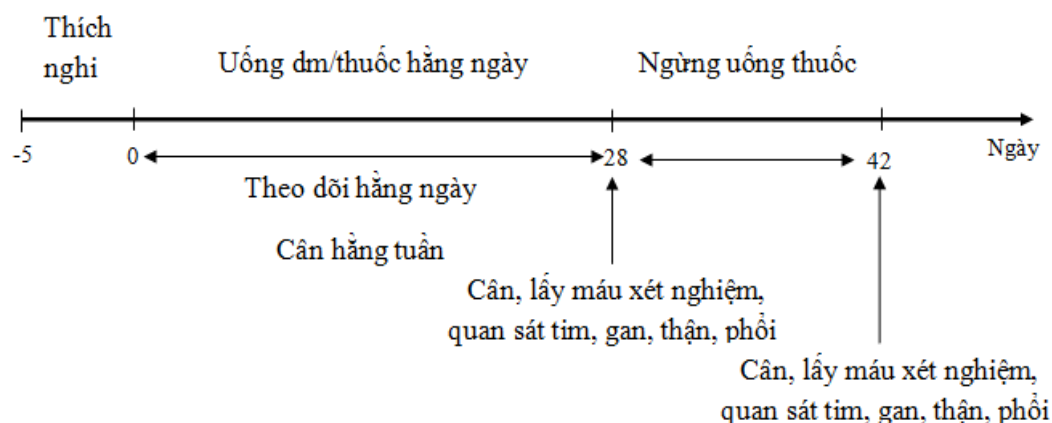
- Lô chứng: uống dung môi

- Lô thử 1: uống chế phẩm nghiên cứu pha trong dung môi với liều bằng với liều thể hiện tác dụng sinh học tối ưu (có quy đổi).

- Lô thử 2: uống chế phẩm nghiên cứu pha trong dung môi với liều bằng với 3 đến 5 lần liều thể hiện tác dụng sinh học tối ưu (có quy đổi).

Động vật thí nghiệm được cho dùng dung môi hoặc chế phẩm thử liên tục trong 28 ngày, vào một giờ nhất định trong ngày. Trước khi uống thuốc 1,5 giờ động vật không được cho ăn nhưng được uống nước bình thường. Theo dõi động vật thí nghiệm hằng ngày trong 28 ngày, và nuôi thêm 14 ngày để theo dõi sự hồi phục của chuột (nếu cần). Tại thời điểm kết thúc (sau 28 ngày dùng thuốc) và sau thời gian nuôi hồi phục (nếu cần), lấy máu để làm các xét nghiệm huyết học và hóa sinh. Mổ toàn bộ động vật thí nghiệm để quan sát đại thể các cơ quan, lấy ngẫu nhiên 3 thỏ để làm tiêu bản vi thể tim, gan và thận.

Quy trình thí nghiệm



Hình 2. 5. Quy trình xác định độc tính bán trường diễn

Thông số đánh giá

- Tình trạng toàn thân: hằng ngày theo dõi các biểu hiện của động vật thực nghiệm: vận động, nhịp thở, tuần hoàn, da, lông, tình trạng ăn, uống, cân nặng.
- Các thông số huyết học: Số lượng hồng cầu, thể tích trung bình hồng cầu, Số lượng bạch cầu, số lượng tiểu cầu, huyết sắc tố
- Đại thể cơ quan: quan sát cảm quan các cơ quan tim, gan, thận, lách. Cân khối lượng các cơ quan và tính tỷ lệ so với khối lượng toàn bộ cơ thể.
- Mô bệnh học: sau khi giết động vật thí nghiệm, các mẫu tim, gan, thận được cố định bằng dung dịch Carnoy, vùi trong parafin, cắt lát mỏng 5 – 7 μm , nhuộm *hematoxylin – eosin* và quan sát dưới kính hiển vi quang học để đánh giá cấu trúc hình thái vi thể tim, gan, thận.

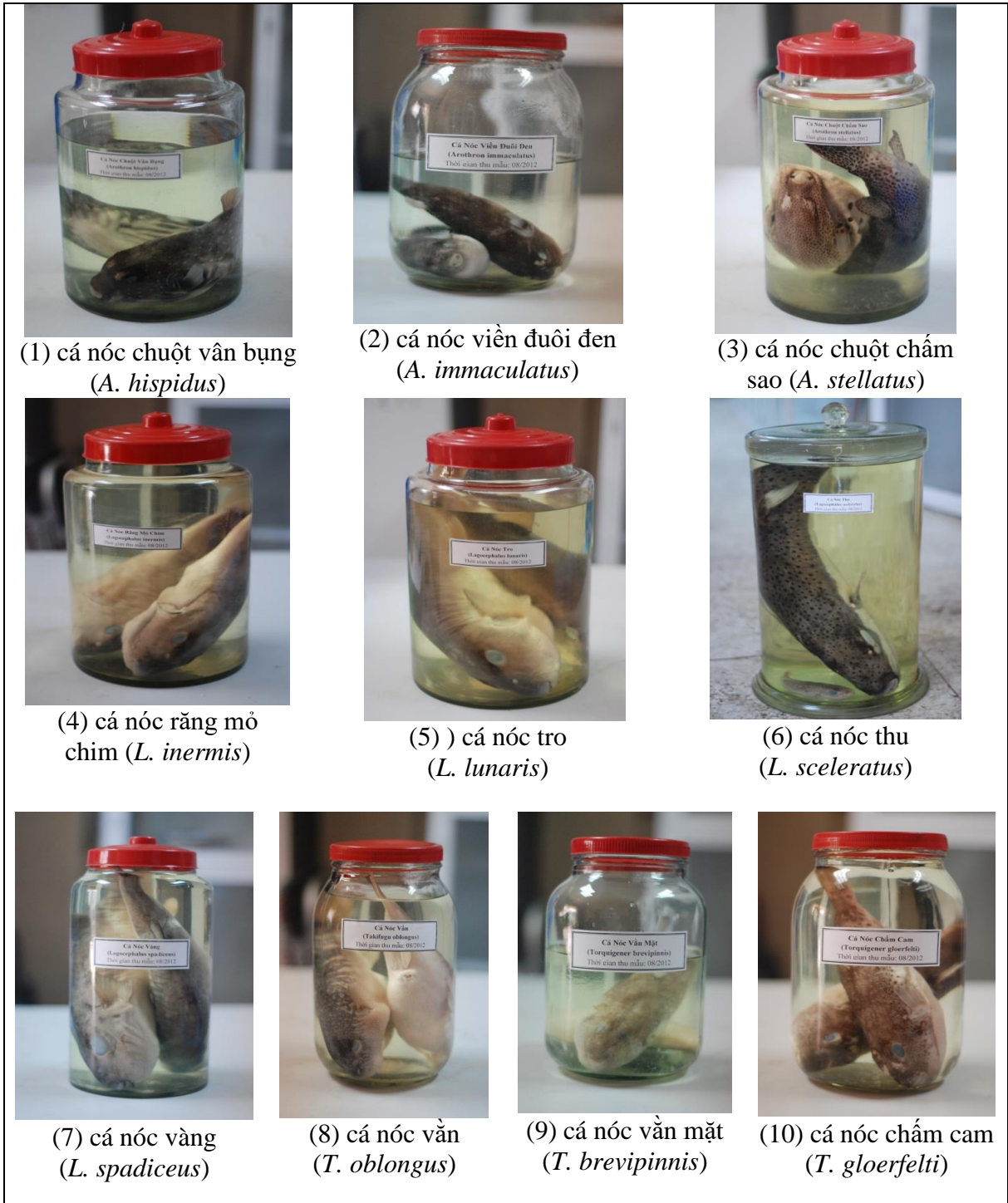
Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu được biểu thị dưới dạng $M \pm \varepsilon$ (M: giá trị trung bình từng lô, ε : khoảng dao động của giá trị). Xử lý số liệu trên phần mềm Excel. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

CHƯƠNG III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. XÂY DỰNG CƠ SỞ DỮ LIỆU VỀ NGUỒN CÁ NÓC *TETRADONTIDAE* CÓ CHỨA *TETRODOTOXIN*

Trong khoảng thời gian 08.2011 đến 03.2012, kết hợp với Viện Hải dương học, Viện hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 10 loài cá nóc độc đã được chúng tôi định hướng thu mẫu ở vùng biển Khánh Hòa và Vũng Tàu, Việt Nam, định danh và lưu tiêu bản, gồm có:



Hình 3. 1. Tiêu bản 10 loài cá nóc độc

10 loài cá nóc độc trên được nghiên cứu đầy đủ đặc điểm hình thái cũng như đặc điểm sinh thái, góp phần vào cơ sở dữ liệu nhận dạng loài (bộ dữ liệu, tiêu bản 10 loài cá nóc này được trình bày chi tiết tại *phụ lục 1.*). Các loài cá nóc này cũng được nghiên cứu dữ liệu hóa học, hàm lượng *tetrodotxin*, các chất độc tương tự *TTX* và phân bố *TTX* trong phủ tạng cá nóc.

3.2. NGHIÊN CỨU PHÁT HIỆN ĐỘC TỐ THÀNH KINH Ở MỘT SỐ LOÀI CÁ NÓC (*TETRAODONTIDAE*)

3.2.1. Xác định nhanh độc tố của phủ tạng một số loài cá nóc

Kết quả phân tích độc tính một số bộ phận (thịt, da, gan, ruột, trứng, tinh sào) của 10 loài cá nóc thu được theo phương pháp sinh hoá chuột.

Bảng 3. 1. Mức độ độc của phủ tạng một số loài cá nóc

TT	Tên loài	Mức độ độc*				
		Thịt	Gan	Ruột	Trứng	Tinh sào
1	Cá nóc chuột vằn bụng (<i>A. hispidus</i>)	+	+	++	+++	+
2	Cá nóc chuột chấm sao (<i>A. stellatus</i>)	+	+	+	+++	++
3	Cá nóc viền đuôi đen (<i>A. immaculatus</i>)	++	+	++	+++	+
4	Cá nóc tro (<i>L. lunaris</i>)	+	++	++	+++	++
5	Cá nóc thu (<i>L. sceleratus</i>)	+	+++	++	++	+
6	Cá nóc vàng (<i>L. spadiceus</i>)	0	++	+	+	0
7	Cá nóc răng mỏ chim (<i>L. inermis</i>)	0	+++	++	++	+
8	Cá nóc vằn mặt (<i>T. brevipinnis</i>)	++	+++	++	++	++
9	Cá nóc chấm cam (<i>T. gloerfelti</i>)	0	+	+	+	-
10	Cá nóc vằn (<i>T. oblongus</i>)	+	+	++	+++	+

(*) 0: không độc, +: độc nhẹ, ++: độc mạnh, +++: độc rất mạnh, -: không có dữ liệu.

Từ kết quả trên, 10 loài cá nóc thu được đều là những loài cá nóc độc. Độc tính cá nóc chủ yếu tập trung ở gan, trứng, tinh sào và ruột.

3.2.2. Xử lý mẫu, làm sạch qua cột chiết pha rắn

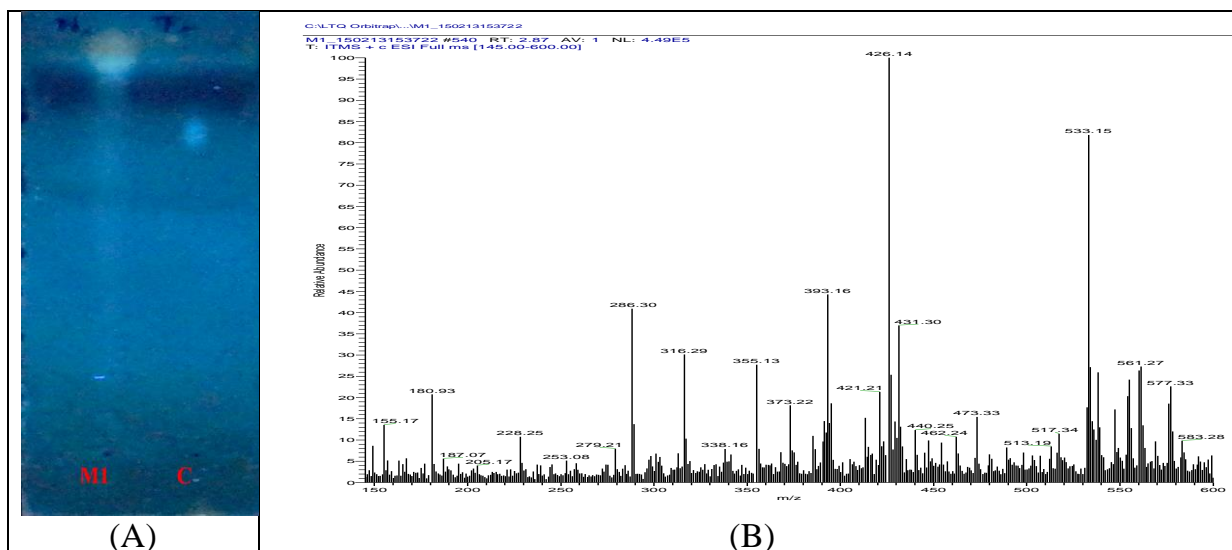
3.2.2.1. Chiết SPE sử dụng cột C18

- Dịch A1.1 thu được có màu vàng trong; cô đến cạn và hòa lại trong 3mL *acid acetic* 0.5%/methanol dùng để chấm TLC và định tính bằng sắc ký lỏng khối phổ

- Kết quả

+ Sắc ký lớp mỏng: trên sắc ký đồ dung dịch thử không thấy xuất hiện vết có màu sắc và vị trí (R_f) giống với màu sắc và vị trí (R_f) của vết *TTX* trên sắc ký đồ dung dịch chuẩn.

+ Định tính bằng sắc ký lỏng khối phổ, không thấy xuất hiện mảnh khối đặc trưng m/z 320 của *TTX*



Hình 3. 2. Sắc ký lớp mỏng (A) và phổ MS (B) của dịch sau khi chiết qua SPE C18

- Kết luận: sau khi chiết SPE qua cột C18, dịch A1.1 thu được không còn chứa TTX

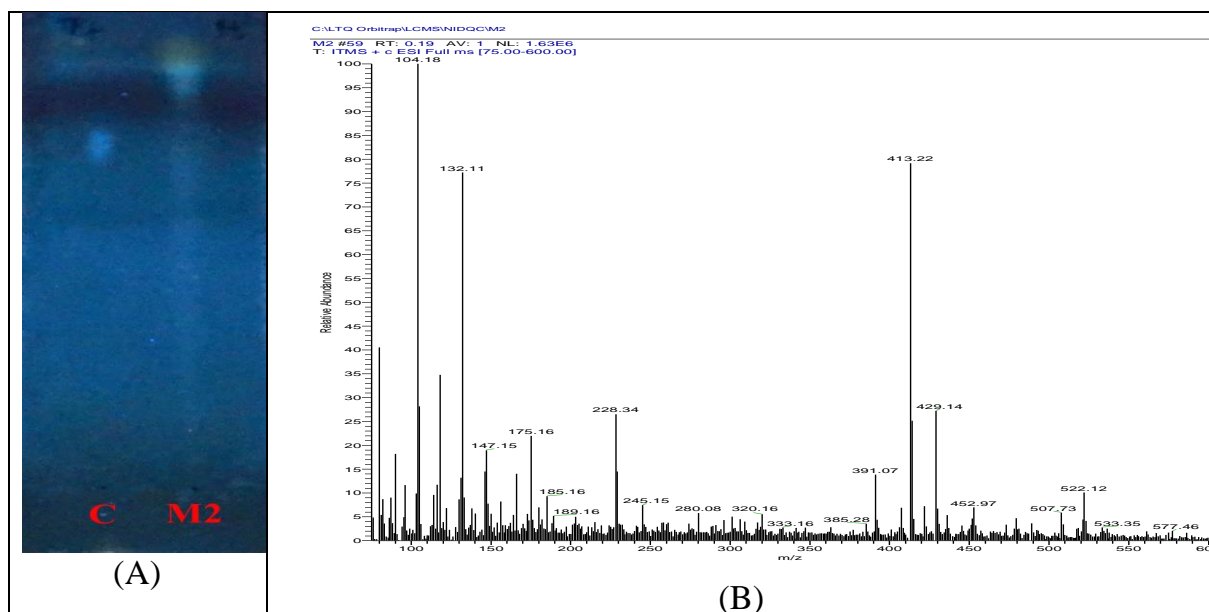
3.2.2.2. Chiết SPE sử dụng cột Evidex

- Dịch A1.2 thu được trong suốt, có màu hơi vàng, màu nhạt hơn màu của dịch A1.1. Cô dịch này đến cạn, hoà tan lại trong 3mL acid acetic 0.5%/methanol dùng để chấm TLC và định tính bằng sắc ký lỏng khối phổ

- Kết quả

+ Sắc ký lớp mỏng: trên sắc ký đồ dung dịch thử không thấy xuất hiện vết có màu sắc và vị trí (R_f) giống với màu sắc và vị trí (R_f) của vết TTX trên sắc ký đồ dung dịch chuẩn

+ Định tính bằng sắc ký lỏng khối phổ, thấy xuất hiện mảnh khối đặc trưng $m/z = 320$ của TTX, nhưng với tín hiệu rất nhỏ



Hình 3. 3. Sắc ký lớp mỏng (A) và phổ MS (B) của dịch sau khi chiết qua SPE cột Evidex

- Kết luận: sau khi chiết SPE qua cột Evidex, dịch A1.2 thu được không còn chứa TTX

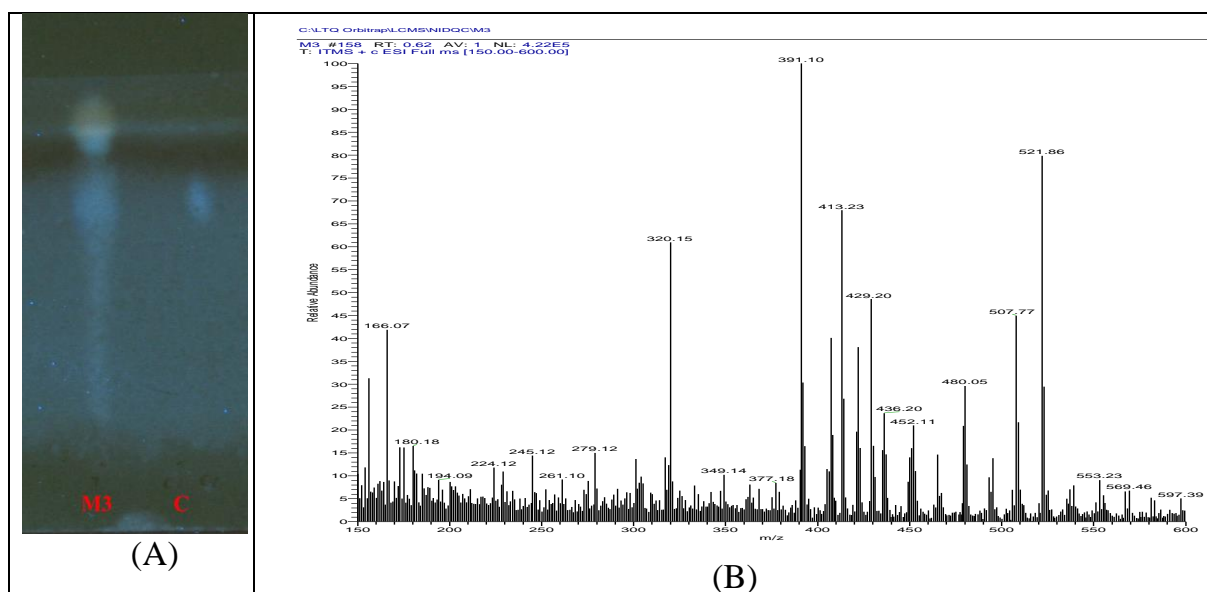
3.2.2.3. Chiết SPE sử dụng cột SCX

- Dịch A1.3 thu được trong suốt, không màu. Cô dịch này đến cạn, hoà tan lại trong 3mL acid acetic 0.5%/methanol dùng để chấm TLC và định tính bằng sắc ký lỏng khối phổ

- Kết quả:

+ Sắc ký lớp mỏng: trên sắc ký đồ dung dịch thử xuất hiện vết có màu sắc và vị trí (R_f) giống với màu sắc và vị trí (R_f) của vết TTX trên sắc ký đồ dung dịch chuẩn

+ Định tính bằng sắc ký lỏng khối phổ, xuất hiện mảnh khối đặc trưng $m/z = 320$ của TTX



Hình 3. 4. Sắc ký lớp mỏng (A) và phổ MS (B) của dịch sau khi chiết qua SPE cột SCX

- Định lượng TTX trong dịch chiết thu được bằng sắc ký lỏng khối phổ, tính độ thu hồi qua SPE.

Tiến hành tạo mẫu spike bằng cách thêm 1,0 ml các dung dịch chuẩn ($10 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, $25 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, $50 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) vào mẫu phủ tạng cá thu. Tiến hành xử lý mẫu theo quy trình, dịch chiết thu được sau khi chiết qua SPE được cô cạn, thêm chính xác 10,0 ml hỗn hợp đệm acetat – MeOH (20 – 80), siêu âm 10 phút, lọc dịch hoà tan qua màng lọc $0,45 \mu\text{m}$.

Tiêm lần lượt các dung dịch thử, dung dịch spike qua máy sắc ký lỏng khối phổ với chương trình sắc ký đã được khảo sát:

- Cột: Alltech Apollo C8; $5 \mu\text{m}$; $250 \times 4,6 \text{mm}$
- Pha động: đệm acetat – MeOH = 30 – 70
- Tốc độ dòng: $500 \mu\text{L}/\text{phút}$
- Thể tích tiêm: $10 \mu\text{L}$

- Điều kiện khối phổ:

+ Nguồn: ESI+

+ Khí: SG: 20, AG: 10

+ Thế ion hóa: 3200V

+ Nhiệt hóa hơi: 200°C

+ Nhiệt độ mao quản: 360°C

+ SRM: 320 → 162 với mức năng lượng CE = 32V

Bảng 3. 2. Khảo sát độ thu hồi của TTX qua cột chiết SCX

Dung dịch chuẩn	S _c	m _c thêm (µg)	S _t	m _{TTX} thu hồi (µg)	% thu hồi
1 µg/ml	481830	10	115562	7,15	71,54
		10	109863	6,80	68,02
		10	112257	6,95	69,50
2,5 µg/ml	161527	25	333544	17,31	69,22
		25	348641	18,09	72,36
		25	343039	17,80	71,20
5 µg/ml	1108135	50	819412	36,97	73,95
		50	789027	35,60	71,20
		50	798620	36,03	72,07
Trung bình					71,01
RSD					2,56

Phương pháp chiết SPE qua cột SCX có độ thu hồi là 71,01% và khá ổn định (RSD = 2,56). Với độ thu hồi này, vẫn đảm bảo giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng của phương pháp định lượng. *Như vậy, ta có thể sử dụng phương pháp chiết, xử lý mẫu như đã khảo sát để có thể định tính, định lượng TTX trong cá nóc cũng như trong phủ tạng cá nóc.*

3.2.3. Định tính tetrodotoxin bằng sắc ký lớp mỏng

3.2.3.1. Khảo sát thuốc thử hiện màu

- Khi phun lần lượt các thuốc thử: KOH 10% - KOH 20% - KOH 30%, NaOH 10%, NaOH 20% với nhiệt độ sấy ở 90°C và 100°C, cứ 5 phút lại quan sát một lần. Tuy nhiên, sau 30 phút, không thấy có vết sáng phát huỳnh quang tại các thời điểm khảo sát. Khi sấy ở nhiệt độ 110°C thì bản mỏng bị uốn cong, không có vết huỳnh quang phát sáng tại thời điểm khảo sát.

- Khi phun thuốc thử NaOH 30%

+ Với nhiệt độ sấy 90°C: bắt đầu xuất hiện vết huỳnh quang sau 15 phút, và hiện rõ hơn ở thời điểm 25 phút

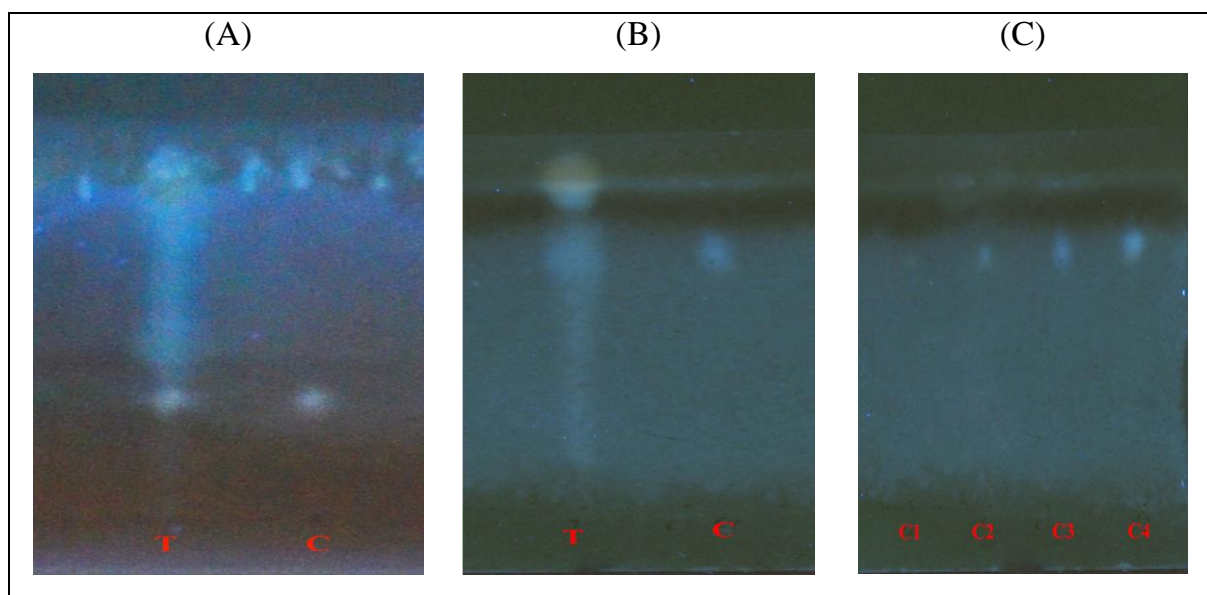
- + Với nhiệt độ sấy 100⁰C: Vết huỳnh quang của *TTX* hiện rõ tại thời điểm 10 phút
- + Khi tăng nhiệt độ sấy lên 110⁰C thì vết huỳnh quang cũng xuất hiện tại thời điểm 10 phút, tuy nhiên bản mỏng có hiện tượng cháy

3.2.3.2. *Khảo sát pha động chạy sắc ký*

Khảo sát 2 hệ dung môi pha động chạy sắc ký

- + Pha động A: Hỗn hợp *n-butanol*, *acid acetic khan* và *nước* (2:1:1)
- + Pha động B: Hỗn hợp *pyridin*, *ethyl acetate*, *acid acetic* và *nước* (15:5:3:6)

Hai hệ dung môi pha động đều có thể phát hiện *TTX*. Dung dịch thử và dung dịch chuẩn đều cho vết huỳnh quang khi phun thuốc thử hiện màu, vị trí vết của dung dịch thử và dung dịch chuẩn là tương ứng nhau. Đối với hệ dung môi pha động A, kết quả $R_f \approx 0,3$; còn với hệ dung môi pha động B, kết quả $R_f \approx 0,6 - 0,7$. Pha động B cho kết quả tốt hơn, chính xác hơn vì giá trị R_f cao hơn; tuy nhiên, pha động B có thành phần chủ đạo là *pyridin*, chất này rất độc, và hiện nay đang hạn chế sử dụng. Vì vậy, có thể sử dụng dung môi pha động A để hạn chế độc hại. Có thể khắc phục nhược điểm của hệ pha động A bằng cách tăng quãng đường đi của dung môi và kéo dài thời gian chạy sắc ký hơn.



Hình 3. 5. (A): Sắc ký đồ bản mỏng hệ pha động A: *n-butanol*, *acid acetic khan* và *nước* (2:1:1); (B): Sắc ký đồ bản mỏng hệ pha động B: *pyridin*, *ethyl acetate*, *acid acetic* và *nước* (15:5:3:6); (C): sắc ký đồ khảo sát LOD theo hệ pha động B.

3.2.3.3. *Khảo sát giới hạn phát hiện của phương pháp*

Chấm 10 μ l riêng biệt từng nồng độ 5 μ g/ml, 10 μ g/ml, 15 μ g/ml, 20 μ g/ml lên bản mỏng và chạy sắc ký. Kết quả thu được tại hình 3.5 (C).

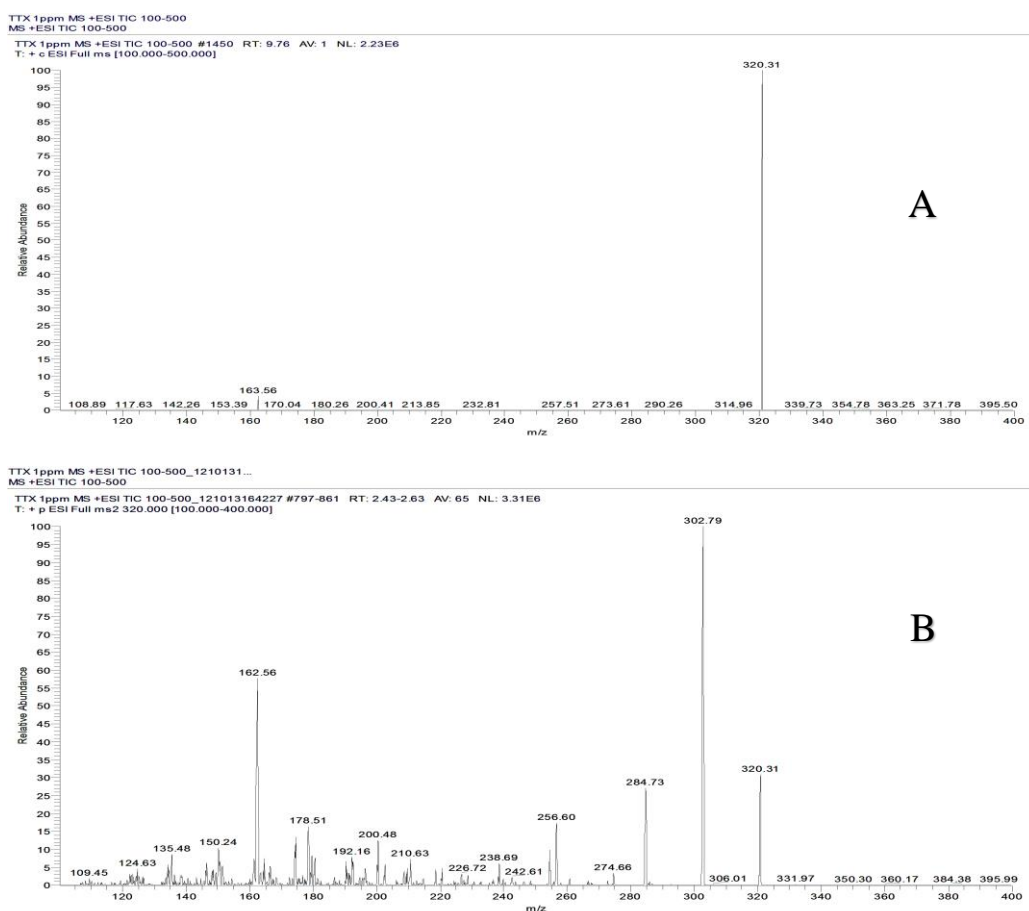
Tại nồng độ 5 $\mu\text{g/ml}$, không thấy xuất hiện vết trên bản mỏng. Tại nồng độ 10 $\mu\text{g/ml}$, vết huỳnh quang đã xuất hiện, tuy nhiên còn hơi mờ, khó phát hiện. Vết huỳnh quang này xuất hiện rõ hơn ở các nồng độ 15 $\mu\text{g/ml}$ và 20 $\mu\text{g/ml}$. Như vậy, có thể coi giới hạn phát hiện của phương pháp là 10 $\mu\text{g/ml}$.

3.2.4. Nghiên cứu phát hiện *tetrodotoxin* và một số độc tố thần kinh khác từ một số loài cá nóc bằng các phương pháp hiện đại

Ứng dụng phổ khối hiện đại ESI iontrap MS và phổ khối phân giải cao ESI FT ICR MS, phân tích từ các mẫu xử lý định tính TTX (phần SKLM) và phân đoạn dịch chiết V2 từ cá nóc độc, cho phép phát hiện nhanh được TTX và các chất tương tự TTX, định hướng cho việc xây dựng quy trình phân lập các chất đó, khẳng định cho kết quả phân tích các hợp chất này bằng NMR

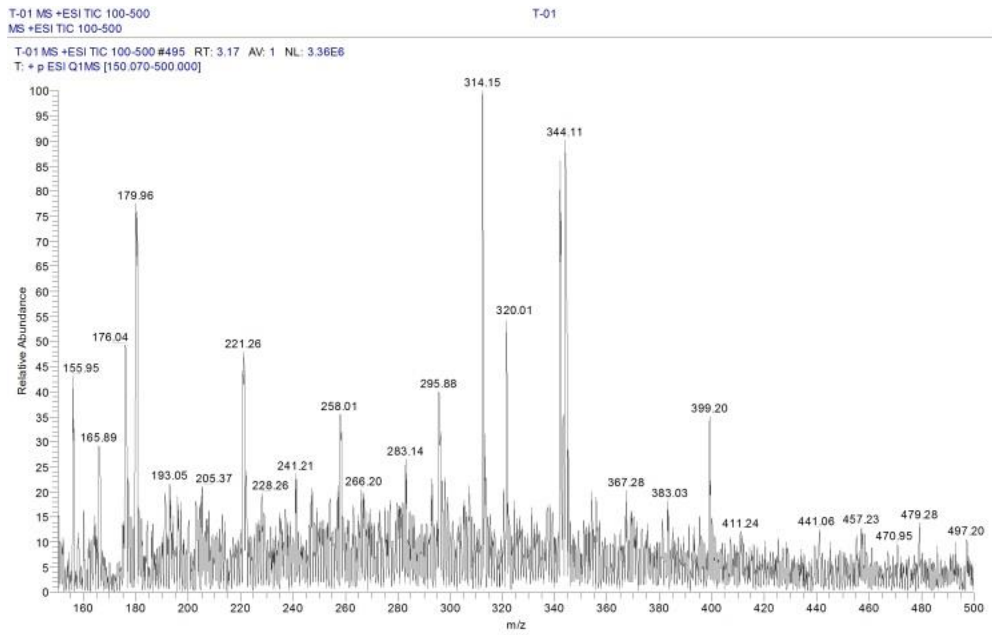
Phổ Ion trap

Các mẫu thử và chuẩn ở mục định tính TTX bằng TLC có thể được pha loãng thích hợp phân tích nhanh bằng cách bơm trực tiếp vào phổ khối iontrap MS của máy LC-MS (Thermo Finnigan LCQ Advantage Max) qua syringe, đều xuất hiện mảnh ion $[M+H]^+ = 320$ và mảnh ion thứ cấp (MS^2) $m/z = 302$ và 162 đặc trưng của TTX

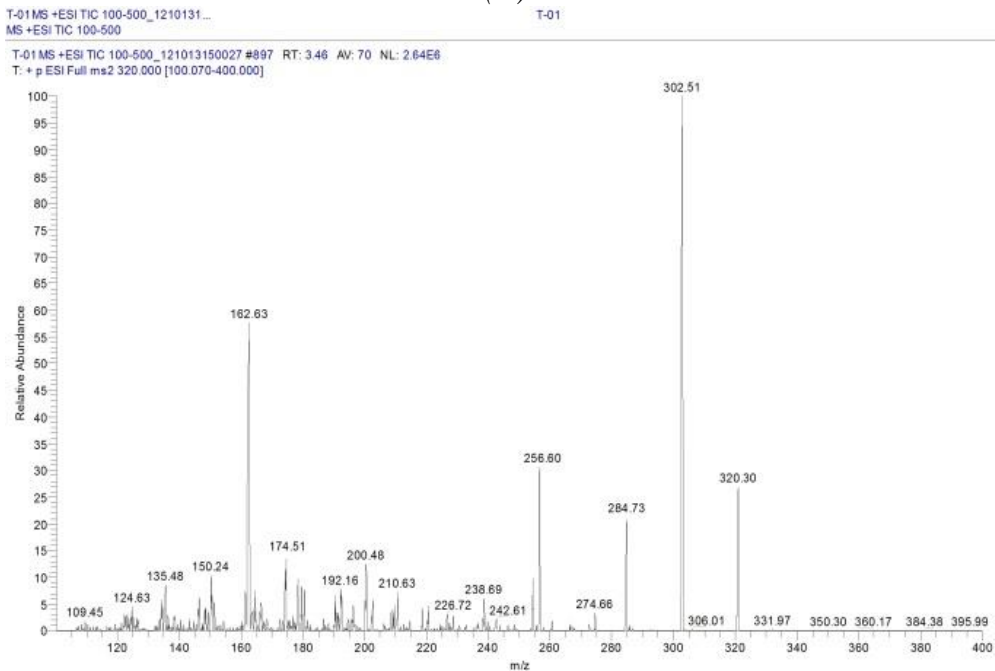


Hình 3. 6. Phổ ESI MS (A) và phổ ESI MS² (B) của TTX chuẩn (1 $\mu\text{g/ml}$)

Kết quả phân tích cho thấy các mẫu thử đem định tính của cả 5 loài cá nóc độc đều có chứa *TTX* (hình 3.7)



(A)

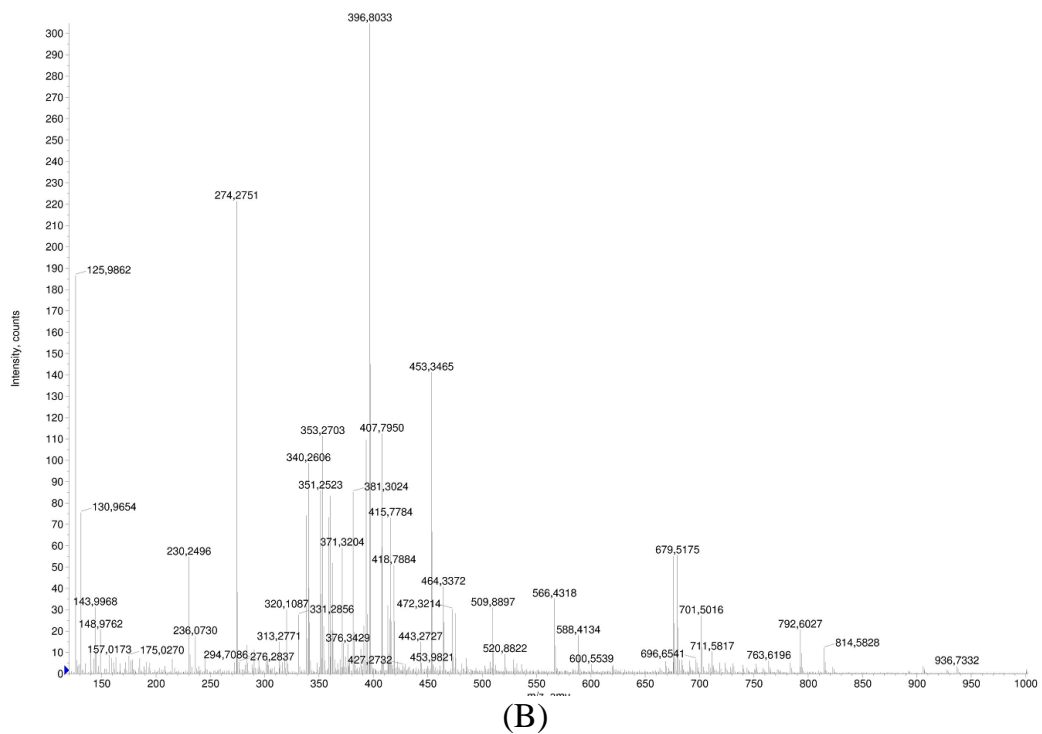
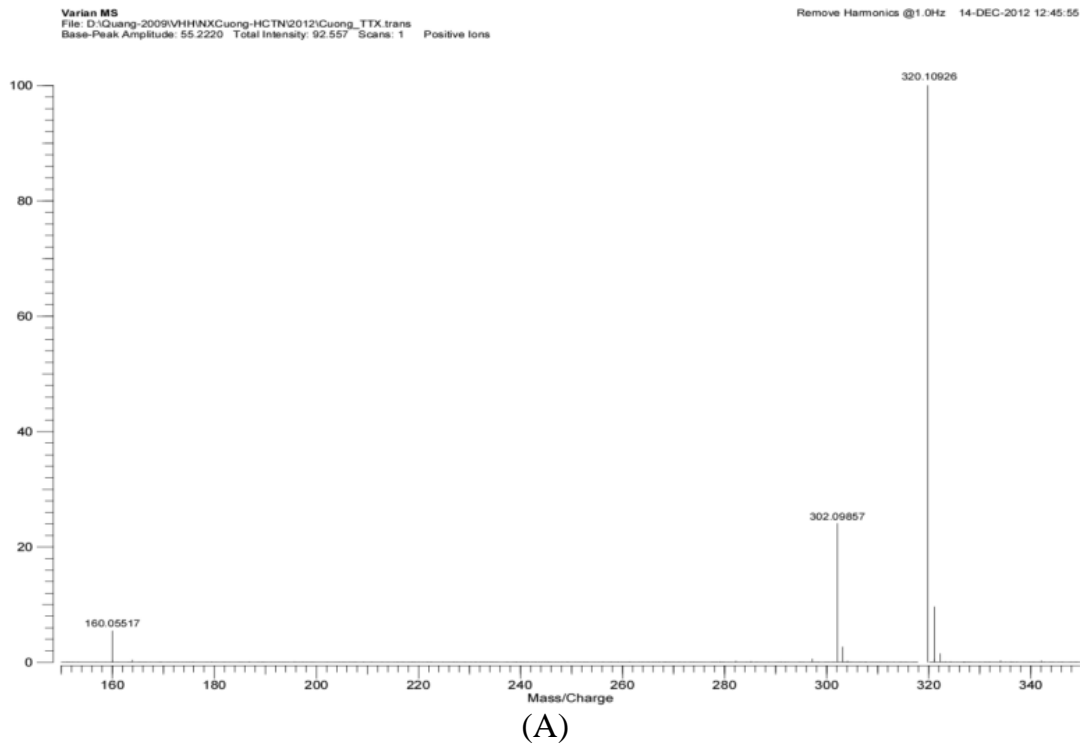


(B)

Hình 3. 7. Phổ *ESI MS* (A) và *ESI MS²* (B) của mẫu cá nóc thuộc loài *T. oblongus* (iontrap MS)

Phân tích phổ *ESI FT ICR MS*

Các mẫu thử trên khi đem phân tích bằng phổ khối phân giải cao *HR ESI FT ICR MS* cũng đều cho mảnh khối đặc trưng của *TTX* $[M + H]^+$ m/z 320,1087.



Hình 3. 8. Phổ HR ESI MS của dung dịch TTX chuẩn $1\mu\text{g}/\text{mL}$ và mẫu thử *A. hispidus*

Vậy có thể kết luận, sử dụng phổ khối iontrap MS hoặc HR MS (FT ICR hoặc orbitrap) đều có thể định tính nhanh được TTX thay vì sử dụng sắc ký lớp mỏng, có độ nhạy không cao và không đặc hiệu. Do đặc thù của nghiên cứu, độc chất này phải thực hiện ở các phòng thí nghiệm hiện đại, sử dụng phương pháp phổ khối ESI-MS định tính hoặc phát hiện TTX là phù hợp.

3.2.5. Xây dựng phương pháp định tính, định lượng *tetrodotoxin* bằng sắc ký lỏng khối phổ (LC/MS)

Tiến hành khảo sát các điều kiện sắc ký trên dung dịch chuẩn *TTX* 10 µg/ml

Chúng tôi đã khảo sát các chương trình sắc ký (A, B, C, D, E, F và G), với các điều kiện sắc ký đề được ghi trong *bảng 3.3*

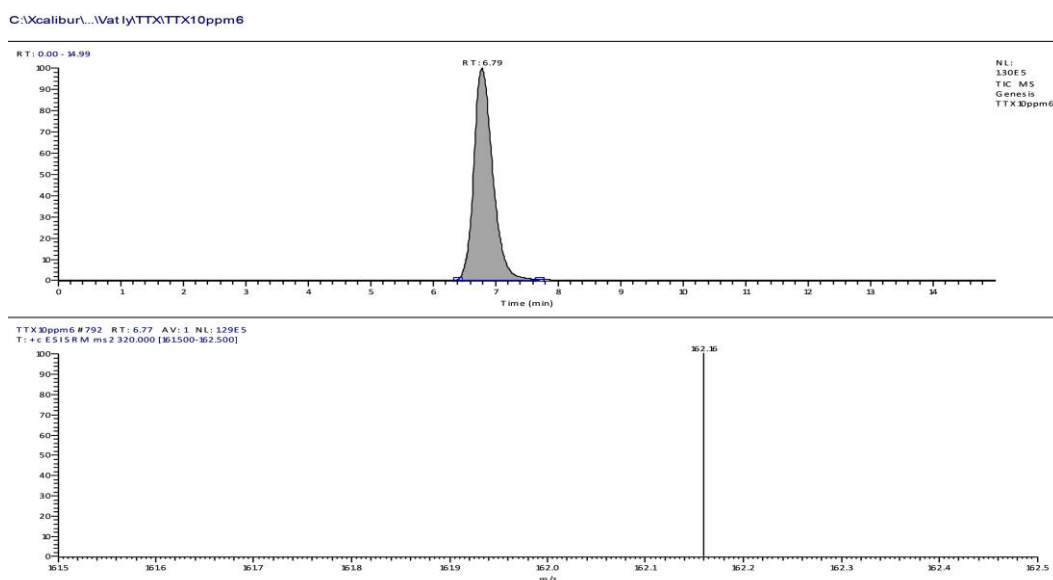
Bảng 3. 3. Khảo sát một số điều kiện sắc ký

Điều kiện sắc ký	A	B	C	D	E	F	G
Cột sắc ký	Zorbax 300SB – C3; (5µm; 250 x 4,6mm)				Alltech Apollo C8; (5µm; 250 x 4,6mm)		
Pha động: <i>Đệm acetat</i> * – <i>MeOH</i>	35 – 65	20 – 80	25 – 75	40 – 60	40 – 60	30 – 70	20 – 80
Tốc độ dòng (µL/phút)	400	500	500	500	500	500	500
Thể tích tiêm (µL)	25	10	10	10	10	10	10
Nguồn ion hoá: +ESI							
Khí Sheath Gas (SG)	30	20	20	25	25	20	20
Khí Auxilliary Gas (AG)	20	10	10	10	10	10	10
Thế ion hoá	3200V						
Nhiệt hoá hơi	200°C						
Nhiệt độ mao quản	360°C						
SRM: 320 → 162 với mức năng lượng CE = 32V							

* (*dung dịch đệm acetat: dung dịch chứa amoni acetat 15 mM, acid acetic 15mM*)

Pic trên sắc ký đồ với các điều kiện sắc ký (A), (B), (C), (D), (E) và (G) có thời gian lưu khoảng 6 – 8 phút; tuy nhiên, pic doãng, tù đầu hoặc kéo đuôi, không phù hợp để phân tích.

Với chương trình sắc ký (F), pic cân đối không bị doãng và không kéo đuôi; thời gian lưu của pic khoảng 6,8 phút. Do đó, có thể sử dụng chương trình sắc ký này để phân tích mẫu *TTX*.

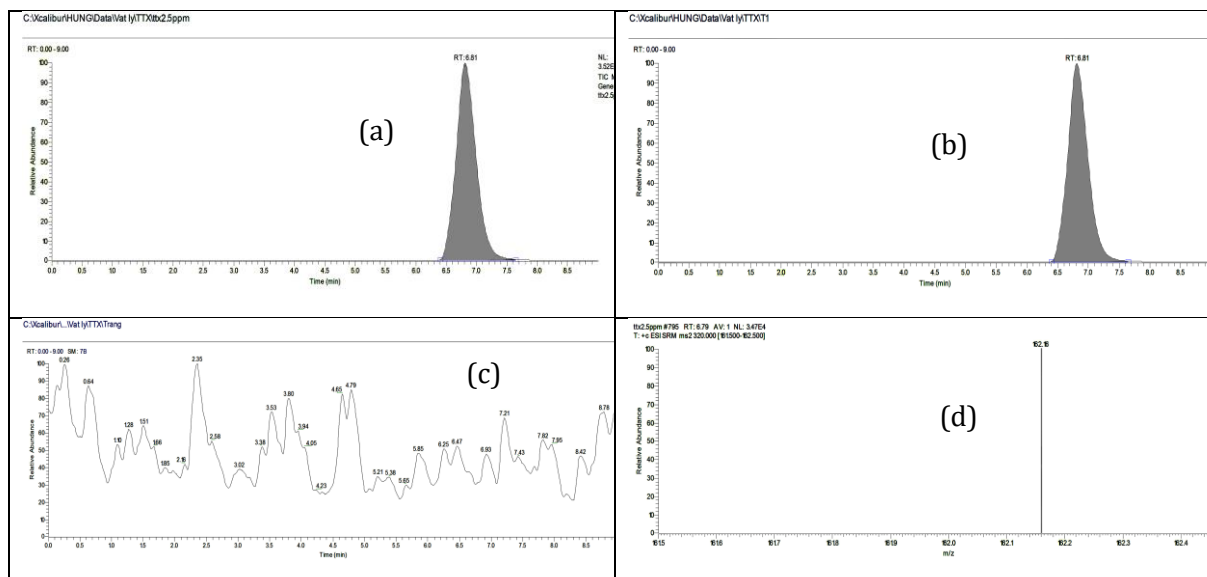


Hình 3. 9. SKĐ phân tích TTX theo chương trình sắc ký (F)

Tiến hành thẩm định phương pháp theo điều kiện sắc ký F, sử dụng để phân tích mẫu TTX nguyên liệu.

Độ đặc hiệu: được xác định bằng cách tiêm dung dịch trắng, dung dịch chuẩn 2,5 µg/ml, và dung dịch thử (mẫu nguyên liệu được pha đến khoảng nồng độ tương ứng 2,5 µg/ml).

Sắc ký đồ được ghi trong hình 3.10



Hình 3. 10. Sắc ký đồ dung dịch chuẩn TTX nồng độ 2,5µg/mL (a), dung dịch thử (b), dung dịch trắng (c) và mảnh phổ SRM $m/z=320 \rightarrow 162$ đặc trưng của TTX để định lượng (d)

Với chương trình sắc ký đã chọn, thời gian chạy mẫu 10 phút. Trên sắc ký đồ của mẫu thử có pic chính có thời gian lưu, phổ MS giống với thời gian lưu và phổ MS của pic chuẩn tương ứng trên sắc ký đồ của mẫu chuẩn. Phổ SRM $m/z = 320 \rightarrow 162$ là đặc trưng cho TTX.

Độ thích hợp hệ thống: Tiến hành tiêm lặp lại 6 lần dung dịch chuẩn TTX nồng độ 2,5µg/ml

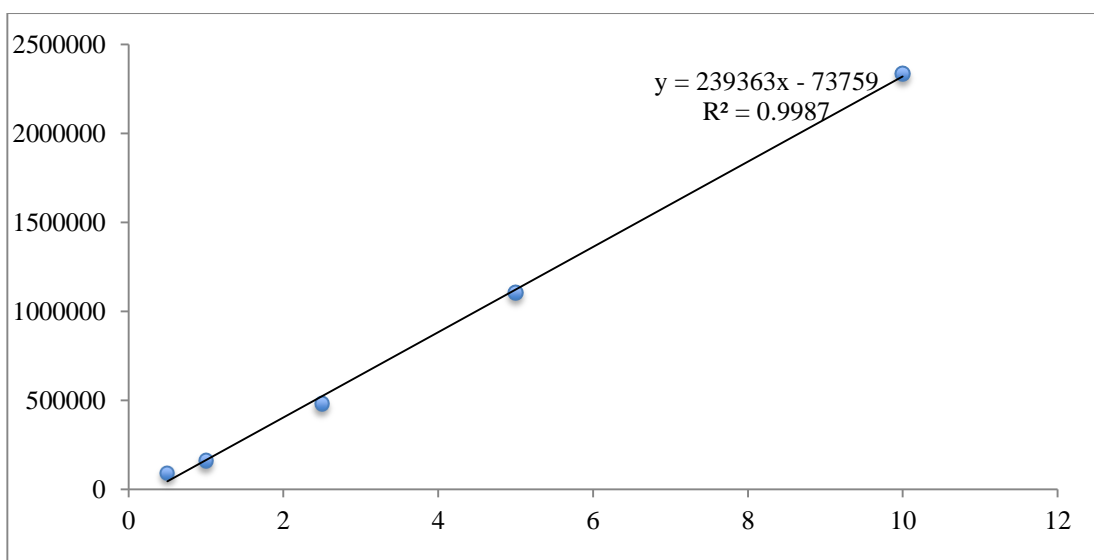
Bảng 3. 4. Kết quả khảo sát độ thích hợp hệ thống

Diện tích pic	477033	481240	483386	488258	482457	484483
Trung bình	482809,5					
RSD	0,77					

Độ tuyến tính:

Bảng 3. 5. Kết quả khảo sát độ tuyến tính của phương pháp

Nồng độ TTX (µg/ml)	0,5	1	2,5	5	10
Diện tích pic	91168	161603	482809,5	1107050	2336471
Phương trình hồi quy tuyến tính	$Y = 239363x - 73759$				
Hệ số tương quan	$r = 0,9993$				



Hình 3. 11. Đồ thị biểu mối tương quan nồng độ TTX và diện tích pic

Kết quả phân tích cho thấy trong khoảng nồng độ khảo sát 0,5 – 10,0 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, có độ tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ và diện tích pic, với phương trình hồi quy $y = 239363x - 73759$, hệ số tương quan $r = 0,9993$

Độ lặp lại của phương pháp:

Sử dụng mẫu thử là mẫu nguyên liệu TTX. Hút 1mL *dung dịch A* vào bình định mức 10,0 ml, pha loãng vừa đủ với pha động, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 μm thu được *dung dịch thử (B)*.

Kết quả định lượng và độ lặp lại ghi trong bảng 2 cho thấy phương pháp có độ lặp lại tốt. Hàm lượng mẫu nguyên liệu TTX định lượng được là 98,27 % với độ lệch chuẩn tương đối (RSD) 0,69%.

Bảng 3. 6. Kết quả khảo sát độ lặp lại

Stt	Lượng cân mẫu thử (mg)	Diện tích pic	Kết quả định lượng (%)
1	2,48	466937	97,49
2	2,49	473893	98,55
3	2,51	478755	98,77
Trung bình			98,27
RSD (%)			0,69

Độ đúng: Sử dụng phương pháp thêm chuẩn, thêm chính xác một lượng chuẩn TTX đã biết vào mẫu thử

- *Dung dịch thử (80%):* Hút 0,25 ml *dung dịch A* và 0,375 ml *dung dịch chuẩn C1* vào bình định mức 5,0 ml, thêm pha động vừa đủ đến vạch, lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,45 μm .

- *Dung dịch thử (100%)*: Hút 0,25 ml *dung dịch A* và 0,625 ml *dung dịch chuẩn C1* vào bình định mức 5,0 ml, thêm pha động vừa đủ đến vạch, lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,45 μm .

- *Dung dịch thử (120%)*: Hút 0,25 ml *dung dịch A* và 0,875 ml *dung dịch chuẩn C1* vào bình định mức 5,0 ml, thêm pha động vừa đủ đến vạch, lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,45 μm .

Bảng 3. 7. Kết quả khảo sát độ thu hồi

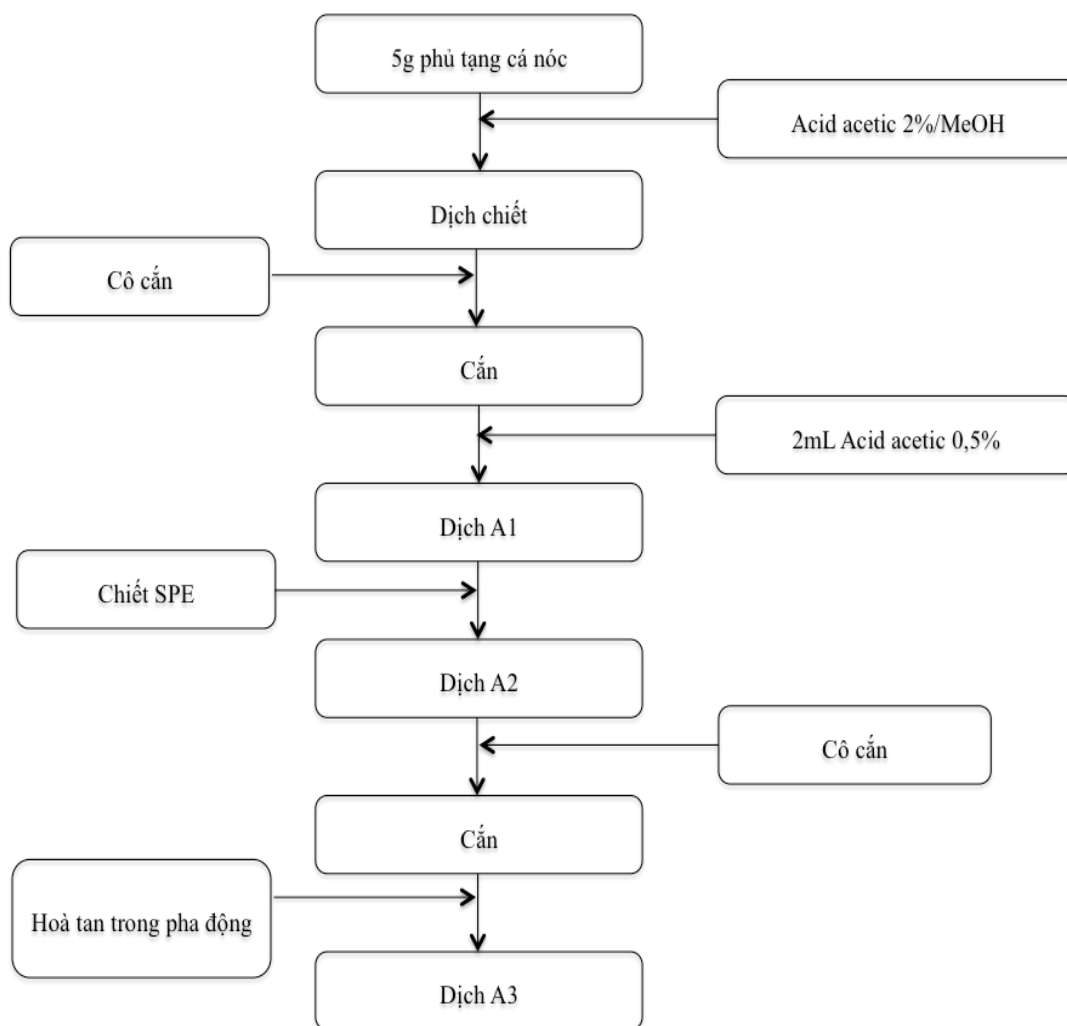
<i>Dung dịch</i>	m_t (mg)	m_c thêm (mg)	S_t	<i>Lượng TTX tính được (mg)</i>	<i>% thu hồi</i>
80%	1,24	0,75	376038	1,95	97,85
80%	1,245	0,75	382611	1,98	99,31
80%	1,255	0,75	378023	1,96	97,63
100%	1,24	1,25	471083	2,44	97,96
100%	1,245	1,25	476732	2,47	98,94
100%	1,255	1,25	478046	2,48	98,82
120%	1,24	1,75	560840	2,90	97,13
120%	1,245	1,75	569380	2,95	98,44
120%	1,255	1,75	574077	2,97	98,92
Trung bình					98,33
RSD					0,74

Kết quả khảo sát ghi trong *bảng 3.7* cho thấy phương pháp có tỷ lệ thu hồi cao, độ đúng tốt (98.33%, RSD = 0,74 %)

Giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng: Giới hạn phát hiện được xác định bằng phương pháp pha loãng dần *dung dịch chuẩn C6* đến khi dung dịch chuẩn không có đáp ứng. Sau khi khảo sát ở điều kiện sắc ký đã chọn, ở nồng độ 10 ng/ml có tỷ số nhiễu nền $s/n = 4$. Pha loãng hơn nồng độ dưới 10 ng/mL thì thấy không còn đáp ứng nên đây được coi là giới hạn phát hiện (LOD) của hệ thống. Như vậy giới hạn định lượng (LOQ) của hệ thống là 25 ng/ml

3.2.6. Khảo sát hàm lượng *tetrodotoxin* trong một số bộ phận của một số loài cá nóc

Tiến hành xử lý mẫu theo quy trình hình 3.12



Hình 3. 12. Quy trình chuẩn bị mẫu định lượng TTX từ cá nóc

Tiến hành định tính, định lượng bằng phương pháp sắc ký lỏng khối phổ theo điều kiện sắc ký đã khảo sát, thẩm định ở trên:

- Cột: Alltech Apollo C8; 5 μ m; 250 x 4,6mm
- Pha động: *đệm acetat – MeOH = 30 – 70*

(*dung dịch đệm acetat: dung dịch chứa amoni acetat 15 mM, acid acetic 15mM*)

- Tốc độ dòng: 500 μ L/phút
- Thể tích tiêm: 10 μ L
- Điều kiện khối phổ

+ Nguồn: ESI+

+ Khí: SG: 20, AG: 10

+ Thế ion hóa: 3200V

+ Nhiệt hóa hơi: 200°C

+ Nhiệt độ mao quản: 360°C

+ SRM: 320 \rightarrow 162 với mức năng lượng CE = 32V

a. Mẫu gan cá nóc chuột vân bụng (*A. hispidus*) được thu mẫu tháng 7-8/2012

- Dung dịch chuẩn: TTX nồng độ 5µg/mL

- Dung dịch thử: dịch chiết A2 được cô cạn qua máy cất quay, thu được cặn. Hòa tan cặn trong 10mL hỗn hợp đệm acetat – methanol (20 – 80) thu được dịch A3, lọc qua màng lọc 0,45µm, tiêm sắc ký

Kết quả: Diện tích pic dung dịch chuẩn $S_c = 1107112$

Bảng 3. 8. Kết quả định lượng TTX trong gan cá nóc chuột vân bụng

Mẫu	Lượng mẫu (g)	S_t	Hàm lượng TTX (µg/g)	Trung bình (µg/g)
1	5,23	1103944	13,43	13,35 (RSD = 0,65%)
		1090313	13,26	
		1099189	13,37	
2	5,37	1024982	12,14	12,22 (RSD = 0,75%)
		1039840	12,32	
		1029837	12,20	
3	5,61	1379873	15,65	15,46 (RSD = 1,20%)
		1347892	15,28	
		1362905	15,45	
Trung bình				13,68

b. Mẫu trứng cá nóc chuột vân bụng (*A. hispidus*) thu được vào tháng 7-8/2012

- Dung dịch chuẩn: TTX nồng độ 50 µg/mL

- Dung dịch thử: dịch chiết A2 được cô cạn qua máy cất quay, thu được cặn. Hòa tan cặn trong 20mL hỗn hợp đệm acetat – methanol (20 – 80) thu được dịch A3, lọc qua màng lọc 0,45µm, tiêm sắc ký

Kết quả: Diện tích pic dung dịch chuẩn: $S_c = 11398714$

Bảng 3. 9. Kết quả định lượng TTX trong trứng cá nóc chuột vân bụng

Mẫu	Lượng mẫu (g)	S_t	Hàm lượng TTX (µg/g)	Trung bình (µg/g)
1	5,84	17530423	370,91	365,67 (RSD = 1,28%)
		17213462	364,20	
		17104557	361,90	
2	5,52	16804878	376,17	373,69 (RSD = 0,97%)
		16507301	369,51	
		16770210	375,39	
3	5,73	15974028	344,47	344,01 (RSD = 0,70%)
		16052854	346,17	
		15832093	341,40	
Trung bình				361,12

c. Mẫu gan cá nóc tro (*L. lunaris*) được thu bắt vào tháng 8/2013

- Dung dịch chuẩn: TTX nồng độ 5µg/mL

- Dung dịch thử: dịch chiết A2 được cô cạn qua máy cất quay, thu được cặn. Hòa tan cặn trong 100mL hỗn hợp đệm acetat – methanol (20 – 80) thu được dịch A3, lọc qua màng lọc 0,45µm, tiêm sắc ký

Kết quả: Diện tích pic dung dịch chuẩn: $S_c = 1093741$

Bảng 3. 10. Kết quả định lượng TTX trong gan cá nóc tro

Mẫu	Lượng mẫu (g)	S_t	Hàm lượng TTX (µg/g)	Trung bình (µg/g)
1	5,84	1109286	124,65	124,82 (RSD = 0,92%)
		1121793	126,05	
		1101428	123,77	
2	5,52	1003574	111,41	111,45 (RSD = 0,31%)
		1007209	111,81	
		1001083	111,13	
3	5,73	1330813	144,25	144,88 (RSD = 0,42%)
		1342088	145,48	
		1336729	144,90	
Trung bình				127,05

d. Mẫu trứng cá nóc tro (*L. lunaris*) được thu bắt vào thời điểm tháng 8/2013

- Dung dịch chuẩn: TTX nồng độ 10µg/mL

- Dung dịch thử: dịch chiết A2 được cô cạn qua máy cất quay, thu được cặn. Hòa tan cặn trong 10mL hỗn hợp đệm acetat – methanol (20 – 80) thu được dịch A3, lọc qua màng lọc 0,45µm, tiêm sắc ký

Kết quả: Diện tích pic dung dịch chuẩn: $S_c = 2179742$

Bảng 3. 11. Kết quả định lượng TTX trong trứng cá nóc tro

Mẫu	Lượng mẫu (g)	S_t	Hàm lượng TTX (µg/g)	Trung bình (µg/g)
1	5,89	21123042	463,46	463,76 (RSD = 0,66%)
		21283462	466,97	
		21004557	460,86	
2	6,23	23447603	486,38	486,50 (RSD = 0,65%)
		23608846	489,73	
		23304009	483,40	
3	5,93	21094029	459,70	458,90 (RSD = 0,70%)
		21184072	461,66	
		20894713	455,35	
Trung bình				469,72

e. Mẫu gan cá nóc vằn (*T. oblongus*) được thu bắt vào tháng 3/2012

- Dung dịch chuẩn: TTX nồng độ 5µg/mL

- Dung dịch thử: dịch chiết A2 được cô cạn qua máy cất quay, thu được cặn. Hòa tan cặn trong 10mL hỗn hợp đệm acetat – methanol (20 – 80) thu được dịch A3, lọc qua màng lọc 0,45µm, tiêm sắc ký

Kết quả: Diện tích pic dung dịch chuẩn: $S_c = 1110593$

Bảng 3. 12. Kết quả định lượng TTX trong gan cá nóc vằn

Mẫu	Lượng mẫu (g)	S_t	Hàm lượng TTX (µg/g)	Trung bình (µg/g)
1	5,68	1148057	12,82	12,85 (RSD = 0,74%)
		1144799	12,78	
		1160932	12,96	
2	5,93	1310947	14,02	14,20 (RSD = 1,21%)
		1330878	14,23	
		1342794	14,36	
3	5,45	1440832	16,76	16,84 (RSD = 0,43%)
		1449083	16,86	
		1452905	16,90	
Trung bình				14,63

f. Mẫu trứng cá nóc vằn (*T. oblongus*) được thu bắt vào tháng 3/2012

- Dung dịch chuẩn: TTX nồng độ 5µg/mL

- Dung dịch thử: dịch chiết A2 được cô cạn qua máy cất quay, thu được cặn. Hòa tan cặn trong 100mL hỗn hợp đệm acetat – methanol (20 – 80) thu được dịch A3, lọc qua màng lọc 0,45µm, tiêm sắc ký

Kết quả: Diện tích pic dung dịch chuẩn: $S_c = 1110593$

Bảng 3. 13. Kết quả định lượng TTX trong trứng cá nóc vằn

Mẫu	Lượng mẫu (g)	S_t	Hàm lượng TTX (µg/g)	Trung bình (µg/g)
1	5,90	1508723	162,15	161,22 (RSD = 1,13%)
		1480482	159,11	
		1510937	162,39	
2	5,84	1459732	158,50	159,73 (RSD = 0,79%)
		1470485	159,66	
		1483040	161,03	
3	6,07	1708405	178,47	176,66 (RSD = 0,89%)
		1680759	175,58	
		1684006	175,92	
Trung bình				165,87

Bảng 3. 14. Hàm lượng TTX trong gan, trứng của một số loài cá nóc

TT	Loài	Hàm lượng TTX trung bình (µg/g)		Thời điểm thu mẫu
		Gan	Trứng	
1	Cá nóc chuột vân bụng (<i>Arothron Hispidus</i>)	13,68	361,12	8/2012
2	Cá nóc tro (<i>Lagocephalus Lunaris</i>)	127,05	469,72	8/2013
3	Cá nóc vằn (<i>Takifugu Oblongus</i>)	14,63	165,87	3/2013

Từ các kết quả trên, có thể thấy, hàm lượng TTX trong các loài khác nhau là khác nhau, không phải bộ phận nào cũng chứa hàm lượng TTX như nhau, đặc biệt là trong trứng cá nóc nhiều TTX nhất.

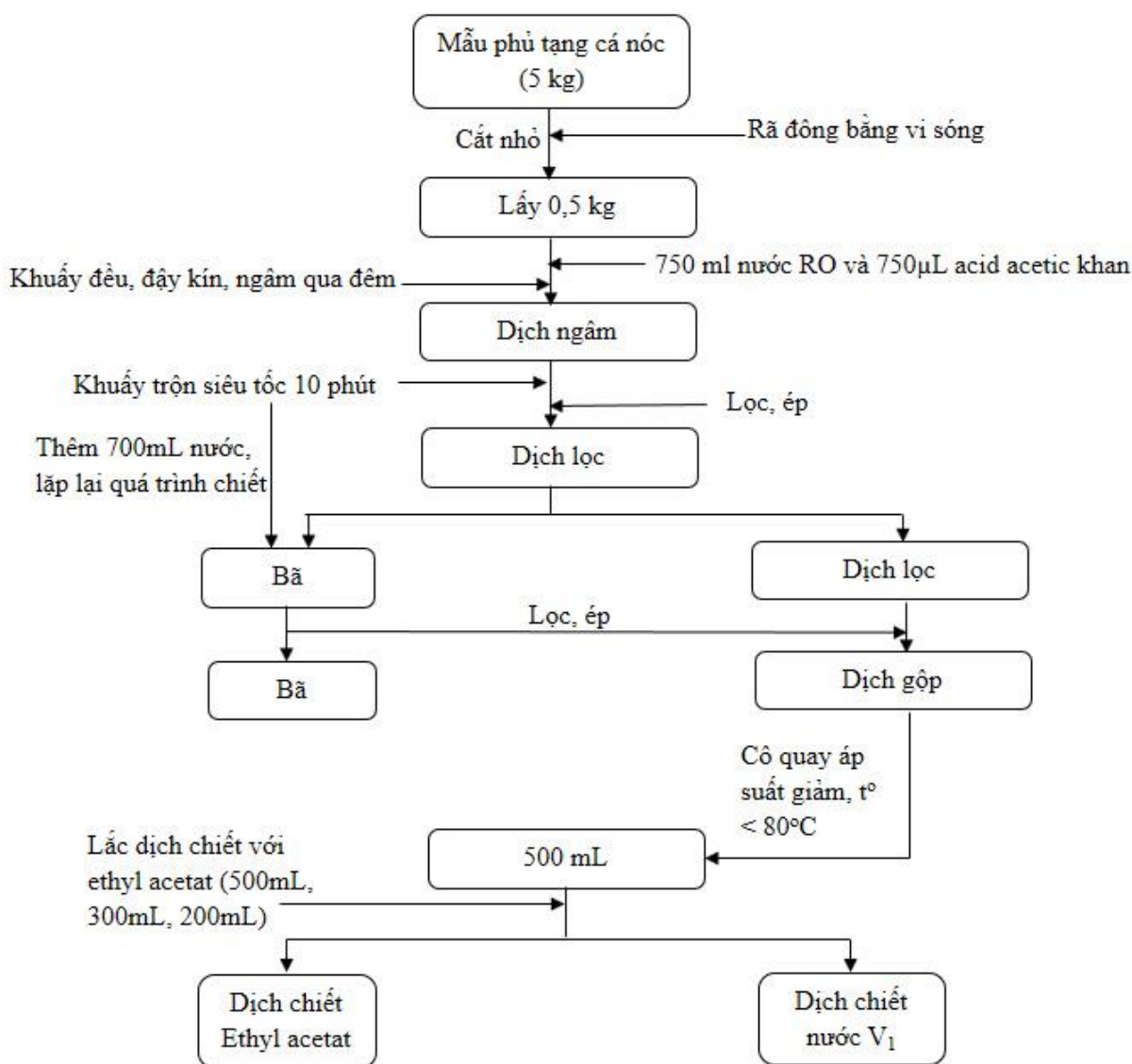
3.3. NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC, PHÂN LẬP TETRODOTOXIN VÀ CÁC DẪN CHẤT TỪ MỘT SỐ LOÀI CÁ NÓC

3.3.1. Phát hiện tetrodotoxin và nhóm chất tương tự tetrodotoxin (TTXs) từ một số loài cá nóc độc

Kết quả thử nghiệm trên chuột nhắt trắng cho thấy 10 loài cá thu thập đều có độc với mức độ khác nhau, có khả năng các loài này đều có chứa TTX hoặc các chất tương tự TTX (*TTX analogues*, ký hiệu TTXs).

Quy trình chiết xuất TTX và các dẫn chất

Phủ tạng cá nóc (trứng, gan, ruột, khoảng 5 kg) được rửa đông trong lò vi sóng, cắt nhỏ, cho khoảng 0,5 kg cho vào các cốc có mỏ 1.000mL. Thêm 750 mL nước khử ion và 750 µL *acid acetic* khan; khuấy đều, đậy kín, ngâm qua đêm. Khởi động thiết bị khuấy trộn và khuấy hỗn hợp trong 10 phút ở nhiệt độ phòng. Lọc và ép, thu lấy dịch lọc trong màu vàng. Thêm 700 mL nước khử ion vào cốc có mỏ và lặp lại quá trình như mô tả ở trên. Gộp các dịch lọc ngâm chiết, cất quay loại nước dưới áp suất giảm và nhiệt độ không quá 80°C đến còn khoảng 500 ml. Làm lạnh, lọc, ly tâm lấy dịch. Dịch thu được đem lắc với *dichloro methan* loại để loại lipid và trung tính hóa với dung dịch *natri hydroxyd* tới pH 6,5. Chuyển toàn bộ 500 ml dịch chiết vào bình gạn 2 L, lắc dịch chiết với *ethyl acetat* 3 lần (500 mL, 300 mL và 200 ml), dịch gộp *ethyl acetat* được cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm tới cạn (cạn E). Phần dịch nước (V_1) tiếp tục được xử lý bằng sắc ký cột. TTX trong dịch chiết này được định tính và định lượng bằng sắc ký lỏng khối phổ. Quy trình tóm tắt qua sơ đồ hình 3.13



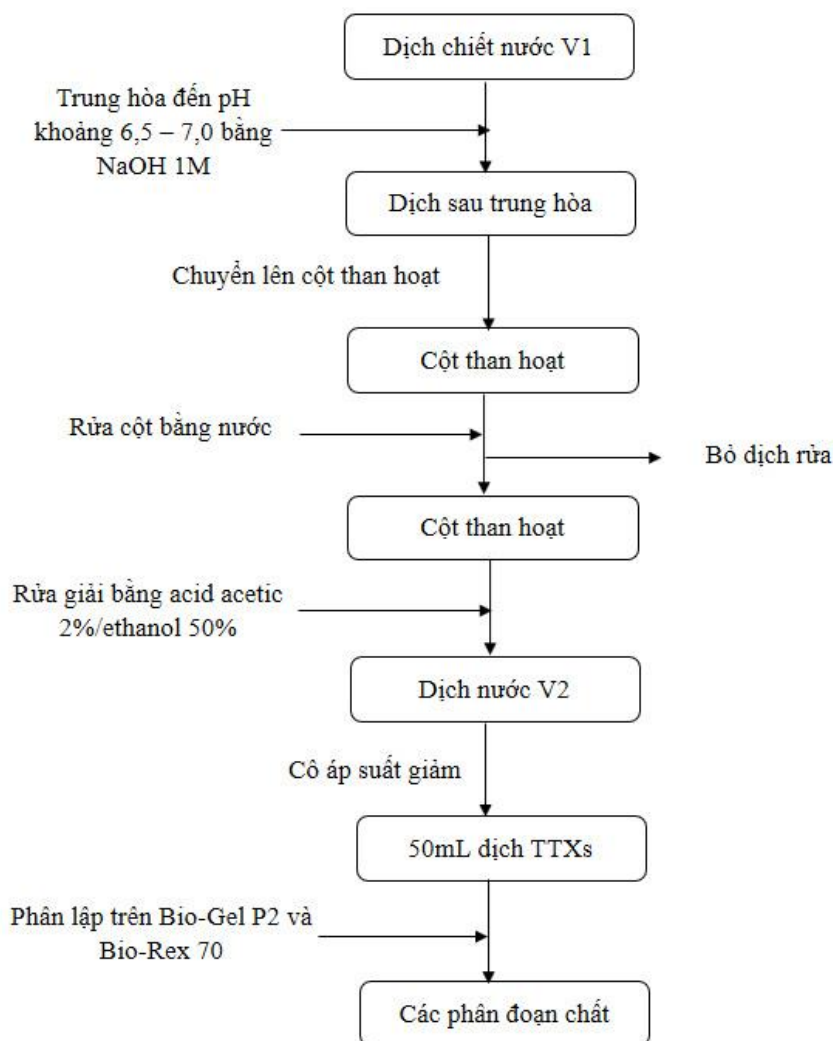
Hình 3. 13. Sơ đồ quy trình chiết TTX và các chất tương tự

Làm giàu và phân lập TTX và các dẫn chất

Từ dịch chiết V_1 , trung hòa đến pH khoảng 6,5 – 7,0 bằng dung dịch $NaOH$ 1M. Chuyển toàn bộ dịch đã trung hòa lên cột than hoạt tính đã được cân bằng và thấm ẩm với nước. Sau khi đã chảy hết và rửa sạch cột với nước, hỗn hợp TTXs được rửa giải bằng dung dịch *acid acetic* 2% pha trong ethanol 50% (phân đoạn V_2) và dung dịch *acid acetic* 5% trong nước (phân đoạn V_3). Dịch chiết V_2 được cô đặc bằng cát quay đến 50 ml, thu được dịch chiết toàn phần (TTXs). TTX trong phần dịch này được định tính và định lượng bằng sắc ký lỏng khối phổ.

Dịch chiết V_2 được chuyển lên cột trao đổi cation *Bio-Gel P2* và *Bio-Rex 70* đã được hoạt hóa và cân bằng với nước. Rửa giải chất bằng dung dịch *acid acetic* theo chương

trình gradient nồng độ từ 0,1 M đến 0,5 M, thu được các phân đoạn chất, bay hơi dung môi, đo phổ khối. Quy trình tóm tắt qua sơ đồ hình 3.14

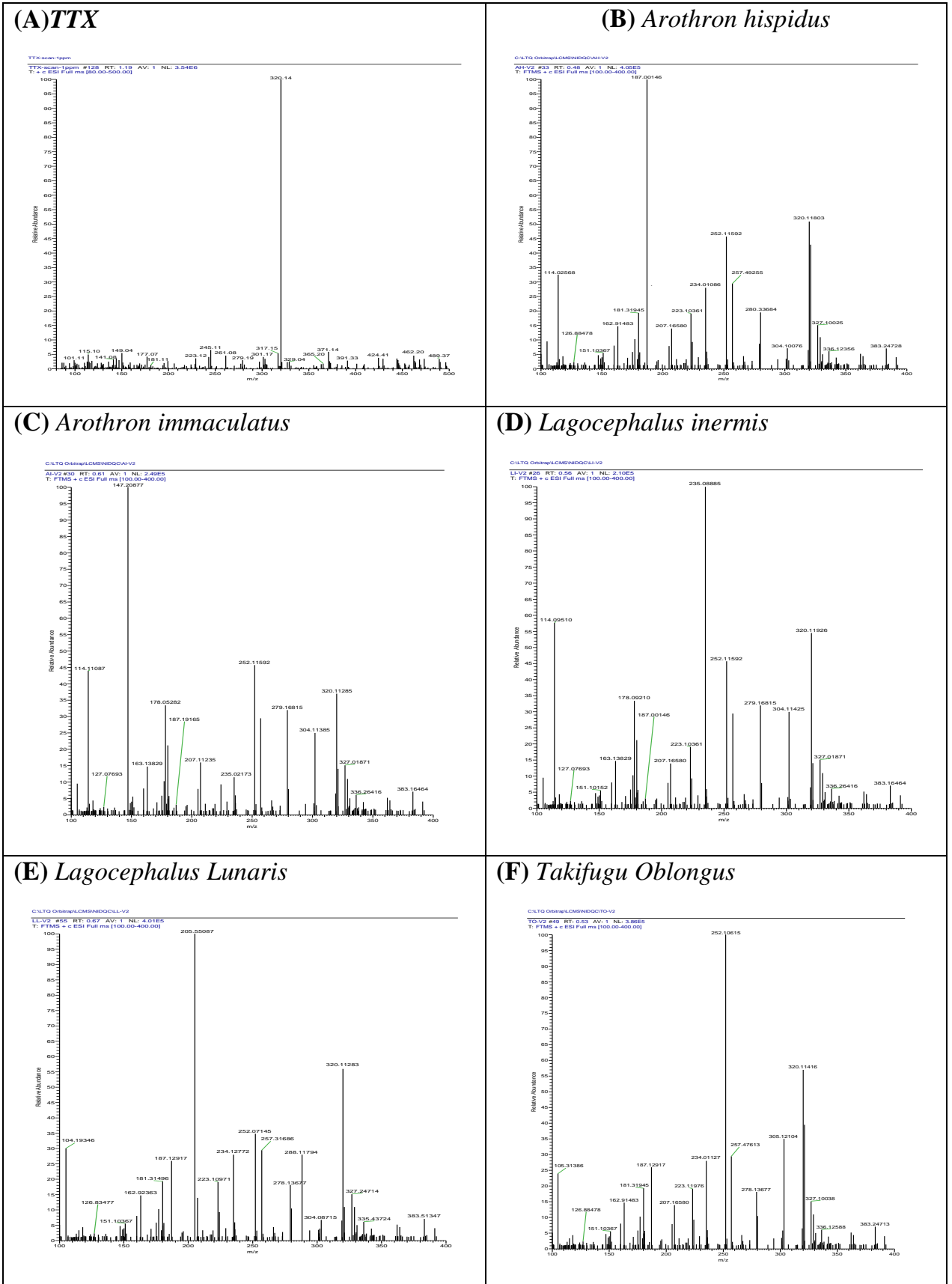


Hình 3. 14. Sơ đồ quy trình làm giàu và phân lập nhóm chất TTX và các dẫn chất

Kết quả định tính dịch chiết V2 của 5 loài:

- (1) *Arothron hispidus* (cá nóc chuột vằn bụng),
- (2) *Arothron immaculatus* (cá nóc viền đuôi đen),
- (3) *Lagocephalus inermis* (cá nóc răng mỏ chim),
- (4) *Lagocephalus lunaris* (cá nóc tro),
- (5) *Takifugu oblongus* (cá nóc vằn).

Bằng phổ khối ESI-MS đều cho thấy dịch chiết V2 của các loài cá nóc này cho mảnh khối $[M+H]^+$ m/z 320 của TTX và một số mảnh 288, 304 với tín hiệu cao, như vậy các loài cá này đều có chứa độc tố TTX và có khả năng chứa các độc tố khác là những chất TTXs



Hình 3. 15. Phổ khối ESI-MS của mẫu chuẩn TTX 1 $\mu\text{g/ml}$ (A) và của dịch chiết phân đoạn V2 của 5 loài cá nóc độc (B, C, D, E và F)

Kết quả định tính và định lượng bằng LC MS trên thiết bị cho thấy 3 loài cá (01) cá chuột vân bụng *Arothron hispidus*, (02) cá nóc tro (*Lagocephalus lunaris*) và (03) cá nóc vằn *Takifugu oblongus*, đều có chứa TTX với hàm lượng khác nhau (**mục 3.3**).

Kết quả khảo sát này định hướng cho việc phân lập TTX, các TTXs cũng như giúp cho việc lựa chọn nguyên liệu để chiết xuất, tinh chế TTX để thiết lập chất chuẩn TTX:

- Để thiết lập chất chuẩn chất đối chiếu TTX, chúng tôi có thể sử dụng bất cứ loài nào trong 10 loài cá trên.

- Để nghiên cứu chiết xuất phân lập các chất TTXs, chúng tôi chọn 5 loài:

- + *Arothron hispidus* (cá nóc chuột vân bụng),
- + *Arothron immaculatus* (cá nóc viền đuôi đen),
- + *Lagocephalus inermis* (cá nóc răng mỏ chim),
- + *Lagocephalus lunaris* (cá nóc tro),
- + *Takifugu oblongus* (cá nóc vằn).

3.3.2. Xây dựng quy trình phân lập tetrodotoxin và một số độc tố thần kinh từ một số loài cá nóc

Từ phân đoạn V_2 của 5 loài cá nóc độc, phân lập theo hướng độc tố của TTX bằng sắc ký cột trao đổi cation (sử dụng *Bio-Gel P2* và *Bio-Rex 70*) thu được 11 cặn, được ký hiệu theo viết tắt của loài, và thứ tự rửa giải thu được (**bảng 3.15**)

Bảng 3. 15. Ký hiệu của các phân đoạn chất phân lập ra từ 05 loài cá nóc độc

Loài	<i>Arothron hispidus</i>	<i>Arothron immaculatus</i>	<i>Lagocephalus inermis</i>	<i>Lagocephalus lunaris</i>	<i>Takifugu oblongus</i>
Ký hiệu phân đoạn chất phân lập được	AHW1 AHW2	AIW1 AIW2	LIW1 LIW2	LLW1 LLW2	TOW1 TOW2 TOW3

Kết quả phân tích NMR và MS của 11 chất phân lập được, được nêu chi tiết trong mục xác định cấu trúc

3.3.3. Phân tích xác định cấu trúc các độc tố phân lập được từ 5 loài cá nóc

Dữ liệu đo phổ NMR ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$) và phổ khối phân giải cao (HR FTICR MS) của 11 chất chiết ra được ghi trong **bảng 3.16**, từ dữ liệu phổ này cho thấy chỉ có 4 chất có phổ khác nhau, còn lại 8 chất, trong đó có 2 nhóm, một nhóm có 5 phổ giống nhau và một nhóm có 3 phổ giống nhau. Như vậy, thực tế chỉ thu được 6 chất, ký hiệu là **TTX1, TTX2, TTX3, TTX4, TTX5** và **TTX6**

Bảng 3. 16. Dữ liệu phổ của TTX và 5 chất phân lập được

	TTX1 (AHW1, AIW1, LLW2, TOW1, LIW2)		TTX2 (AHW2, TOW2)	
C	δ_H (mult., <i>J</i> in Hz)	δ_C	δ_H (mult., <i>J</i> in Hz)	δ_C
2	-	154,1	-	156,1
4	5,40 (1H, d, 9,5)	72,6	5,47 (1H, d, 9,5)	74,8
4a	2,25 (1H, d, 9,5)	38,1	2,02 (1H, overlap)	40,2
5	4,15 (1H, s)	71,3	4,32 (1H, s)	74,9
6	-	68,9	-	72,3
7	3,98 (1H, s)	77,1	4,10 (1H, s)	82,1
8	4,19 (1H, s)	70,2	4,15 (1H, s)	73,1
8a	-	57,2	-	59,2
9	3,85 (1H, s)	68,3	4,02 (1H, s)	70,5
10	-	108,3	-	110,4
11	3,93 (2H, d, 11,0)	63,0	3,75 (2H, d, 11,0)	65,2
	HR-ESI-MS: m/z 320,1087 [M + H] ⁺ (calcd, for C ₁₁ H ₁₈ N ₃ O ₈ , 320,1094)		HR-ESI-MS: m/z 320,1087 [M + H] ⁺ (calcd, for C ₁₁ H ₁₈ N ₃ O ₈ , 320,1094)	
	TTX3 (TOW3)		TTX4 (AIW2)	
C	δ_H (mult., <i>J</i> in Hz)	δ_C	δ_H (mult., <i>J</i> in Hz)	δ_C
2	-	156,4	-	156,5
4	5,22 (1H, d, 9,4)	77,6	5,44 (1H, d, 9,5)	74,9
4a	2,30 (1H, m)	42,5	1,97 (1H, d, 9,5)	46,1
5	2,01 and 1,25 (each 1H, m)	29,7	4,50 (1H, s)	71,5
6	-	77,0	1,88 (1H, m)	43,2
7	4,62 (1H, s)	82,6	4,24 (1H, s)	78,5
8	4,43 (1H, s)	71,3	4,05 (1H, s)	76,2
8a	-	61,4	-	60,6
9	4,65 (1H, s)	72,7	3,92 (1H, s)	71,0
10	-	176,6	-	110,4
11	3,51 (1H, d, 11,0) 3,72 (1H, d, 11,0)	67,0	3,99 (1H, dd, 11,0, 7,5), 3,85 (1H, dd, 11,0, 7,0)	62,0
	HR-ESI-MS: m/z 305,1211 [M + H] ⁺ (calcd, for C ₁₁ H ₁₉ N ₃ O ₇ , 305,1217)		HR-ESI-MS: m/z 304,1140 [M + H] ⁺ (calcd, for C ₁₁ H ₁₈ N ₃ O ₇ , 304,1145)	
	TTX5 (LIW1)		TTX6 (LLW1)	
C	δ_H (mult., <i>J</i> in Hz)	δ_C	δ_H (mult., <i>J</i> in Hz)	δ_C
2	-	156,2	-	156,4
4	5,48 (1H, d, 9,5)	74,9	5,49 (1H, d, 9,5)	75,1
4a	2,25 (1H, m)	40,4	1,93 (1H, m)	45,9
5	4,10 (1H, s)	77,2	4,25 (1H, s)	75,6
6	-	69,2	1,82 (1H, m)	35,4
7	3,96 (1H, s)	83,5	4,12 (1H, s)	82,6
8	4,27 (1H, s)	72,8	4,04 (1H, s)	76,3
8a	-	59,6	-	60,0
9	4,00 (1H, s)	70,6	3,96 (1H, s)	71,2
10	-	110,4	-	110,1
11	1,68 (3H, br s)	25,8	1,32 (1H, d, 6,5)	15,5
	HR-ESI-MS: m/z 304,1140 [M + H] ⁺ (calcd, for C ₁₁ H ₁₈ N ₃ O ₇ , 304,1145)		HR-ESI-MS: m/z 288,1189 [M + H] ⁺ (calcd, for C ₁₁ H ₁₈ N ₃ O ₆ , 288,1196)	

Tiến hành giải phổ NMR thu được để định danh các chất thu được.

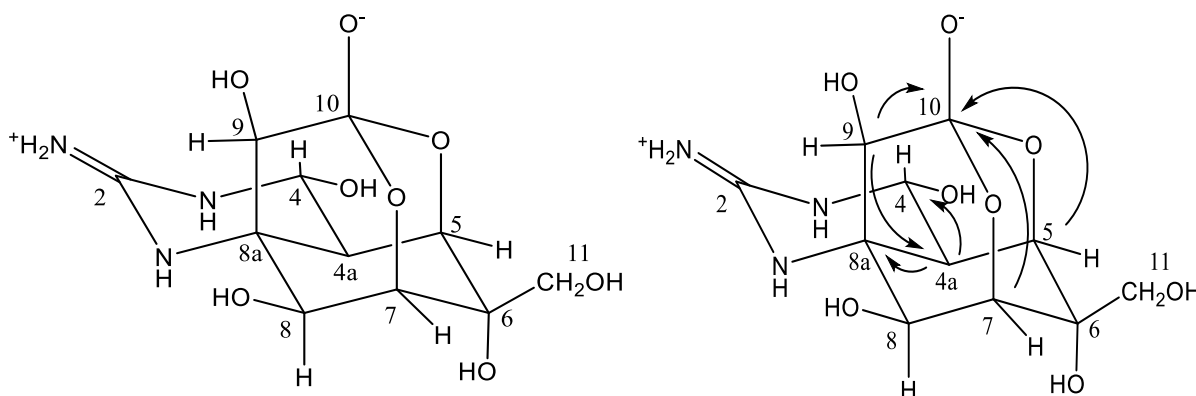
Hợp chất TTX1 (thu được từ các phân đoạn AHW1, AIW1, LLW2, TOW1, LIW2)

Phổ khối lượng phân giải cao HR ESI MS của hợp chất TTX1 có pic ion $[M + H]^+$ $m/z = 320,1087$ cho phép xác định hợp chất này có khối lượng phân tử 319 và công thức phân tử dự đoán là $C_{11}H_{17}N_3O_8$.

Phổ 1H -NMR xuất hiện 3 tín hiệu doublet tại δ 2,25 (1H; d; $J = 9,5$ Hz; H-4a); 3,93 (2H; d; $J = 11,0$ Hz; H-11); 5,40 (1H; d; $J = 9,5$ Hz) cùng với 4 singlet tại δ 3,85 (1H; s; H-9); 3,88 (1H; s; H-7); 4,15 (1H; s; H-5); 4,19 (1H; s; H-8)

Trên phổ ^{13}C -NMR và DEPT của TTX1 cho thấy sự xuất hiện của 11 vạch tín hiệu gồm 1 nhóm CH_2 tại δ_C 63,0 (C-11); 6 nhóm CH [δ_C 72,6 (C-4); 38,1 (C-4a); 71,3 (C-5); 77,1 (C-7); 70,2 (C-8); 68,3 (C-9)] và 4 nhóm C bậc 4 [δ_C 154,1 (C-1); 68,9 (C-6); 57,2 (C-8a); 108,3 (C-10)]

Các phân tích trên phổ 2 chiều HSQC cho phép gán tín hiệu proton và carbon tương ứng (Bảng 3.16). Tương tác dị hạt nhân HMBC cho thấy H-4a (δ 2,25) với C-8a (δ 57,2), C-6 (68,9) và C-4 (72,4); giữa H-7 (δ 3,98), H-9 (δ 3,85) và H-5 (δ 71,5) với C-10 (δ 108,3). Những dữ kiện phổ trên cho thấy sự phù hợp với số liệu phổ đã công bố của hợp chất tetrodotoxin (TTX) đã công bố trước đó. **Như vậy hợp chất TTX1 được xác định chính là TTX**, một hợp chất có mặt khá phổ biến trong các loài cá nóc độc.



Hình 3. 16. Cấu trúc của TTX1 và các tương tác HMBC chính

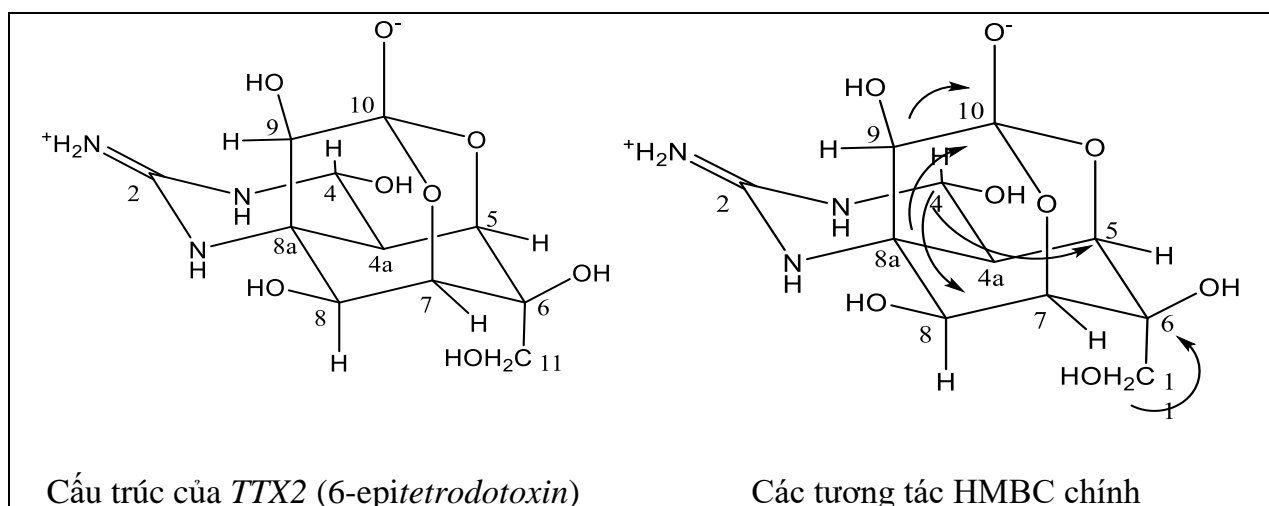
Hợp chất *TTX2* (thu được từ phân đoạn chất *AHW2* và *TOW2*)

Hợp chất *TTX2* cũng được xác định có khối lượng phân tử 319 và công thức phân tử là $C_{11}H_{17}N_3O_8$ dựa vào phổ khối lượng phân giải cao với pic ion tại m/z 320,1092 $[M + H]^+$.

Phổ 1H -NMR xuất hiện 2 tín hiệu doublet tại δ 3,75 (2H, d, $J = 11,0$ Hz, H-11), 5,47 (1H, d, $J = 9,5$ Hz) cùng với 4 singlet tại δ 4,02 (1H, s, H-9), 4,10 (1H, s, H-7), 4,32 (1H, s, H-5), 4,15 (1H, s, H-8).

Trên phổ ^{13}C -NMR của *TTX2* cho thấy sự xuất hiện của 11 vạch tín hiệu. Các phân tích trên phổ 2 chiều HSQC cho phép gán tín hiệu proton và carbon tương ứng, từ đó xác định được sự có mặt của 1 nhóm CH_2 tại δ_C 65,2 (C-11), 6 nhóm CH [δ_C 74,8 (C-4), 38,1 (C-4a), 74,9 (C-5), 82,1 (C-7), 73,1 (C-8), 70,5 (C-9)] và 4 nhóm C bậc 4 [δ_C 156,1 (C-1), 72,3 (C-6), 59,2 (C-8a), 110,4 (C-10)].

Số liệu phổ này có sự tương đồng với số liệu phổ của hợp chất *TTX* ngoại trừ sự khác biệt lớn ở vị trí các vị trí C-5 đến C-8 cho phép dự đoán có sự khác nhau về cấu hình trong cấu trúc của 2 chất. So sánh với các số liệu đã công bố [171] cho thấy số liệu phổ của *TTX2* hoàn toàn trùng khớp với hợp chất *6-epitetrodotoxin*. **Như vậy, hợp chất *TTX2* được xác định là *6-epitetrodotoxin***



Hình 3. 17. Cấu trúc và tương tác HMBC của *TTX2*

Hợp chất TTX3 (thu được từ phân đoạn chất TOW3)

Phổ khối lượng HR ESI MS có pic ion tại m/z 305.1211 $[M + H]^+$ cho phép xác định hợp chất này có khối lượng phân tử 304 và công thức phân tử là $C_{11}H_{17}N_3O_7$.

Phổ 1H -NMR của *TTX3* xuất hiện 3 tín hiệu doublet tại δ 3,51 và 3,72 (each 1H; d; $J = 11,0$ Hz; H-11); và 5,22 (1H; d; $J = 9,4$ Hz) cùng với 4 singlet tại δ 4,65 (1H; s; H-9); 4,62 (1H; s; H-7); 4,43 (1H; s; H-8).

Phổ ^{13}C -NMR của *TTX3* có các tín hiệu rất giống với phổ của *TTX2* ngoại trừ sự xuất hiện của tín hiệu tại δ 176,6 và 29,7. Phổ HSQC cho phép xác định tín hiệu 176,6 là nhóm C bậc 4 còn tín hiệu 29,7 là CH_2 .

Phổ HMBC cho thấy tương tác giữa H-5 (δ 2,00 và 1,25) với C-8a (δ 61,4), C-11 (67,0) và C-4 (77,6) chứng tỏ nhóm OH tại vị trí C-5 đã bị mất đi trong cấu trúc của *TTX3* so với *TTX1*. **Như vậy có thể khẳng định hợp chất *TTX3* là 5-deoxyTetrodotoxin** và số liệu phổ thu được hoàn toàn trùng khớp với nghiên cứu của Yotsu-Yamashita [176]. Đây là lần đầu tiên hợp chất này được phân lập từ loài cá nóc *Takifugu oblongus* ở biển Việt Nam.

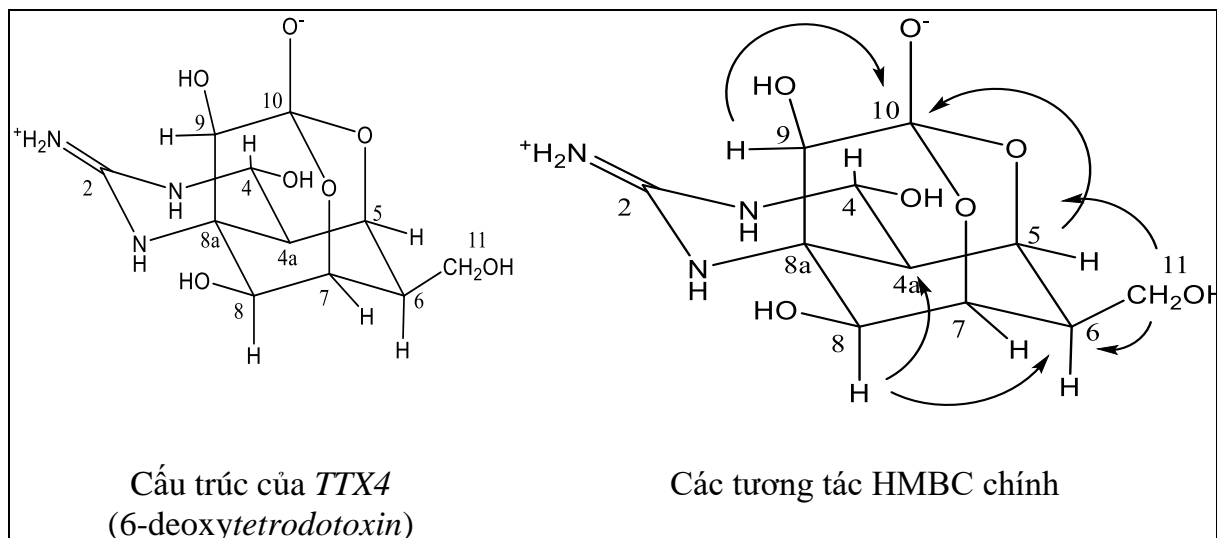
Hợp chất TTX4 (thu từ phân đoạn chất AIW2)

Hợp chất *TTX4* được xác định có khối lượng phân tử 303 và công thức phân tử là $C_{11}H_{17}N_3O_7$ dựa vào phổ khối lượng phân giải cao với pic ion tại m/z 304,1140 $[M+H]^+$.

Phổ 1H - và ^{13}C -NMR của AIW2 có những tín hiệu tương đồng với phổ của hợp chất *TTX1*. Trên phổ 1H -NMR cũng xuất hiện tín hiệu doublet tại δ 5,44 (1H, d, $J = 9,5$ Hz) cùng với 4 singlet tại δ 3,92 (1H, s, H-9), 4,05 (1H, s, H-8), 4,24 (1H, s, H-7), 4,50 (1H, s, H-5). Ngoài ra còn có các tín hiệu tại vùng trường cao δ 1,88 và 1,97.

Trên phổ ^{13}C -NMR của *TTX4* cho thấy sự xuất hiện của 11 vạch tín hiệu. Các phân tích trên phổ 2 chiều HSQC cho phép gán tín hiệu proton và carbon tương ứng, từ đó xác định được sự xuất hiện một nhóm metin tại δ 43,2 thay vì nhóm C bậc 4 tại δ 68,9 như của hợp chất *TTX4*. Phân tích chi tiết phổ HMBC cho thấy có sự tương tác từ proton H-11 (δ 3,99 và 3,85) đến vị trí 43,2 này. Dữ kiện này cho phép dự đoán nhóm OH tại vị

trí C-6 đã bị mất đi, điều này hoàn toàn phù hợp với số liệu phổ khối lượng có sự chênh lệch 16 đơn vị giữa 2 chất *TTX4* và *TTX1*. **Như vậy, có thể khẳng định hợp chất *TTX4* là 6-deoxytetrodotoxin** và số liệu phổ thu được hoàn toàn trùng khớp với nghiên cứu của Kudo [83]



Hình 3. 18. Cấu trúc và tương tác HMBC của *TTX4*

Hợp chất *TTX5* (thu được từ phân đoạn chất *LIW1*)

Hợp chất *TTX5* được xác định có khối lượng phân tử 303 và công thức phân tử là $C_{11}H_{17}N_3O_7$ dựa vào phổ khối lượng phân giải cao với pic ion tại m/z 304,1140 $[M+H]^+$.

Phổ 1H - và ^{13}C -NMR của *TTX5* có những tín hiệu tương đồng với phổ của hợp chất *TTX1*. Trên phổ 1H -NMR cũng xuất hiện tín hiệu doublet tại δ 5,48 (1H, d, $J = 9,5$ Hz, H-4) cùng với 4 singlet tại δ 3,96 (1H, s, H-7), 4,00 (1H, s, H-9), 4,10 (1H, s, H-5), 4,27 (1H, s, H-8). Ngoài ra còn xuất hiện thêm 1 tín hiệu nhóm CH_3 tại δ 1,68 (3H, br s, H-11).

Trên phổ ^{13}C -NMR của *TTX5* cho thấy sự xuất hiện của 11 vạch tín hiệu. Các phân tích trên phổ 2 chiều HSQC cho phép gán tín hiệu proton và carbon tương ứng, từ đó xác định được sự xuất hiện một nhóm CH_3 tại δ 25.8 thay vì nhóm CH_2 tại δ 63.0 như của hợp chất *TTX4*. Dữ kiện này cho phép dự đoán nhóm OH tại vị trí C-11 đã bị mất đi để tạo thành nhóm CH_3 , điều này cũng hoàn toàn phù hợp với số liệu phổ khối lượng có sự chênh lệch 16 đơn vị giữa 2 chất *TTX5* và *TTX1*. **Như vậy có thể kết luận *LIW1* là hợp chất 11-deoxytetrodotoxin**, phù hợp với tài liệu đã công bố [171].

Hợp chất TTX6 (thu được từ phân đoạn chất LLW1)

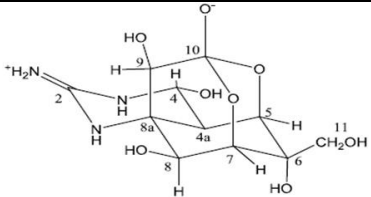
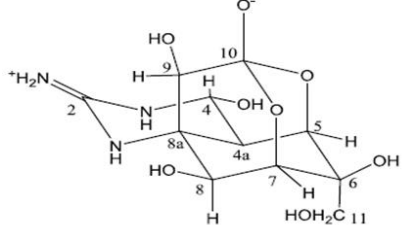
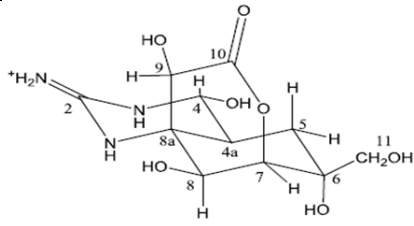
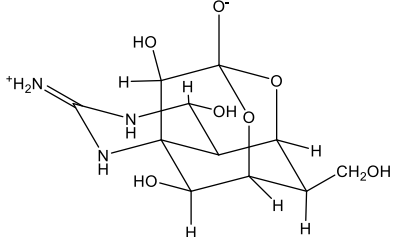
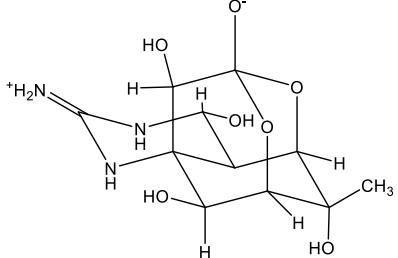
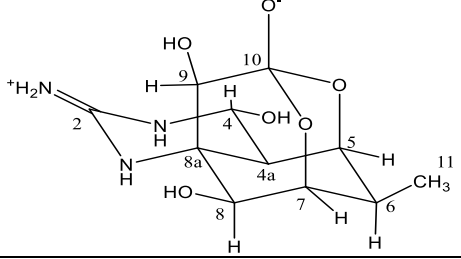
Phổ ^1H - và ^{13}C -NMR của *TTX6* có những tín hiệu đặc trưng của lớp chất *tetrodotoxin* đã phân lập từ các loài cá nóc. Trên phổ ^1H -NMR cũng xuất hiện tín hiệu doublet tại δ 5,48 (1H, d, $J = 9,5$ Hz) đặc trưng của proton H-4, cùng 4 tín hiệu singlet tại δ 3,95 (1H, s, H-9), 4,04 (1H, s, H-8), 4,12 (1H, s, H-7), 4,25 (1H, s, H-5). Ngoài ra còn xuất hiện thêm 1 tín hiệu nhóm CH_3 tại δ 1,32 (3H, br d, $J = 6,5$ Hz, H-11).

Trên phổ ^{13}C -NMR của *TTX6* cho thấy sự xuất hiện của 11 vạch tín hiệu phù hợp với cấu trúc của lớp chất là dẫn xuất của *tetrodotoxin*. Các phân tích trên phổ 2 chiều HSQC cho phép gán tín hiệu proton và carbon tương ứng, từ đó xác định được sự xuất hiện một nhóm metin tại δ 35,4 thay vì nhóm C bậc 4 tại δ 68,9 như của hợp chất *TTX1*. Điều này gợi ý hợp chất này bị mất nhóm OH tại vị trí C-6 giống trường hợp của hợp chất *6-deoxytetrodotoxin (TTX4)*. Ngoài ra còn sự xuất hiện một nhóm CH_3 tại δ 15,6 thay vì nhóm CH_2 tại δ 63,0 như của hợp chất *TTX1*. Dữ kiện này cho phép dự đoán nhóm OH tại vị trí C-11 đã bị mất đi để tạo thành nhóm CH_3 tương tự trường hợp của hợp chất *11-deoxytetrodotoxin (TTX5)*. Các phân tích trên phổ hai chiều HMBC đã khẳng định vị trí mất nhóm OH là tại C-6 và C-11.

Những dữ liệu phổ NMR ở trên đã cho thấy hợp chất *TTX6* là dẫn xuất dideoxy hoá của *tetrodotoxin*, điều này cũng hoàn toàn phù hợp với số liệu phổ khối lượng có sự chênh lệch 23 đơn vị giữa 2 chất *TTX6* và *tetrodotoxin*. *TTX6* được xác định có khối lượng phân tử 287 và công thức phân tử là $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_6$ dựa vào phổ khối lượng phân giải cao với pic ion tại m/z 288,1189 $[\text{M} + \text{H}]^+$. Như vậy, có thể khẳng định hợp chất *TTX6* là *6,11-dideoxyTTX*, phù hợp với nghiên cứu của Jang [68].

Như vậy, qua giải phổ, từ phân đoạn V_2 của 05 loài cá nóc độc: (1) *Arothron hispidus* (cá nóc chuột vân bụng), (2) *Arothron immaculatus* (cá nóc viền đuôi đen), (3) *Lagocephalus inermis* (cá nóc răng mỏ chim), (4) *Lagocephalus lunaris* (cá nóc tro), (5) *Takifugu oblongus* (cá nóc vằn), đã phân lập được 6 hợp chất. Phân tích phổ NMR và HR ESI MS đã xác định các hợp chất phân lập được là *tetrodotoxin (TTX)* và 5 *TTXs*: *6-epitetrodotoxin*, *5-deoxytetrodotoxin*, *6-deoxytetrodotoxin*, *11-deoxytetrodotoxin* và *6,11-dideoxytetrodo-toxin* (xem bảng 3.17)

Bảng 3. 17. Các chất độc tetrodotoxin và tương tự tetrodotoxin được phân lập từ phủ tạng một số loài cá nóc độc

TT	PD chất	Tên chất	Công thức, M,	Cấu trúc
TTX1	AHW1 AIW1 LLW2 TOW1 LIW2	<i>Tetrodotoxin</i>	$C_{11}H_{17}N_3O_8$, M: 319,1	
TTX2	AHW2 TOW2	<i>6-epitetrodotoxin</i>	$C_{11}H_{17}N_3O_8$, M: 319,1	
TTX3	TOW3	<i>5-deoxytetrodotoxin</i>	$C_{11}H_{17}N_3O_7$, M: 303,1	
TTX4	AIW2	<i>6-deoxytetrodotoxin</i>	$C_{11}H_{17}N_3O_7$ M: 303,1	
TTX5	LIW1	<i>11-deoxytetrodotoxin</i>	$C_{11}H_{17}N_3O_7$ M: 303,1	
TTX6	LLW1	<i>6,11-dideoxytetrodotoxin</i>	$C_{11}H_{17}N_3O_6$ M: 287,1	

3.4. NGHIÊN CỨU CHIẾT XUẤT VÀ TINH CHẾ *TETRODOTOXIN* Ở QUY MÔ PHÒNG THÍ NGHIỆM ĐỂ LÀM NGUYÊN LIỆU THIẾT LẬP CHẤT CHUẨN

3.4.1. Nghiên cứu chiết xuất, phân lập *tetrodotoxin* thô

Bước 1. Chiết và làm giàu mẫu (dịch chiết toàn phần có chứa TTX)

Xử lý mẫu, ngâm, chiết và lọc: Phũ tạng cá nóc (trứng, gan, ruột, khoảng 10 kg) được rửa đông, cắt nhỏ, cho vào thùng chứa của thiết bị xay ngâm chiết. Thêm một lượng nước khoảng (20 L), thêm khoảng 30 - 60 ml dung dịch *acid acetic 10 %*. Khởi động hệ thống cánh khuấy của thiết bị, khuấy trong vòng 4 – 8 tiếng (hoặc qua đêm). Khởi động phần thiết bị xay thô, mở van để chuyển toàn lượng dịch và cá xuống phần xay thô, mẫu được nghiền và xay nát qua lưới, được chuyển tiếp xuống phần xay mịn, và được lọc qua lưới vào thùng đựng dung tích 100 L. Chuyển 15 - 20L nước và 30 - 60 ml dung dịch *acid acetic 10 %* vào thùng khuấy, mở van và khởi động máy xay. Thực hiện bước này thêm 1 lần nữa để chiết được tối đa độc tố. Phần bã cá nóc còn lại được xử lý theo quy định. Chuyển toàn bộ dịch chiết vào thiết bị cất quay dung tích 200 L, điều chỉnh để dịch ngâm được ngâm ở nhiệt độ 60 – 90°C (tốt nhất là 85 - 90°C) trong 10 – 20 phút, để làm kết tủa và loại bỏ protein.

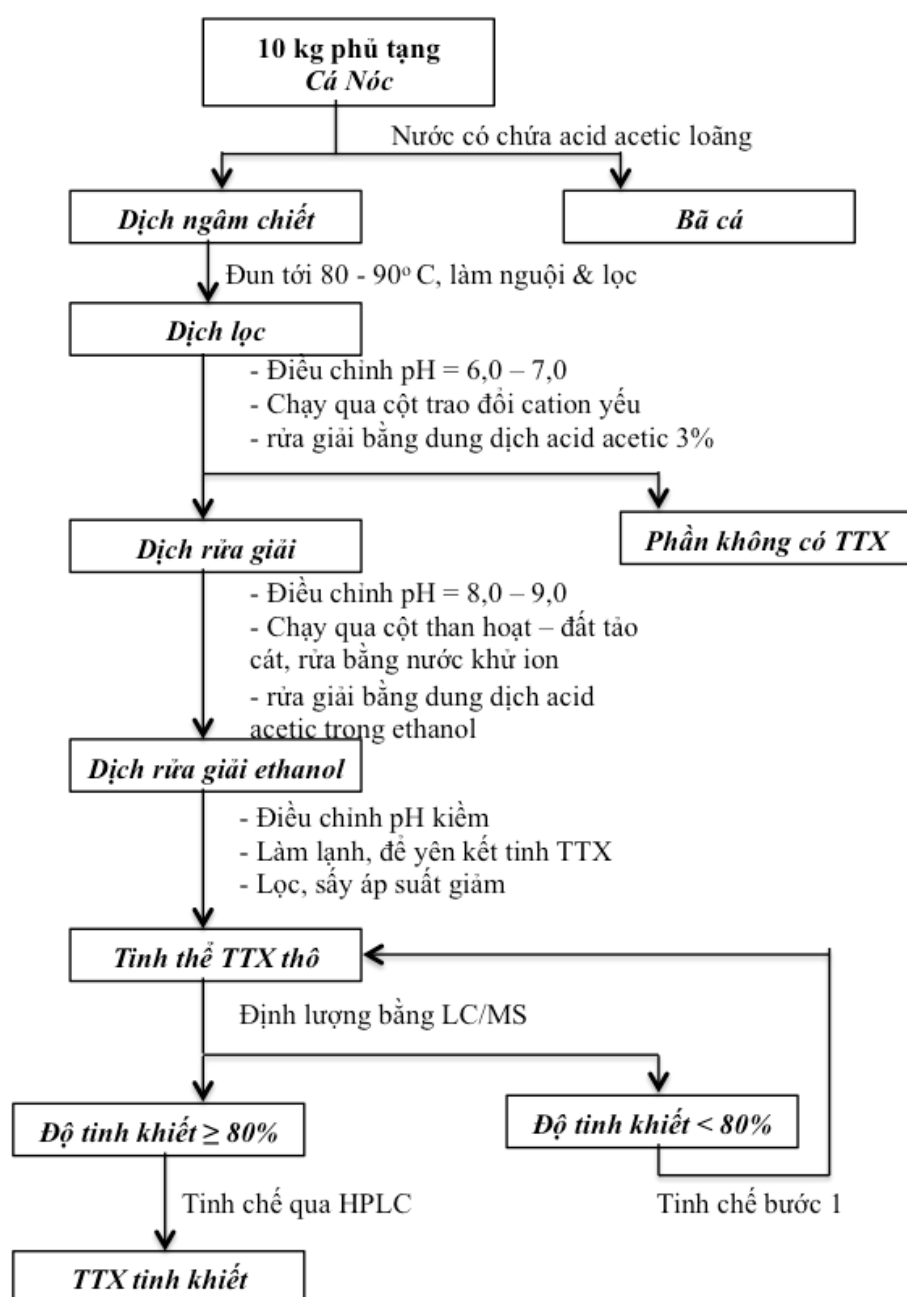
Sắc ký trao đổi ion thu dịch chiết toàn phần TTX: Điều chỉnh dịch ngâm tới pH 6,0 – 7,0 bằng dung dịch *NaOH 0,1 M*, cho dịch chạy qua cột trao đổi *cation acid yếu* để loại protein hoà tan và làm giàu độc tố. Rửa cột bằng nước khử ion đến khi không còn protein trong nước rửa. Rửa giải *TTX* bằng *acid acetic 3 %*. Điều chỉnh dịch rửa giải về pH 8-9 bằng *NaOH 0,1 M*, cho dịch lọc qua cột nhồi hỗn hợp than hoạt và đất tảo cát (*silica diatomaceous*) để loại muối vô cơ, muối acid amin kiềm. Cột được nhồi thành hai lớp, lớp *silica diatomaceous* ở trên lớp than hoạt và có độ dày bằng 1/10 tới 1/2 (tốt nhất là 1/10 tới 1/5) lớp than hoạt. Rửa cột bằng nước khử ion, sau đó rửa giải với dung dịch *acid acetic 2%* trong *ethanol*.

Bước 2. Tinh chế bằng kết tinh cho sản phẩm TTX thô.

Dịch rửa giải thu được được điều chỉnh đến pH kiềm (pH 9,0) bằng *ammoniac đặc*, làm lạnh, để yên kết tinh *TTX*, lọc, sấy dưới áp suất giảm đến khối lượng không đổi (khoảng 24 giờ). Định lượng *TTX* thô bằng phương pháp sắc ký lỏng khối phổ (LC MS).

Bước 3. Tinh chế TTX thô bằng sắc ký cột.

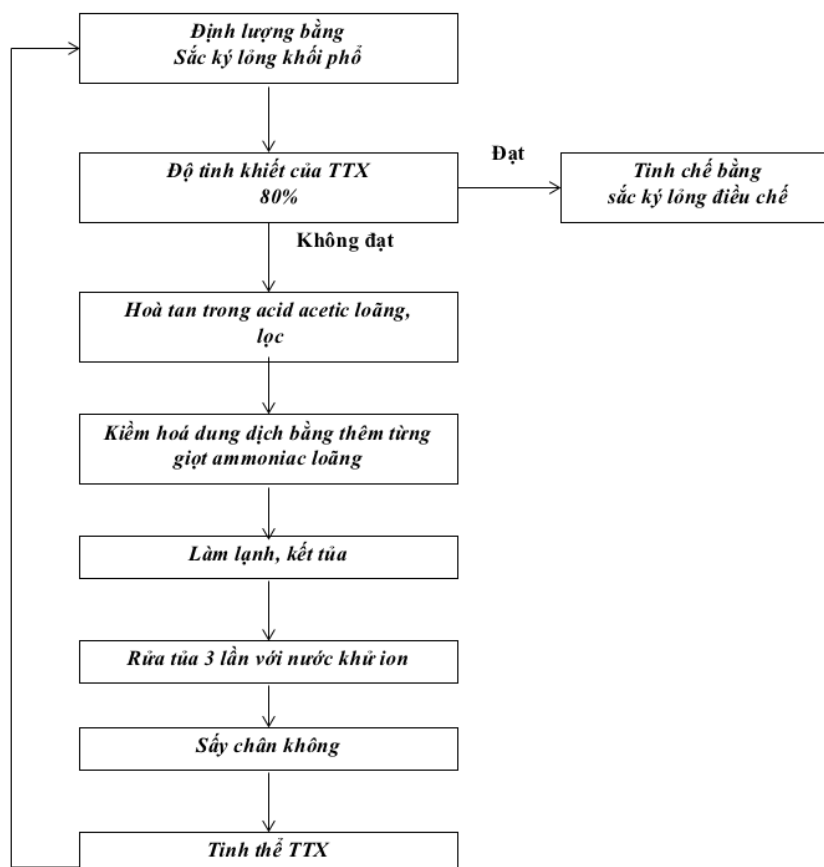
TTX thô được hòa tan trong dung dịch acid acetic 1 %. Chuyển dịch lên cột trao đổi cation *Bio-Gel P2* và *Bio-Rex 70* đã được hoạt hóa và cân bằng với nước. Rửa giải chất bằng dung dịch acetic 0,1 – 0,5 M. Gộp dịch rửa giải. Điều chỉnh pH bằng dung dịch ammoniac 10 % đến pH kiềm (pH = 9,0), tiếp tục làm lạnh, để lắng để kết tinh TTX. Rửa tủa kết tinh bằng nước khử ion vài lần và sấy tủa trong tủ sấy áp suất giảm thu được TTX thô



Hình 3. 19. Quy trình chiết xuất TTX

TTX thô chiết xuất qua giai đoạn này phải có hàm lượng $\geq 80\%$. Nếu sản phẩm không đạt hàm lượng theo yêu cầu, cần phải tiến hành sơ tinh chế.

Sơ tinh chế: Hòa tan lại tủa TTX trong dung dịch acid acetic 1%, trung hòa dung dịch bằng dung dịch ammoniac 10 % đến pH kiềm (pH =9,0), tiếp tục làm lạnh, để lắng để kết tinh TTX. Rửa tủa kết tinh bằng nước khử ion vài lần và sấy tủa trong tủ sấy áp suất giảm thu được tinh thể TTX.



Hình 3. 20. Quy trình sơ tinh chế

Từ 10 kg củ tằm cá nóc tươi, với quy trình chiết xuất, thu được từ 35 mg đến 55 mg TTX thô (hàm lượng TTX $\geq 80\%$, bảng 3.18)

Bảng 3. 18. Lượng TTX thu được và độ tinh khiết đạt được

STT	Khối lượng củ tằm (kg)	Lượng TTX thu được (mg)	Hàm lượng TTX (%)	Hiệu suất ($\mu\text{g TTX/g}$ củ tằm tươi)
Mê 01	10,3	47,13	83,27	4,6
Mê 02	10,8	35,55	81,19	3,3
Mê 03	10,6	55,17	84,44	5,2
	TB: 10,56	Tổng Lô NCI: 137,85 mg	TB: 82,97	TB: 4,36

Do nguyên liệu phủ tạng cá nóc được trộn lẫn từ nhiều loại cá, không được làm đồng nhất mẫu, hàm lượng *TTX* thay đổi theo cá thể, loài và bộ phận (ruột, gan, trứng), nên có sự khác nhau đáng kể về lượng *TTX* thu được qua 3 mẻ khảo sát.

Đây là nghiên cứu bước đầu, chúng tôi cũng không định lượng hàm lượng *TTX* trong mẫu trước khi chiết và sấy khô mẫu để tính kết quả theo lượng mẫu đã sấy khô. Tuy nhiên, đây cũng là quy mô *pilot* được thực hiện và thu được lượng *TTX* đủ lớn và có độ tinh khiết được xác định một cách chính xác ở Việt Nam. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã sử dụng hệ thống xay ngâm chiết phủ tạng cá nóc với quy mô thiết kế tới 20 kg/mẻ, có khả năng chiết tối đa *TTX*. Quá trình sắc ký trao đổi ion và loại tạp bằng than hoạt đã thu được *TTX* thô với hàm lượng *TTX* khá cao ($\geq 80\%$)

3.4.2. Tinh chế *tetrodotoxin* bằng sắc ký lỏng điều chế

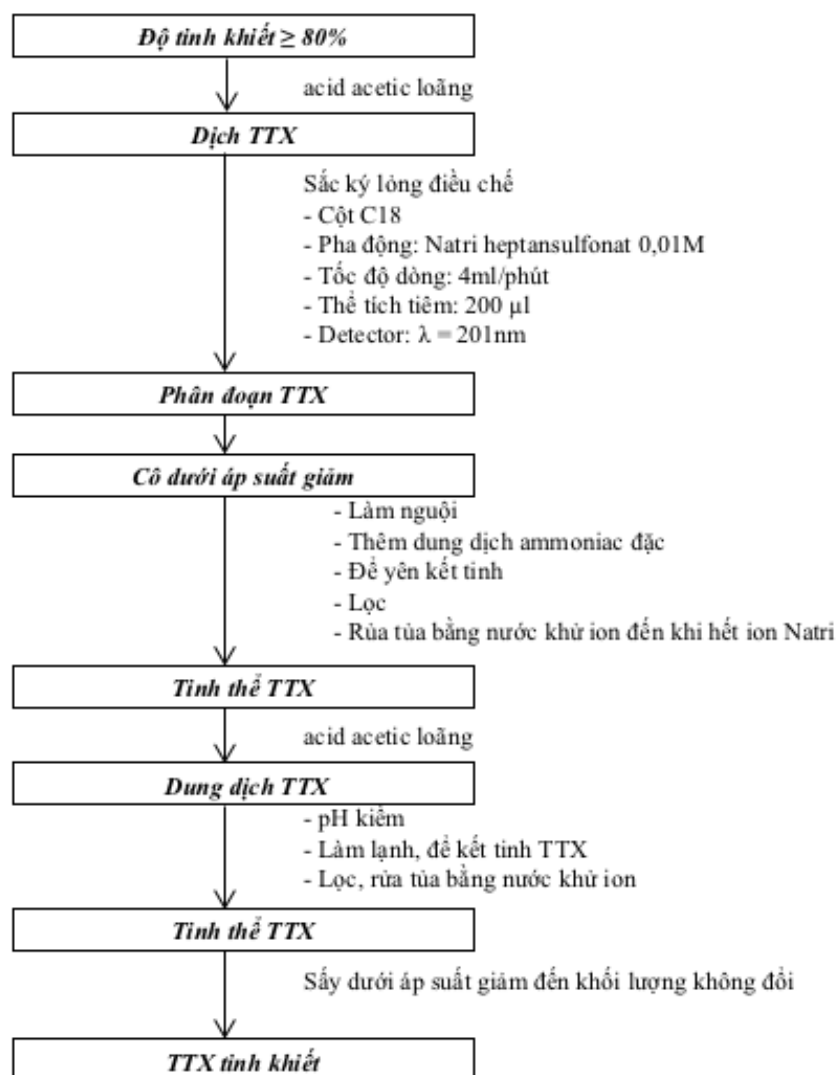
TTX thô được tinh chế bằng sắc ký lỏng điều chế.

Chương trình sắc ký tinh chế TTX từ sản phẩm TTX thô:

- Cột sắc ký bán điều chế: *ODS (HIQ Sil, 250 x 21,2 mm, 5 μ m hoặc 10 μ m)*;
- Pha động: *Dung dịch natri heptansulfonat 0,01 M*;
- Tốc độ dòng: 4 ml/phút;
- Thể tích tiêm: 200 μ l,
- Detector UV: bước sóng 201 nm

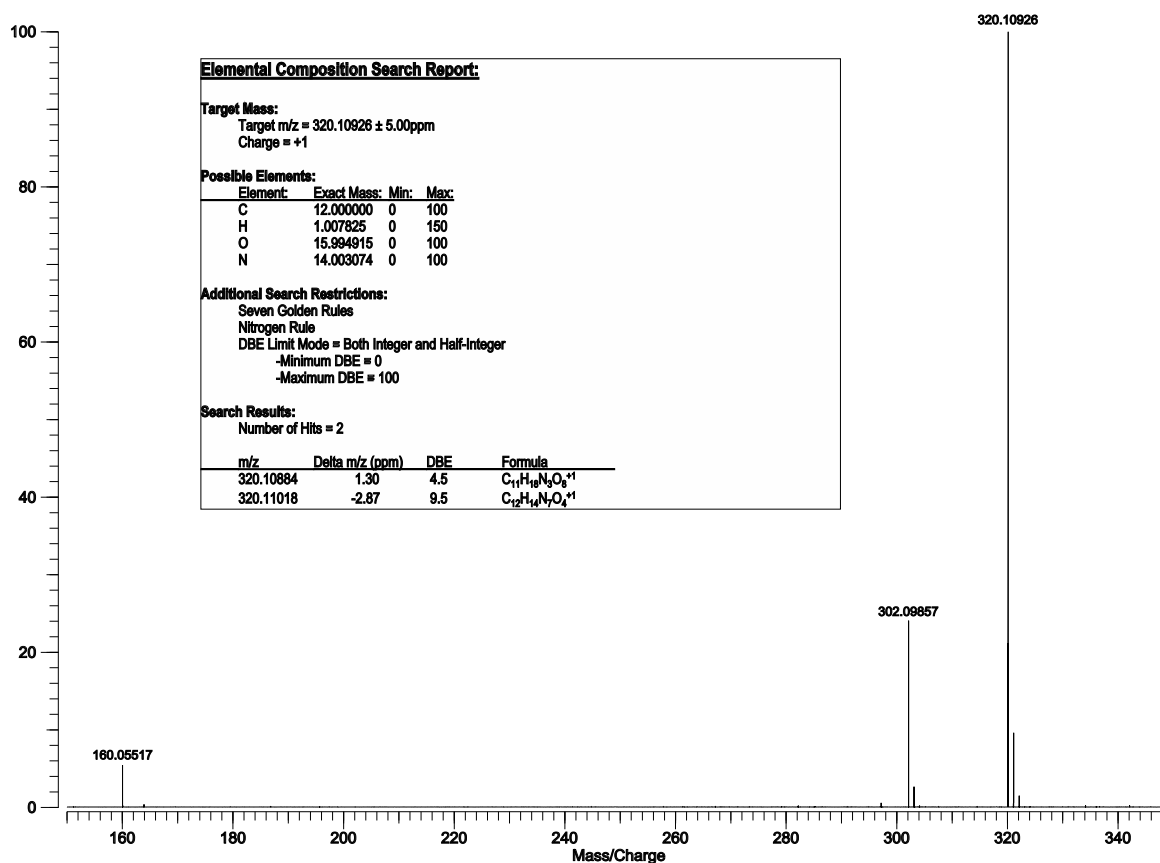
Tiến hành

- *TTX thô* được hòa tan trong dung dịch *acid acetic 1%* nồng độ khoảng 20 mg/ml. Tiêm mỗi lần 200 μ l, thu phân đoạn pic *TTX* tinh khiết.
- Gộp các tất cả các phân đoạn *TTX* thu được và cô quay dưới áp suất giảm. Làm lạnh dịch, thêm *dung dịch amoniac* đậm đặc để kết tinh *TTX*, lọc tủa kết tinh, rửa tủa kết tinh bằng nước khử ion đến khi hết phản ứng Na^+ (dùng đũa thủy tinh, đốt dịch rửa dưới ngọn lửa).
- Hòa tan lại tủa *TTX* trong *dung dịch acid acetic 1%*, trung hòa dung dịch bằng *dung dịch ammoniac 10%* đến pH kiềm, tiếp tục làm lạnh để kết tinh *TTX*.
- Rửa tủa kết tinh bằng nước khử ion vài lần và sấy tủa trong tủ sấy áp suất giảm thu được tinh thể *TTX* tinh khiết.

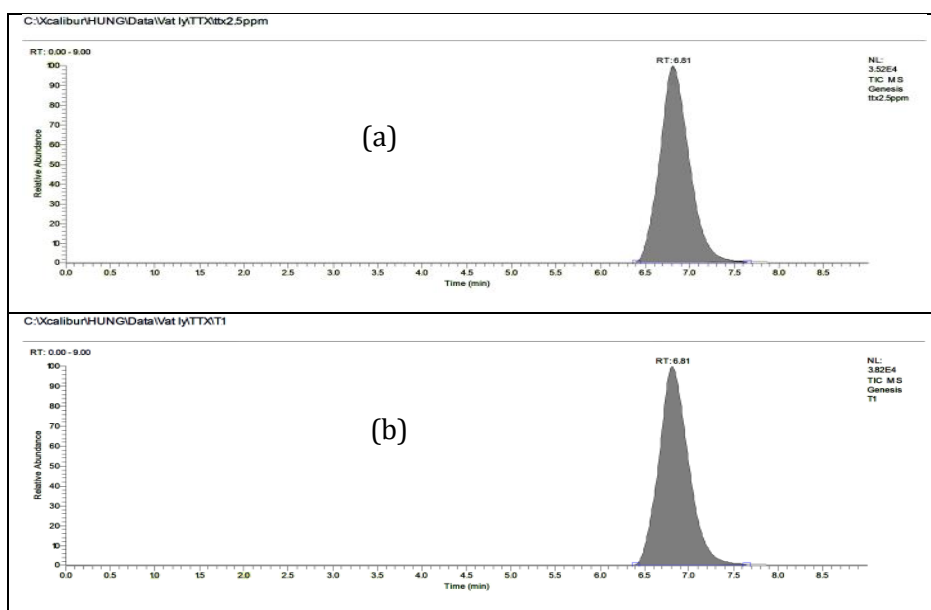


Hình 3. 21. Quy trình tinh chế TTX từ TTX thô

Sử dụng sắc ký lỏng điều chế đã thu được **93,49 mg** tinh thể TTX. Phổ NMR của chất sau khi tinh chế cũng phù hợp với dữ liệu phổ TTX đã nghiên cứu. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với kết quả đo phổ khối phân giải cao (HR ESI) của hợp chất sau khi tinh chế, cho mảnh phổ $[M+H]^+$ 320,10926, tương ứng với công thức $[C_{11}H_{17}N_3O_8 + H]^+$ của tetrodotxin (Hình 3.22)



Hình 3. 22. Phổ khối phân giải cao (HR ESI MS) của hợp chất TTX tinh chế. Kết quả phân tích cho thấy TTX sau khi tinh chế bằng sắc ký điều chế pha đảo trên cột ODS cho độ tinh khiết cao. Hàm lượng mẫu nguyên liệu TTX định lượng được là 98,27 % với độ lệch chuẩn tương đối (RSD) 0,69%. Kết quả định lượng TTX được ghi trong bảng 3.19



Hình 3. 23. Sắc ký đồ định lượng TTX, (a) dung dịch chuẩn TTX nồng độ 2,5µg/mL; (b) dung dịch thử

Bảng 3. 19. Kết quả định lượng TTX trong mẫu sau khi tinh chế

Stt	Lượng cân mẫu thử (mg)	Diện tích pic	Kết quả định lượng (%)
1	2,48	466937	97,49
2	2,49	473893	98,55
3	2,51	478755	98,77
Trung bình			98,27
RSD (%)			0,69

3.5. XÂY DỰNG TIÊU CHUẨN CƠ SỞ CỦA NGUYÊN LIỆU *TETRODOTOXIN*

Bước đầu xây dựng tiêu chuẩn cơ sở của nguyên liệu *tetrodotoxin* với các chỉ tiêu:

Bảng 3. 20. Tóm tắt chỉ tiêu chất lượng trong TCCS nguyên liệu TTX

TT	Chỉ tiêu	Yêu cầu
1	Hình thức	Bột kết tinh hay tinh thể màu trắng hoặc gần như trắng
2	Định tính	Phải thể hiện các phép thử định tính của <i>tetrodotoxin</i> .
3	Độ mất khối lượng do làm khô	Không quá 0,5 %
4	Định lượng	Hàm lượng TTX trong sản phẩm phải không ít hơn 95%

3.6. NGHIÊN CỨU THIẾT LẬP CHẤT CHUẨN *TETRODOTOXIN*

3.6.1. Nghiên cứu độ ổn định của *tetrodotoxin* trong một số dung môi

TTX được hoà tan trong một số dung dịch đệm (*methanol*, đệm citrat pH 4-5, dung dịch acid acetic loãng 2%, đệm phosphat pH 4-5, đệm acetat pH 4-5) với hàm lượng 0,1 mg/ml, đóng lọ 1 ml, bảo quản trong điều kiện nhiệt độ $-20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ trong tủ bảo quản đông. Định kỳ đánh giá chất lượng, đánh giá tại các thời điểm 0, 3, 6 tháng (tháng 6/2014, tháng 9/2014 và tháng 12/2014).

Các chỉ tiêu theo dõi:

- Cảm quan: Tất cả các lô, tại các thời điểm khảo sát đều đạt chỉ tiêu cảm quan. Các dung dịch vẫn trong suốt, không màu.
- Định tính: Tất cả các lô, tại các thời điểm khảo sát vẫn thể hiện tốt phép thử định tính. Trên sắc ký đồ dung dịch thử trong phần định lượng đều cho pic có thời gian lưu, phổ khối MS giống với thời gian lưu, phổ khối MS của pic *TTX* trên sắc ký đồ dung dịch chuẩn
- Định lượng: hàm lượng *TTX* trong các dung dịch đệm, giữa các thời điểm khảo sát khác nhau đã có sự biến đổi

Bảng 3. 21. Hàm lượng TTX trong một số dung môi theo thời gian

TT	TTX trong các dung dịch	Hàm lượng TTX (%)		
		0 tháng	3 tháng	6 tháng
1	MeOH	100,1	99,5	97,4
2	Đệm citrat pH 4 - 5	99,9	99,8	99,5
3	Đệm acetat pH 4 - 5	100,2	98,3	97,2
4	Đệm phosphat pH 4 - 5	100,2	98,7	96,9
5	Dung dịch acid acetic 2%	100,2	99,5	97,1

Từ kết quả nghiên cứu 6 tháng, ta thấy TTX trong dung dịch đệm citrat pH 4 – 5 có sự giảm nồng độ ít nhất (0,4%/6 tháng). Như vậy, có thể lựa chọn đệm citrat có pH 4 – 5 làm dung môi pha dung dịch chuẩn TTX.

3.6.2. Nghiên cứu quy trình đóng ống chuẩn, 100 µg chất/lọ 1 ml, sử dụng dung môi thích hợp

Xây dựng quy trình đóng ống chuẩn đúng quy định đối với chất độc, sử dụng thiết bị Glove - Box Labonco

Thời điểm đóng gói: tháng 12/2014

Điều kiện môi trường thời điểm đóng gói: nhiệt độ 20 °C, độ ẩm tương đối 48 %.

Số lượng nguyên liệu: 10,17 mg

Số ống chuẩn đóng được: 100 ống

Hàm lượng TTX trung bình trong các ống đã được đánh giá đồng nhất lô: 99,89%



Hình 3. 24. Lọ chuẩn tetradotoxin 0,1 mg trong 1 ml dung dịch đệm citrate

3.6.3. Kiểm tra đánh giá chất lượng ống chuẩn

3.6.3.1. Đánh giá đồng nhất lô trong quá trình đóng gói

Yêu cầu:

Lô sản xuất được coi là đồng nhất khi giá trị RSD của kết quả hàm lượng giữa các ống được kiểm tra $\leq 0,5\%$ \Rightarrow điều kiện đóng gói ổn định.

Tiến hành:

- Lấy ngẫu nhiên ít nhất 10 ống để kiểm tra đồng nhất quá trình đóng gói chỉ tiêu hàm lượng.
- Áp dụng phương pháp định lượng trong Tiêu chuẩn ống chuẩn TTX để tiến hành xác định hàm lượng.

Kết quả:

Bảng 3. 22. Kết quả đánh giá đồng nhất lô

Số thứ tự ống	01	15	26	34	47	55	68	77	88	99
HL (%) so với nhãn	99,67	99,73	99,86	100,12	99,91	99,68	100,09	99,97	99,66	100,03
Trung bình (%)	99,87									
RSD (%)	0,18									

Kết luận: $RSD = 0,18\% < 0,5\%$ \rightarrow Lô bán TP đồng nhất về hàm lượng

3.6.3.2. Đánh giá liên phòng thí nghiệm về chất chuẩn (2 phòng thí nghiệm)

- Áp dụng phương pháp định lượng trong Tiêu chuẩn chất lượng ống chuẩn TTX.
- Mỗi PTN nhận được chất chuẩn gốc và 06 ống chuẩn bán thành phẩm.

Bảng 3. 23. Các thông số của hệ sắc ký

Các thông số	Yêu cầu	PTN 1 (Khoa thiết lập chất chuẩn – chất đối chiếu)	PTN 2 (Trung tâm Đánh giá Tương đương sinh học)
	Thiết bị	Tandem MS (Thermo Scientific TSQ Quantum Ultra)	Tandem MS (Thermo Scientific TSQ Quantum Ultra)
	Cột sắc ký	Alltech Apollo C ₈ (250 x 4,6 mm; 5 μ m)	Phenomenex C ₈ (250 x 4,6 mm; 5 μ m)
Thời gian lưu của pic chính		6,8 phút	6,5 phút

Bảng 3. 24. Kết quả đánh giá liên phòng

Yêu cầu		PTN 1 (HL %)	PTN 2 (HL %)
Hàm lượng TTX phải từ 99,5 % đến 100,5% so lượng ghi trên nhãn	1	99,67	99,72
	2	99,73	100,08
	3	99,86	100,01
	4	100,12	99,89
	5	99,91	100,04
	6	99,68	99,76
	7	100,09	
	8	99,97	
	9	99,66	
	10	100,03	
	TB	99,87	99,92
	RSD	0,18 %	0,15 %

Bảng 3. 25. Kết quả đánh giá theo ANOVA

TÓM TẮT				
Nhóm	Số KQ	Tổng	Trung bình	Phương sai
PTN 1	10	998,72	99,87	0,0320
PTN 2	6	599,5	99,92	0,0229

ANOVA					
Nguồn sai số	Tổng số bình phương	Bậc tự do	Bình phương trung bình	F_m	F_{tc}
Giữa các nhóm	0,0075	1	0,0075	0,260	4,600
Trong từng nhóm	0,4025	14	0,0287		
Tổng cộng	0,4100	15			

Nhận xét: $F_m < F_{tc} \Rightarrow$ Kết quả trung bình của 2 phòng thử nghiệm giống nhau, phương pháp phân tích có độ tái lập và độ lặp lại tốt

3.6.3.3. Hoàn thiện hồ sơ chuẩn, xác định giá trị ấn định ghi trên nhãn và trên chứng chỉ phân tích

Bảng 3. 26. Tập hợp kết quả của hai PTN

TT	X_i (%)	TT	X_i (%)
1	99,66	9	99,91
2	99,67	10	99,97
3	99,68	11	100,01
4	99,72	12	100,03
5	99,73	13	100,04
6	99,76	14	100,08
7	99,86	15	100,09
8	99,89	16	100,12
Trung bình		99,89	
RSD		0,17 %	

Nhận xét:

Hàm lượng trung bình: 99,9 % so với hàm lượng nhãn, độ không đảm bảo đo mở rộng $U = \pm 0,09$ % với hệ số phủ $k=2$ ở độ tin cậy 95%.

Tất cả các kết quả thu được của 2 PTN nằm trong khoảng 99,5 % đến 100,5 % so với hàm lượng nhãn do vậy kết quả ghi trên nhãn và chứng chỉ là: Chất chuẩn *tetrodotoxin* SKS: TTX.DTDL.2015 1,0 ml dung dịch chứa 0,1 mg *tetrodotoxin* ($C_{11}H_{17}N_3O_8$) trong đệm citrate pH 4,8.

3.7. BÀO CHẾ BỘT ĐÔNG KHÔ TETRODOTOXIN 0,1 %

3.7.1. Bào chế bột đông khô

Công thức bào chế cho 1 lọ

TTX thô (hàm lượng TTX ≥ 80 %)...tương ứng với.... 1 mg TTX

Dung dịch lactose 20% (kl/tt) 5 mL

Đệm citratevừa đủ.....10 mL

Pha chế

TTX thô lô NC02 có hàm lượng 81,19% thu được theo quy trình chiết xuất trên để làm nguyên liệu bào chế bột đông khô. Cân 24,6 mg TTX thô vào bình định mức 200 ml, thêm dung 50 ml dịch đệm citrat pH 4-5 để hòa tan. Thêm chính xác 100 ml dung dịch lactose 20% (kl/tt), lắc kỹ, thêm dung dịch đệm citrat vừa đủ, lắc đều.

Hút 10 ml dung dịch trên vào lần lượt 20 lọ thủy tinh nâu dung tích 10 ml, đem đông khô.

Chương trình đông khô:

- Nhiệt độ đông lạnh -30°C;
- Thời gian đông lạnh 90 phút;
- Thời gian đông khô 22 giờ;
- Nhiệt sấy khô từ: -25°C đến 0°C;
- Nhiệt độ condensor – 60°C;
- Áp suất 0,1 mbar;
- Thời gian sấy khô 19 giờ;
- Nhiệt sấy khô từ: 4°C đến 27°C.



Hình 3. 25. Bột đông khô tetrodotoxin 0,1%

3.7.2. Xây dựng tiêu chuẩn cơ sở và kiểm nghiệm sản phẩm

Đã bước đầu xây dựng được tiêu chuẩn chất lượng cho bột đông khô TTX 0,1 % (phụ lục 4) với các chỉ tiêu

Bảng 3. 27. Tóm tắt chỉ tiêu chất lượng trong TCCS bột đông khô 0,1%

TT	Chỉ tiêu	Yêu cầu
1	Hình thức	Bột xốp, màu trắng hoặc trắng ngà
2	Định tính	Phải thể hiện các phép thử định tính của <i>tetrodotoxin</i> .
3	Độ mất khối lượng do làm khô	$\leq 1,5 \%$
4	Định lượng	Hàm lượng TTX trong sản phẩm phải đạt từ 0,09 đến 0,11%

Áp dụng tiêu chuẩn, đánh giá chất lượng lọ bột nồng độ bào chế được: Hàm lượng TTX trung bình đạt 0,103%.

3.7.3. Đánh giá độc tính cấp và bán trường diễn của bột đông khô 0,1%

3.7.3.1. Độc tính cấp

a. Mức liều

Thử sơ bộ

- Cách xử lý và chuẩn bị mẫu thử: Pha loãng bột nồng độ với nước cất thành các dung dịch có độ pha loãng cách xa nhau để thử sơ bộ.

- Thăm dò ở mức liều không làm chết chuột thí nghiệm:

Dung dịch có nồng độ 1 mg/ml. Cho 10 chuột uống thuốc, mỗi chuột uống 0,4 ml mẫu thử. Sau 24 giờ theo dõi thấy không chết chuột nào. LD₀ = 20 mg bột nồng độ/kg chuột.

- Thăm dò mức liều làm chết 100% số chuột thí nghiệm:

Dung dịch có nồng độ 30 mg/ml. Cho 10 chuột uống thuốc, mỗi chuột uống 0,4 ml mẫu thử. Sau 24 giờ theo dõi 100% chuột thí nghiệm bị chết. LD₁₀₀ = 600 mg bột nồng độ/kg chuột.

Mức liều thử nghiệm chính thức

Mức liều 1: 20 mg/kg chuột

Mức liều 2: 165 mg/kg chuột

Mức liều 3: 310 mg/kg chuột

Mức liều 4: 455 mg/kg chuột

Mức liều 5: 600 mg/kg chuột

b. Tiến hành

Tiến hành

- Chuột được nhịn ăn 15 giờ trước khi thí nghiệm, nước uống theo nhu cầu. Kiểm tra cân nặng trước khi thử nghiệm. Chuột đạt các yêu cầu về cân nặng được đưa vào thử nghiệm.

- Cách dùng: Lấy thẻ tích mẫu thử theo quy định đưa thẳng vào dạ dày chuột bằng kim cong đầu tù.

- Dựa trên kết quả thăm dò trong thử nghiệm sơ bộ, tiến hành thử nghiệm chính thức trên 50 chuột, chia thành 5 nhóm thử theo mức liều như sau:

Bảng 3. 28. Mức liều thử nghiệm trên chuột

Nhóm chuột	Liều dùng (mg bột nồng độ/kg chuột)	Số chuột thí nghiệm
Mức liều 1	20 mg/kg chuột	10
Mức liều 2	165 mg /kg chuột	10
Mức liều 3	310 mg /kg chuột	10
Mức liều 4	455 mg /kg chuột	10
Mức liều 5	600 mg/kg chuột	10

- Lịch theo dõi: Theo dõi biểu hiện của chuột sau khi uống trong 24 giờ đầu và theo dõi hoạt động của ĐVTN trong thời gian 7 ngày sau khi uống.

Phép thử được tiến hành với 2 mẫu dịch chiết toàn phần: NC1, NC2.

Theo dõi

Sau khi uống dung dịch thử: Ở mức liều 1 không nhận thấy biểu hiện ngộ độc, chuột ăn uống hoạt động bình thường. Ở mức liều 2,3,4 và 5 sau khi uống mẫu thử khoảng 0,5 – 4 giờ, một số chuột có biểu hiện ngộ độc, và một số chết.. Số lượng chuột chết ở các nhóm tỷ lệ thuận với mức liều thử. Chuột trước khi chết có hiện tượng co giật, tăng tiết nước bọt.

c. Kết quả

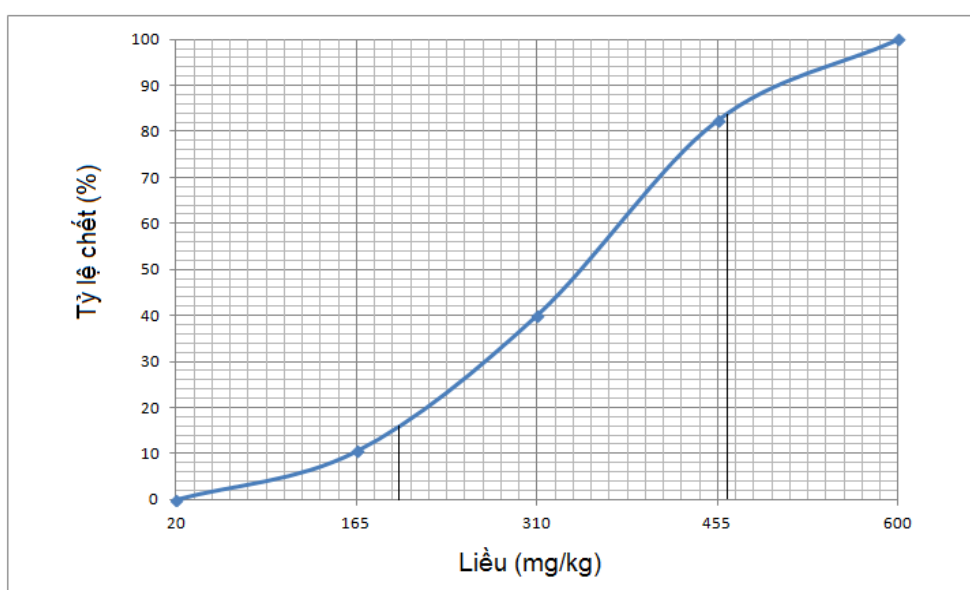
Bảng số liệu:

Mẫu bộ nồng độ đem thử nghiệm cho kết quả như sau:

Bảng 3. 29. Kết quả thử nghiệm độc tính bột đông khô

Mức liều	Liều thử (mg/kg chuột)	Số chuột chết/ số sống thực tế	Số chuột chết/ số sống kỳ vọng	% Chết
1	20	0/10	0/27	0
2	165	2/8	2/17	10,5
3	310	4/6	7/9	40,0
4	455	7/3	14/3	82,4
5	600	10/0	24/0	100

Vẽ đồ thị theo các số liệu trên bảng



Hình 3. 26. Đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa liều thí nghiệm và tỷ lệ chết chuột

Tính LD₅₀ theo Behrens

$$LD_{50} = A + \frac{(50-a) \times d}{b-a}$$

Trong đó: A - Liều gây chết a% ĐVTN

a - % ĐVTN chết sát dưới 50% sao cho a < 50%

b - % ĐVTN chết sát trên 50% sao cho b > 50%

d - khoảng cách giữa các liều (ml)

Theo bảng trên, ta có:

$$a = 40,0\%$$

$$b = 82,4\%$$

$$A = 310 \text{ mg/kg chuột}$$

$$d = 145 \text{ mg/ kg chuột}$$

$$LD_{50} = 310 + \frac{(50-40,0) \times 145}{82,4-40,0} = 344,20 \text{ mg/ kg chuột}$$

Tính sai số chuẩn: $(S_{LD50})^2 = \frac{k \times S \times d}{n}$

Trong đó:

k: hệ số Behrens = 0,66

n: Số chuột trong mỗi nhóm.

$$S = \frac{LD_{84} - LD_{16}}{2}$$

Theo đồ thị, ta có:

$$LD_{16} = 198 \text{ mg/ kg chuột}$$

$$LD_{84} = 469 \text{ mg/ kg chuột}$$

$$S = \frac{LD_{84} - LD_{16}}{2} = 135,5 \text{ mg/kg chuột}$$

$$(S_{LD50})^2 = \frac{k \times S \times d}{n} = \frac{0,66 \times 135,5 \times 145}{10} = 1296,7$$

$$\rightarrow S_{LD50} = 36,01 \text{ mg/ kg chuột}$$

Vậy $LD_{50} = 344,20 \pm 36,01 \text{ mg/ kg chuột}$.

d. Kết luận

Trong thử nghiệm này, chúng tôi đã tìm được liều không gây chết chuột theo đường uống là 20 mg/ kg chuột, liều gây chết 100% số chuột thử nghiệm là 600 mg/ kg chuột. Dựa trên số liệu thực nghiệm, chúng tôi đã tìm được liều LD_{50} trong khoảng $LD_{50} = 344,20 \pm 36,01 \text{ mg/ kg chuột}$.

Sau khi uống thuốc, chuột có các biểu hiện ngộ độc như sau: Chuột giảm hoạt động, nằm mê, vã mồ hôi, thở gấp và chết trong tình trạng co giật, kích động. Riêng nhóm thử 1, không nhận thấy có biểu hiện ngộ độc. Sau khi uống khoảng 20 phút giờ bắt đầu có chuột chết ở các nhóm 2, 3, 4, và 5. Trong vòng 24 giờ sau khi uống, nhóm thử 5 gây chết 100% số chuột thử nghiệm, các nhóm 2, 3 và 4 có chuột chết tăng dần theo mức liều. Trong thời gian theo dõi tiếp theo (sau khi uống 24 giờ đến 7 ngày) không có thêm chuột chết. Toàn bộ số chuột không chết sau khi uống 24 giờ ở các nhóm đều ăn uống, hoạt động bình thường.

3.7.3.2. Độc tính bán trường diễn

a. Chuẩn bị mẫu thử:

Lựa chọn mức liều thử nghiệm: Chúng tôi dựa trên liều dự kiến dùng trên người liều *TTX* tương đương 25 mg bột đông khô/ ngày/ người nặng khoảng 50 kg và bảng ngoại suy liều dưới đây để đưa ra mức liều thử có ý nghĩa, hợp lý khi chuyển đổi.

Bảng 3. 30. Bảng ngoại suy liều

	Chuột nhắt trắng	Chuột cống	Thỏ	Chó	Người
Chuột nhắt trắng	1	0,55	0,25	0,15	0,085
Chuột cống	1,82	1	0,45	0,27	0,15
Thỏ	4	2,20	1	0,60	0,34
Chó	6,67	3,67	1,67	1	0,57
Người	11,76	6,47	2,94	1,67	1

Cách xử lý và chuẩn bị mẫu thử:

- + *Dung dịch đối chứng*: Nước cất.
- + *Mẫu thử 1*: Dung dịch bột đông khô 0,5 mg/ml.
- + *Mẫu thử 2*: Dung dịch bột đông khô 1,5 mg/ml.

b. *Bố trí thí nghiệm*:

Thí nghiệm được bố trí và thử với các mức liều như ở bảng sau:

Bảng 3. 31. Bố trí thí nghiệm thử độc tính bán trường diễn

Nhóm	Số thử thí nghiệm	Thể tích cho uống (ml dung dịch thử/kg thỏ)	Liều dùng (mg bột đông khô/kg thỏ)
<i>Chứng</i>	7	3,0 ml dung dịch đối chứng/kg thỏ	0
<i>Thử 1.1</i>	7	3,0 ml dung dịch thử 1/kg thỏ	1,5
<i>Thử 1.2</i>	7	3,0 ml dung dịch thử 2/kg thỏ	4,5

c. *Theo dõi và đánh giá*:

Theo dõi thỏ hàng ngày về mức độ tiêu thụ thức ăn, nước uống, khả năng hoạt động, tình trạng phân, nước tiểu, và lông.

Trước thí nghiệm, xác định cân nặng của thỏ, các dấu hiệu toàn thân, lấy máu xét nghiệm đánh giá các chỉ số huyết học (số lượng hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu, hemoglobin, hematocrit), các chỉ số sinh hóa (GOT, GPT, creatinin, urea, protein toàn phần). Theo dõi cân nặng của thỏ hàng tuần. Sau 14 và 28 ngày uống thuốc, xác định cân nặng của thỏ và lấy máu để làm các xét nghiệm như trên. So sánh kết quả của nhóm thử và nhóm chứng theo phương pháp thống kê. Sau khi kết thúc thí nghiệm thỏ ở các nhóm được mổ lấy tim, gan, thận được lấy làm tiêu bản để quan sát đại thể cấu trúc.

d. *Kết quả*

Tình trạng thỏ:

Trong thời gian thí nghiệm, tất cả các thỏ đều hoạt động bình thường, ăn uống tốt, phân khô, lông mượt.

Bảng 3. 32. Kết quả theo dõi cân nặng thỏ

Nhóm (n=7)	Kết quả cân nặng (kg)					P
	Trước TN (m ₀)	Sau 1 tuần (m ₁)	Sau 2 tuần (m ₂)	Sau 3 tuần (m ₃)	Sau 4 tuần (m ₄)	
Chứng (C)	2,05±0,07	2,08±0,04	2,10±0,04	2,14±0,04	2,18±0,03	P _{trước-sau} =0,002
Δ(m _t -m ₀)		0,03±0,03	0,05±0,04	0,09±0,05	0,113±0,07	
Thử 1 (T1)	2,03±0,10	2,06±0,09	2,10±0,06	2,15±0,04	2,18±0,03	P _{trước-sau} =0,003 P _{trước} (T1-C)=0,633 P _{sau} (T1-C)=0,942
Δ(m _t -m ₀)		0,003±0,02	0,08±0,06	0,12±0,08	0,15±0,09	
Thử 2 (T2)	2,02±0,08	2,05±0,07	2,10±0,05	2,15±0,03	2,18±0,02	P _{trước-sau} =0,000 P _{trước} (T2-C)=0,566 P _{sau} (T2-C)=0,903
Δ(m _t -m ₀)		0,04±0,05	0,01±0,10	0,04±0,11	0,05±0,13	

Kết luận:

Theo dõi cân nặng thỏ trong quá trình thí nghiệm cho thấy, cân nặng trung bình của thỏ ở các nhóm thử trước khi đưa vào thí nghiệm không có sự khác biệt so với nhóm chứng (P_{trước} (T1-C), P_{trước} (T2-C) ≥ 0,05). Sau 28 ngày thử nghiệm, thỏ tăng cân đều ở nhóm chứng, nhóm thử 1 và 2; không có sự khác biệt về cân nặng trung bình giữa nhóm thử so với nhóm chứng (P_{sau} (T1-C), P_{sau} (T2-C) > 0,05).

Kết quả theo dõi các chỉ số huyết học

Trước thí nghiệm:

Bảng 3. 33. Bảng theo dõi các chỉ số huyết học trước thí nghiệm

Chỉ tiêu	N	Nhóm chứng	Nhóm T1	P _{C-T1} trước	Nhóm T2	P _{C-T2} trước
Hồng cầu (x 10 ¹² /L)	7	5,75 ± 0,25	5,73 ± 0,40	0,924	5,75 ± 0,41	0,972
Bạch cầu (x 10 ⁹ /L)	7	9,70 ± 2,57	7,59 ± 1,05	0,087	7,59 ± 1,06	0,087
Tiểu cầu (x 10 ⁹ /L)	7	420,14 ± 98,97	506,14 ± 128,94	0,220	524,71 ± 98,35	0,092
Hematocrit (%)	7	35,46 ± 2,50	35,44 ± 1,79	0,991	35,44 ± 1,79	0,991
Hemoglobin (g/dL)	7	11,67 ± 0,72	11,80 ± 0,96	0,797	11,80 ± 0,96	0,797

Giữa thí nghiệm:

Bảng 3. 34. Bảng theo dõi các chỉ số huyết học giữa thí nghiệm

Chỉ tiêu	N	Nhóm chứng	Nhóm T1	P _{C-T1} giữa	Nhóm T2	P _{C-T2} giữa
Hồng cầu (x10 ¹² /L)	7	5,75 ± 0,26	5,87 ± 0,20	0,597	5,83 ± 0,12	0,756
Bạch cầu (x 10 ⁹ /L)	7	9,61 ± 2,49	7,56 ± 0,22	0,106	7,46 ± 0,20	0,907
Tiểu cầu (x 10 ⁹ /L)	7	424,71 ± 98,12	478,71 ± 0,63	0,412	479,43 ± 0,80	0,381
Hematocrit (%)	7	35,51 ± 2,58	34,54 ± 0,35	0,459	35,03 ± 0,23	0,627
Hemoglobin (g/dL)	7	11,71 ± 0,99	11,46 ± 0,36	0,606	11,53 ± 0,58	0,724

Sau thí nghiệm:

Bảng 3. 35. Bảng theo dõi các chỉ số huyết học sau thí nghiệm

Chỉ tiêu	N	Nhóm chứng	Nhóm T1.1	P_{C-T1} sau	Nhóm T2	P_{C-T2} sau
Hồng cầu ($\times 10^{12}/L$)	7	$5,67 \pm 0,46$	$5,82 \pm 0,75$	0,549	$5,84 \pm 0,20$	0,461
Bạch cầu ($\times 10^9/L$)	7	$9,60 \pm 2,38$	$7,56 \pm 0,21$	0,094	$7,39 \pm 0,10$	0,063
Tiểu cầu ($\times 10^9/L$)	7	$430,57 \pm 102,83$	$480,57 \pm 0,71$	0,454	$488,43 \pm 0,98$	0,347
Hematocrit (%)	7	$35,60 \pm 2,22$	$34,06 \pm 0,27$	0,175	$34,04 \pm 0,26$	0,288
Hemoglobin (g/dL)	7	$11,79 \pm 0,89$	$11,43 \pm 0,52$	0,449	$11,51 \pm 0,576$	0,576

Kết luận:

Trước khi thử nghiệm các thử nghiệm được kiểm tra các thông số về huyết học cho thấy không có sự khác biệt giữa nhóm chứng và 2 nhóm thử (P_{C-T} trước $> 0,05$). Giữa và sau khi thử nghiệm, không nhận thấy sự khác biệt có ý nghĩa giữa nhóm chứng và 2 nhóm thí nghiệm (P_{C-T} giữa $> 0,05$; P_{C-T} sau $> 0,05$).

Kết quả theo dõi các chỉ số sinh hóa

Trước thí nghiệm:

Bảng 3. 36. Bảng theo dõi các chỉ số sinh hoá trước thí nghiệm

Chỉ tiêu	n	Nhóm chứng	Nhóm T1.1	P_{C-T1} trước	Nhóm T2	P_{C-T2} trước
SGOT (IU/ lít)	7	$27,7 \pm 5,9$	$28,1 \pm 2,8$	0,875	$27,0 \pm 3,6$	0,805
SGPT (IU/ lít)	7	$69,3 \pm 8,0$	$62,4 \pm 10,2$	0,219	$58,7 \pm 8,8$	0,05
Creatinin ($\mu\text{mol/lit}$)	7	$85,7 \pm 6,4$	$77,9 \pm 9,6$	0,122	$76,4 \pm 9,3$	0,068
Urea (mmol/lit)	7	$5,0 \pm 0,7$	$5,5 \pm 0,5$	0,129	$5,5 \pm 0,5$	0,180
Bilirubin toàn phần ($\mu\text{mol/lit}$)	7	$2,2 \pm 0,2$	$2,5 \pm 1,2$	0,492	$2,5 \pm 1,2$	0,560
Protein toàn phần (g/ lít)	7	$57,6 \pm 3,2$	$59,0 \pm 5,0$	0,567	$58,9 \pm 4,4$	0,573

Giữa thí nghiệm:

Bảng 3. 37. Bảng theo dõi các chỉ số sinh hoá giữa thí nghiệm

Chỉ tiêu	N	Nhóm chứng	Nhóm T1	P_{C-T1} giữa	Nhóm T2	P_{C-T2} giữa
SGOT (IU lit)	7	$29,7 \pm 3,8$	$29,1 \pm 2,2$	0,758	$27,9 \pm 4,0$	0,427
SGPT (IU/ lít)	7	$71,9 \pm 10,0$	$63,9 \pm 6,1$	0,119	$59,6 \pm 11,6$	0,073
Creatinin ($\mu\text{mol/lit}$)	7	$86,7 \pm 6,4$	$79,3 \pm 11,2$	0,184	$77,9 \pm 9,6$	0,086
Urea (mmol/lit)	7	$5,1 \pm 0,6$	$5,6 \pm 0,4$	0,111	$5,5 \pm 0,5$	0,181
Bilirubin toàn phần ($\mu\text{mol/lit}$)	7	$2,2 \pm 0,2$	$2,6 \pm 0,9$	0,246	$2,4 \pm 0,8$	0,496
Protein toàn phần (g/ lít)	7	$57,4 \pm 3,3$	$59,7 \pm 4,6$	0,341	$59,0 \pm 5,0$	0,533

Sau thí nghiệm:

Bảng 3. 38. Bảng theo dõi các chỉ số sinh hoá sau thí nghiệm

Chỉ tiêu	N	Nhóm chứng	Nhóm T1	P_{C-T1} sau	Nhóm T2	P_{C-T2} sau
SGOT (IU/lit)	7	29,0 ± 3,0	29,1 ± 2,0	0,924	32,4 ± 6,0	0,241
SGPT (IU/lit)	7	71,6 ± 9,9	60,3 ± 10,7	0,082	64,1 ± 17,2	0,382
Creatinin (µmol/lit)	7	84,4 ± 4,7	89,4 ± 7,5	0,195	89,1 ± 7,1	0,203
Urea (mmol/lit)	7	5,1 ± 0,6	5,7 ± 0,3	0,052	5,8 ± 0,8	0,075
Bilirubin toàn phần (µmol/lit)	7	2,2 ± 0,2	2,2 ± 0,3	0,920	2,1 ± 0,2	0,415
Protein toàn phần (g/lit)	7	57,7 ± 3,0	59,3 ± 4,0	0,457	59,9 ± 4,3	0,339

Kết luận: Trước thí nghiệm các chỉ số sinh hóa của thỏ ở nhóm thử và nhóm chứng không có sự khác biệt nhau (P_{C-T} trước > 0,05). Giữa và sau thí nghiệm không nhận thấy có sự khác biệt đáng kể giữa nhóm chứng và các nhóm thử (P_{C-T} giữa > 0,05; P_{C-T} sau > 0,05).

Quan sát đại thể: Không nhận thấy có biểu hiện khác thường về hình dạng bên ngoài, màu sắc các tổ chức tim, gan, thận, phổi, dạ dày, ruột của các thỏ nhóm thử so với nhóm chứng sau thí nghiệm.

Quan sát vi thể: Lấy ngẫu nhiên mẫu gan, thận của 3 thỏ trên mỗi nhóm để làm tiêu bản. Thỏ được mã hóa trước khi gửi sang Bộ môn Giải phẫu sinh lý bệnh - Trường Đại học Y Hà Nội thực hiện quan sát vi thể.

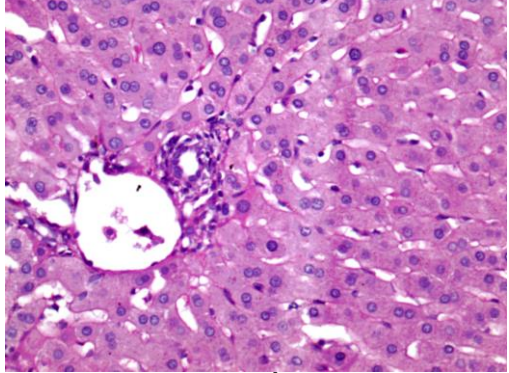
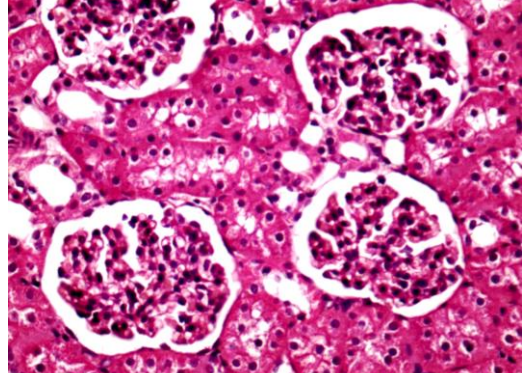
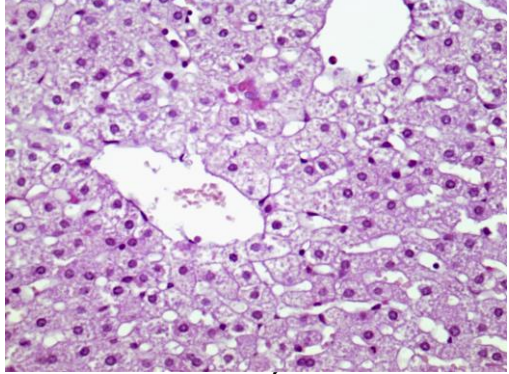
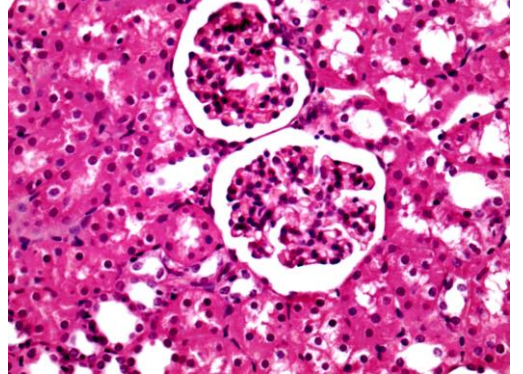
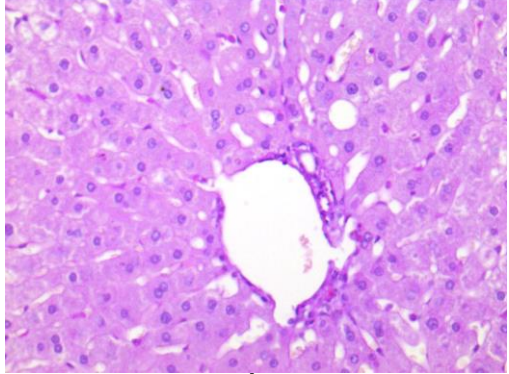
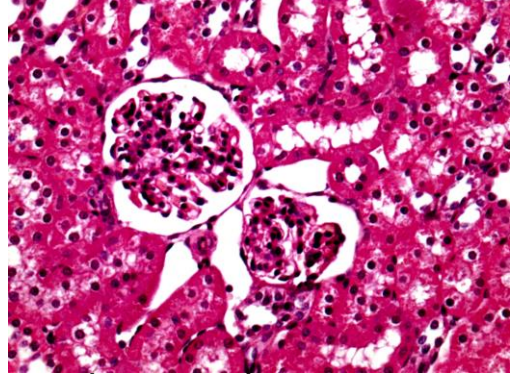
Kết quả quan sát vi thể thu được cho thấy các mẫu gan, thận của 3 thỏ trên mỗi nhóm đều bình thường, cụ thể:

+ **Gan:** Cấu trúc mô gan không đảo lộn, nhận rõ các tiểu thùy gan. Các tĩnh mạch trung tâm tiểu thùy sung huyết. Khoảng cửa không tăng sinh xơ, không xâm nhập các loại tế bào viêm. Các tế bào gan thoái hóa nhẹ (chủ yếu là thoái hóa nước, thoái hóa hạt), tập trung quanh các tĩnh mạch trung tâm tiểu thùy sung huyết, càng ra xa tĩnh mạch trung tâm tiểu thùy, mức độ thoái hóa càng nhẹ. Có lắng đọng glycogen ở các tế bào gan thoái hóa quanh tĩnh mạch trung tâm tiểu thùy. **Kết luận: Mô gan bình thường.**

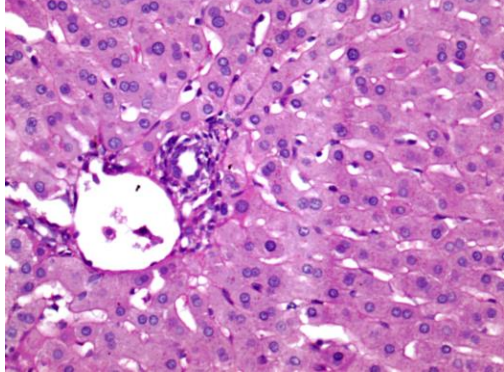
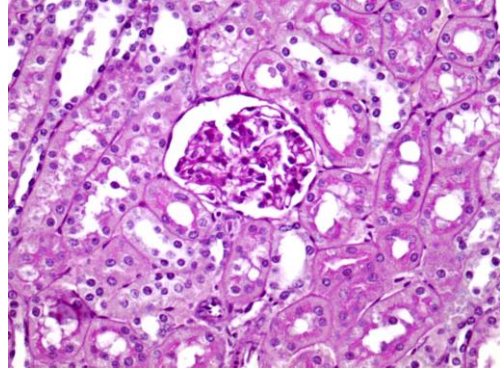
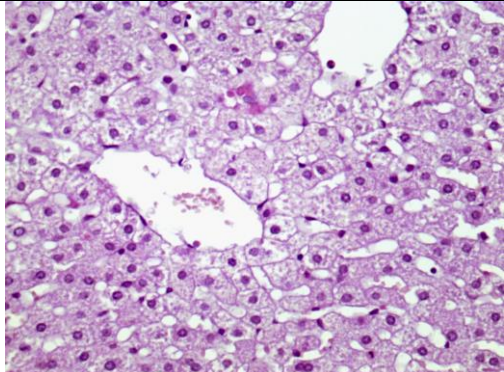
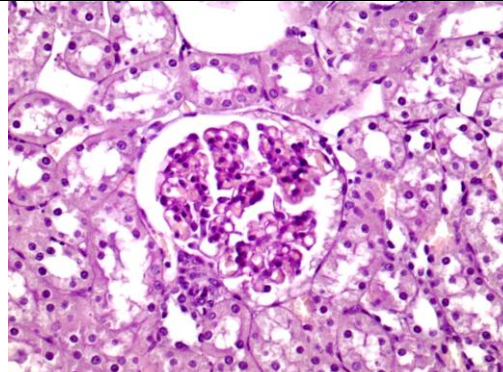
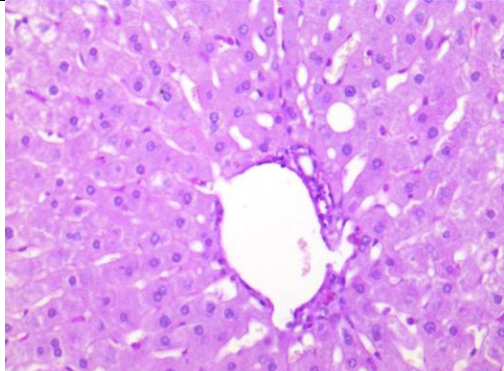
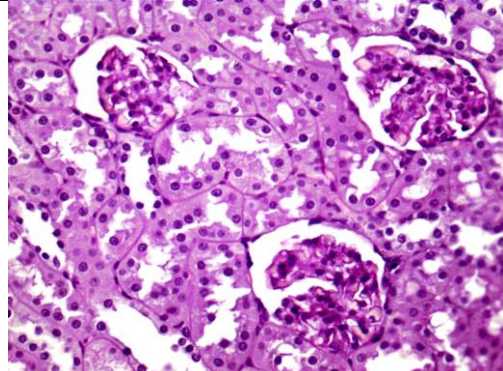
+ **Thận:** Nhu mô thận sung huyết, các huyết quản ở khoảng kẽ và các cuộn mao mạch cầu thận rãn, chứa nhiều hồng cầu. Các cầu thận không teo, không xơ hóa và không thấy tăng sinh tế bào. Màng đáy cuộn mao mạch cầu thận và màng đáy các ống thận không dày. Một số tế bào ống lượn gần thoái hóa nhẹ. Mô đệm không thấy xâm nhập tế bào viêm. **Kết luận: Mô thận bình thường.**

e. Kết luận

Sau khi cho thỏ uống bột đông khô liên tục trong 28 ngày với mức liều 1,5 mg/kg thỏ/ngày và 4,5 mg/kg thỏ/ngày, chúng tôi nhận thấy hầu như không có sự khác nhau về chỉ sinh hóa và huyết học giữa nhóm chứng và nhóm thử. Toàn bộ thỏ thí nghiệm ở nhóm chứng tăng cân đều, nhóm thử 1 và 2 không tăng trọng lượng nhưng so với nhóm chứng không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. Quan sát đại thể, không nhận thấy sự khác nhau về hình dạng bên ngoài, màu sắc của các tổ chức tim, gan, thận, phổi và hệ tiêu hóa giữa các thỏ nhóm chứng và các nhóm thử sau thí nghiệm. Quan sát vi thể cho thấy mô gan và thận ở nhóm chứng bình thường, nhưng có sự tổn thương mô gan ở cả hai nhóm thử sau thí nghiệm.

<i>Nhóm</i>	<i>Hình ảnh mô gan</i>	<i>Hình ảnh mô thận</i>
<i>Chứng</i>	 <p data-bbox="368 568 879 680">Nhu mô gan có cấu trúc hình thái trong giới hạn bình thường</p>	 <p data-bbox="901 568 1426 680">Các cầu thận và ống thận không thấy tổn thương</p>
<i>Thử 1</i>	 <p data-bbox="368 1057 879 1137">Nhu mô gan có cấu trúc hình thái trong giới hạn bình thường</p>	 <p data-bbox="901 1057 1426 1137">Các cầu thận và ống thận không thấy tổn thương</p>
<i>Thử 2</i>	 <p data-bbox="368 1514 879 1603">Nhu mô gan có cấu trúc hình thái trong giới hạn bình thường</p>	 <p data-bbox="901 1514 1426 1603">Các cầu thận và ống thận không thấy tổn thương</p>

Hình 3. 27. Hình ảnh mô gan, thận đại diện của từng nhóm thử nghiệm
(Nhuộm HE, độ phóng đại 400 lần)

<i>Nhóm</i>	<i>Hình ảnh mô gan</i>	<i>Hình ảnh mô thận</i>
<i>Chứng</i>	 <p data-bbox="368 633 874 719">Các tế bào gan không lắng đọng glycogen</p>	 <p data-bbox="901 633 1406 719">Các cầu thận và ống thận không thấy tổn thương</p>
<i>Thử 1</i>	 <p data-bbox="368 1171 874 1256">Các tế bào gan không lắng đọng glycogen</p>	 <p data-bbox="901 1171 1406 1256">Các cầu thận và ống thận không thấy tổn thương</p>
<i>Thử 2</i>	 <p data-bbox="368 1715 874 1800">Các tế bào gan không lắng đọng glycogen</p>	 <p data-bbox="901 1715 1406 1800">Các cầu thận và ống thận không thấy tổn thương</p>

Hình 3. 28. Hình ảnh mô gan, thận đại diện của từng nhóm thử nghiệm (Nhuộm PAS, độ phóng đại 400 lần)

4.1. VỀ CƠ SỞ DỮ LIỆU NGUỒN CÁ NÓC VÀ ĐỘC TỔ CÁ NÓC

Theo nghiên cứu, ở Việt Nam có 46 loài cá nóc, trong 4 họ (*Diodontidae*, *Ostraciidae*, *Tetraodontidae*, *Triodontidae*) sống ở biển, trong đó họ Cá nóc (*Tetraodontidae*) là chủ yếu, chiếm khoảng 85%. Tổng trữ lượng cá nóc trên toàn vùng biển Việt Nam năm 2005 khoảng 37.400 tấn, trong đó ở vùng biển Trung Bộ khoảng 16.000 tấn, tây Nam Bộ khoảng 7.800 tấn và vịnh Bắc Bộ khoảng 5.600 tấn.

Các nghiên cứu từ trước tới nay về độc tính cá nóc chủ yếu để phòng chống ngộ độc cá nóc. Các nghiên cứu về ứng dụng độc tố cá nóc đã được một số tác giả trong nước thực hiện trong khoảng 10 năm lại đây, cho thấy có thể sử dụng độc tố cá nóc làm thuốc cai nghiện hoặc thuốc giảm đau. Một số tác giả đã nghiên cứu kết hợp dịch chiết của cá nóc với một số thảo dược để thử nghiệm làm thuốc giảm đau, hỗ trợ cai nghiện. Nghiên cứu này cũng đã khảo sát đánh giá độc tính cấp, độc tính bán trường diễn của sản phẩm nghiên cứu.

Tuy vậy, độc tố cá nóc rất khác nhau tùy thuộc vào cá thể và mùa sinh sản, nếu không chuẩn hóa được nguyên liệu đầu vào về chất lượng và độc tính sẽ không an toàn và không được cấp phép đăng ký sản xuất thuốc theo quy định.

Nghiên cứu này đã thu thập, xây dựng được bộ cơ sở dữ liệu về đặc điểm hình thái, sinh thái cũng như sơ bộ dữ liệu độc tố của 10 loài cá nóc độc. Các loài này chủ yếu thuộc họ cá nóc 4 răng *Tetraodontidae*. Bộ dữ liệu này góp phần làm giảm số vụ ngộ độc do ăn nhầm phải cá nóc độc, giúp định hướng cho các nghiên cứu tiếp theo, cho các nghiên cứu lựa chọn, chuẩn hóa nguồn nguyên liệu trong các định hướng ứng dụng làm thuốc. Từ những năm 2000, cá nóc và các sản phẩm từ cá nóc vẫn thuộc diện cấm đánh bắt, thu mua, chế biến, vận chuyển, kinh doanh theo Chỉ thị của Bộ Thủy sản hay một số UBND như Nghệ An, Huế, Đà Nẵng, Thành phố Hồ Chí Minh, Tuy nhiên, từ năm 2013, Đề án thí điểm khai thác, thu mua, chế biến và xuất khẩu cá nóc bảo đảm an toàn thực phẩm giai đoạn 2013-2015 đã được Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn phê duyệt ngày 26/6/2013 nhằm thí điểm khai thác, thu mua, chế biến, xuất khẩu cá nóc tại một số tỉnh để tận thu nguồn cá đã khai thác phục vụ xuất khẩu, hạn chế không để người dân sử dụng cá nóc độc làm thực phẩm, ảnh hưởng đến sức khỏe. Chính vì vậy, cá nóc lại có thể là nguồn cung cấp nguyên liệu TTX dồi dào, đặc biệt là có thể tận dụng phế

phẩm của ngành công nghiệp chế biến cá nóc là phủ tạng. Điều này làm tăng lợi ích kinh tế và thặng dư xã hội.

Qua việc nghiên cứu dữ liệu các loài cá nóc có độc tính, định hướng cho việc thu phủ tạng của các loài có độc tính nhằm chiết xuất *TTX* lượng lớn phục vụ thiết lập chất chuẩn và nghiên cứu ứng dụng trong y học.

4.2. VỀ NGHIÊN CỨU PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN, ĐỊNH TÍNH VÀ ĐỊNH LƯỢNG ĐỘC TÍNH, ĐỘC TỔ THẦN KINH *TETRODOTOXIN* VÀ CÁC CHẤT TƯƠNG TỰ *TETRODOTOXIN*

4.2.1. Sàng lọc, phát hiện độc tính bằng phương pháp sinh hóa chuột

Phương pháp này đã được chấp nhận trên toàn thế giới [16], [43], [135], tuy nhiên, phương pháp này lại có nhược điểm là độ nhạy không cao, không đặc hiệu, bởi độc tố *tetrodotoxin* có nhiều dẫn chất cũng mang độc tính. Hơn nữa, việc sử dụng dung dịch trắng là dung dịch *acid acetic* 0,02% để tiêm phúc mạc chuột cũng gây tỷ lệ tử vong chuột cao, vì vậy nghiên cứu chỉ có ý nghĩa khi 2/3 số chuột đối chứng không bị chết. Chúng tôi sử dụng phương pháp chỉ để thử nghiệm nhanh trên chuột nhất cho biết loài cá có độc hay không, độc ít hay rất độc, sơ lược đánh giá hàm lượng *TTX* và *TTXs* cao hay thấp, qua đó sàng lọc để loại những loài cá không độc hoặc độc ít.

4.2.2. Các phương pháp định tính *tetrodotoxin* và dẫn chất

Hàm lượng *TTX* trong cá nóc ở chỉ mức độ vết, do đó để phân tích, phải qua nhiều giai đoạn làm giàu độc tố. Qua nghiên cứu định tính *TTX* bằng sắc ký lớp mỏng thông thường cho thấy, độ nhạy thấp và kém đặc hiệu. Thêm vào đó, để định tính *TTX* trong cá nóc phải sử dụng một lượng chất đối chiếu không nhỏ, trong khi chất chuẩn đối chiếu *TTX* rất đắt. Vì vậy, chúng tôi sẽ không sử dụng phương pháp định tính *TTX* bằng TLC trong các nghiên cứu tiếp theo.

Phương pháp khối phổ ESI có độ nhạy cao, có thể sử dụng để định tính hoặc định lượng chính xác hàm lượng *TTX* trong phủ tạng cá nóc.

Với nồng độ của *TTX* khoảng 0,1 $\mu\text{g/ml}$ dung dịch thử, sau khi làm sạch có thể phát hiện bằng cách tiêm mẫu trực tiếp qua syringe vào detector khối phổ của các thiết bị LC/MS (ion trap, quadrupole) để phát hiện mảnh khối phân tử $[M + H]^+$ m/z 320 hoặc mảnh ion con m/z 302, 162 của *TTX*. Trong nghiên cứu này, ESI MS được sử dụng để phân tích *TTXs* trong quá trình phân lập và tinh chế được từ phủ tạng cá nóc, thêm thông tin cho bộ dữ liệu xác định cấu trúc và khẳng định cấu trúc của *TTX*.

Sử dụng phổ khối phân giải cao (*HR ESI MS*), lần đầu tiên ở Việt Nam trong nghiên cứu phát hiện *TTX*, có độ nhạy tốt và cho phép phát hiện *TTXs*. Nhờ độ phân giải và độ chính xác cao, cho phép dự đoán phân tử các chất tương tự *TTX* nhanh. Phương pháp đã được sử dụng trong phát hiện và phân lập *TTX* và *TTXs* từ 5 loài cá nóc khác nhau. (**bảng 4.1**)

Bảng 4. 1. Các mảnh ion phân tử đặc trưng của *TTX* và các chất tương tự *TTX*

<i>Tetrodotoxin</i>	<i>6-epitetrodotoxin</i>
HR-ESI-MS: m/z 320,1087 [M + H] ⁺ (calcd. for C ₁₁ H ₁₈ N ₃ O ₈ , 320,1094)	HR-ESI-MS: m/z 320,1087 [M + H] ⁺ (calcd. for C ₁₁ H ₁₈ N ₃ O ₈ , 320,1094)
<i>5-deoxytetrodotoxin</i>	<i>6-deoxytetrodotoxin</i>
HR-ESI-MS: m/z 305,1211 [M + H] ⁺ (calcd. for C ₁₁ H ₁₉ N ₃ O ₇ , 305,1217)	HR-ESI-MS: m/z 304,1140 [M + H] ⁺ (calcd. for C ₁₁ H ₁₈ N ₃ O ₇ , 304,1145)
<i>11-deoxytetrodotoxin</i>	<i>6,11-dideoxytetrodotoxin</i>
HR-ESI-MS: m/z 304,1140 [M + H] ⁺ (calcd. for C ₁₁ H ₁₈ N ₃ O ₇ , 304,1145)	HR-ESI-MS: m/z 288,1189 [M + H] ⁺ (calcd. for C ₁₁ H ₁₈ N ₃ O ₆ , 288,1196)

Như vậy, phổ khối phân giải cao có thể được sử dụng trong nghiên cứu tạp và đánh giá định kỳ chất chuẩn, tuy nhiên, cần được nghiên cứu tiếp, không nằm trong phạm vi của nghiên cứu này.

Phổ NMR là một công cụ hữu hiệu để định danh chất. Nghiên cứu sử dụng NMR để định danh các *TTXs* phân lập được. vì vậy, kết hợp phổ 1 chiều ¹H-NMR và ¹³C-NMR và phổ 2 chiều cũng như phổ MS phân giải cao được sử dụng để nhận dạng và khẳng định chất *TTX* chiết xuất và tinh chế để làm chất chuẩn và thiết lập chất chuẩn, cũng như giúp đánh giá độ tinh khiết, xác định tạp chất liên quan của chuẩn *TTX* thiết lập được.

4.2.3. Các phương pháp định lượng *tetrodotoxin*

Do trong phân tử *TTX* không có liên kết đôi liên hợp, do đó nếu định tính và định lượng *TTX* bằng HPLC với detector UV, bước sóng phát hiện thường phải sử dụng là 201 nm, phương pháp độ nhạy thấp, độ chọn lọc thường không cao bởi trong cá nóc có rất nhiều dẫn xuất của *TTX* [182], vì vậy chỉ được sử dụng phát hiện và thu phân đoạn có *TTX* khi tinh chế bằng sắc ký bán điều chế (Preparative HPLC) trong quy trình tinh chế.

Định tính và định lượng *TTX* bằng HPLC - detector huỳnh quang (FLD), bước sóng kích thích 381 nm và bước sóng phát hiện 505 nm cho độ nhạy rất tốt. Phương pháp này được nhiều tác giả trên thế giới và ở Việt Nam sử dụng, có thể sử dụng ở những phòng thí nghiệm có sẵn phương tiện. Tuy nhiên, hạn chế của phương pháp này là phải sử dụng NaOH đặc, nóng [38], [97] tạo thành 2-amino-6-hydroxymethyl-8-hydroxyquinazoline (C9-base) để phát huỳnh quang. Điều này làm quy trình định lượng phức tạp, kéo dài thời gian chuẩn bị mẫu và phân tích. Ngoài ra, một nhược điểm nữa của phương pháp

này là cường độ huỳnh quang của *TTX* và các dẫn chất khác nhau, phụ thuộc vào cấu trúc, như: cường độ huỳnh quang của *5-deoxyTTX* và *11-deoxyTTX* chỉ bằng 1/20 và 1/100 của *TTX*, trong khi *6-epiTTX* và *11-norTTX-6(R)-ol* có cường độ huỳnh quang cao gấp 20 lần và 10 lần so với *TTX* [146]. Điều này làm ảnh hưởng đến độ nhạy, giới hạn phát hiện *TTX* và các dẫn chất.

Bản thân *TTX* chỉ tan được trong các acid hữu cơ yếu, nên không thể phân tích trực tiếp bằng phương pháp sắc ký khí khối phổ. *TTX* phải được kiềm hóa, chuyển về dạng *C9-base* (*2-amino-6-hydroxymethyl-8-hydroxyquinazoline*) rồi tạo dẫn xuất [53], [86] với *BSTFA* (*N,O-bis-trimethylsilyl-trifluoroacetamide*) [25] hoặc *MSTFA* (*N-methyl-N-TMS-trifluoroacetamide*) [37]. Điều này làm cho quá trình phân tích phức tạp và có thể làm giảm độ nhạy.

Sử dụng sắc ký lỏng khối phổ LC MS có thể định tính và định lượng *TTX*, tùy theo thiết bị, thường có độ giới hạn định lượng LOQ < 0,1 µg/ml, do đó trong nghiên cứu này, LC-MS được sử dụng để định tính và định lượng *TTXs* trong phủ tạng cá nóc, trong các dịch chiết, phân đoạn của quá trình nghiên cứu, và trong sản phẩm tinh chế và quá trình thiết lập, đánh giá chất chuẩn.

Trong các nghiên cứu của các tác giả trên thế giới, cột phân tích được sử dụng gồm cột *C₃* [155], cột *HILIC* [70], [41], [108], [128], [186], cột *amid gel* (*TSKgel Amide-80*) [69], [83] hay cột *Shodex RSpak NN-414* [100] hoặc bộ cột chuyển đổi (*Column Switching*) [60], Trong nghiên cứu này, cột được sử dụng là cột *C₈*, một loại cột phổ biến trong phân tích sắc ký lỏng hiệu năng cao, cho thấy thời gian phân tích nhanh (thời gian lưu khoảng 7 phút, 1 lần chạy mẫu là 10 phút), và cho kết quả ổn định.

4.3. PHÂN LẬP TETRODOTOXIN VÀ NHÓM CHẤT TƯƠNG TỰ TETRODOTOXIN TỪ MỘT SỐ LOÀI CÁ NÓC THU ĐƯỢC TỪ VÙNG BIỂN VIỆT NAM

Do quá trình thu bắt cá nóc gặp phải nhiều khó khăn, rào cản, hơn nữa tập trung thu bắt định hướng vào các loài cá nóc độc, nên số lượng cá thể các loài cá nóc thu được là không nhiều, chỉ tập chung chủ yếu ở 5 loài:

- + *Arothron hispidus* (cá nóc chuột vằn bụng),
- + *Arothron immaculatus* (cá nóc viền đuôi đen),
- + *Lagocephalus inermis* (cá nóc răng mỏ chim),
- + *Lagocephalus lunaris* (cá nóc tro),
- + *Takifugu oblongus* (cá nóc vằn).

Qua nghiên cứu sàng lọc, chúng tôi nhận thấy đây cũng là 5 loài có độc tố mạnh, vì vậy, chúng tôi lựa chọn 5 loài này để nghiên cứu phân lập các hợp chất của *TTX*.

Từ nghiên cứu phát hiện *TTX* và nhóm chất tương tự *TTX*, qua xem xét cấu trúc, chúng tôi đã sử dụng phương pháp phân lập các chất này bằng sắc ký lọc gel và trao đổi cation yếu (*Bio-Gel P2* và *Bio-Rex 70*). Đã phân lập được *TTX* và 5 chất tương tự *TTX*, gồm 6-deoxytetrodotoxin từ cá nóc viền đuôi đen *Arothron immaculatus*; 6-epitetrodotoxin và 5-deoxytetrodotoxin từ cá nóc vằn *Takifugu oblongus*; 11-deoxytetrodotoxin từ cá nóc răng mỏ chim *Lagocephalus inermis* và 6,11-dideoxytetrodotoxin phân lập từ cá nóc tro *Lagocephalus lunaris*. Các hợp chất này đã được nghiên cứu, phân lập bởi nhiều tác giả trên thế giới, từ nhiều loài khác nhau, cả cá nóc [109], [177] và những loài khác như loài sấu *Cephalothrix simula* [30], sa giông *Cynops ensicauda* [171], ... Tuy nhiên, phân lập chúng từ các loài cá nóc ở Việt Nam thì chưa có tác giả trong và ngoài nước nào nghiên cứu.

Độc chất chiết từ cá nóc là hỗn hợp của hơn 10 *analog*, chủ yếu là *TTX*, (chiếm tới 70% - 80% khối lượng chiết). Việc lấy ra được các chất tương tự khác sẽ góp phần vào những nghiên cứu liên quan giữa cấu trúc và tác dụng của độc tố thần kinh *TTX* trên hệ thần kinh.

Một trong những vấn đề được đặt ra hiện nay là hoạt lực của *TTX* trên hệ thần kinh quá mạnh, tác dụng chặn kênh Na^+ của *TTX* trên hệ thần kinh có phục hồi, *TTX* có hủy hoại tế bào thần kinh hay không vẫn đang được nghiên cứu làm sáng tỏ. Việc tìm kiếm các dẫn xuất khác của *TTX* có hoạt lực thấp hơn hay thiết kế các dẫn chất sao cho tạo liên kết *ligand* – *receptor* được phục hồi là cần thiết đối nghiên cứu phát triển thuốc mới.

Các hợp chất tương tự *TTX* sẽ được tiếp tục nghiên cứu trong hướng phát triển thuốc mới, tìm kiếm các chất dẫn đường (*lead compounds*) tiềm năng, hạn chế nhược điểm của *TTX*, và bổ sung thêm cho các nghiên cứu tìm hiểu về sự hình thành độc tố trong sinh vật cũng như nghiên cứu liên quan giữa cấu trúc và tác dụng của nhóm chất này (*Structure Activity Relationship, SAR*)... vv

Việc chiết tách được các *TTXs* cũng góp phần nghiên cứu, phân tích một số tạp chất liên quan trong quá trình sử dụng *TTX* làm nguyên liệu thiết lập chuẩn hay làm nguyên liệu để bào chế các dạng chế phẩm làm thuốc ứng dụng trong y học. Điều này rất quan trọng, việc kiểm soát hàm lượng *TTX* là chưa đủ, bởi các *TTXs* khác cũng có độc tính khá

mạnh, trong khi kiểm soát độc tố bằng các thử nghiệm độc tính cấp, độc tính bán trường diễn cũng chỉ mang tính tương đối.

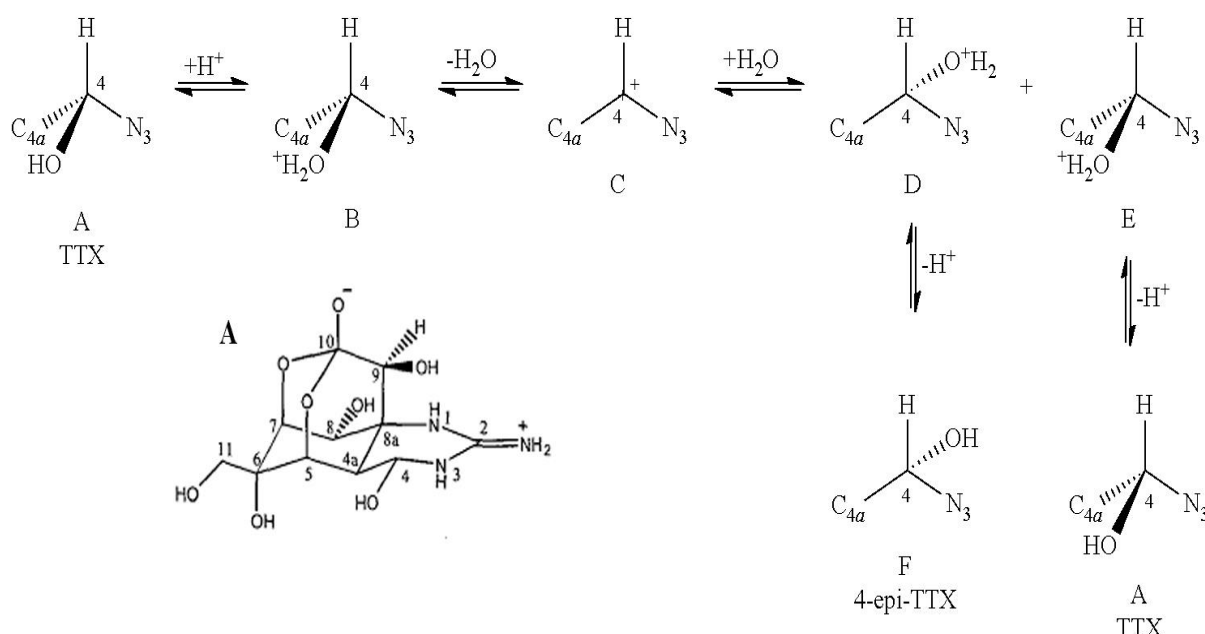
4.4. VỀ PHƯƠNG PHÁP CHIẾT XUẤT VÀ TINH CHẾ *TETRODOTOXIN* ĐẠT ĐỘ TINH KHIẾT LÀM NGUYÊN LIỆU THIẾT LẬP CHẤT CHUẨN

4.4.1. Chiết xuất

Các nhóm chức quan trọng quyết định hoạt tính của phân tử *TTX* bao gồm:

- Nhóm *guanidin* tích điện dương với 3 nguyên tử *nitơ*;
- Vòng *pyrimidin* với 3 vòng liên kết tạo thành 03 nhóm hydroxyl (có chức năng giữ ổn định cho phức hợp gắn kết giữa *TTX* và kênh Na^+ tại bề mặt pha lỏng).

Ngoài ra, vị trí C-4 cũng ảnh hưởng đến hoạt lực, độc tính của *TTX*. C-4 là vị trí ortho của nguyên tử nitơ với nhóm OH ở vị trí liên kết biên và nguyên tử H ở vị trí liên kết trục. Bởi vậy, các hoạt tính hóa học và sinh học của nhóm hydroxyl ở C-4 là rất đáng kể. Nếu H^+ có mặt trong dung dịch, nguyên tử ôxy từ nhóm hydroxyl của C-4 sẽ kết hợp với nó, tạo ra cấu trúc B hóa trị dương từ cấu trúc A. Cấu trúc B mất phân tử H_2O tạo thành cấu trúc C với C-4 hóa trị dương.



Hình 1. 25. Cơ chế epimer hoá OH-C4 của *TTX*

Cấu trúc C có thể tương tác với H_2O trong dung dịch. H_2O có thể tấn công vị trí nơi phân tử H_2O gốc bị loại bỏ và tạo thành cấu trúc E, hoặc tấn công vị trí đối diện nơi phân tử H_2O gốc bị loại bỏ và tạo thành cấu trúc D. Nếu phân tử H_2O bị loại khỏi cấu trúc E, cấu trúc A gốc của *TTX* được tạo thành. Cấu trúc D chuyển thành cấu trúc F sau khi H_2O bị loại bỏ. Sự khác nhau giữa cấu trúc F và cấu trúc A là vị trí của H và OH

hoán đổi cho nhau. H trong C-4 của cấu trúc A là liên kết trực và OH là vị trí biên, trong khi đó ở cấu trúc F nguyên tử H trong C-4 là xích đạo và OH là trục.

Tetrodotoxin cấu trúc A được gọi “*tetrodotoxin*”, là chất chủ yếu của *TTX* thu được từ cá nóc tự nhiên. *Tetrodotoxin* cấu trúc F thường được gọi “4-*epi tetrodotoxin*”. Do nhóm hydroxyl ở C-4 gần với nhóm hydroxyl ở C-9 trong 4-*epi tetrodotoxin*, phân tử H_2O dễ dàng bị loại bởi tương tác với H^+ , tạo ra một analog của *TTX* chứa liên kết ether, được gọi là “4-*epi anhydro tetrodotoxin*”. Các đặc tính hóa học của các phân tử này khác nhau không đáng kể. Nhưng chúng khác nhau đáng kể về hoạt tính sinh học. Ví dụ, độc tố của *TTX* là 4500 MU/mg; của 4-*epiTTX* là 710 MU/mg và của 4-*epi anhydro tetrodotoxin* chỉ là 92 MU/mg [109].

Sự quan trọng của nhóm hydroxyl C-4 còn thể hiện ở chỗ: độc tính của nó giảm đáng kể khi nó được thay thế bằng những nhóm khác, như H, CH_3 hay CH_3CO- . Do đó, về lý thuyết, cần giữ nhóm hydroxyl trong C-4 ở vị trí xích đạo trong quá trình chiết *TTX*.

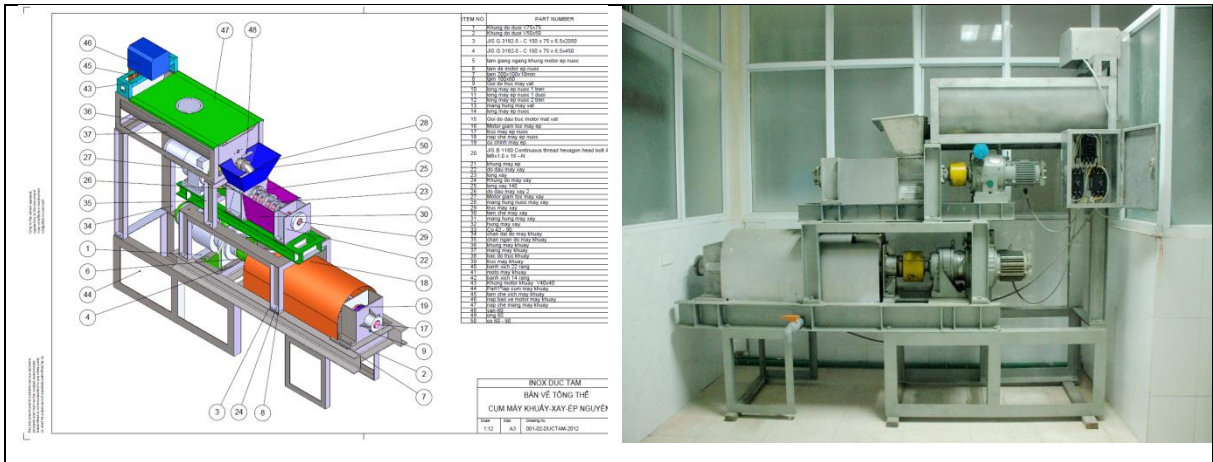
Như vậy, điều quan trọng là cần phải lựa chọn đúng các vật liệu và thiết bị chiết, khoảng pH và nhiệt độ của dung dịch, cũng như thời gian chiết phù hợp để thu được *TTX* tối đa. Kết quả khảo sát cho thấy hàm lượng *TTX* trong nội tạng cá nóc từ vài chục đến vài trăm $\mu\text{g/g}$ tùy theo bộ phận trứng hay gan, từ đó chúng tôi thiết kế chiết xuất 10 kg/mẻ, không cần phải tách riêng trứng và gan.

Do *TTX* rất ít tan trong nước và các dung môi thông thường, nhưng lại hòa tan tốt trong acid nhẹ, do đó chúng tôi chọn *acid acetic 10%* để ngâm chiết.

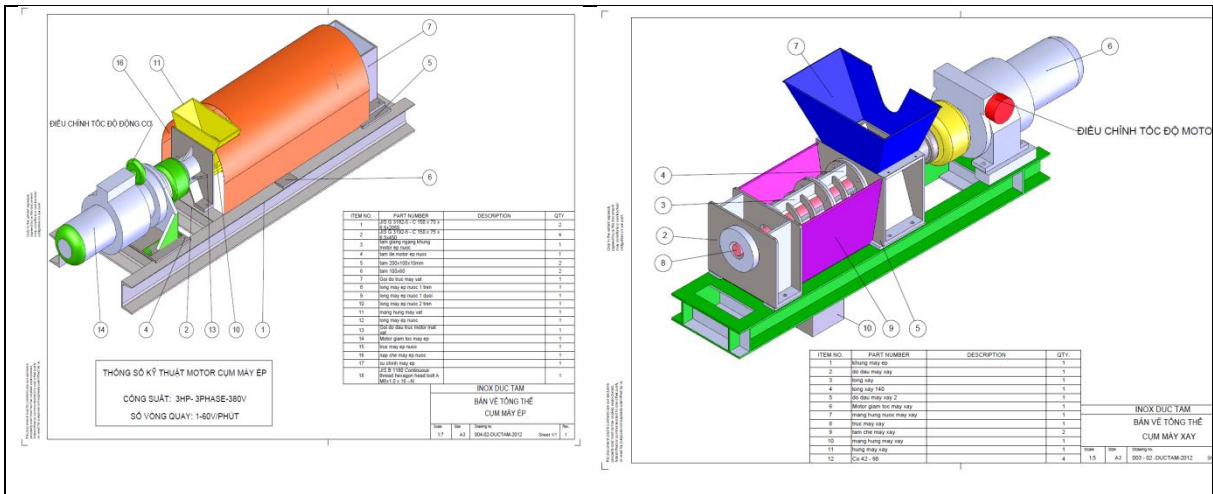
Để hỗ trợ cho việc ngâm chiết, chúng tôi đã thiết kế thiết bị xay ngâm chiết (hình 4.1). Khác với các tác giả khác, thiết kế thùng ngâm và cánh khuấy trộn mạnh, trong thiết kế của chúng tôi, thiết kế ngâm sau đó xay 2 lần, xay thô và xay mịn theo nguyên tắc trực nghiền ép tốc độ cao qua mắt rây thô và mắt rây mịn.

Thiết kế này có thể xay ngâm chiết tối đa 25 - 30 kg phủ tạng/mẻ, tuy nhiên, để phù hợp với các thiết bị khác, quy trình chiết được tiến hành là 10 kg. Vận hành 3 mẻ có thể thu được lượng *TTX* cần thiết khoảng là 100 – 200 mg.

Do *TTX* bền nhiệt, do đó quá trình loại protein hòa tan được xử lý bằng cách đun nóng dịch chiết tới 85 – 90°C. Dịch chiết được kiềm hóa, *TTX* được tách ra trên cột trao đổi *cation acid yếu* (nhựa *Amberlit IRC-60*) để làm giàu độc tố. Quá trình sơ tinh chế đã thu được *TTX* thô có hàm lượng $\geq 80,0\%$, sau đó tiếp tục tinh chế qua sắc ký lỏng điều chế để thu được *TTX* có độ tinh khiết $\geq 95\%$ để thiết lập chất chuẩn.



Hình 4. 1. Thiết bị xay, ngâm và chiết: Mô hình và thiết bị sử dụng trong nghiên cứu



Hình 4. 2. Sơ đồ thiết kế phần ngâm, xay thô và motor điều tốc

4.4.2. Tinh chế

Quá trình tinh chế được thực hiện bằng sắc ký lỏng điều chế, sử dụng cột ODS (HIQ Sil, 250 x 21,2 mm, 5µm hoặc 10 µm), dung dịch tiêm sắc ký có nồng độ khoảng 20 mg/ml, tiêm mỗi lần 200 µl (tinh chế được khoảng 3 – 4 mg TTX/1 lần sắc ký). Do TTX không hấp thụ UV, do đó bước sóng phát hiện phải đặt ở bước sóng ngắn (201 nm), và trong pha động, chúng tôi có sử dụng thêm 1 lượng chất tạo cặp ion là natri heptansulfonat để làm tăng khả năng phát hiện TTX.

Sử dụng sắc ký bán điều chế đã thu được **93,49 mg** tinh thể TTX có hàm lượng 98,27 % với độ lệch chuẩn tương đối (RSD) 0,69%, đảm bảo độ tinh khiết để thiết lập chất chuẩn. Từ TTX tinh khiết có thể nghiên cứu bào chế thuốc tiêm giảm đau hoặc tạo các dẫn xuất khác nhằm giảm độc tính hoặc thay đổi ái lực với kênh Na⁺ là một hướng nghiên cứu có thể được thực hiện tiếp.

4.5. THIẾT LẬP CHẤT CHUẨN *TETRODOTOXIN*

Luận án đã thiết lập dung dịch *TTX* chuẩn 0,1 mg/ml, đã nghiên cứu sự ổn định của *TTX* trong một số dung môi thông thường, và đã lựa chọn *đệm citrat pH 4,8*, quá trình theo dõi độ ổn định cho thấy dung dịch chuẩn ổn định trong 6 tháng ở nhiệt độ - 20°C

Xây dựng được quy trình đóng ống chuẩn, dung dịch được đóng trong lọ thủy tinh nâu. Từ dung dịch này, có thể pha vào bình định mức 5 hoặc 10 ml để tạo dung dịch chuẩn gốc 10 µg/ml hoặc 20µg/ml phục vụ kiểm nghiệm hoặc nghiên cứu.

Chất đối chiếu *TTX* lần đầu tiên được thiết lập ở Việt Nam, sẽ giúp cơ quan quản lý chủ động trong việc kiểm tra, giám sát độc tố *TTX* trong an toàn thực phẩm, độc tố và các nghiên cứu ứng dụng *TTX* làm thuốc

Tuy nhiên, hiện nay chất chuẩn *TTX* trên thế giới thường đóng 1 mg/lọ, do đó nếu có điều kiện, trong các nghiên cứu tiếp theo, sẽ nâng cấp chất chuẩn *TTX*, thiết lập lọ chuẩn nồng độ *TTX* 1mg/ml hoặc 1mg/lọ bằng phương pháp đông khô.

4.6. BỘT ĐÔNG KHÔ *TETRODOTOXIN* 0,1 %

Để phục vụ các nghiên cứu ứng dụng *TTX* trong y học, và bào chế sản phẩm có chứa *TTX* sử dụng trong y học, do *TTX* có hoạt lực rất cao và nồng độ *TTX* trong dịch chiết không ổn định, vậy cần phải bào chế bột đông khô có nồng độ *TTX* thấp, ổn định nhằm pha loãng, làm thành nguyên liệu để có thể dễ dàng bào chế được các chế phẩm khác.

Từ bột *TTX* thô có nồng độ $\geq 80\%$, bào chế bột đông khô sử dụng lactose làm tá dược đệm. Luận án cũng đã xây dựng dự thảo *Tiêu chuẩn chất lượng Bột TTX đông khô 0,1 %*, định lượng hàm lượng của chế phẩm và thử độc tính cấp và bán trường diễn của chế phẩm. Kết quả độc tính cho thấy bột đông khô này hoàn toàn có thể sử dụng làm nguyên liệu để bào chế các sản phẩm tiếp theo.

Bột đông khô *TTX* nồng độ 0,1% là định hướng ứng dụng gần nhất, nhằm góp phần vào các nghiên cứu phát triển thuốc của các tác giả trên thế giới cũng như ở Việt Nam hướng tới: bào chế thuốc cai nghiện hoặc thuốc giảm đau. Với giả thiết mỗi viên nang có chứa lượng *TTX* là 100 ng, vậy 100 g bột đông khô có thể bào chế được 1 triệu viên thuốc tương ứng với 2 hoặc 3 lô công nghiệp (quy mô 300.000 – 500.000 viên/lô).

Đây là định hướng ứng dụng tiềm năng nhất cho việc ứng dụng độc tố thần kinh *TTX* từ cá nóc, có thể phục vụ cho hàng triệu người cai nghiện và bệnh nhân ung thư ở Việt Nam cũng như trên thế giới. Tác dụng giảm đau của *TTX* đã được biết đến từ lâu, tuy nhiên, do độc tính quá mạnh nên chưa được ứng dụng. Gần đây, trên thế giới, đã có chế

phẩm chứa *TTX* [35], [62], [111] đang được nghiên cứu làm thuốc hỗ trợ giảm đau trong điều trị ung thư và đang được nghiên cứu lâm sàng pha III, đó là cơ sở vững chắc cho định hướng ứng dụng sản phẩm của luận án. Tuy nhiên, các chế phẩm trên đều được bào chế từ *TTX* tinh khiết, sử dụng đường tiêm. Định hướng bột đông khô làm nguyên liệu để bào chế thuốc, sử dụng qua đường uống, vì vậy, nghiên cứu này cũng thử nghiệm đánh giá độc tính cấp, độc tính bản trường diễn qua đường uống của bột đông khô có chứa 0,1% *TTX*. Đây cũng là điểm khác so với các nghiên cứu độc tính trên thế giới khi các báo cáo đưa ra độc tính của *TTX* chủ yếu sử dụng đường tiêm như tiêm dưới da, tiêm phúc mạc ổ bụng. Tuy nhiên, để phục hướng nghiên cứu này, cần thiết:

+ Hoàn chỉnh dự thảo tiêu chuẩn chất lượng, kiểm nghiệm và thẩm định, đặc biệt là giới hạn hàm lượng, giới hạn tạp chất liên quan phải được kiểm soát chặt chẽ.

+ Hoàn thiện quy trình bào chế bột đông khô và theo dõi, đánh giá độ ổn định

+ Đánh giá độc tính, thử nghiệm tác dụng giảm đau hoặc/và hỗ trợ điều trị cai nghiện của chế phẩm sau khi bào chế từ bột đông khô.

Ngoài ra, bột đông khô nồng độ 0,1% có thể trở thành dạng bán thành phẩm của nhiều dạng thuốc chứa *TTX* phục vụ các mục đích khác nhau mà các nhà khoa học trên thế giới đang còn tiếp tục nghiên cứu như:

+ Thuốc gây tê, gây mê dùng trong phẫu thuật

+ Thuốc kháng virus HIV

+ Thuốc kháng một số loại ung thư như ung thư vú.

4.7. ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

(1) - Đưa ra được bộ dữ liệu về 10 loài cá nóc độc ở Việt Nam, gồm: đặc điểm hình thái, danh pháp, hình ảnh tiêu bản và bộ dữ liệu độc tính, góp phần nhận dạng cá nóc độc và định hướng trong các nghiên cứu tiếp theo.

(2) - Lần đầu tiên, thu được hợp chất *TTX* tinh khiết (>95%) và chất chuẩn đối chiếu hóa học *TTX* được thiết lập tại Việt Nam. Chất chuẩn này sẽ được sử dụng trong kiểm nghiệm độc tố *TTX* trong an toàn thực phẩm và các nghiên cứu ứng dụng *TTX* làm thuốc. Ngoài ra, từ *TTX* tinh khiết có thể nghiên cứu bào chế thuốc tiêm hoặc tạo các dẫn xuất khác nhằm giảm độc tính hoặc thay đổi ái lực với kênh Na^+ là những hướng nghiên cứu có thể được thực hiện tiếp.

(3) - Ngoài *TTX*, lần đầu tiên ở Việt Nam, phân lập được 5 dẫn chất của *TTX* là 6-deoxytetrodotoxin từ cá nóc viền đuôi đen *Arothron immaculatus*, 6-epitetrodotoxin và

5-deoxytetrodotoxin từ cá nóc vằn *Takifugu oblongus*, *11-deoxytetrodotoxin* từ cá nóc răng mỏ chim *Lagocephalus inermis* và *6,11-dideoxytetrodotoxin* phân lập từ cá nóc tro *Lagocephalus lunaris*. Các hợp chất tương tự *TTX* (*TTX analogues* hay *TTXs*) sẽ được tiếp tục nghiên cứu trong hướng phát triển thuốc mới, tìm kiếm các chất dẫn đường (lead compounds) tiềm năng, hạn chế nhược điểm của *TTX*, và bổ sung thêm cho các nghiên cứu tìm hiểu về sự hình thành độc tố trong sinh vật cũng như nghiên cứu liên quan giữa cấu trúc và tác dụng của nhóm chất này, ... vv

(4) - Xây dựng được quy trình chiết xuất, tinh chế và tiêu chuẩn bột *TTX* thô >80%, qua phân tích có thể xác định 20% còn lại chủ yếu là các chất độc thần kinh *TTXs*. Các analogues này qua các nghiên cứu cho thấy độc tính của chúng thường kém hơn nhiều lần so với độc tính của *TTX*. Từ bột *TTX* thô này luận án đã bào chế thử nghiệm dạng bột đông khô nồng độ 0,1%. Bột đông khô này đã được xây dựng tiêu chuẩn cơ sở để kiểm soát chất lượng, đánh giá độc tính để có thể định hướng ứng dụng làm nguyên liệu bào chế các sản phẩm khác, đặc biệt là các sản phẩm giảm đau, hỗ trợ cai nghiện, ... Ngoài ra, từ bột đông khô này còn có thể hướng đến nhiều dạng thuốc chứa *TTX* phục vụ các mục đích khác nhau mà các nhà khoa học trên thế giới đang còn tiếp tục nghiên cứu như:

- + *Thuốc gây tê, gây mê dùng trong phẫu thuật*
- + *Thuốc kháng virus HIV*
- + *Thuốc kháng một số loại ung thư như ung thư vú.*

(5) - Thiết kế được hệ thống thiết bị xay ngâm chiết *TTX* từ phủ tạng cá nóc độc ở Việt Nam (đã đăng ký giải pháp hữu ích), cùng với quy trình công nghệ phân lập, tinh chế *TTX* có thể áp dụng thực hiện trên quy mô lớn, công nghiệp hóa. Đối tượng của quy trình công nghệ này là phủ tạng các loài cá nóc độc, như vậy có thể tận dụng phế phẩm của ngành công nghiệp chế biến cá nóc là phủ tạng. Điều này làm tăng lợi ích kinh tế và thặng dư xã hội, góp phần khai thác hợp lý nguồn lợi tự nhiên tương đối lớn ở biển Việt Nam là cá nóc.

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

KẾT LUẬN

Sau quá trình thực hiện, mục tiêu của luận án đã được hoàn thành, với kết quả cụ thể như sau:

- Sàng lọc và phát hiện *TTX* trong một số loài cá nóc:

+ Thu thập, định danh và tiêu bản 10 loài cá nóc độc, gồm: (1) cá nóc chuột vằn bụng (*Arothron hispidus*), (2) cá nóc chuột chấm sao (*Arothron stellatus*), (3) cá nóc tro (*Lagocephalus lunaris*), (4) cá nóc vằn mặt (*Torquigener brevipinnis*), (5) cá nóc thu (*Lagocephalus sceleratus*), (6) cá nóc viền đuôi đen (*Arothron immaculatus*), (7) cá nóc chấm cam (*Torquigener gloerfelti*), (8) cá nóc vàng (*Lagocephalus spadiceus*), (9) cá nóc răng mỏ chim (*Lagocephalus inermis*) và (10) cá nóc vằn (*Takifugu oblongus*). Tất cả 10 loài này đều thuộc họ cá nóc 4 răng *Tetraodontidae*.

+ Tiến hành sàng lọc nhanh độc tố của một số bộ phận (thịt, gan, ruột, trứng, tinh sào) của các loài cá này, cho thấy 10 loài cá nóc này đều là cá nóc độc, độc tố chủ yếu tập trung ở gan, trứng, tinh sào và ruột. Trong đó, đã định lượng được chính xác hàm lượng *TTX* trong gan, trứng của 3 loài cá nóc chuột vằn bụng (*Arothron hispidus*), cá nóc tro (*Lagocephalus lunaris*) và cá nóc vằn (*Takifugu oblongus*). Kết quả cho thấy hàm lượng *TTX* trong các loài khác nhau là khác nhau, không phải bộ phận nào cũng chứa hàm lượng *TTX* như nhau, trong đó hàm lượng *TTXs* trong trứng là cao nhất.

- Chiết xuất phân lập và xác định cấu trúc một số độc tố thần kinh khác

+ Phân lập được 5 hợp chất tương tự *TTX* (*tetrodotoxin analogues*, kí hiệu *TTXs*): *5-deoxytetrodotoxin*, *6-epitetrodotoxin*, *6-deoxytetrodotoxin*, *11-deoxytetrodotoxin* và *6,11-dideoxytetrodotoxin*. **Các hợp chất này lần đầu tiên được phân lập từ các loài cá nóc thu được ở Việt Nam**, sẽ góp phần vào các nghiên cứu độc tố *TTX*.

+ Xây dựng được bộ phổ dữ liệu định danh của *TTX* và các dẫn chất, bao gồm phổ khối, phổ khối phân giải cao và phổ cộng hưởng từ hạt nhân.

- Xây dựng quy trình phân lập *tetrodotoxin* có độ tinh khiết phù hợp để làm chất chuẩn và định hướng sử dụng trong y học.

+ **Đã tinh chế được tổng lượng 93,49 mg *TTX* tinh khiết đạt hàm lượng 98,27%.**

+ Làm chủ được công nghệ/kỹ thuật chiết xuất và tinh chế *TTX* có độ tinh khiết cao, ***lần đầu tiên ở Việt Nam thiết lập được chất chuẩn TTX*** phục vụ kiểm nghiệm và nghiên cứu, góp phần cho hướng nghiên cứu ứng dụng *TTX* trong y học.

+ Xây dựng được bộ phổ dữ liệu định danh *TTX* gồm phổ khối, phổ khối phân giải cao và phổ cộng hưởng từ hạt nhân

+ Đã đưa ra định hướng sử dụng trong y học:

* Đã thiết lập được 100 lọ chuẩn *TTX* nồng độ 0,1 mg/ml, đóng trong lọ thủy tinh nâu chứa dung dịch đệm *citrat pH 4,8* đã được theo dõi độ ổn định trước khi đóng lọ.

* ***Đã chiết xuất, phân lập được bột TTX thô có hàm lượng > 80%.***

* Bào chế thử nghiệm bột đông khô có chứa 0,1% *TTX*, đã xây dựng tiêu chuẩn cơ sở, đánh giá chất lượng, độc tính của bột này. Từ bột này có thể ứng dụng tiếp làm nguyên liệu bào chế thuốc cũng như các chế phẩm có chứa *TTX*

ĐỀ XUẤT

- Ứng dụng chất chuẩn *TTX* thiết lập được để phục vụ công tác kiểm nghiệm, kiểm tra đánh giá các chế phẩm có chứa *TTX* hay tiếp tục phục vụ công tác nghiên cứu khác về *TTX* và *TTXs*.

- Tiếp tục nghiên cứu thiết lập chất chuẩn đối chiếu *TTX* 1 mg/lọ dạng đông khô

- Tiếp tục nghiên cứu ứng dụng bột đông khô *TTX* 0,1 % hay các dạng nguyên liệu bán thành phẩm khác để có thể bào chế thuốc giảm đau hoặc hỗ trợ điều trị cai nghiện.

- Khai thác hợp lý nguồn lợi cá nóc biển Việt Nam.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ

<i>TT</i>	<i>Tên bài báo</i>	<i>Tên tạp chí</i>	<i>Số Tạp chí và thời điểm phát hành</i>
1	Tetrodotoxin Constituents in the Vietnamese Sea Pufferfish <i>Takifugu oblongus</i>	The International Journal Of Science & Technoledge	Vol 2, Issue 13 12/2014
2	Định lượng nguyên liệu <i>tetrodotoxin</i> phân lập từ các loài họ cá nóc (<i>Tetraodontidae</i>) bằng sắc ký lỏng ghép nối khối phổ (LC-MS/MS)	Tạp chí dược học	Số 466, 02/2015
3	Một số kết quả nghiên cứu bước đầu về thành phần hoá học và độc tố tetrodotoxin từ loài cá nóc vằn (<i>Takifugu Oblongus</i>) ở Việt Nam	Tạp chí dược học	Số 467, 03/2015
4	Nghiên cứu chiết và tinh chế độc tố <i>tetrodotoxin</i> từ phủ tạng một số loài cá nóc độc (<i>Tetraodontidae</i>) của vùng biển Việt Nam	Tạp chí dược học	Số 468, 04/2015
5	Nghiên cứu định tính, định lượng <i>tetrodotoxin</i> trong bột đông khô <i>tetrodotoxin</i> 0,1% bằng phương pháp sắc ký lỏng khối phổ (LC-MS/MS)	Tạp chí dược học	Số 475, 11/2015

TÀI LIỆU THAM KHẢO

TIẾNG VIỆT

1. Đái Duy Ban (2009) *Nghiên cứu sử dụng Tetrodotoxin làm thuốc hỗ trợ điều trị các bệnh tim mạch, ung thư, nghiện ma túy, nghiện thuốc lá, nghiện rượu và HIV/AIDS*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội,
2. Trần Đáng (2004) "Sự phân bố độc tố cá nóc". *Tạp chí Thông tin y dược*, 6, 8-10.
3. Trần Đáng, cs. (2004) *Điều tra tình hình các yếu tố liên quan và mô hình can thiệp nhằm kiểm soát ngộ độc thực phẩm do cá nóc*, Cục An toàn vệ sinh thực phẩm,
4. Nguyễn Thị Dụ (2004) "Ngộ độc cá nóc". *Tạp chí y học quân sự*, 4, 57-60.
5. Đào Việt Hà, Phạm Xuân Kỳ, Nguyễn Phương Anh, Phan Bảo Vy, Đặng Quốc Minh (2012) *Độc tính Tetrodotoxin ở ốc hương *Babylonia areolata* (Link, 1807) nuôi bằng thức ăn chế biến từ cá nóc độc. Chương trình Hội nghị Khoa học Biển Đông.*
6. Vũ Việt Hà, Nguyễn Hoài Nam, Đặng Văn Thi (2005) *Hiện trạng nguồn lợi cá nóc ở biển Việt Nam. Tuyển tập các công trình nghiên cứu nghề cá biển*. NXB. Nông nghiệp Hà Nội,
7. Bùi Thị Thu Hiền (2010) *Đánh giá kết quả nghiên cứu đã đạt được từ năm 2009-2010 và định hướng cho các nghiên cứu tiếp theo của đề tài: Nghiên cứu phân lập, nuôi cấy chủng vi sinh vật sản sinh Tetrodotoxin (TTX) trong cá nóc độc Việt Nam và tách chiết TTX. Tài liệu hội thảo khoa học.*
8. Bùi Thị Thu Hiền (2013) *Nghiên cứu công nghệ nuôi cấy và thu nhận Tetrodotoxin từ một số chủng vi khuẩn phân lập từ cá nóc độc Việt Nam*, Công nghệ sinh học, Đại học Bách Khoa Hà Nội,
9. Bùi Thị Thu Hiền, Nguyễn Hữu Hoàng, Phạm Quốc Long, Khuất Hữu Thanh (2012) "Nghiên cứu quy trình công nghệ tinh sạch tetrodotoxin từ sinh khối vi khuẩn". *Nông nghiệp và phát triển nông thôn*, 1 (2), 66-72.
10. Bùi Thị Thu Hiền, Bùi Trọng Tâm, Phạm Quốc Long (2009) "Tetrodotoxin nguồn gốc vi sinh vật và triển vọng ứng dụng trong y dược ở Việt Nam". *Tuyển tập Hội nghị Khoa học toàn quốc về sinh học biển và phát triển bền vững*, 626-634.
11. Lê Văn Hiệp, Nguyễn Ái Thường, Lâm Thành Hưng, Ngô Phú, Nguyễn Công Bảy (2007) "Bước đầu thử nghiệm tinh chế độc tố cá nóc". *Tạp chí Y học dự phòng*, 7 (92), 26-29.
12. Lê Quang Huân (1996) *Nghiên cứu hoàn thiện quy trình tách chiết, tinh chế và đánh giá hàm lượng Tetrodotoxin của một số loài cá nóc (Tetraodontidae) vùng biển miền Trung ở Việt Nam*, Luận án Phó Tiến sỹ Khoa học Sinh học, chuyên ngành lý sinh,
13. Lê Quang Huân, Đái Duy Ban, Phan Xuân Đọc (2010) "Cơ chế phân tử của chế phẩm Bahudo chứa Tetrodotoxin (TTX) dùng trong hỗ trợ giảm đau và cai nghiện ma túy". *Tạp chí Nghiên cứu y học*, 71 (6), 131-134.
14. Lê Quang Huân, Nguyễn Gia Bình, Đái Duy Ban (2010) "Những thay đổi một số chỉ tiêu sinh hóa sau khi sử dụng chế phẩm BAHUDO". *Tạp chí Y học Việt Nam*, 372 (2), 124-129.
15. Lê Quang Huân, Lê Xuân Tú (1994) "Tách chiết và tinh chế tetrodotoxin từ phủ tạng cá nóc (Tetraodontidae) tại vùng biển Việt Nam". *Tạp chí Sinh học*, 3, 38-41.
16. Nguyễn Văn Lê (2004) "Nghiên cứu độc tính cá nóc và các giải pháp xử lý, chế biến, quản lý từ khâu khai thác đến khâu tiêu thụ cá nóc đảm bảo an toàn vệ sinh thực phẩm". *Kỷ yếu hội thảo toàn quốc về khai thác chế biến và dịch vụ hậu cần nghề cá*, 256-264.

17. Nguyễn Văn Lê, Nguyễn Hữu Hoàng, Bùi Thị Thu Hiền và ctv (2006) "Kết quả phân tích độc tố cá nóc biển Việt Nam". *Tuyển tập Nghiên cứu nghề cá biển*, 4, 256-264.
18. Dược điển Việt Nam (2009) Dược điển Việt Nam IV.
19. Nguyễn Hoài Nam, Đặng Văn Thi (2007) "Một số thông tin về cá nóc biển Việt Nam". *Tạp chí Thủy sản*, 1, tr. 25-28.
20. Đỗ Tuyết Nga, Đào Việt Hà, Phạm Xuân Kỳ, Lưu Thị Hà, Cao Phương Dung (2003) "Xác định độc tố *Tetrodotoxin* trong một số loài cá nóc thu ở Nha Trang (năm 2001)". *Tuyển tập Nghiên cứu biển, Nha Trang*, 13/2003, 215-224.
21. Trần Văn Sung (2002) *Phổ cộng hưởng từ hạt nhân trong hóa hữu cơ*, Nxb: Đại học quốc gia Hà Nội,
22. Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương (2009) *Ứng dụng sắc ký lỏng khối phổ trong kiểm nghiệm thuốc*, Tài liệu đào tạo,
23. Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương (2008) Báo cáo tổng thuật đề tài "Nghiên cứu phát triển bộ dữ liệu chuẩn của một số dược liệu thường dùng phục vụ công tác kiểm tra giám sát chất lượng dược liệu và thuốc đông dược". *Đề tài cấp Bộ Y tế (2006-2008)*.
24. Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương (2010) Báo cáo tổng hợp đề tài "Nghiên cứu chiết tách, tinh chế một số hợp chất đặc trưng từ dược liệu để làm chất chuẩn phục vụ kiểm nghiệm dược liệu". *Đề tài cấp nhà nước (MS: KC.10.16/06-10, 2008 - 2010) thuộc Chương trình KHCN trọng điểm cấp nhà nước KC.10/06-10*.

TIẾNG ANH

25. Alcaraz A., Whipple R.E., Gregg H.R., Andresen B.D., Grant P.M. (1998) "Analysis of tetrodotoxin". *Forensic Science International*, 99 (1999), 35-45.
26. Alguacil L.F., Pérez-García C., Salas E., González-Martín C., Castillo C., Polanco M.J., Herradón G., Morales L. (2008) "Subcutaneous tetrodotoxin and inflammatory pain". *Br. J. Anaesth.*, 100, 729-730.
27. Alonso D., Khalilb Z., Satkunanathanb N., Livettec BG. (2003) "Drugs From the Sea: Conotoxins as Drug Leads for Neuropathic Pain and Other Neurological Conditions". *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 3, 785-787.
28. Andrew H., Bois J. D. (2003) "A Stereoselective Synthesis of (-)-Tetrodotoxin". *Journal of the American Chemical Society*, 125 (38), 11510-11511.
29. Arakawa H. (1956) *J.Chem.Soc.Japan*, 77, 1732-1740.
30. Asakawa M., Ito K., Kajihara H. (2013) "Highly toxic ribbon worm *Cephalothrix simula* containing tetrodotoxin in Hiroshima Bay, Hiroshima Prefecture, Japan.". *Toxins*, 5, 376-395.
31. Asakawa M., Toyoshima T., Ito K., Bessho K., Yamaguchi C., Tsunetsugu S., Shida Y., Kajihara H., Mawatari S. F., Noguchi T., Miyazawa K. (2003) "Paralytic toxicity in the ribbon worm *Cephalothrix* species (Nemertea) in Hiroshima Bay, Hiroshima Prefecture, Japan and the isolation of tetrodotoxin as a main component of its toxins.". *Toxicon*, 41, 747-753.
32. Bane V, Lehane M., Dikshit M., O'Riordan A., Furey A. (2014) "Tetrodotoxin: Chemistry, Toxicity, Source, Distribution and Detection". *Toxins*, 6, 693-755.
33. Beloeil H., Ababneh Z., Chung R., Zurakowski D., Mulkern R.V., Berde C.B. (2006) "Effects of bupivacaine and tetrodotoxin on carrageenan-induced hind paw inflammation in rats (Part 1): Hyperalgesia, edema, and systemic cytokines". *Anesthesiology*, 105, 128-138.

34. Buschmann H. H., Farre Gomis A., Hamon M. (2006) Analgesic combination of sodium channel blockers with opioid antagonists. IN Patent (Ed.).
35. Buschmann H. H., Shum F.H.K, Fisher K.N, Ngoc A.H., Hamon M. (2009) Tetrodotoxin And Its Derivatives For The Treatment Of Central-Nervously Derived Neuropathic Pain. IN Patent (Ed.) Wex Pharmaceuticals, Inc., USA.
36. Charles B. Berde, Umeshkumar Athiraman, Barak Yahalom, David Zurakowski, Gabriel Corfas, Christina Bogner (2011) "Tetrodotoxin-Bupivacaine-Epinephrine Combinations for Prolonged Local Anesthesia". *Marine Drugs*, 9, 2717-2728.
37. Che Nin Man, Norjuliana Mohd Noor, Gam Lay Harn, Razak Lajis, Samsur Mohamad (2010) "Screening of tetrodotoxin in puffers using gas chromatography–mass spectrometry". *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010), 7455-7459.
38. Chen CY., Chou HN. (1998) "Detection of *Tetrodotoxin* by High Performance Liquid Chromatography in Lined-Moon Shell and Puffer Fish". *Acta Zoologica Taiwanica*, 9 (1), 41-48.
39. Chen J.J., Lue J.H., Lin L.H., Huang C.T., Chiang R.P., Chen C.L., Tsai Y.J. (2010) "Effects of pre-emptive drug treatment on astrocyte activation in the cuneate nucleus following rat median nerve injury". *Pain*, 148, 158–166.
40. Chen R., Chung SH. (2014) "Mechanism of *tetrodotoxin* block and resistance in *sodium* channels". *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 446 (1), 370-374.
41. Cho HE., Ahn SY., Son IS., In S., Hong RS., Kim DW., Woo SH., Moon DC., Kim S. (2012) "Determination and validation of *tetrodotoxin* in human whole blood using hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectroscopy and its application". *Forensic Science International*, 217, 76–80.
42. Chung-him Yu (2008) "Detection and Biosynthesis of Puffer Fish Toxin from Bacterial Culture for Novel Medical Application".
43. Dao Viet Ha Nguyen Tien Dung, Nguyen Thu Hong, Yoshinobu Takata, Shigeru Sato, Masaaki Kodama, Yasuwo Fukuyo (2012) "High individual variation in the toxicity of three species of marine puffer in Vietnam". *Coastal Marine Science*, 35 (1), 1-6.
44. David R. Lide (2005-2006) *CRC Handbook of Chemistry and Physics 86TH Edition*, CRC Press, Taylor & Francis, Boca Raton, FL2005, 3-482.
45. Duff H. J., Sheldon R. S., Cannon N. J. (1988) "Tetrodotoxin sodium channel specific anti arrhythmic activity". *Cardio vascular research*, 22, 800-807.
46. Edward G. Moczydlowski (2013) "The molecular mystique of tetrodotoxin". *Toxicon*, 63, 165-183.
47. Efsa Panel on Contaminants in the Food Chain Knutsen H.K., Alexander J., Barregård L., Bignami M., Brüschweiler B., Ceccatelli S., Cottrill B., Dinovi M., Edler L., Grasl-Kraupp B., Hogstrand C., Hoogenboom L., Nebbia C.S., Oswald I. P., Rose M., Roudot AC., Schwerdtle T., Vleminckx C., Vollmer G., Wallace H., Arnich N., Benford D., Botana L., Viviani B., Arcella D., Binaglia M., Horvath Z., Steinkellner H., van Manen M., Petersen A. (2017) "Risks for public health related to the presence of *tetrodotoxin* (TTX) and TTX analogues in marine bivalves and gastropods". *EFSA Journal*, 15 (4), 4752-4817.
48. Entrena J.M., Cobos E.J., Nieto F.R., Cendán C.M., Gris G., Del Pozo E., D. Zamanillo, Baeyens J.M. (2009) "Sigma-1 receptors are essential for capsaicin-induced mechanical hypersensitivity: Studies with selective sigma-1 ligands and sigma-1 knockout mice". *Pain*, 143, 252–261.

49. Fleisher JH., Killos PJ., Harrison CS. (1960) "Effects of puffer poison on neuromuscular transmission". *Technical Report. CRDLR. US Army Edgewood Arsenal Chemical Research and Development Laboratories*, 3046, 1-26.
50. Fouda Fatma M. (2005) "Anti-tumor activity of tetrodotoxin extracted from the Masked Puffer fish *Arothron diadematus*". *Egyptian Journal of Biology*, 7, 1-13.
51. Froese R. and D. Pauly. Editors. (2007) 448 "Family Tetraodontidae - Puffers". FishBase.
52. Fuhrman F.A. (1967) "Tetrodotoxin". *In: Scientific American*, 217 (2), 6171.
53. Fukushima S. (1991) "Examination of the poisoning level of tetrodotoxin in body fluids". *Japanese Journal of Forensic Toxicology*, 9, 126–127.
54. Goto T., et al (1964) "Extraction and purification of the puffer fish toxin tetrodotoxin". *Japan Chemical society*, 85, 508.
55. Goto T., Kishi Y., Takahashi S., Hirata Y. (1965) "Tetrodotoxin.". *Tetrahedron*, 21, 2059–2088.
56. Hagen N.A., Lapointe B., Ong-Lam M., Dubuc B., Walde D., Gagnon B., Love R., Goel R., Hawley P., Ngoc A.H., du Souich, P. (2011) "A multicentre open-label safety and efficacy study of tetrodotoxin for cancer pain". *Curr. Oncol.*, 18, 109–116.
57. Hagen N.A., Fisher K.M., Lapointe B., du Souich P., Chary S., Moulin D., ellers E., A.H. Ngoc (2007) "Canadian Tetrodotoxin Study Group. An open-label, multi-dose efficacy and safety study of intramuscular tetrodotoxin in patients with severe cancer-related pain". *J. Pain Symptom Manag*, 34, 171 - 182.
58. Hagen N.A., du Souich P., Lapointe B., Ong-Lam M., Dubuc B., Walde D., Love R., Ngoc A.H.. . 10: 305 (2012) "Canadian Tetrodotoxin Study Group. Tetrodotoxin for moderate to severe cancer". *Mar. Drugs*,
59. Hashimoto Y. (1979) *Marine toxins and other marine bioactive metabolites*, Japan Scientific Societies Press,
60. Hayashida M., Hayakawa H., Wada K., Nihira M., Ohno Y. (2004) "Sensitive Determination of Tetrodotoxin Using Column Switching Liquid Chromatography Mass Spectrometry with Electrospray Ionization in Mouse Serum". *Journal of Analytical Toxicology*, 28, 46-49.
61. Houck C.S., Khodorova A., Reale A.M., Strichartz G.R., G. Davar (2004) "Sensory fibers resistant to the actions of tetrodotoxin mediate nocifensive responses to local administration of endothelin-1 in rats.". *Pain*, 110, 719–726.
62. Howard Cohen (2004) "Puffer Fish Toxin for Cancer Pain".
63. Huang Audris *Synthetic Approaches to Tetrodotoxin*,
64. Hwang D. F., Arakawa O., Saito T., Noguchi T., Simidu U., Tsukamoto K., Shida Y., Hashimoto K. (1989) "Tetrodotoxin-producing bacteria from the Blue-ringer octopus *Octopus maculosus*". *Marine Biology*, 100, 327-332.
65. Ikeda S. R., Schofield G. G. (1987) "Tetrodotoxin resistant sodium current of rat no dose, monovalent cation selectivity and divalent cation block". *The Journal of Physiology*, 389, 255-270.
66. Islam Q.T., Razzak M.A., Islam M.A., Bari M.I., Basher A., Chowdhury F.R., Sayeduzzaman A.B.M., Ahasan H.A.M.N., Faiz M.A., Arakawa O., et al. (2011) "Puffer fish poisoning in Bangladesh: Clinical and toxicological results from large outbreaks in 2008". *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 105 (74-80)
67. Iwamoto T., Takasugi Y., Higashino H., Ito H., Koga Y., Nakao S. (2011) "Antinociceptive action of carbamazepine on thermal hypersensitive pain at spinal level

- in a rat model of adjuvant-induced chronic inflammation." *Journal of Anesthesia*, 25, 78–86.
68. Jang J.H., Yotsu-Yamashita M. (2007) "6,11-DideoxyTTX from the puffer fish, *Fugu pardalis*". *Toxicon.*, 50, 947–951.
69. Jang JH., Lee JS., Yotsu-Yamashita M. (2010) "LC/MS Analysis of *Tetrodotoxin* and Its Deoxy Analogs in the Marine Puffer Fish *Fugu niphobles* from the Southern Coast of Korea, and in the Brackishwater Puffer Fishes *Tetraodon nigroviridis* and *Tetraodon biocellatus* from Southeast Asia". *Marine drugs*, 8, 1049-1058.
70. Jen HC., Lin SJ., Tsai YH., Che CH., Lin ZC., Hwang DF. (2008) "Tetrodotoxin poisoning evidenced by solid-phase extraction combining with liquid chromatography–tandem mass spectrometry". *Journal of Chromatography B*, 871, 95–100.
71. Jeon J. K., Narita H., Nara M., Noguchi T., Maruyama J., Hashimoto K. (1984) "Occurrence of *tetrodotoxin* in a gastropod mollusk, "araregai" *Niotha clathrata*". *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish*, in press
72. Kao C.Y. (1966) "Tetrodotoxin, Saxitoxin, and their significance in the study of excitation phenomena". In: *Pharmacological Reviews*, Copyright 1966 by the Williams & Wilkins, 18 (2), 997-1049.
73. Kao C.Y., Furman F.A. (1963) "Pharmacological studies on *tetrodotoxin*, a potent neurotoxin". *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 140, 31–40.
74. Kawastsu K., Y. Hamano, T. Yoda, Y. Terano, T. Shibata (1997) "Rapid and highly sensitive enzyme immunassay for quantitative determination of *tetrodotoxin*". *Japanese Journal of Medical Science and Biology*, 50, 133-150.
75. Kayser V., Viguier F., Ioannidi M., Bernard J.F., Latrémolière A., Michot B., Vela J.M., Buschmann H., Hamon M., Bourgoin S. (2010) "Differential anti-neuropathic pain effects of tetrodotoxin in sciatic nerve- versus infraorbital nerve-ligated rats-behavioral, pharmacological and immunohistochemical investigations". *Neuropharmacology*, 58, 474–487.
76. Keeler J. (2010) *Understanding NMR Spectroscopy*, Wiley,
77. Keiichi Matura, James C Tyler (1998) *Encyclopedia of fishes*. IN W.N., P. J. R. E. (Ed.) San Diego: Academic Press.
78. Khora S.S., Yasumoto T. (1989) "Isolation of 11-oxotetrodotoxin from the puffer *Arothron nigropunctatus*". *Tetrahedron Lett.*, 30, 4393–4394.
79. Kim Y.H., Brown G.B., Moshe H.S., Fuhrman F.A. (1975) "Tetrodotoxin: Occurrence in atelopid frogs of Costa Rica". *Science*, 189, 151-152.
80. Kishi Y., et. al (1972) *Journal of the American Chemical Society*, 94, 9217-9221.
81. Kodama M., Ogata T., Noguchi T., Maruyama J., Hashimoto K. (1983) "Occurrence of *saxitoxin* and other toxins in the liver of the puffer fish *Takifugu pardalis*". *Toxicon*, 21 (96), 897-900.
82. Kotake M., Arakawa, H. (1956) *J.Inst.Polytech.Osaka City Univ (C)*, 5, 57.
83. Kudo Y., Finn J., Fukushima K., Sakugawa S., Cho Y., Konoki K., Yotsu-Yamashita M. (2014) "Isolation of 6-Deoxytetrodotoxin from the Pufferfish, *Takifugu pardalis*, and a Comparison of the Effects of the C-6 and C-11 Hydroxy Groups of *Tetrodotoxin* on Its Activity". *Journal of Natural Products*, 77 (4), 1000-1004.
84. Kungsuwan A., Arakawa O., Promdet M., 53 (8): 1341-1346 Onoue Y. . (1997) "Occurrence of paralytic shellfish poisons in Thai Freshwater puffers.". *Toxicon.*, 53 (8), 1341.

85. Kuno M., Goto K., Oka S., Negishi H., Hosogamada A., Inada (1988) "The effect of *TTX* in cardiovascular dynamics". *The Japanese Journal of Anesthesiology*, 37 (5), 530-535.
86. Kurono S., Hattori H., Suzuki O., Yamada T., Seno H. (2001) "Sensitive analysis of tetrodotoxin in human plasma by solid-phase extraction and gas chromatography/mass spectrometry". *Analytical Letters*, 34, 2439–2446.
87. Lee MJ., Jeong DY., Kim WS., Kim HD., Kim CH., Park WW., Park YH., Kim KS., Kim HM., Kim DS. (2000) "A *tetrodotoxin*-producing *Vibrio* strain, LM-1, from the puffer fish *Fugu vermicularis radiatus*". *Appl Environ Microbiol*, 66 (4), 1698-1701.
88. Lesort M., Diop A. G., Eschaire F., Sindon P. (1994) "TTX block HIV coat protein gp-120 toxicity in primary neuronal cultures". *Neu. Lett.*, 165 (1-2), 187-190.
89. Leung KS., Fong BM., Tsoi YK. (2011) "Analytical challenges: determination of *tetrodotoxin* in human urine and plasma by LC-MS/MS". *Marine drugs*, 9, 2291-2303.
90. Lyu Y.S., Park S.K., Chung K., Chung J.M. (2000) "Low dose of tetrodotoxin reduces neuropathic pain behaviors in an animal model". *Brain Res*, 871, 98–103.
91. Mahmud Y., Yamamori K., T. Noguchi (1999) "Occurrence of TTX in a brackishwater puffer “Midorifugu” *Tetraodon nigroviridis*, collected from Thailand". *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, 40, 363-367.
92. Manabu A., Miyazawa K., Shida Y., Noguchi T. (2012) "Instrumental Analysis of *Tetrodotoxin*". *Chromatography-the most versatile method of chemical analysis*, 245-270.
93. Maoqing Naning (CN) Zhou, North Point Frank Hay Kong Shum (2003) Method of extracting tetrodotoxin. *United State Patent*. USA.
94. Maoqing Naning Zhou, North Point Frank Hay Kong Shum (2003) Method of purrifying *tetrodotoxin*. IN Patent, U. S. (Ed.). USA.
95. Maran B.A., Iwamoto E., Okuda J., Matsuda S., Taniyama S., Shida Y., Asakawa M., Ohtsuka S., Nakai T., Boxshall G. A. (2007) "Isolation and characterization of bacteria from the copepod *Pseudocaligus fugu ectoparasitic* on the panther puffer *Takifugu pardalis* with the emphasis on *TTX*". *Toxicon*, 50, 779–790.
96. Marcil J., Walczak J.S., Guindon J., Ngoc A.H., Lu S., Beaulieu P. (2006) "Antinociceptive effects of *tetrodotoxin (TTX)* in rodents.". *British Journal of Anaesthesia* 96, 761–768.
97. Margaret A., O’Leary, Jennifer J. Schneider, Geoffrey K. Isbister (2004) "Use of high performance liquid chromatography to measure tetrodotoxin in serum and urine of poisoned patients". *Toxicon*, 44, 549–553.
98. Maruyama J., Noguchi T., Jeon J. K., Yamazaki K., Hashimoto K. (1983) "An other occurrence of *tetrodotoxin* in a trumpet shell *Charonia sauliae*". *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, 24, 465-468.
99. Maruyama J., Noguchi T., Jeon J. K., Harada T., Hashimoto K. (1984) "Occurrence of *tetrodotoxin* in starfish *Astropecten latespinosus*". *Experientia*, in press
100. Masakazu Horie, Susumu Kobayashi, Naoto Shimizu, Hiroyuki Nakazawa (2002) "Determination of tetrodotoxin in puffer-fish by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry". *Analyst* 127, 755-759.
101. Matsui T., Hamada S., Konosu S. (1981) "Difference in Accumalation of puffer fish toxin and crytalline *TTX* in the puffer fish, *Fugu rubripes rubripes*". *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 47 (4), 535-537.

102. Matsui T., Taketsugu S., Sato H., Yamamori K., Hirose H., Shimizu C. (1990) "Toxification of Cultured puffer fish by the administration of *tetrodotoxin* producing bacteria". *Nippon Suisan Gakkaishi*, 56 (4), 705.
103. Matsui T., Taketsugu S., Kodama K., Ishii A., Yamamori K., Shimizu C. (1989) "Production of TTX by the Intestinal Bacteria of a puffer fish *Takifugu niphobles*". *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55 (12), 2199-2203.
104. Matsumura K. (1995) "Reexamination of *tetrodotoxin* production by bacteria". *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (9), 3468-3470.
105. Mosher H.S., Fuhrman F.A., Buchwald H.D., Fisher H. G. (1964) "Tarichatoxin - Tetrodotoxin: a potent neurotoxin". *Science*, 144, 1100-1110.
106. Murtha E. F., Stabile D.E., Wills J.H. (1958) "Some pharmacological effects of puffer poison". *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 122, 247-254.
107. Nagashima Y, Mataka I, Toyoda M, Nakajima H, Tsumoto K, Shimakura K, Shiomi K. (2010) "Change in tetrodotoxin content of the puffer fish *Takifugu rubripes* during seed production from fertilized eggs to juveniles". *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 51 (1), 48-51.
108. Nakagawa T., Junho J., Yotsu-Yamashita M. (2006) "Hydrophilic interaction liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry of tetrodotoxin and its analogs". *Analytical Biochemistry*, 352, 142-144.
109. Nakamura M., Yasumoto T. (1985) "Tetrodotoxin derivatives in puffer fish.". *Toxicon*, 23, 271-276.
110. Narahashi T. (1972) "Mechanism of action of *tetrodotoxin* and *saxitoxin* on excitable membranes". *Federation proceedings*, 31 (2), 1124-1132.
111. Narahashi T. (2000) "Neuroreceptors and Ion Channels as the Basis for Drug Action: Past, Present, and Future". *The journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 294 (1), 1-26.
112. Narahashi T., Haas HG., Therrien EF. (1967) "*Saxitoxin* and *tetrodotoxin*: comparison of nerve blocking mechanism". *Science*, 157 (3795), 1441-1442.
113. Narita H., Matsubara S., Miwa N., et al. (1987) "*Vibrio alginolyticus*, a TTX-producing bacterium isolated from the starfish *Astropecten polyacanthus*". *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53 (4), 617-621.
114. Narita H., Noguchi T., Maruyama J., Nara M., Hashimoto K. (1984) "Occurrence of *tetrodotoxin* - associated substance in a gastropod, "*hanamushirogai*" *Zeuxis siquijorensis*". *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish*, 50, 85-88.
115. Narita H., Noguchi T., Maruyama J., Ueda Y., Hashimoto K., Watanabe Y., Hida K. (1981) "Occurrence of *tetrodotoxin* in a trumpet shell, "*boshubora*" *Charonia sauliae*". *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish*, 47, 935-941.
116. Nguyen T.H.K., Nguyen H.N., Nghe D.V., Nguyen K.H. (2015) "Biological Activities of Tetrodotoxin-Producing *Enterococcus faecium* AD1 Isolated from Puffer Fishes". *BioMed Research International*, 2015, 8.
117. Ngy L., K. Tada, C.F. Yu, T. Takatani, O. Arakawa (2008) "Occurance of paralytica shellfish toxins in Cambodian Mekong pufferfish *Tetraodon turgidus*: Selective toxin accumulation in the skin". *Toxicon*, 51, 280-288.
118. Nieto F.R., Entrena J.M., Cendán C.M., Pozo E.D., Vela J.M., Baeyens J.M. (2008) "Tetrodotoxin inhibits the development and expression of neuropathic pain induced by paclitaxel in mice". *Pain*, 137, 520–531.

119. Nieto FR., Cobos EJ., Tejada MÁ., Sánchez-Fernández C., González-Cano R., Cendán CM. (2012) "*Tetrodotoxin (TTX) as a Therapeutic Agent for Pain*". *Marine drugs*, 10 (2), 281-305.
120. Nishikawa T., Urabe D., Isobe M. (2004) "An efficient total synthesis of optically active *tetrodotoxin*". *Angewandte Chemie International Edition*, 43, 4782–4785.
121. Noda M., T. Ikeda, T. Kayono, H. Suzuki, H. Takeshima, M. Kurasaki, H. Takahashi, and S. Numa (1986) "Existence of distinct sodium channel messenger RNAs in rat brain". *Nature*, 320, 188-192.
122. Noguchi T., Hwang D F., Arakawa O., Sugita H., Deguchi Y., Shida Y., Hashimoto K. (1987) "*Vibrio alginolyticus*, a *tetrodotoxin*-producing bacterium, in the intestines of the fish *Fugu vermicularis vermicularis*". *Marine Biology*, 94 (625-630)
123. Noguchi T., Maruyama J., Narita H., Hashimoto K. (1984) "Occurrence of *tetrodotoxin* in the gastropod mollusk *Tutufa lissostoma* (frog shell)". *Toxicon*, 22, 219-226.
124. Noguchi T., Jeon J.K., Arakawa O., Sugita H., Deguchi Y., Shida Y., Hashimoto K. (1986) "Occurrence of *tetrodotoxin* and *anhydrotetrodotoxin* in *Vibrio* sp. isolated from the intestines of a xanthid crab". *Atergatis floridus. J. Biochem.*, 99 (1), 311-314.
125. Noguchi T., Arakawa O. (2008) "*Tetrodotoxin – Distribution and Accumulation in Aquatic Organisms, and Cases of Human Intoxication*". *Marine drugs*, 6, 220-242.
126. Noguchi T., Hashimoto Y. (1973) "Isolation of *tetrodotoxin* from a goby *Gobius criniger*". *Toxicon*, 11 (3), 305-307.
127. Nozaki-Taguchi N., Chaplan S.R., Higuera E.S., Ajakwe R.C., Yaksh T.L. (2001) "*Vincristine*-induced allodynia in the rat". *Pain*, 93 (1), 69–76.
128. Nzoughet JK., Campbell K., Barnes P., Cooper KM., Chevallier OP., Elliott CT. (2013) "Comparison of sample preparation methods, validation of an UPLC–MS/MS procedure for the quantification of *tetrodotoxin* present in marine gastropods and analysis of pufferfish". *Food Chemistry*, 136 (3-4), 1584–1589.
129. O'Neil M.J (ed.) (2006) *The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*, Whitehouse Station, NJ: Merck and Co., Inc., 1590.
130. Ohyabu N., Nishikawa T., Isobe M. (2003) "First asymmetric total synthesis of *tetrodotoxin*". *journal of the American Chemical Society*, 125, 8798–8805.
131. Onoue Y., Noguchi T., Hashimoto K. (1984) *Tetrodotoxin determination method*. IN E.P.Ragelis, e. (Ed.) "*Seafood Toxin*" American Chemical Society, Washington, DC., 345-355.
132. Pavelka L. A., Kim Y. H., Mosher H. S. (1977) "*Tetrodotoxin* and *tetrodotoxin*-like compound from the eggs of the Costa Rican frog, *Atelopus chiriquiensis*". *Toxicon*, 15, 135-139.
133. Ritchie K.B, Nagelkerken I., Jame S., Smit G.W. (2000) "A *tetrodotoxin*-producing marine pathogen". *Nature*, 404, 354.
134. Roger S., Le Guennec JY, Besson P. (2004) "Particular sensitivity to calcium channel blockers of the fast inward voltage-dependent sodium current involved in the invasive properties of a metastatic breast cancer cell line". *Brit. J. Pharmacology*, 141, 610–615.
135. Sabrah M. M., El-Ganainy A. A., Zaky M. A. (2006) "Biology and toxicity of the pufferfish *Lagocephalus sceleratus* (Gmelin, 1789) from the Gulf of Suez". *Egyptian journal of aquatic research*, 32 (1), 283-297.
136. Saito T., Kanoh S., Noguchi T., Shida Y., Hashimoto K. (1987) Occurrence of *anhydrotetrodotoxin* in several nontoxic species of puffer. IN C.K.Tan, P. G. a. (Ed.)

Progress in venom and toxin research. National University of Singapore, Singapore., 314-324.

137. Santini F., Sorenson L, Alfaro ME. (2013) "A new phylogeny of tetraodontiform fishes (Tetraodontiformes, Acanthomorpha) based on 22 loci". *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 69 (1), 177-187.

138. Saoudi M., Abdelmouleh A., El Feki A. (2010) "Tetrodotoxin: A potent marine toxin". *Toxins*, 29, 60-70.

139. Sato K., Akai S., Shoji H., Sugita N., Yoshida S., Nagai Y., Suzuki K., Nakamura Y., Kajihara Y., Funabashi M., Yoshimura J. (2008) "Stereoselective and Efficient Total Synthesis of Optically Active *Tetrodotoxin* from *D-Glucose*". *The Journal of Organic Chemistry*, 73, 1234-1242.

140. Sato S., Kodama M., Ogata T., Saitanu K., Furuya M., Hirayam K., Kakinuma K. (1997) "Short communications: *saxitoxin* as a toxic principle of a fresh water puffer, *Tetraodon fangi* in Thailand". *Toxicon*, 35 (1), 137-140.

141. Sato S., Ogata T., Borja V., Gonzales C., Fukyo Y., Kodama M. (2000) "Frequent occurrence of paralytic shellfish poisoning toxins as dominant toxins in marine puffer from tropical water.". *Toxicon*, 38: 1101-1109, 38, 1101-1109.

142. Schwartz DM, Fields HL, Duncan KG, Duncan JL, Jones MR. (1998) "Experimental study of tetrodotoxin, a long-acting topical anesthetic". *Am. J. Ophthalmol.*, 125 (4), 481-487.

143. Schwartz D M., Duncan K. G., Fields H. L., Jones M. R. (1998) "Tetrodotoxin: anesthetic activity in the de-epithelialized cornea.". *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol*, 236 (10), 790-794.

144. Sheumack D. D., Howden M. E. H., Spence I., Quinn R. J. (1978) "Maculotoxin: A neurotoxin from venom glands of the octopus *Hapalochlaena maculosa* identified as tetrodotoxin". *Science*, 199, 189-199.

145. Shimizu U., Noguchi T., Hwang D. F., Shida Y., Hashimoto K. (1987) "Marine bacteria which produce *tetrodotoxin*". *Applied and Environmental Microbiology*, 53, 1714-1715.

146. Shoji Y., Yamashita-Yotsu M., Miyazawa T., Yasumoyto T. (2001) "Electrospray ionization mass spectrometry of tetrodotoxin and its analogs: liquid chromatography/mass spectrometry, tandem mass spectrometry, and liquid chromatography/tandem mass spectrometry.". *Analytical Biochemistry*, 290, 10-17.

147. Sowerbutt C. (2004) "Puffer fish toxin could change the treatment of cancer pain".

148. Stan'kov I. N., Kondrat'ev V. B., Derevyagina I. D., Morozova O. T., Selivanova V. I., Semchenko F. M., Rufanov K. A., Dvoret'skaya S. I. (2016) "Gas-chromatographic determination of trace amounts of *tetrodotoxin* in water, drugs, and blood plasma". *Journal of Analytical Chemistry*, 71 (3), 289-296.

149. Tahara Y. (1909) "Studies on the puffer toxin". *J.Pharm.Soc.Japan*, 29, 587.

150. Tahara Y. (1911) *Biochem. Z.*, 30 (255-275)

151. Tamplin M. L. (1990) *Marine Toxins, Origin, Structure, and Molecular Pharmacology*. Eds: Sherwood Hall & Gary Strichartz ed., 78-86.

152. Tani I. (1948) "Toxicological studies on Japanese puffers". *Tokyo: Teikoku Tosho*,

153. Tanu M.B., Noguchi T. (1999) "*Tetrodotoxin* as a toxic principal in the horseshoe crab *Carcinoscorpius rotundicauda* collected from Bangladesh". *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, 40, 426-430.

154. Tanu M.B., Mahmud Y., Tsuruda K., Arakawa O., Noguchi T. (2001) "Occurrence of *tetrodotoxin* in the skin of a rhacophoridaid frog *Polypedates* sp. from Bangladesh." *Toxicon*, 39, 937-941.
155. Tsai Y.H., D.F. Hwang, C.A. Cheng, C.C. Hwang, J.F. Deng (2006) "Determination of *tetrodotoxin* in human urine and blood using C18 cartridge column, ultrafiltration and LC-MS". *Journal of Chromatography B*, 832, 75-80.
156. Tsuda et al. (1952) *J. Pharm. Soc. Japan*,
157. Tsuda K., Ikuma S., Kawamura M., Tachikawa R., Sakai K., Tamura C., Amakasu O. (1964) "*Tetrodotoxin*. VII. On the structures of *tetrodotoxin* and its derivatives". *Chem. Pharm. Bull. Jpn.*, 12, 1357-1374.
158. Tsuda Kagaku no Ryouiki (1967) *J. Pharm. Soc. Japan - supplement*, 80, 9.
159. Vadhanan C. P., Narendren G. (2014) "Future Local Anesthetics – Neurotoxins?". *International Journal of Anesthesiology Research*, 2, 11-15.
160. Voyksner R. D. (1997) *Combining Liquid Chromatography with Electrospray Mass Spectrometry*, In *Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation, and Applications*, John Wiley & Sons, New York, 323-342.
161. Wang GK., Srichartz GR. (2012) "State dependent inhibition of sodium channels by local anesthetics: A 40 year evolution". *Biochem (Mosc) Suppl Ser A Membr Cell Biol*, 6 (2), 120-127.
162. Wang XJ., Yu RC., Luo X., Zhou MJ., Lin XT. (2008) "Toxin-screening and identification of bacteria isolated from highly toxic marine gastropod *Nassarius semiplicatus*". *Toxicon*, 52 (1), 55-61.
163. Watters R., Michael. (2000) *Marine neurotoxins as a starting point to drugs*. In *Seafood and freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection*, Ed. Luis. M Botana, 889-896.
164. Whitehouse C. M., R. N. Dreyer, et al. (2002) "Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers". *Analytical Chemistry*, 57 (3), 675-679.
165. Woodward R.B. (1964) "The structure of *tetrodotoxin*". *Pure and Applied Chemistry*, 9, 49-74.
166. Wu B.Q., Yang L., Kao C.Y., Levinson S.R., Yotsu-Yamashita M., Yasumoto T. (1996) "*11-Oxo-tetrodotoxin* and a specifically labelled *3H-tetrodotoxin*". *Toxicon*, 34, 407-416.
167. Wu YJ. (2008) "Application of LC/FLD and LC/MS determination on *tetrodotoxin* accumulated in puffer fish".
168. Xie W., Strong J.A., Meij J.T., Zhang J.M., Yu L. (2005) "Neuropathic pain: Early spontaneous afferent activity is the trigger." *Pain*, 116, 243-256.
169. Yasumoto M., Yasumura D., Yotsu M., Michishita T., Endo A., Kotaki Y. (1986) "Bacteria production of *tetrodotoxin* and *anhydrotetrodotoxin*". *Agricultural and Biological Chemistry journal*, 50, 793-795.
170. Yasumoto T., Yasumura D., Yotsu M., Michishita T., Endo A., Kotaki Y. (1986) "Bacterial productin of *TTX* and *anhydrotetrodotoxin*". *Agricultural and Biological Chemistry journal*, 50 (3), 793-795.
171. Yasumoto T., Yotsu M., Murata M., Naoki H. (1988) "New *tetrodotoxin* analogue from the newt *Cynops ensicauda*". *J. Am. Chem. Soc.*, 110, 2344-2345.
172. Yasumoto T., Y. Oshima, M. Hosaka, S. Miyakoshi (1981) "Occurrence on *tetrodotoxin* in the ivory shell *Babylonia japonica* from Wakasa Bay". *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish*, 47, 929-934.
173. Yokoo A. (1950) *J.Chem.Soc.Japan*, 71, 590-592.

174. Yotsu-Yamashita M (2001) "Chemistry of puffer fish toxin". *J. Toxicol. Toxin Rev*, 20, 51-66.
175. Yotsu-Yamashita M., Sugimoto A., Takai A., Yasumoto T. (1999) "Effects of specific modifications of several hydroxyls of *tetrodotoxin* on its affinity to rat brain membrane". *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 289, 1688–1696.
176. Yotsu-Yamashita M., Schimmele B., Yasumoto T. (1999) "Isolation and structural assignment of 5-deoxytetrodotoxin from the puffer fish *Fugu poecilonotus*". *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 63 (5), 961-963.
177. Yotsu-Yamashita M., Yamagishi Y., Yasumoto T. (1995) "5,6,11-Trideoxytetrodotoxin from the puffer fish, *Fugu poecilonotus*". *Tetrahedron Lett.*, 36, 9329–9332.
178. Yotsu M., Endo A., Yasumoto T. (1989) "An improved tetrodotoxin analyzer.". *Agricultural and Biological Chemistry journal*, 53, 893-895.
179. Yotsu M., Yamazaki T., Meguro Y., Endo A., Murata, Naoki H., Yasumoto T. (1987) "Production of *tetrodotoxin* and its derivatives by *Pseudomonas sp.* from puffer fish". *Toxicon*, 25 (2), 225-228.
180. Yu CF, Yu PH, Chan PL, Yan Q, Wong PK. (2004 Nov) "Two novel species of tetrodotoxin-producing bacteria isolated from toxic marine puffer fishes". *Toxicon*, 44 (6), 641-647.
181. Yu CF., Yu P. HF., Chan PL., Yan Q., Wong PK. (2004) "Two novel species of *tetrodotoxin*-producing bacteria isolated from toxic marine puffer fishes". *Toxicon*, 44, 641-647.
182. Yu CH, Yu CF, Tam S, Yu PH (2010) "Rapid screening of tetrodotoxin in urine and plasma of patients with puffer fish poisoning by HPLC with creatinine correction". *Food Addit Contam*, 27, 89-96.
183. Yu C. H. (2007) *Detection and biosynthesis of puffer fish toxin from bacterial culture for novel medical application*, Department of applied biology and chemical technology, The Hong Kong Polytechnic University,
184. Yu P. HF., Yu C.F. (2008) *Method of biosynthesizing tetrodotoxin*. The Hong Kong Polytechnic University
185. Zaman L., Arakawa O., Shimos A. (1997) "Occurrence of paralytic shellfish poisoning in Bangladeshi freshwater puffer". *Toxicon*, 35 (3), 423-431.
186. Zhang X.Y, Cai X.X (2009) "Rapid determination of *tetrodotoxin* in human urine and plasma using hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry". *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 37 (12), 1829-1833.
187. Zimmer T. (2010) "Effects of *tetrodotoxin* on the Mammalian Cardiovascular System". *Marine Drugs*, 8, 741-762.

PHỤ LỤC

MỤC LỤC PHỤ LỤC

MỤC LỤC PHỤ LỤC
PHỤ LỤC 1. BỘ DỮ LIỆU MỘT SỐ LOÀI CÁ NÓC ĐỘC.....	PL-1
Phụ lục 1.1. Cá nóc chuột vân bụng	PL-1
1.1.1. Danh pháp	PL-1
1.1.2. Đặc điểm sinh thái	PL-1
1.1.3. Hình ảnh tiêu bản	PL-2
Phụ lục 1.2. Cá nóc chuột chấm sao	PL-3
1.2.1. Danh pháp.....	PL-3
1.2.2. Đặc điểm sinh thái	PL-3
1.2.3. Hình ảnh tiêu bản.....	PL-4
Phụ lục 1.3. Cá nóc viền đuôi đen	PL-5
1.3.1. Danh pháp.....	PL-5
1.3.2. Đặc điểm sinh thái	PL-5
1.3.3. Hình ảnh tiêu bản.....	PL-6
Phụ lục 1.4. Cá nóc đầu thỏ mắt to (Cá nóc tro).....	PL-7
1.4.1. Danh pháp	PL-7
1.4.2. Đặc điểm sinh thái	PL-7
1.4.3. Hình ảnh tiêu bản	PL-8
Phụ lục 1.5. Cá nóc đầu thỏ chấm tròn (Cá nóc thu)	PL-9
1.5.1. Danh pháp	PL-9
1.5.2. Đặc điểm sinh thái	PL-9
1.5.3. Hình ảnh tiêu bản.....	PL-10
Phụ lục 1.6. Cá nóc vàng.....	PL-11
1.6.1. Danh pháp.....	PL-11
1.6.2. Đặc điểm sinh thái	PL-11
1.6.3. Hình ảnh tiêu bản.....	PL-12
Phụ lục 1.7. Cá nóc răng mỏ chim.....	PL-13
1.7.1. Danh pháp	PL-13
1.7.2. Đặc điểm sinh thái	PL-13
1.7.3. Hình ảnh tiêu bản.....	PL-14
Phụ lục 1.8. Cá Nóc chấm cam vằn mắt	PL-15
1.5.1. Danh pháp	PL-15

1.8.2. Đặc điểm sinh thái:.....	PL-15
1.8.3. Hình ảnh tiêu bản.....	PL-16
Phụ lục 1.9. Cá nóc chàm cam.....	PL-17
1.9.1. Danh pháp.....	PL-17
1.9.2. Đặc điểm sinh thái.....	PL-17
1.9.3. Hình ảnh tiêu bản.....	PL-18
Phụ lục 1.10. Cá nóc vằn.....	PL-19
1.10.1. Danh pháp.....	PL-19
1.10.2. Đặc điểm sinh thái.....	PL-19
1.10.3. Hình ảnh tiêu bản.....	PL-20
PHỤ LỤC 2. BỘ DỮ LIỆU CHUẨN NHẬN DẠNG TTX VÀ CÁC CHẤT TƯƠNG	
TỰ TTX.....	PL-21
2.1. Bộ dữ liệu nhận dạng <i>TTX</i>	PL-21
2.2. Bộ dữ liệu nhận dạng <i>6-epitetrodotoxin</i>	PL-33
2.3. Bộ dữ liệu nhận dạng <i>5-deoxytetrodotoxin</i>	PL-38
2.4. Bộ dữ liệu nhận dạng <i>6-deoxytetrodotoxin</i>	PL-43
2.5. Bộ dữ liệu nhận dạng <i>11-deoxyTetrodotoxin</i>	PL-48
2.6. Bộ dữ liệu nhận dạng <i>6,11-dideoxyTetrodotoxin</i>	PL-53
PHỤ LỤC 3. CHẤT CHUẨN TETRODOTOXIN.....	PL-58
Phụ lục 3.1. Tetrodotoxin tinh khiết.....	PL-58
3.1.1. Ảnh chụp lọ tetrodotoxin tinh khiết.....	PL-58
3.1.2. Phiếu kiểm nghiệm tetrodotoxin tinh khiết.....	PL-59
Phụ lục 3.2. Chất chuẩn đối chiếu hoá học phòng thử nghiệm tetrodotoxin	PL-60
3.2.1. Ảnh chụp một số lọ chuẩn tetrodotoxin 0,1mg/ml.....	PL-60
3.2.2. Chứng chỉ phân tích.....	PL-61
PHỤ LỤC 4. BỘT ĐÔNG KHÔ TTX NỒNG ĐỘ 0,1%.....	PL-63
Phụ lục 4.1. Tetrodotoxin thô.....	PL-63
Phụ lục 4.2. Bột đông khô TTX 0,1%.....	PL-64
4.2.1. Ảnh chụp lọ bột đông khô.....	PL-64
4.2.2. Phiếu kiểm nghiệm.....	PL-65
4.2.3. Tiêu chuẩn chất lượng bột đông khô.....	PL-66

PHỤ LỤC 1. BỘ DỮ LIỆU MỘT SỐ LOÀI CÁ NÓC ĐỘC

Phụ lục 1.1. Cá nóc chuột vân bụng

1.1.1. Danh pháp

Phân loại khoa học:

- Giới: *Animalia*
- Ngành: *Chordata*
- Lớp: *Actinopterygii*
- Bộ: *Tetraodontiformes*
- Họ: *Tetraodontidae*, họ phụ *Tetraodontinae*
- Chi: *Arothron*
- Loài: *A. hispidus*

Tên khoa học: ***Arothron hispidus* (Linnaeus, 1758)**

Tên Việt Nam: Cá nóc chuột vân bụng

Tên địa phương: Cá nóc, Cá nóc mú

Tên tiếng Anh: White-spotted puffer, Stars-and-stripes Puffer

1.1.2. Đặc điểm sinh thái

Trừ phần xung quanh mõm và cuống đuôi, toàn thân đều có gai nhỏ dạng lông mao. Toàn thân có màu nâu nhạt. Phía dưới cằm, đầu, lưng, hai bên thân và cuống đuôi và trên gốc vây đuôi đều có những đốm trắng phân bố thưa và đều.

Phần bụng có những dải trắng lớn chạy từ trước ra sau.

Vì những đặc điểm này mà nó rất dễ được nhận ra. Tên tiếng anh “White-spotted puffer” xuất phát từ những chấm trắng phía trên loài cá này hay tên “Stars-and-stripes Puffer” có nghĩa là cá nóc có chấm sao và các sọc.

Xung quanh gốc vây ngực màu đen và trên đó có 1– 2 vòng tròn hoặc các vạch chỉ màu vàng.

Vây đuôi tròn, có màu đen lục, không có chấm.

Loài này có kích thước khá lớn, chiều dài tối đa khoảng 50 cm. Kích thước thường gặp của chúng khoảng 10 – 26 cm.

Chúng thường sống ở trong các hang hốc của rạn đá nằm ở độ sâu không quá 50 m, cố định ở một vùng lãnh thổ nhất định. Cá con thường sống ở vùng cửa sông.

Loài này có tập tính sống đơn lẻ và là loài ăn thịt. Chúng ăn thịt có chứa canxi hoặc tảo san hô, động vật thân mềm, tunicates, bọt biển, cua, giun nhiều tơ sâu, sao biển, urchin, nhuyễn thể.

1.1.3. Hình ảnh tiêu bản



Cá Nóc Chuột Vân Bụng (*Arothron hispidus* L.1758)

- Địa điểm thu mẫu: Nha Trang, Khánh Hoà
- Thời gian thu mẫu: 08/2012
- Người thu mẫu: TS. Đào Việt Hà, Viện Hải Dương học Nha Trang
- Nơi lưu mẫu: Phòng nghiên cứu độc tố cá nóc, Khoa Nghiên cứu phát triển, Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Phụ lục 1.2. Cá nóc chuột chấm sao

1.2.1. Danh pháp

Phân loại khoa học

- Giới: *Animalia*
- Ngành: *Chordata*
- Lớp: *Actinopterygii*
- Bộ: *Tetraodontiformes*
- Họ: *Tetraodontidae*, họ phụ *Tetraodontinae*
- Chi: *Arothron*
- Loài: *A. stellatus*

Tên khoa học: ***Arothron stellatus* (Bloch & Schneider, 1801)**

Tên địa phương: Cá nóc, Cá nóc chuột chấm đen, Cá nóc mú, Cá nóc vây vân dày

Tên tiếng Anh: Starry toadfish, Stellate puffer

Tên khác: Star blaasop (Ấn độ), Starry pufferfish (Indonesia), Starry toadfish (Malaysia), ...

1.2.2. Đặc điểm sinh thái

Toàn thân đều có gai nhỏ.

Trừ phần bụng, còn lại toàn thân, kể cả gốc vây lưng và trên vây đuôi đều có các chấm đen phân bố dày và đều. Khi cá còn bé thì bụng của chúng có các vằn đen vàng xen kẽ nhau. Cá càng lớn thì các vằn này mờ nhạt dần cho đến khi cá trưởng thành thì bụng của chúng có màu trắng và ngay dưới vây ngực có một vài chấm đen khá lớn. Xung quanh gốc vây ngực và lỗ hậu môn có màu đen tuyền.

Là loài có kích thước khá lớn, chiều dài tối đa của chúng khoảng 120 cm. Thường bắt gặp nhóm chiều dài 15 – 25 cm. Chúng sống cả môi trường nước lợ và mặn ở đáy ven bờ hoặc các rạn đá san hô ngoài khơi và trong vùng biển có độ sâu khoảng 3 – 58 m. Là loài ăn thịt.

1.2.3. Hình ảnh tiêu bản



Cá Nóc chuột chấm sao *Arothron stellatus* (Bloch & Schneider, 1801)

- Địa điểm thu mẫu: Nha Trang, Khánh Hoà
- Thời gian thu mẫu: 08/2012
- Người thu mẫu: TS. Đào Việt Hà, Viện Hải Dương học Nha Trang
- Nơi lưu mẫu: Phòng nghiên cứu độc tố cá nóc, Khoa nghiên cứu phát triển, Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Phụ lục 1.3. Cá nóc viền đuôi đen

1.3.1. Danh pháp

Phân loại khoa học

- Giới: *Animalia*
- Ngành: *Chordata*
- Lớp: *Actinopterygii*
- Bộ: *Tetraodontiformes*
- Họ: *Tetraodontidae*, họ phụ *Tetraodontinae*
- Chi: *Arothron*
- Loài: *A. immaculatus*

Tên khoa học: *Arothron immaculatus* (Bloch & Schneider, 1801)

Tên địa phương: Cá nóc, Cá nóc chuột, Cá nóc mú

Tên tiếng Anh: Immaculate puffer

Tên khác: Kasumifugu (Nhật Bản), Buntal-pasir bersih (Malaysia), ...

1.3.2. Đặc điểm sinh thái

Thân hình quả đạn.

Trừ bấp đuôi, còn toàn thân đều có nhiều gai nhỏ li ti trên lớp da nhầy.

Mồm hơi nhô ra phía trước, hàm trên và dưới đều có hai răng dạng tấm, cứng, sắc, xếp khít nhau ở trước miệng và có màu trắng.

Toàn cơ thể có màu tro phớt vàng, trừ phần bụng màu trắng. Trên thân không có các chấm hay các vằn vện. Gốc vây ngực có màu xám.

Vây ngực, vây hậu môn và vây lưng có màu vàng xám nhạt. Vây đuôi tròn, có màu vàng, nhưng viền ngoài có màu đen khá dày.

Kích thước của loài này nhỏ. Chiều dài tối đa thân chỉ khoảng 30 cm. và chiều dài thường gặp dao động từ 11 – 17 cm.

Chúng thích nghi được cả môi trường nước mặn và lợ, sống ở đáy khu vực ven bờ, cửa sông hay trong các hang hốc hoặc lùm cỏ có độ sâu không quá 20 m.

1.3.3. Hình ảnh tiêu bản



**Cá Nóc chuột viên đuôi
đen**
Arothron immaculatus
(Bloch & Schneider, 1801)

- Địa điểm thu mẫu:
Nha Trang, Khánh
Hoà
- Thời gian thu mẫu:
08/2012
- Người thu mẫu: TS.
Đào Việt Hà, Viện Hải
Dương học Nha Trang
- Nơi lưu mẫu: Phòng
nghiên cứu độc tố cá
nóc, Khoa nghiên cứu
phát triển, Viện Kiểm
nghiệm thuốc Trung
ương

Phụ lục 1.4. Cá nóc đầu thỏ mắt to (Cá nóc tro)

1.4.1. Danh pháp

Phân loại khoa học:

- Giới: *Animalia*
- Ngành: *Chordata*
- Lớp: *Actinopterygii*
- Bộ: *Tetraodontiformes*
- Họ: *Tetraodontidae*, họ phụ *Tetraodontinae*
- Chi: *Lagocephalus*
- Loài: *L. Lunaris*

Tên khoa học: ***Lagocephalus Lunaris* (Bloch & Schneider, 1801)**

Tên địa phương: Cá nóc, Cá nóc tro, Cá nóc vàng, Cá nóc xanh (khi cá bé)

Tên tiếng Anh: Green rough-backed puffer, Rough Golden Toadfish, Lunartail puffer, Moontail Blaasop

Tên tại một số nước khác: Doku-sabafugu (Nhật Bản); Buntal pisang (Malaysia); Pakpaolangkhiao (Thái Lan)

1.4.2. Đặc điểm sinh thái

Thân hình trứng kéo thon dài phía sau.

Lung và bụng có gai nhỏ. Gai ở mặt lưng phân bố dạng hình bầu dục, bắt đầu từ đỉnh đầu kéo đến tận góc vây lưng. Mặt bụng thì gai phân bố từ cằm cho đến phía trước lỗ hậu môn.

Mỗi bên thân có một đường gờ ngăn cách mặt bên và mặt bụng.

Lung và đầu có màu xám lục.

Vây hậu môn, mặt bụng và hai bên thân dọc gờ bụng màu trắng. Vây ngực, vây lưng, nửa trên vây đuôi, phía dưới sau mắt và dọc hai bên của lưng thân đều có màu vàng tươi, nửa dưới của vây đuôi có màu xám nhạt.

Lỗ mang màu trắng.

Cá Nóc đầu thỏ mắt to có kích thước tối đa tương đối lớn, TL \approx 50 cm. Chiều dài thường khai thác được của loài này ở Việt nam dao động từ 10 – 25 cm. Trong đó, nhóm chiều dài 13 – 15 cm chiếm tỷ lệ cao trong sản lượng. Chiều dài thành thực của loài này khoảng 25 cm.

Chúng thường có tập tính sống đáy ở cả vùng nước lợ và nước mặn ven bờ hay vùng cửa sông thuộc vùng nước nhiệt đới hoặc những rạn san hô. Chúng ngụy trang, ẩn nấp trong những rạn san hô để sinh tồn.

Đây là một trong những loài có khả năng di chuyển nhanh trong họ cá Nóc.

Mùa sinh sản, các con cái đẻ hàng trăm trứng rất nhỏ, các con đực giải phóng tinh trùng vào nước xung quanh. Nước mang chất dinh dưỡng cần thiết để trứng lớn lên và phát triển.

Đây là loài ăn tạp. Chúng là loài cá dữ, săn mồi. Thức ăn chủ yếu của chúng là động vật thân mềm, động vật giáp xác, đôi khi cả tảo.

1.4.3. Hình ảnh tiêu bản



Cá Nóc Tro *Lagocephalus Lunaris* (Bloch & Schneider, 1801)

- Địa điểm thu mẫu: Nha Trang, Khánh Hoà
- Thời gian thu mẫu: 08/2012
- Người thu mẫu: TS. Đào Việt Hà, Viện Hải Dương học Nha Trang
- Nơi lưu mẫu: Phòng nghiên cứu độc tố cá nóc, Khoa Nghiên cứu phát triển, Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Phụ lục 1.5. Cá nóc đầu thỏ chấm tròn (Cá nóc thu)

1.5.1. Danh pháp

Phân loại khoa học:

- Giới: *Animalia*
- Ngành: *Chordata*
- Lớp: *Actinopterygii*
- Bộ: *Tetraodontiformes*
- Họ: *Tetraodontidae*, họ phụ *Tetraodontinae*
- Chi: *Lagocephalus*
- Loài: *Lagocephalus Sceleratus*

Tên khoa học: ***L. Sceleratus* (Gmelin, 1789)**

Tên địa phương: Cá nóc, Cá nóc thu

Tên tiếng Anh: Silverstripe blaasop, Silver Toadfish, Silver stripe puffer

1.5.2. Đặc điểm sinh thái

Thân hình trụ tròn, dài, mõm tù.

Lưng và bụng đều có gai nhỏ, phân bố phía trước vây lưng và lỗ hậu môn.

Vây đuôi lõm sâu.

Mỗi bên thân có một đường gờ ngăn cách mặt bên và mặt bụng rất rõ ràng.

Lỗ mang màu đen.

Răng dạng bản, hình mỏ chim, cứng, sắc và có màu trắng.

Lưng và đầu có màu xám tro, trên đó có nhiều nốt chấm đen nhỏ rõ ràng. Cơ thể không có màu ánh vàng.

Hai bên thân, từ dưới góc miệng đến gốc vây đuôi màu trắng bạc.

Trong giống *Lagocephalus*, đây là loài có kích thước tối đa tương đối lớn, chiều dài TL có thể đạt đến khoảng 120 cm và khối lượng có thể đạt 7kg.

Ở biển Việt nam, kích thước khai thác của loài khá nhỏ, thường chỉ bắt gặp các cá thể có chiều dài trong khoảng 12 –20 cm.

Chúng sống ở rạn đá, rạn san hô, có độ sâu khoảng 18 – 100 m, và có trường hợp sống ở độ sâu 250m (biển Đỏ)

Đây là loài ăn tạp, bao gồm cả tôm, cua, cá, ...

1.5.3. Hình ảnh tiêu bản



Cá Nóc Thu ***Lagocephalus Sceleratus*** **(Gmelin, 1789)**

- Địa điểm thu mẫu: Nha Trang, Khánh Hoà
- Thời gian thu mẫu: 08/2012
- Người thu mẫu: TS. Đào Việt Hà, Viện Hải Dương học Nha Trang
- Nơi lưu mẫu: Phòng nghiên cứu độc tố cá nóc, Khoa Nghiên cứu phát triển, Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Phụ lục 1.6. Cá nóc vàng

1.6.1. Danh pháp

Phân loại khoa học

- Giới: *Animalia*
- Ngành: *Chordata*
- Lớp: *Actinopterygii*
- Bộ: *Tetraodontiformes*
- Họ: *Tetraodontidae*, họ phụ *Tetraodontinae*
- Chi: *Lagocephalus*
- Loài: *Lagocephalus spadiceus*

Tên khoa học: ***Lagocephalus spadiceus* (J. Richardson, 1845)**

Tên địa phương: Cá nóc, Cá nóc xanh, Cá nóc vàng

Tên tiếng Anh: Half-smooth golden pufferfish, Brownback Toadfish

Tên khác: Buntal kerisi, Buntal kuning (Malaysia), Chinese blaasop (Ấn độ), ...

1.6.2. Đặc điểm sinh thái

Gai ở mặt lưng phân bố hình quả chùy có cán kéo dài (có thể bị ngắt quãng), vượt qua cả ngang đầu mút vây ngực nhưng mút sau của đám gai không phân bố đến gốc vây lưng. Gai phân bố ở mặt bụng, kéo dài từ dưới cằm cho đến lỗ hậu môn.

Mỗi bên thân có một đường gờ ngăn cách mặt bên và mặt bụng.

Lưng và đầu có màu xám lục.

Vây ngực, vây lưng, hai bên đầu ngang với lỗ mang và lườn trên dọc thân có ánh vàng kim. Vây đuôi có nửa dưới màu xám nhạt, nửa trên màu vàng và hai đầu mút màu trắng.

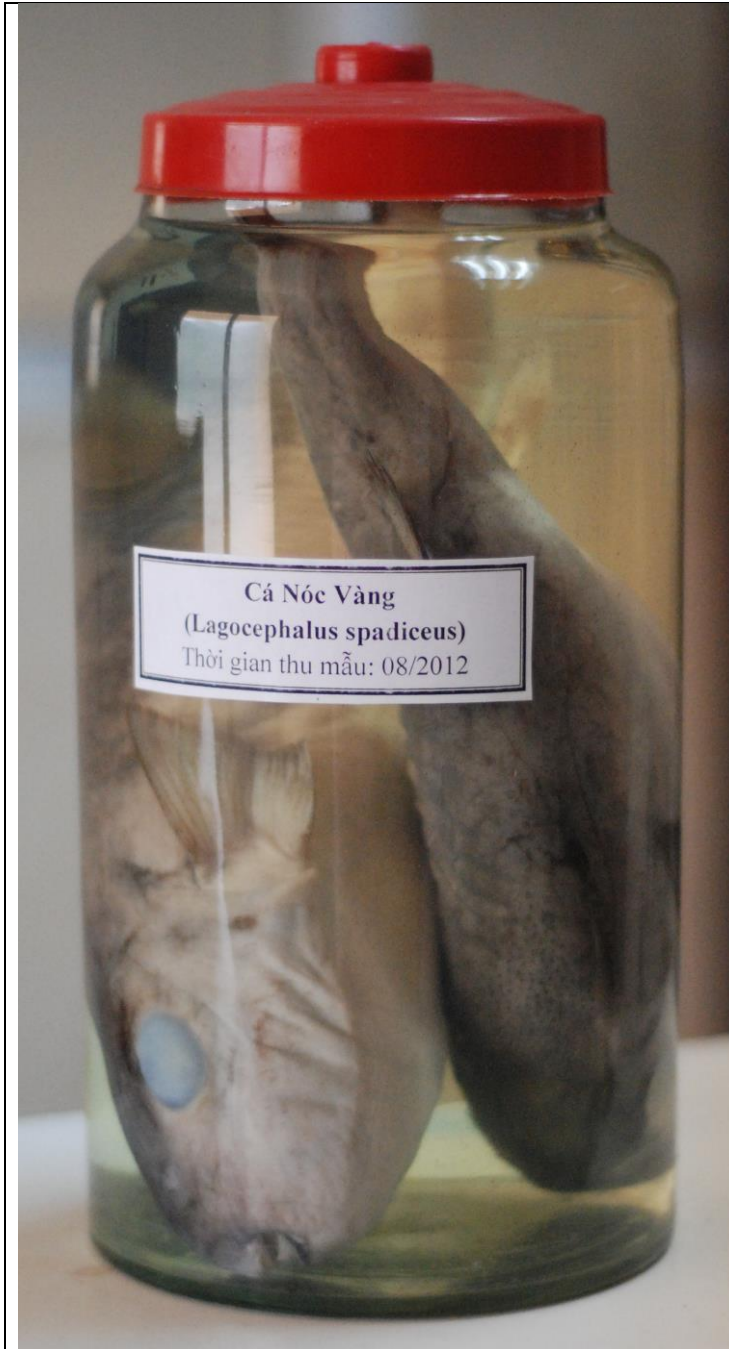
Lỗ mang màu trắng.

Kích thước của loài này khá nhỏ. Chiều dài TL chỉ khoảng 30 cm. Chiều dài thước khai thác của loài này ở Việt nam dao động từ 12 – 21 cm, nhưng nhóm chiều dài 12 – 16 cm có tỷ lệ cao hơn cả. Chiều dài thành thực của loài khoảng 17– 19 cm.

Chúng có xuất hiện cả ở vùng biển sâu và cả ở các cửa sông hay ở các vùng nước lợ ven bờ.

Đây là loài thường sống thành đàn ở đáy và ăn tạp.

1.6.3. Hình ảnh tiêu bản



Cá Nóc Vàng ***Lagocephalus spadiceus*** **(J. Richardson, 1845)**

- Địa điểm thu mẫu: Nha Trang, Khánh Hoà
- Thời gian thu mẫu: 08/2012
- Người thu mẫu: TS. Đào Việt Hà, Viện Hải Dương học Nha Trang
- Nơi lưu mẫu: Phòng nghiên cứu độc tố cá nóc, Khoa Nghiên cứu phát triển, Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Phụ lục 1.7. Cá nóc răng mỏ chim

1.7.1. Danh pháp

Phân loại khoa học

- Giới: *Animalia*
- Ngành: *Chordata*
- Lớp: *Actinopterygii*
- Bộ: *Tetraodontiformes*
- Họ: *Tetraodontidae*, họ phụ *Tetraodontinae*
- Chi: *Lagocephalus*
- Loài: *L. inermis*

Tên khoa học: ***Lagocephalus inermis* (Temminck & Schlegel, 1850)**

Tên địa phương: Cá nóc, Cá nóc vàng

Tên tiếng anh: Smooth blaasop, Smooth puffer

Tên khác: Buntal pisang, Buntal timah (Malaysia), Smooth-backed blowfish (Ấn độ)

1.7.2. Đặc điểm sinh thái

Thân hình quả đạn.

Gai nhỏ không có ở mặt lưng, chỉ có ở mặt bụng và phân bố phía trước lỗ hậu môn.

Vây đuôi lõm nhẹ. Mỗi bên thân có một đường gờ ngăn cách mặt bên và mặt bụng.

Lỗ mang màu đen.

Răng dạng bản, hình mỏ chim, cứng, sắc và có màu trắng.

Bên lưng thân và đầu có màu nâu tro, không có chấm đen hay vân vện.

Vây ngực, hai bên đầu ngang với lỗ mang và lườn có màu vàng kim, mặt bụng màu trắng. Vây lưng, vây đuôi có màu vàng nhạt, đoạn cuối chuyển dần thành màu xám đen.

Loài này có kích thước tối đa khá lớn, TL đạt tới 95 cm. Chiều dài khai thác được ở Việt nam dao động trong khoảng 19 – 30 cm, nhưng chiều dài 20 – 22 cm chiếm tỷ lệ cao.

Loài cá này thường được tìm thấy ở các dốc thềm lục địa.

Cá sống ở đáy, ăn tạp.

1.7.3. Hình ảnh tiêu bản



Cá Nóc Răng Mỏ Chim
Lagocephalus inermis
(Temminck & Schlegel, 1850)

- Địa điểm thu mẫu: Nha Trang, Khánh Hoà
- Thời gian thu mẫu: 08/2012
- Người thu mẫu: TS. Đào Việt Hà, Viện Hải Dương học Nha Trang
- Nơi lưu mẫu: Phòng nghiên cứu độc tố cá nóc, Khoa Nghiên cứu phát triển, Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Phụ lục 1.8. Cá Nóc chấm cam vằn mắt

1.5.1. Danh pháp

Phân loại khoa học:

- Giới: *Animalia*
- Ngành: *Chordata*
- Lớp: *Actinopterygii*
- Bộ: *Tetraodontiformes*
- Họ: *Tetraodontidae*, họ phụ *Tetraodontinae*
- Chi: *Torquigener*
- Loài: *Torquigener Brevipinnis*

Tên khoa học: ***Torquigener Brevipinnis* (Regan, 1903)**

Tên địa phương: Cá nóc, Cá nóc vằn mắt, Cá nóc mít

Tên tiếng Anh: Brown-spotted puffer

Tên khác: Yellow-stripe toadfish (Indonesia)

1.8.2. Đặc điểm sinh thái:

Trên thân có gai nhỏ, tương đối ngắn, nằm sát vào da, và thưa. Gai ở mặt lưng và mặt bụng nối liền với nhau ở hai bên thân phía trước khe mang và phía sau vây ngực, nhưng không có ở khoảng giữa vây lưng và vây hậu môn.

Đường gờ ngăn cách mặt bên và mặt bụng nổi thành cạnh rõ ràng.

Mồm tù, cằm thẳng đứng và khe miệng cao hơn hoặc bằng rìa trên gốc vây ngực.

Đầu và mặt lưng màu nâu vàng, trên đó có nhiều chấm trắng, lớn nhỏ không đều.

Hai bên đầu có 4 – 5 đường vằn ngang màu nâu.

Chạy dọc 2 bên thân, từ gốc vây ngực đến gốc vây đuôi là hai hàng các chấm màu cam, đường trên dày và đậm màu hơn đường dưới.

Khác với cá Nóc chấm cam (*Torquigener gloerfelti*), cá Nóc chấm cam có đầu và mặt lưng có các chấm nâu nhỏ phân bố dày đặc, chúng sắp xếp tạo ra một số hoa tròn, màu trắng, có kích thước lớn hơn chúng. Các hoa đó phân bố rải rác và khá đều trên mặt lưng. Dọc hai bên thân có một số chấm nâu lớn, phân bố rải rác và không xếp thẳng hàng trên nền xám nâu.

Trên các tia vây đuôi có các vằn ngang màu nâu còn cá Nóc chấm cam có rìa sau vây đuôi màu đen.

Trong số mẫu thu được, chiều dài tối đa TL là 16,8 cm và nhóm chiều dài thường gặp nằm trong khoảng 9 – 12 cm.

Đây là loài sống đáy và ăn tạp, chúng thường sống ở vùng biển tương đối sâu (34 – 100 m), thuộc vùng cận nhiệt đới.

1.8.3. Hình ảnh tiêu bản



Cá Nóc Vàng Mắt *Torquigener Brevipinnis* (Regan, 1903)

- Địa điểm thu mẫu: Nha Trang, Khánh Hoà
- Thời gian thu mẫu: 08/2012
- Người thu mẫu: TS. Đào Việt Hà, Viện Hải Dương học Nha Trang
- Nơi lưu mẫu: Phòng nghiên cứu độc tố cá nóc, Khoa Nghiên cứu phát triển, Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Phụ lục 1.9. Cá nóc chấm cam

1.9.1. Danh pháp

Phân loại khoa học

- Giới: *Animalia*
- Ngành: *Chordata*
- Lớp: *Actinopterygii*
- Bộ: *Tetraodontiformes*
- Họ: *Tetraodontidae*, họ phụ *Tetraodontinae*
- Chi: *Torquigener*
- Loài: *T. gloerfelti*

Tên khoa học: ***Torquigener gloerfelti* (Hardy, 1984)**

Tên địa phương: Cá nóc, Cá nóc chấm cam, Cá nóc mít

Tên tiếng Anh: Rusty spotted toadfish

Tên khác: 南海窄額魮 (Trung quốc)

1.9.2. Đặc điểm sinh thái

Gai trên thân nhỏ, tương đối ngắn, nằm sát vào da, và thưa. Gai ở mặt lưng và mặt bụng nối liền với nhau ở hai bên thân phía trước khe mang và phía sau vây ngực, nhưng không có ở khoảng giữa vây lưng và vây hậu môn.

Đường gờ ngăn cách mặt bên và mặt bụng nổi thành cạnh rõ ràng.

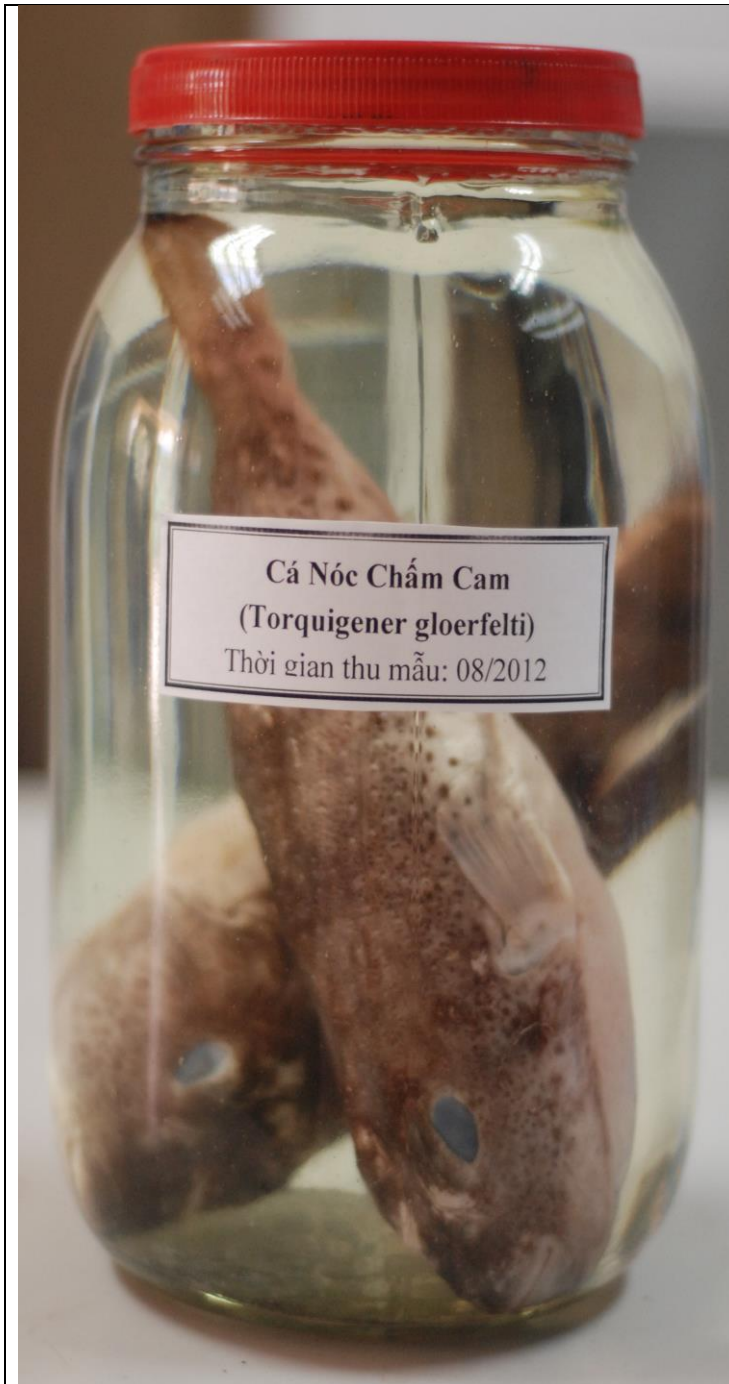
Mồm tù, cằm thẳng đứng và khe miệng cao hơn hoặc bằng rìa trên gốc vây ngực.

Đầu và mặt lưng có các chấm nâu nhỏ phân bố dày đặc, chúng sắp xếp tạo ra một số hoa tròn, màu trắng, có kích thước lớn hơn chúng. Các hoa đó phân bố rải rác và khá đều trên mặt lưng. Dọc hai bên thân có một số chấm nâu lớn, phân bố rải rác và không xếp thẳng hàng trên nền xám nâu. Rìa sau vây đuôi màu đen.

Chiều dài tối đa TL của cá là 22 cm và thường bắt gặp được các cá thể có chiều dài nằm trong khoảng 13 – 18 cm. Chiều dài thành thực của loài nằm trong khoảng 18 – 20 cm.

Loài này sống ở đáy, ven bờ và là loài ăn tạp.

1.9.3. Hình ảnh tiêu bản



Cá Nóc chấm cam *Torquigener gloerfelti* (Hardy, 1984)

- Địa điểm thu mẫu: Nha Trang, Khánh Hoà
- Thời gian thu mẫu: 08/2012
- Người thu mẫu: TS. Đào Việt Hà, Viện Hải Dương học Nha Trang
- Nơi lưu mẫu: Phòng nghiên cứu độc tố cá nóc, Khoa Nghiên cứu phát triển, Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Phụ lục 1.10. Cá nóc vằn

1.10.1. Danh pháp

Phân loại khoa học

- Giới: *Animalia*
- Ngành: *Chordata*
- Lớp: *Actinopterygii*
- Bộ: *Tetraodontiformes*
- Họ: *Tetraodontidae*, họ phụ *Tetraodontinae*
- Chi: *Takifugu*
- Loài: *T. Oblongus*

Tên khoa học: ***Takifugu Oblongus* (Bloch, 1786)**

Tên Việt Nam: Cá nóc vằn, cá Nóc hổ

Tên địa phương: Cá nóc, Cá nóc hổ, Cá nóc trần, Cá nóc bông

Tên gọi ở một số nước: Oblong blow fish (Anh), Lattice blaasop (India), Bebo (India), Ikan Buntal (Malaysia), Pita-pita (Indonesia), Ruitjies-blaasop (South Africa), Honfugu (Nhật Bản)

1.10.2. Đặc điểm sinh thái

Gai nhỏ phân bố ở mặt lưng, mặt bụng nối liền với hai bên thân ở phía trước khe mang và phía sau vây ngực. Gai không có ở hai bên bấp đuôi.

Trên cơ thể có đường bên và đường gờ ngăn cách mặt bên và mặt bụng.

Khe miệng thấp hơn rìa trên gốc vây ngực.

Trên đầu và lưng màu nâu với các chấm vàng nhạt lớn nhỏ không đều.

Hai bên đầu, lưng có nhiều vân màu nâu và màu vàng nhạt xen kẽ như da hổ. Phía cuối lưng và trên bấp đuôi, các vân này có dạng hình chữ V nằm vắt ngang qua.

Vây ngực, vây đuôi có màu vàng tươi. Vây lưng và vây hậu môn hình tam giác. Vây lưng mềm (12-14), vây hậu môn (10-12)

Mặt bụng màu trắng.

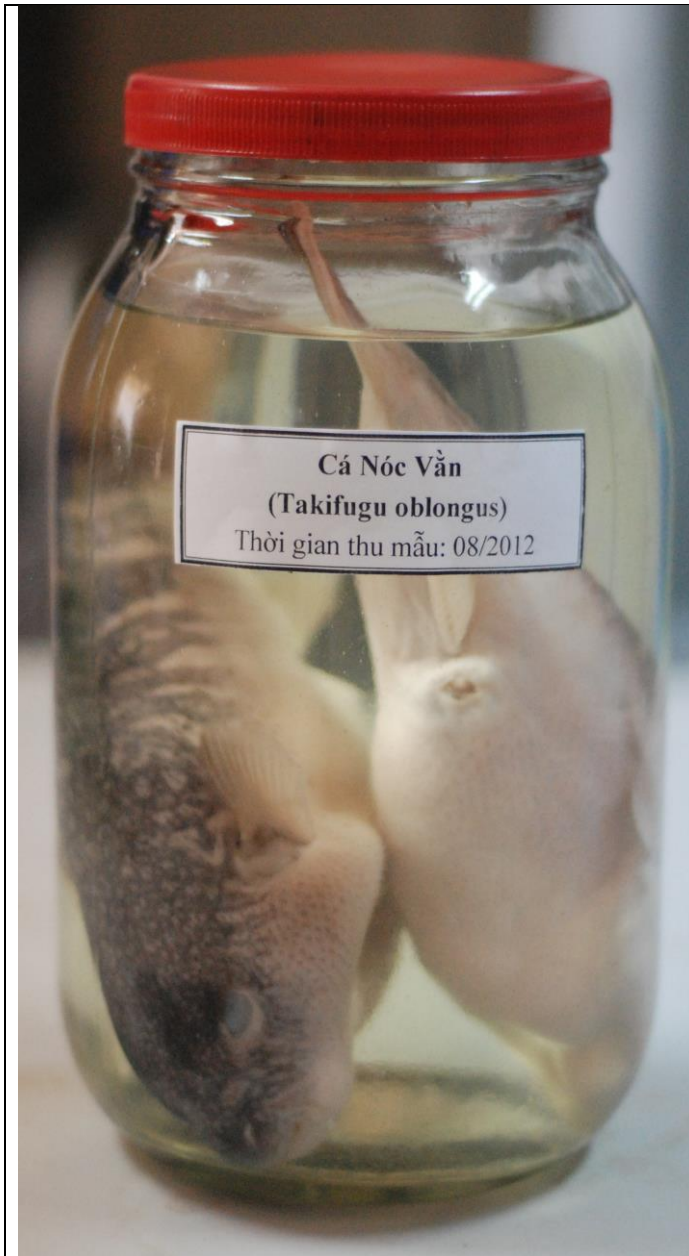
Đây là loại cá có hàm răng mạnh mẽ mà có thể phát triển quá dài nếu cá không thể tiêu thụ thực phẩm thô.

Loài này có kích thước tương đối lớn, chiều dài TL tối đa khoảng 40 cm. Nhóm chiều dài thường bắt gặp nằm trong khoảng 15 – 25 cm.

Loài này thường sống đáy ở cả vùng nước mặn và lợ, ở các vùng nước ven bờ, cửa sông và bãi triều, đồng thời, người ta cũng bắt gặp chúng ở các khu rừng ngập mặn.

Là loài ăn tạp. Thức ăn chủ yếu của chúng là tảo, động vật thân mềm, động vật không xương sống, hoặc động vật giáp xác nhỏ.

1.10.3. Hình ảnh tiêu bản



Cá Nóc Vằn (*Takifugu oblongus* B. 1786)

- Địa điểm thu mẫu: Nha Trang, Khánh Hoà
- Thời gian thu mẫu: 08/2012
- Người thu mẫu: TS. Đào Việt Hà, Viện Hải Dương học Nha Trang
- Nơi lưu mẫu: Phòng nghiên cứu độc tố cá nóc, Khoa Nghiên cứu phát triển, Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

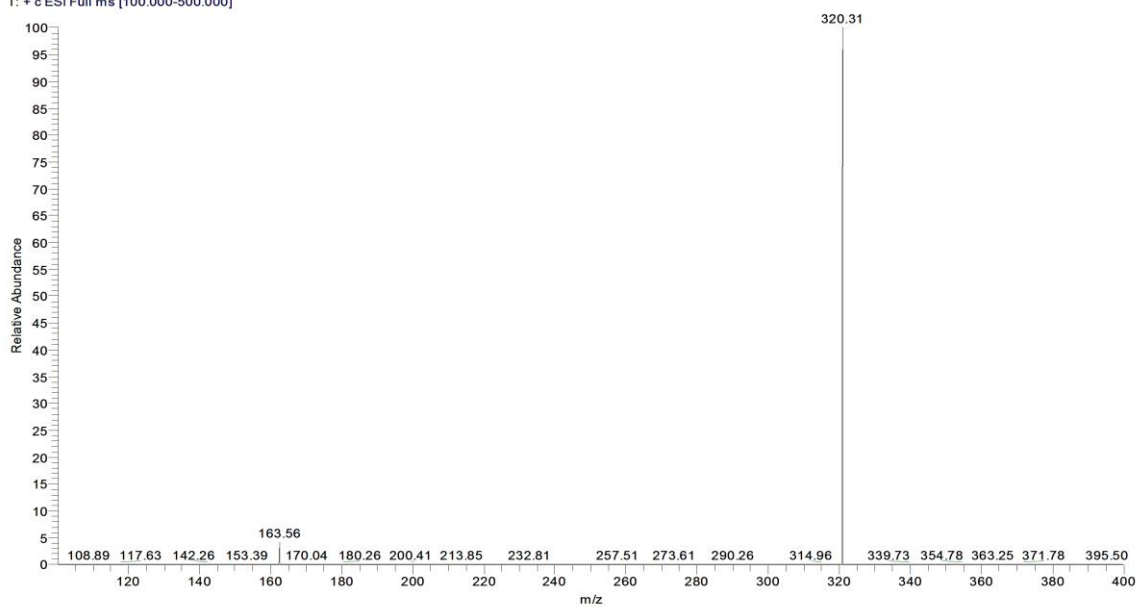
PHỤ LỤC 2. BỘ DỮ LIỆU CHUẨN NHẬN DẠNG TTX VÀ CÁC CHẤT TƯƠNG TỰ TTX

2.1. Bộ dữ liệu nhận dạng TTX

Phổ khối lượng ESI MS

TTX 1ppm MS +ESI TIC 100-500
MS +ESI TIC 100-500

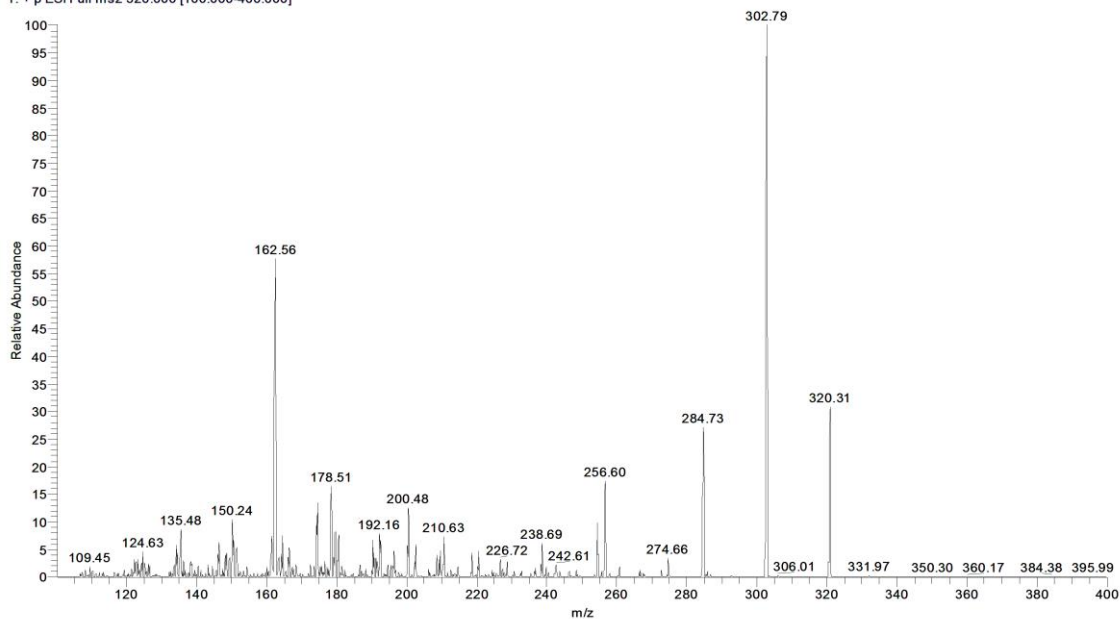
TTX 1ppm MS +ESI TIC 100-500 #1450 RT: 9.76 AV: 1 NL: 2.23E6
T: + c ESI Full ms [100.000-500.000]



Phổ ESI MS fullscan của TTX

TTX 1ppm MS +ESI TIC 100-500_1210131...
MS +ESI TIC 100-500

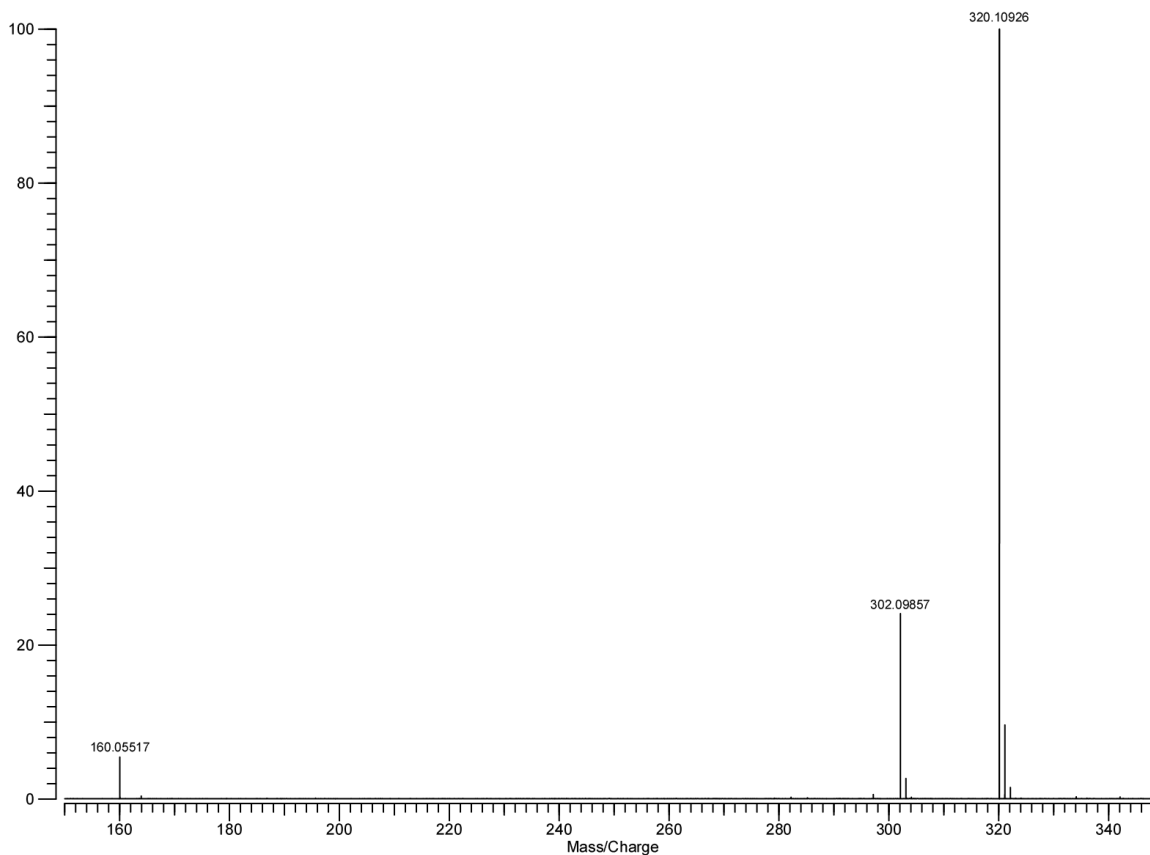
TTX 1ppm MS +ESI TIC 100-500_121013164227 #797-861 RT: 2.43-2.63 AV: 65 NL: 3.31E6
T: + p ESI Full ms2 320.000 [100.000-400.000]



Phổ ESI MS/MS mảnh mẹ m/z = 320

Phổ khối phân giải cao HR ESI FT ICR MS

Varian MS
File: D:\Quang\VVH\NXCuong-HCTN\Cuong_TTX.trans
Base-Peak Amplitude: 55.2220 Total Intensity: 92.557 Scans: 1 Positive Ions



Phổ khối phân giải cao HR ESI FT ICR MS

Elemental Composition Search Report:

Target Mass:

Target m/z = 320.10926 ± 5.00ppm
Charge = +1

Possible Elements:

Element	Exact Mass	Min	Max
C	12.000000	0	100
H	1.007825	0	150
O	15.994915	0	100
N	14.003074	0	100

Additional Search Restrictions:

Seven Golden Rules
Nitrogen Rule
DBE Limit Mode = Both Integer and Half-Integer
-Minimum DBE = 0
-Maximum DBE = 100

Search Results:

Number of Hits = 2

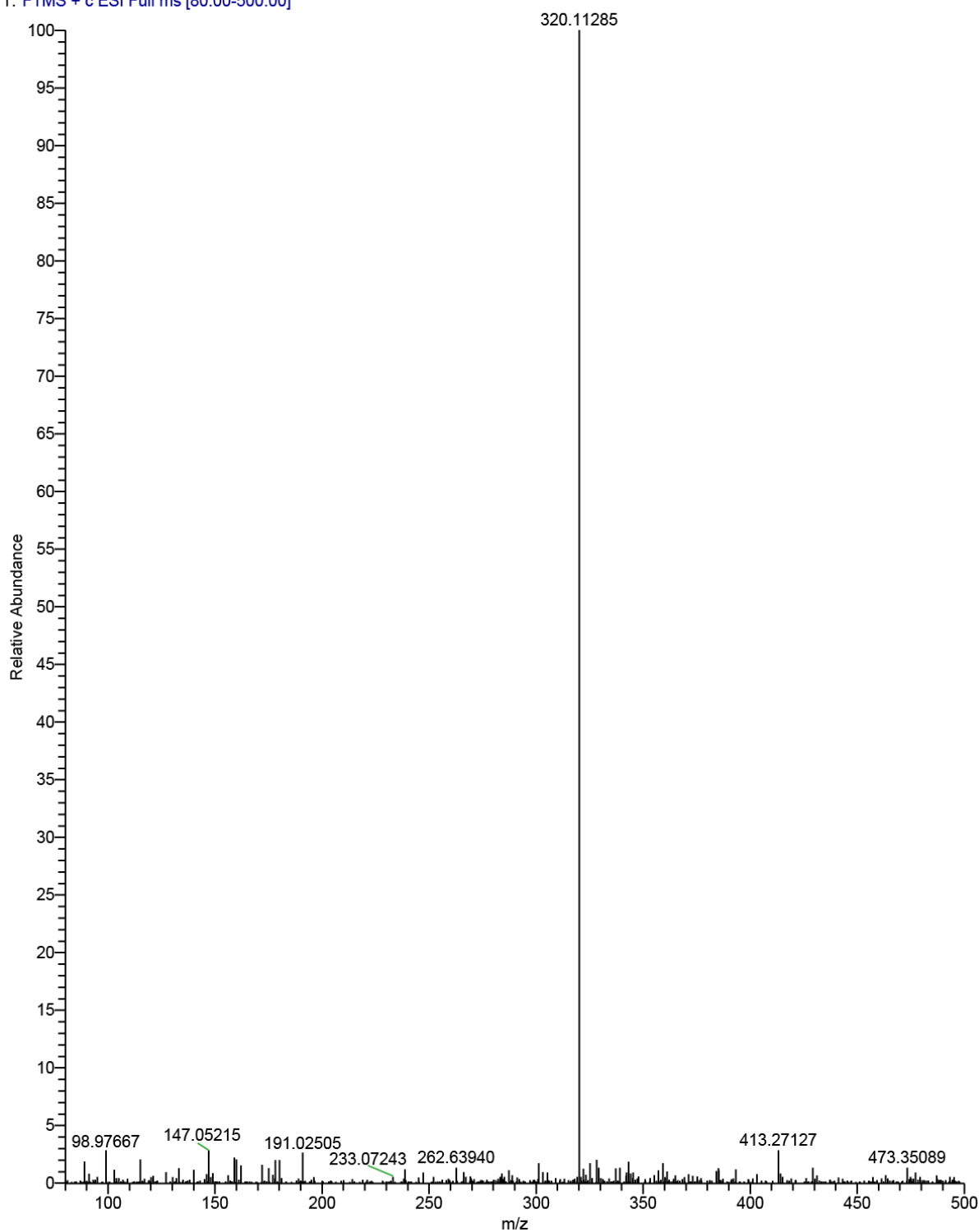
m/z	Delta m/z (ppm)	DBE	Formula
320.10884	1.30	4.5	C ₁₁ H ₁₈ N ₃ O ₈ ⁺¹
320.11018	-2.87	9.5	C ₁₂ H ₁₄ N ₇ O ₄ ⁺¹

Phỏng đoán công thức phân tử dựa trên phổ khối lượng phân giải cao

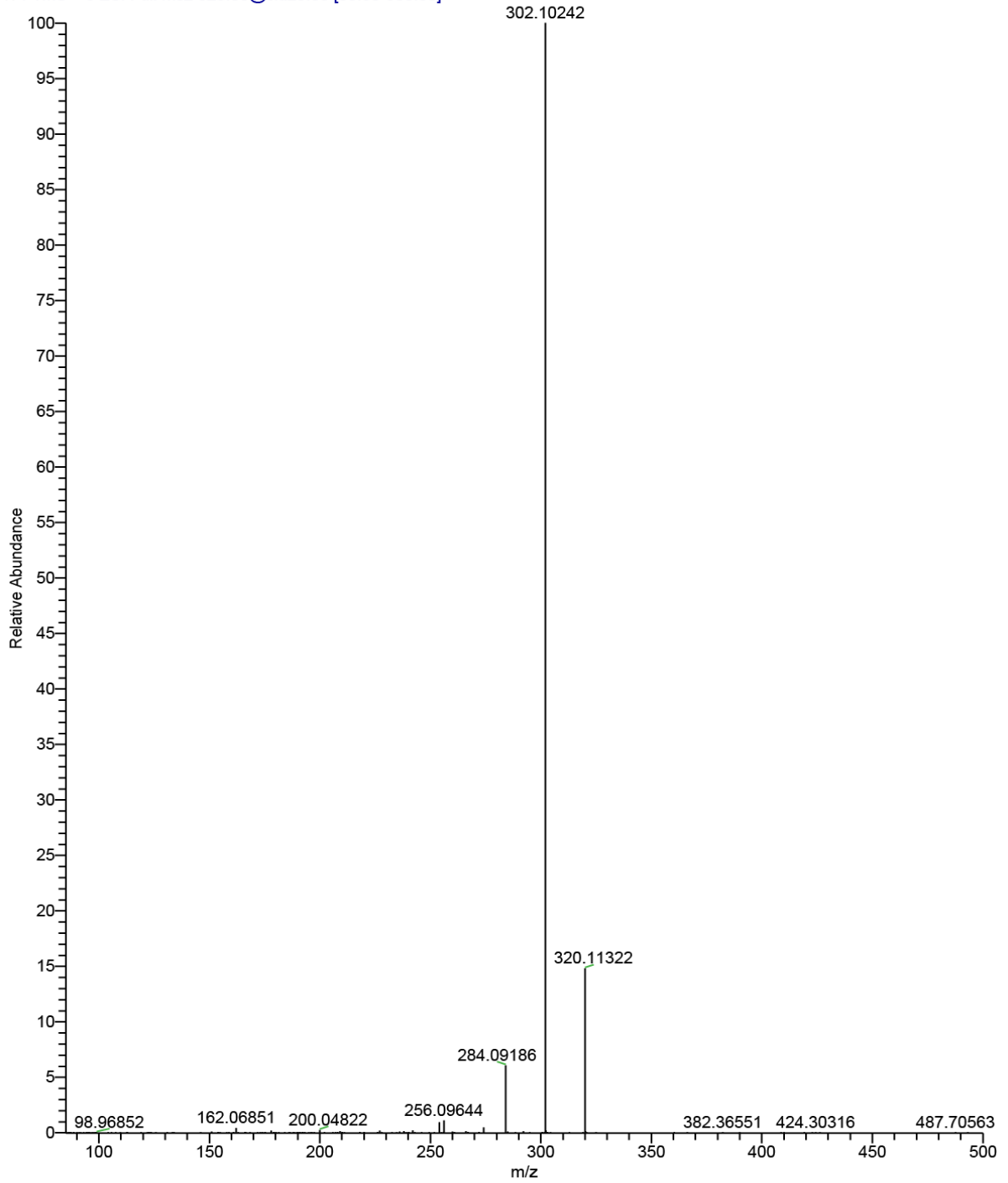
Phổ khối phân giải cao ESI Orbitrap MS

TTX-Fullscan50-500_150128152305

TTX-Fullscan50-500_150128152305 #265 RT: 4.10 AV: 1 NL: 4.07E7
T: FTMS + c ESI Full ms [80.00-500.00]

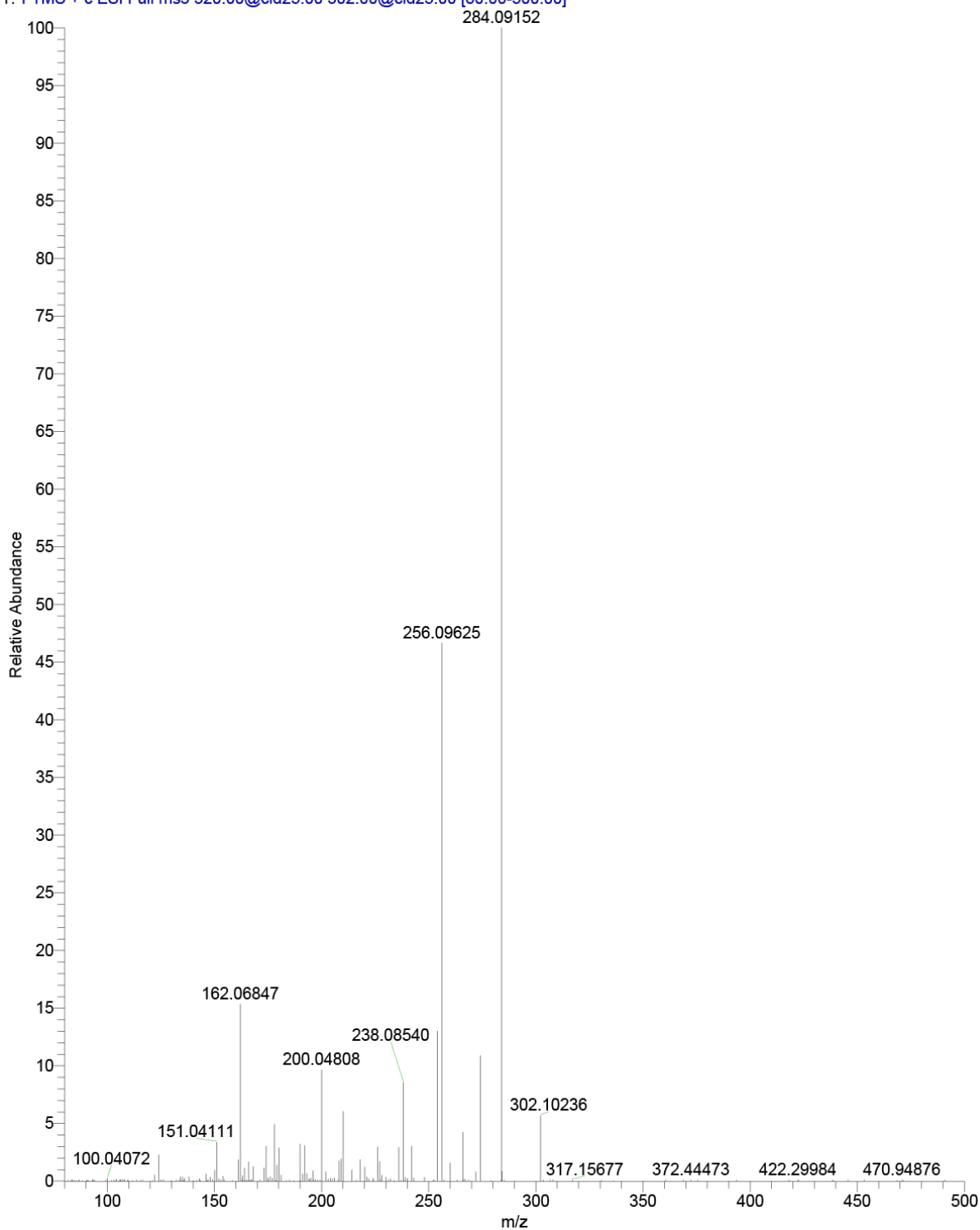


Phổ ESI Orbitrap MS fullscan của TTX



Phổ ESI Orbitrap MS² mảnh mẹ m/z=320 với mức năng lượng bắn phá CE = 25eV

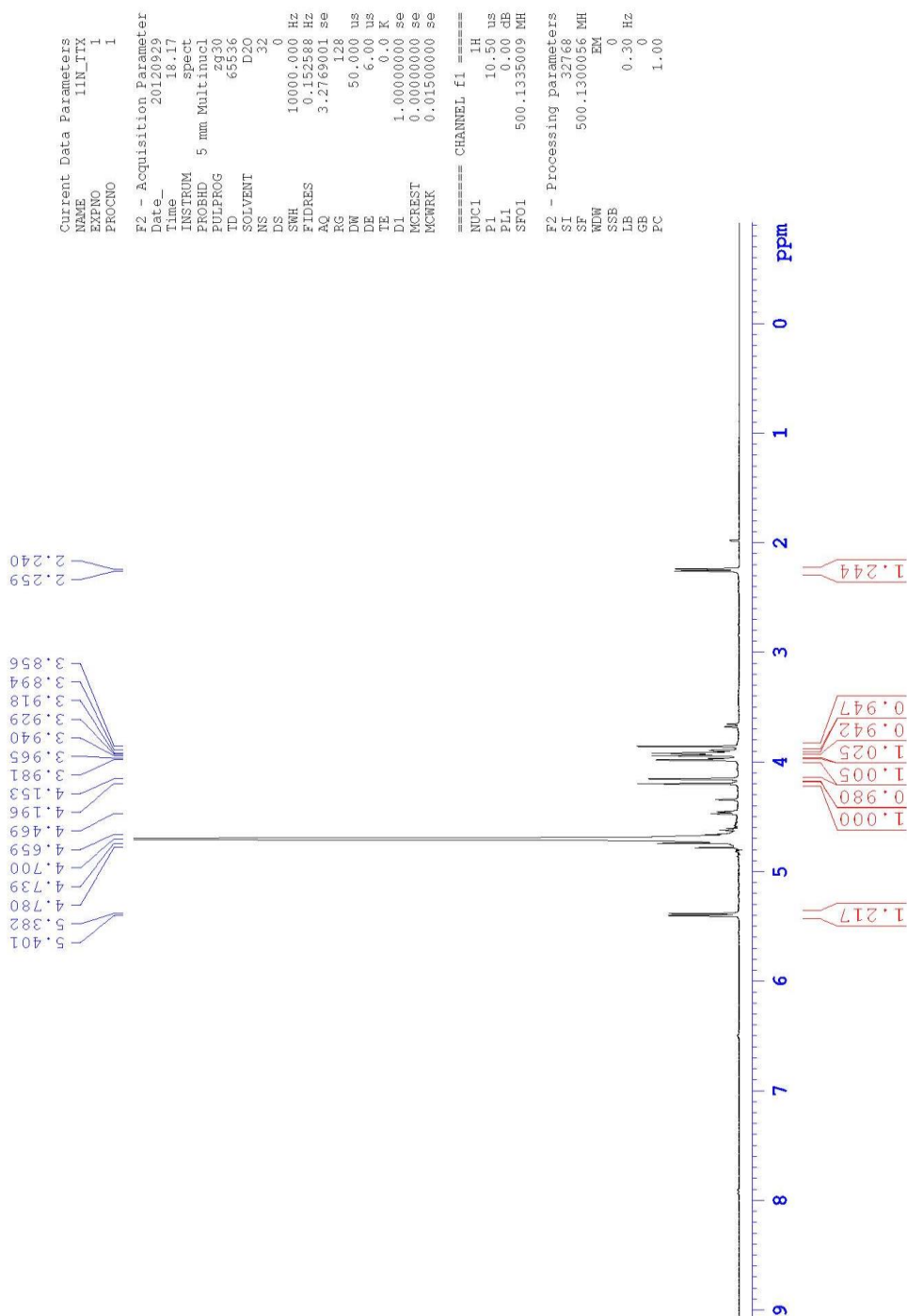
TTX-Fullscan50-500_150128152305 #212 RT: 3.22 AV: 1 NL: 6.33E6
T: FTMS + c ESI Full ms3 320.00@cid25.00 302.00@cid25.00 [80.00-500.00]



Phổ ESI Orbitrap MS³ mảnh m/z=320 =>302 với mức năng lượng bắn phá CE₁ = 25eV, CE₂ = 25eV

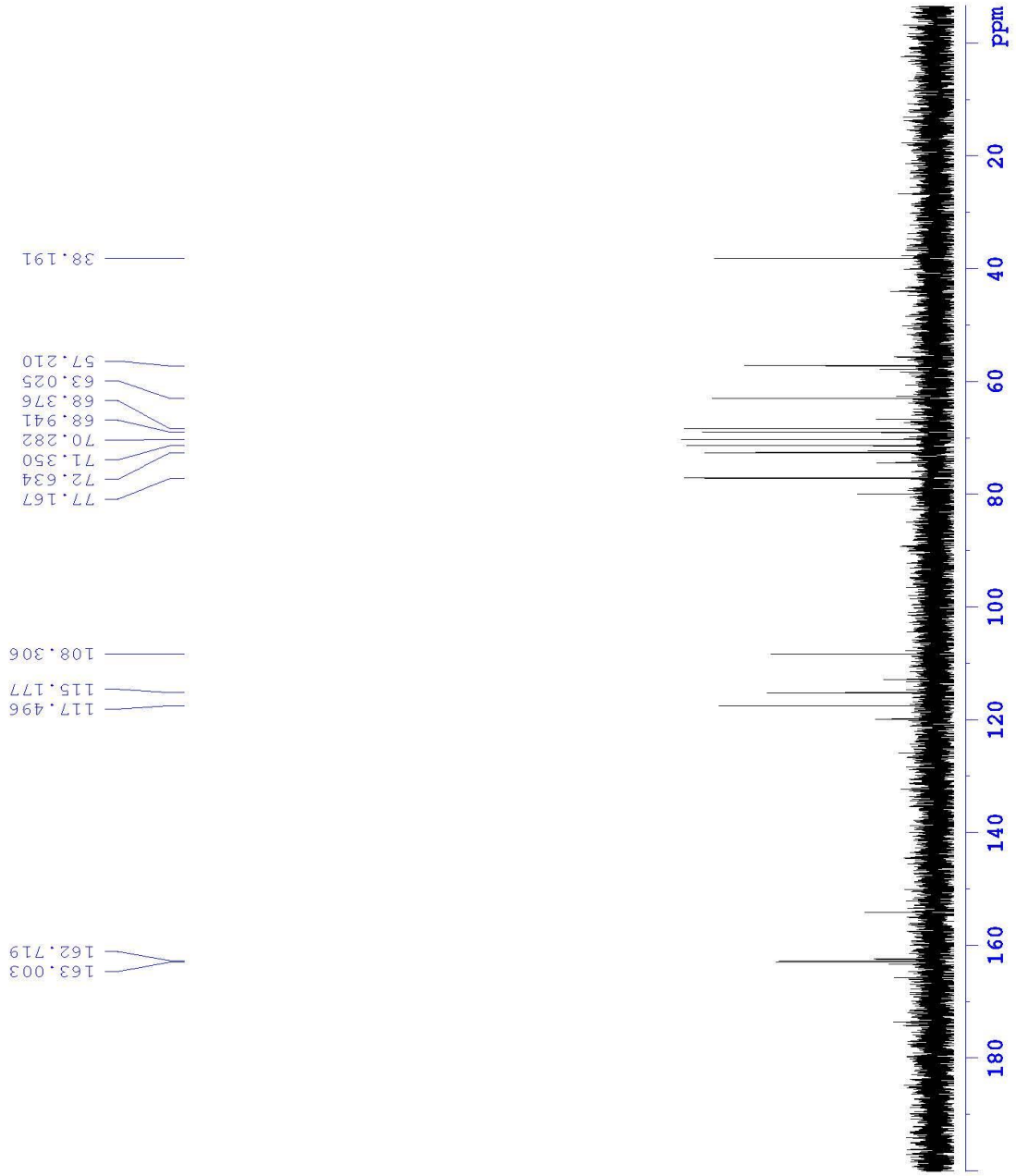
Phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR

TTX-D2O&CF3COOD-1H



Phổ NMR ^1H của TTX

TTX-D2O&CF300D-C13CPD



```

Current Data Parameters
NAME      IIN_TTX
EXPNO    2
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20120929
Time     21.57
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm Multinucl
PULPROG  zgpg30
TD        65536
SOLVENT  D2O
NS        4096
DS        2
SWH       31446.541
FIDRES   0.479836
AQ        1.0420883
RG        32768
DW        15.900
DE        6.00
TE        0.0
D1        2.00000000
g11       0.03000000
DELTA    1.89999998
MCREST   0.00000000
MCWREK   0.01500000

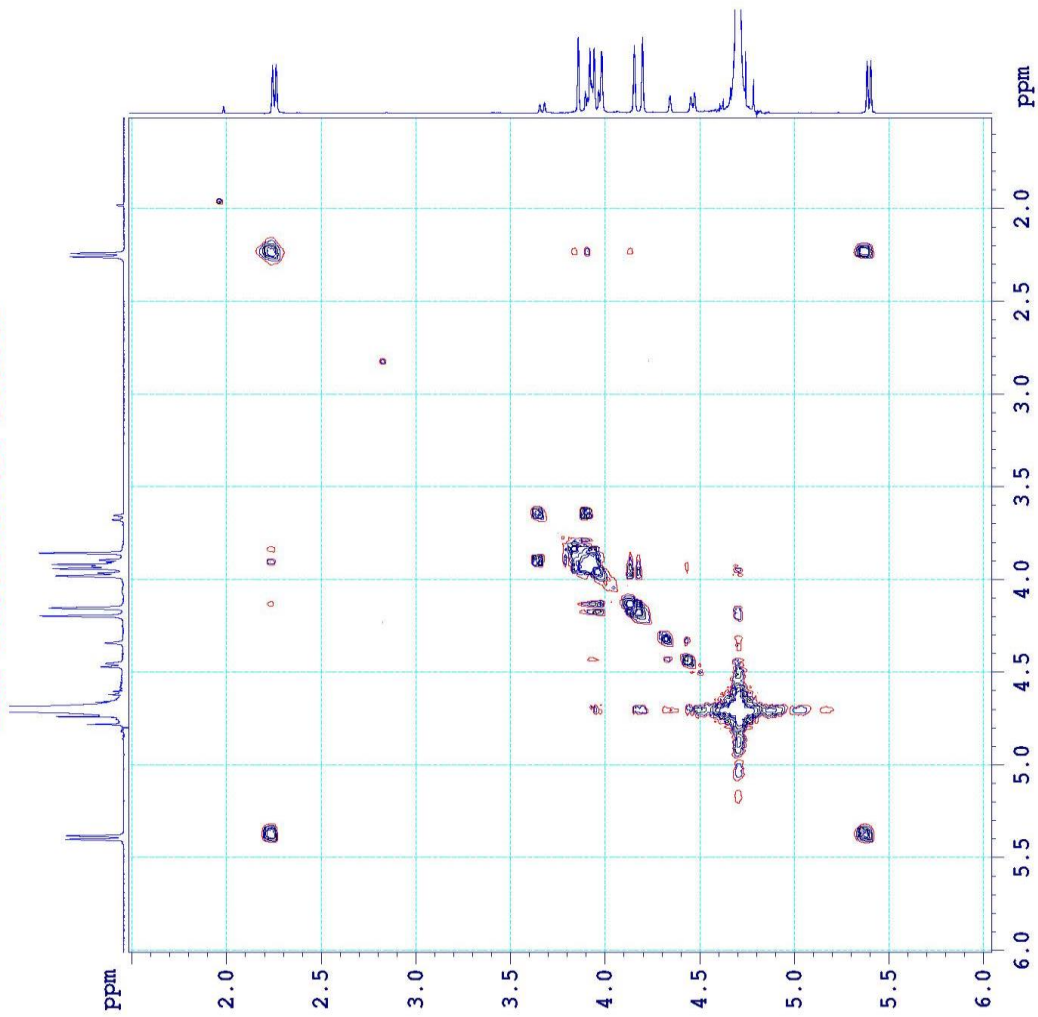
===== CHANNEL f1 =====
NUC1      13C
P1        5.80
PL1       -1.00
SF01     125.7716224 I

===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2  waltz16
NUC2      1H
PCPD2    80.00
PL2       0.00
PL12     17.64
PL13     22.00
SF02     500.1320005 I

F2 - Processing parameters
SI        32768
SF        125.7577878 I
WDW       EM
SSB       0
LB        1.00
GB        0
    
```

Phổ NMR ^{13}C của TTX

TTX-D2O&CF300D-COSYGP



```

Current Data Parameters
NAME      IIN_TTX
EXNO     5
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20120929
Time_    23.31
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm Multinucl
PULPROG  cosygpgf
ID       2048
SOLVENT  D2O
NS       8
DS       8
SWH      5000.000 Hz
AQ       2.4448000 sec
RG       0.2098479 sec
PC       100.000 usec
DE       6.00 usec
TE       0.0 K
d0       0.00000300 sec
d1       1.48689198 sec
d13      0.00000400 sec
d16      0.00020000 sec
INO      0.00020000 sec
MCREST   0.00000000 sec
MORPH    1.48689198 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1     1H
P0       10.50 usec
P1       10.50 usec
PL1      0.00 dB
SF01     500.1322506 MHz

===== GRADIENT CHANNEL =====
GENAM1   SINE.100
GENAM2   SINE.100
GFX1     0.00 %
GFX2     0.00 %
GFI1     0.00 %
GFI2     0.00 %
GFT1     10.00 %
GFT2     10.00 %
PL6      1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
ND0      1
ID       160
SF01     500.1323 MHz
FIDRES   31.250000 Hz
SW       9.997 ppm
FmMODE   QF

F2 - Processing parameters
SI       0
SF       500.1300000 MHz
SFBW     0
WDW      SINE
SSB      0
LB       0.00 Hz
GB       0
PC       1.40

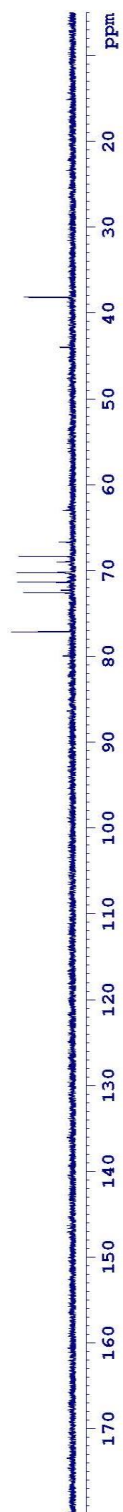
F1 - Processing parameters
SI       1024
MC2      QF
SF       500.1300000 MHz
SFBW     0
WDW      SINE
SSB      0
LB       0.00 Hz
GB       0

```

Phổ NMR COSY của TTX

TTX-D20&CF3OOD-C13CPD&DEPT

DEPT90



DEPT135

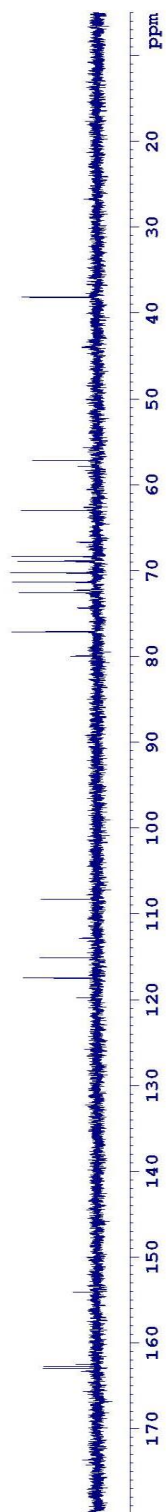
CH&CH3



CH2

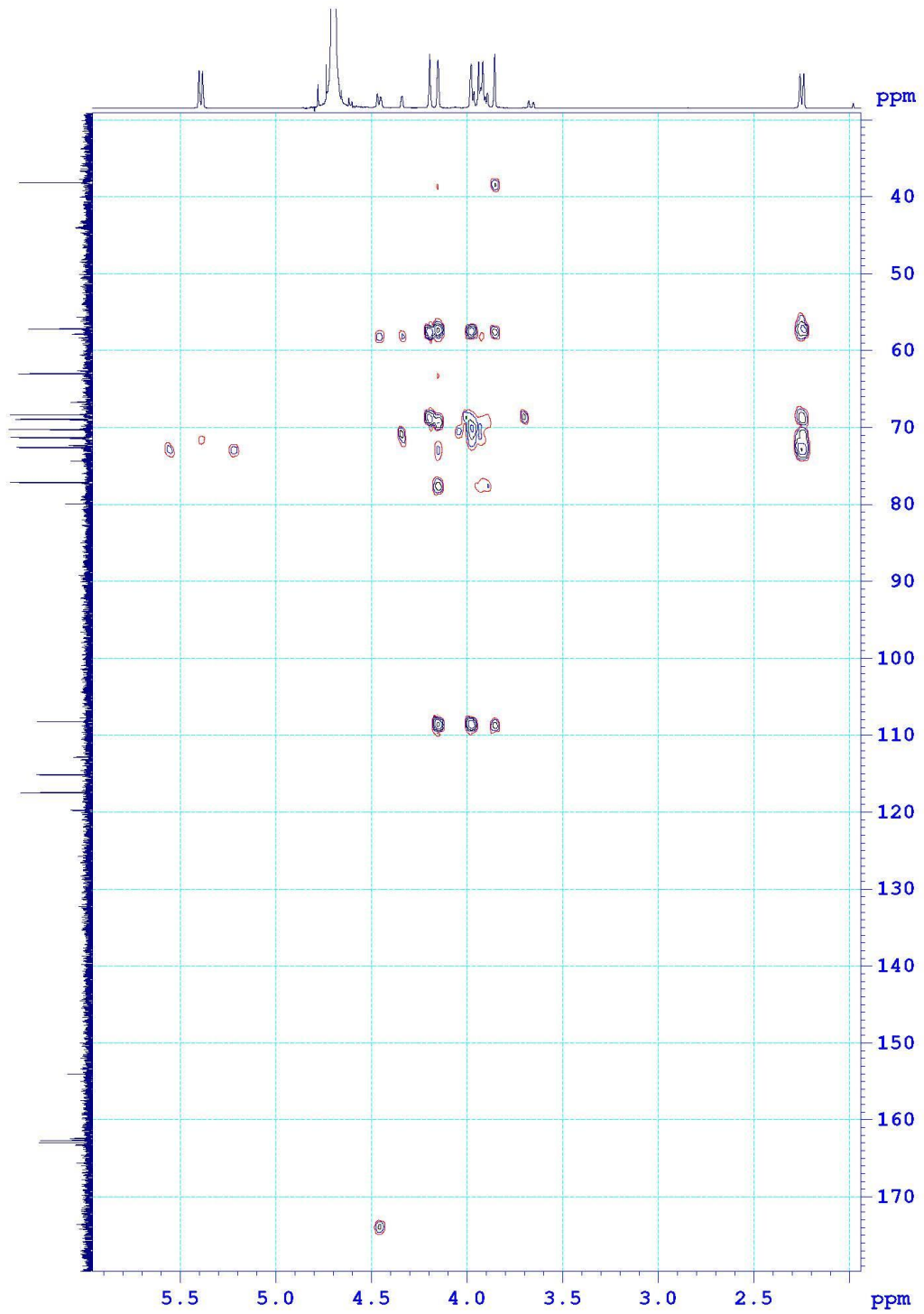


C13CPD



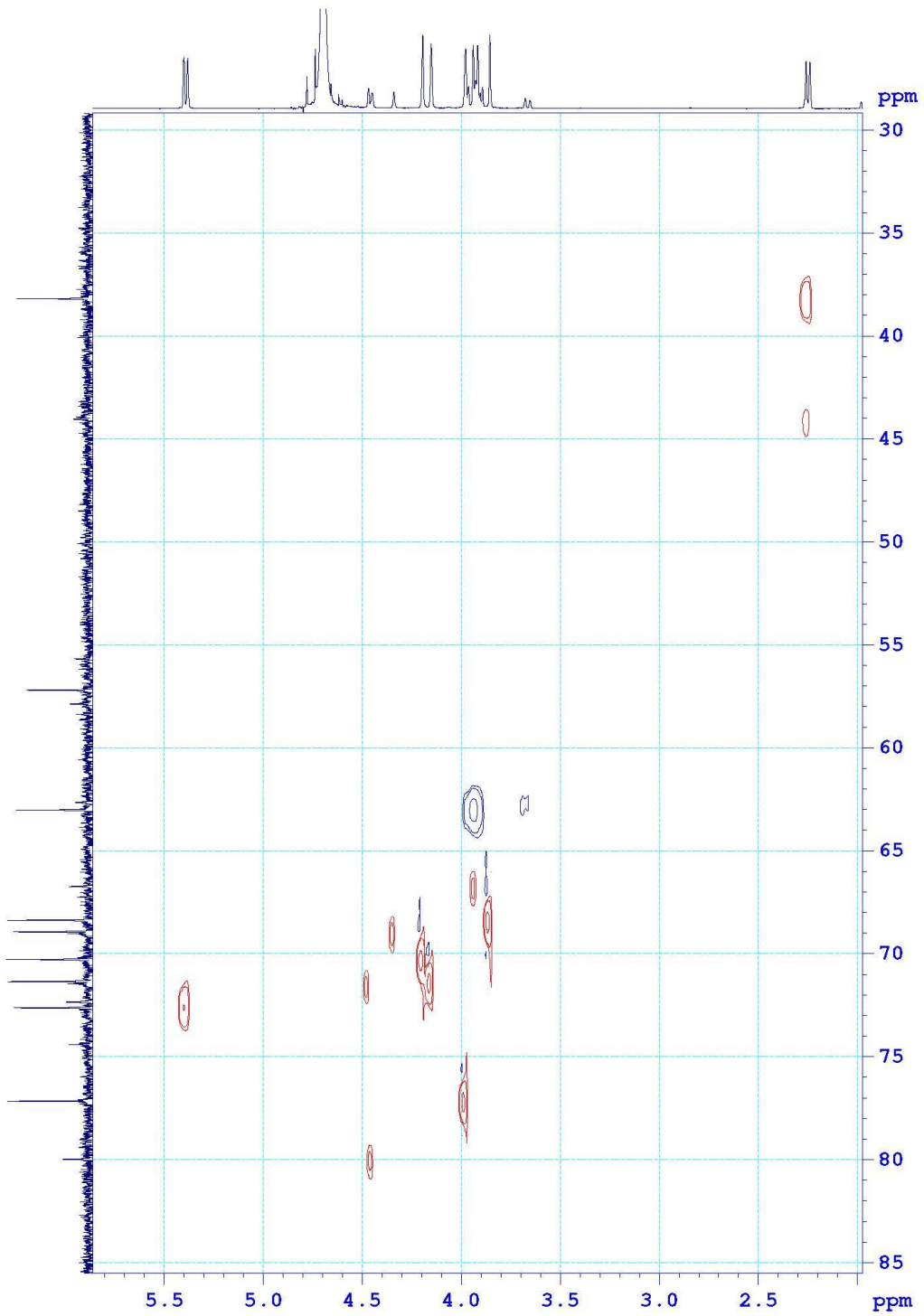
Phổ NMR DEPT của TTX

TTX-D20&CF300D-HMBC



Phổ NMR HMBC của TTX

TTX-D2O&CF3OOD-HSQC



Phổ NMR HSQC của TTX

TTX-D2O&CF3COOD-ROESY

Current Data Parameters
 NAME 11N_TTX
 EXENO 8
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters

Date_ 20120930
 Time 7.19
 INSTRUM spect
 PROBD 5 mm Multinucl
 PULPROG zgpg30
 TD 64
 SOLVENT D2O
 NS 16
 DS 16
 SWH 4496.403 Hz
 FIDRES 4.391018 Hz
 AQ 0.1140300 sec
 RG 645.1
 DW 111.200 usec
 DE 6.00 usec
 TE 0.0 K
 d0 0.00010040 sec
 d1 2.00000000 sec
 d12 0.00020000 sec
 INO 0.00022216 sec
 MCREST 0.00000000 sec
 MCWRK 1.00000000 sec
 STICNT 128

CHANNEL f1

NUCL 1H
 P1 10.50 usec
 PL1 200000.00 Hz
 F1 0.00 Hz
 P11 20.40 usec
 PL11 500.1317505 MHz
 SF01 500.1317505 MHz

F1 - Acquisition Parameters

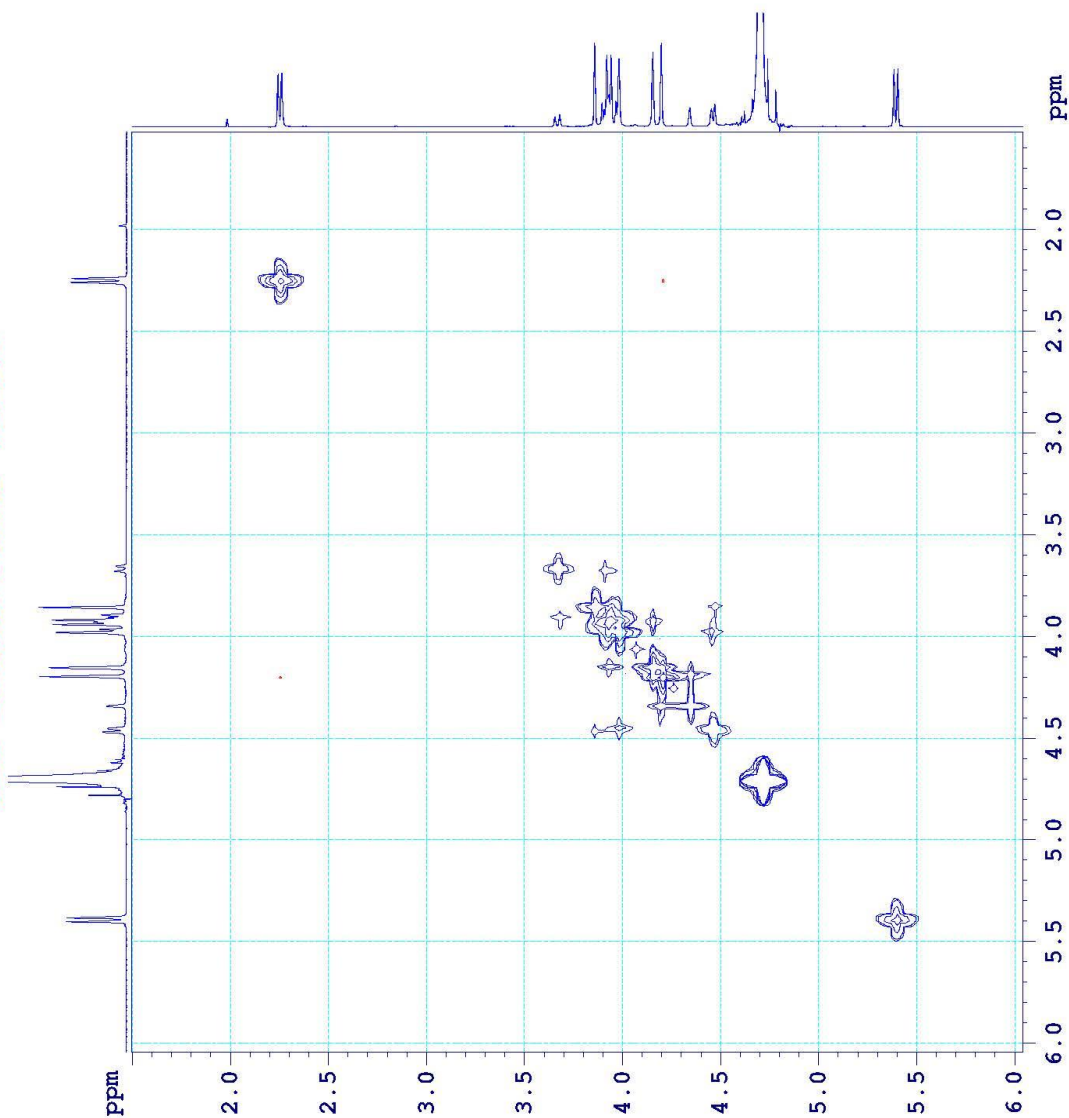
ND0 1
 TD 256
 SF01 500.1318 MHz
 FIDRES 30.413580 Hz
 SW 9.000 ppm
 FmODE States-TPI

F2 - Processing Parameters

SI 512
 SF 500.1300019 MHz
 OSINE
 WDW 2
 SSB 0.00 Hz
 LB 0
 GB 0
 PC 1.00

F1 - Processing Parameters

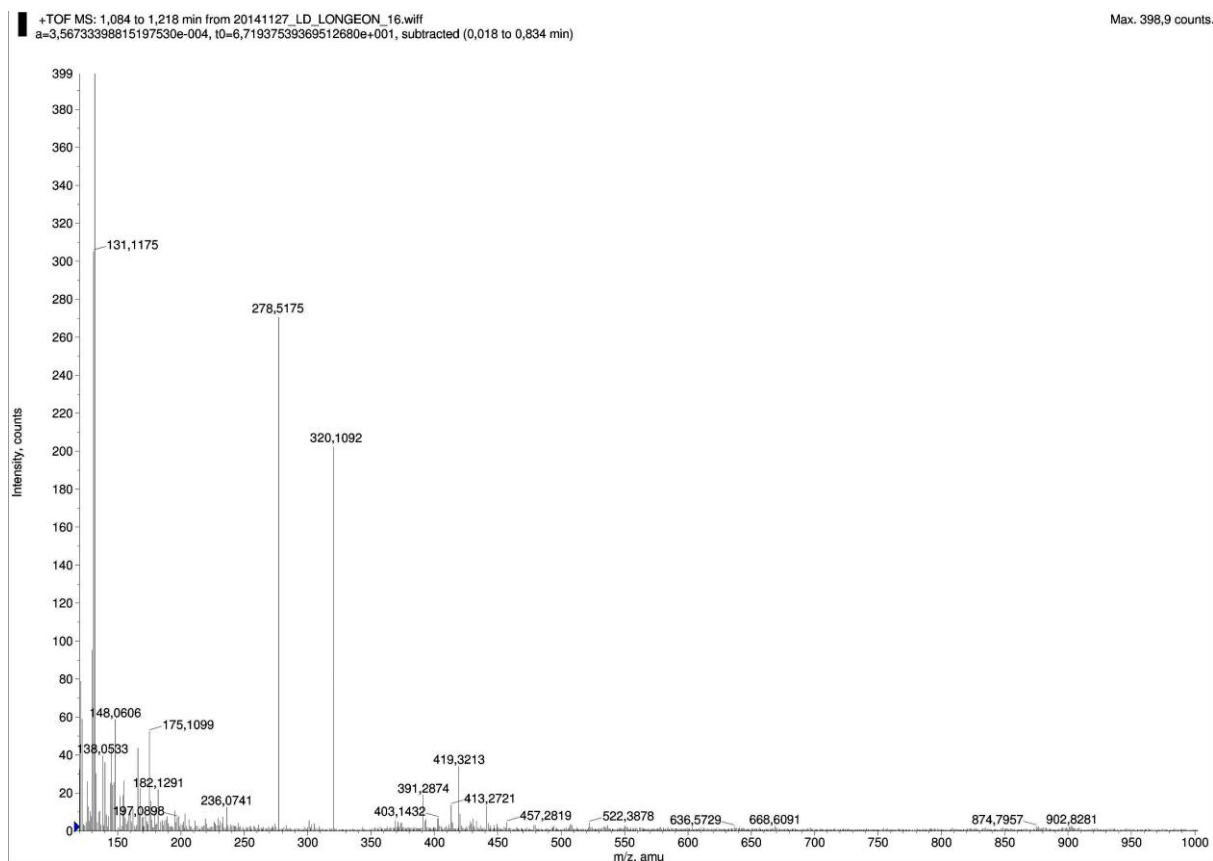
SI 512
 SF 500.1299981 MHz
 OSINE
 WDW 2
 SSB 0.00 Hz
 LB 0
 GB 0



Phổ NMR ROESY của TTX

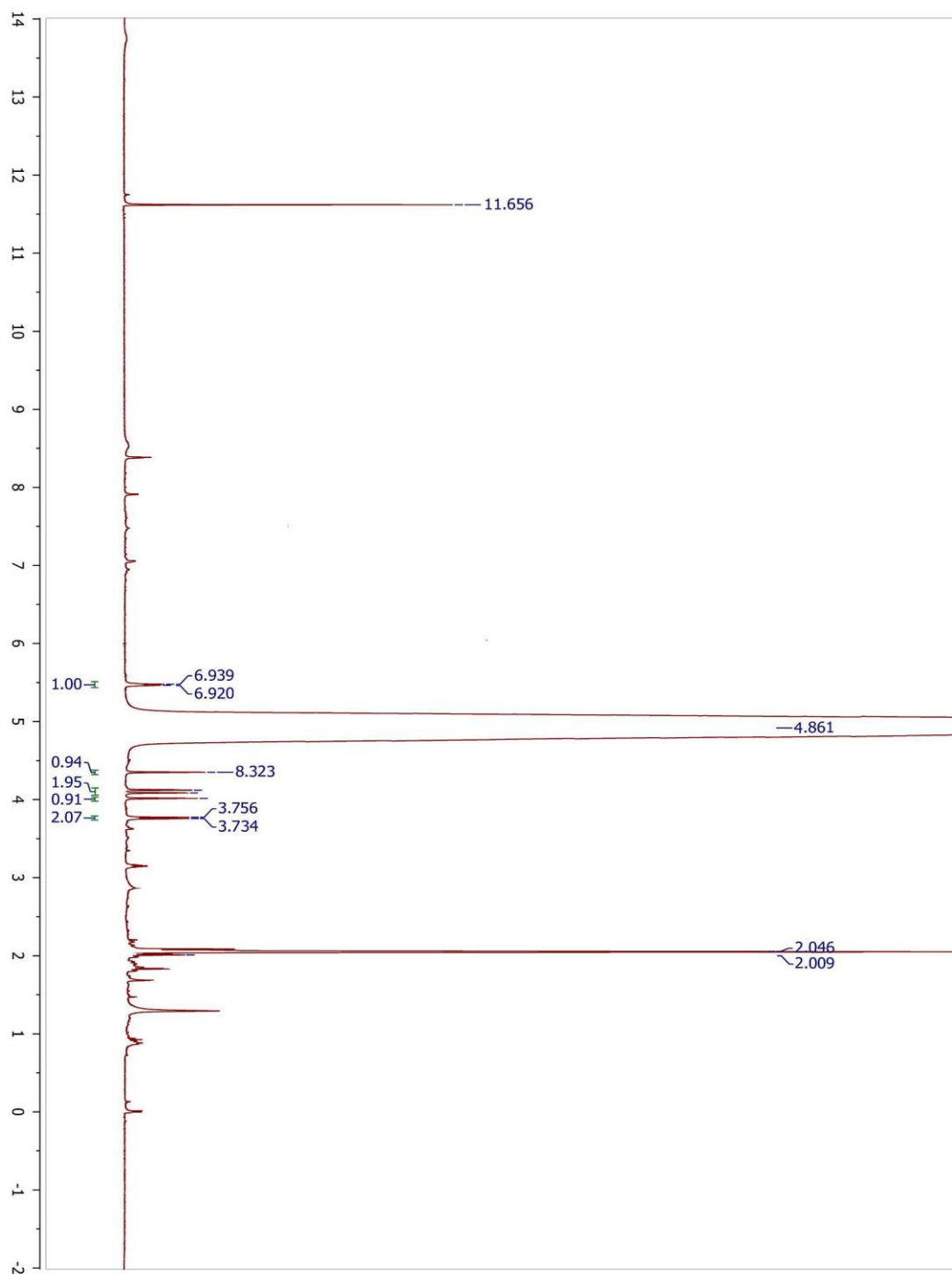
2.2. Bộ dữ liệu nhận dạng 6-epitetrodotoxin

Phổ khối lượng phân giải cao HR ESI FTICR MS

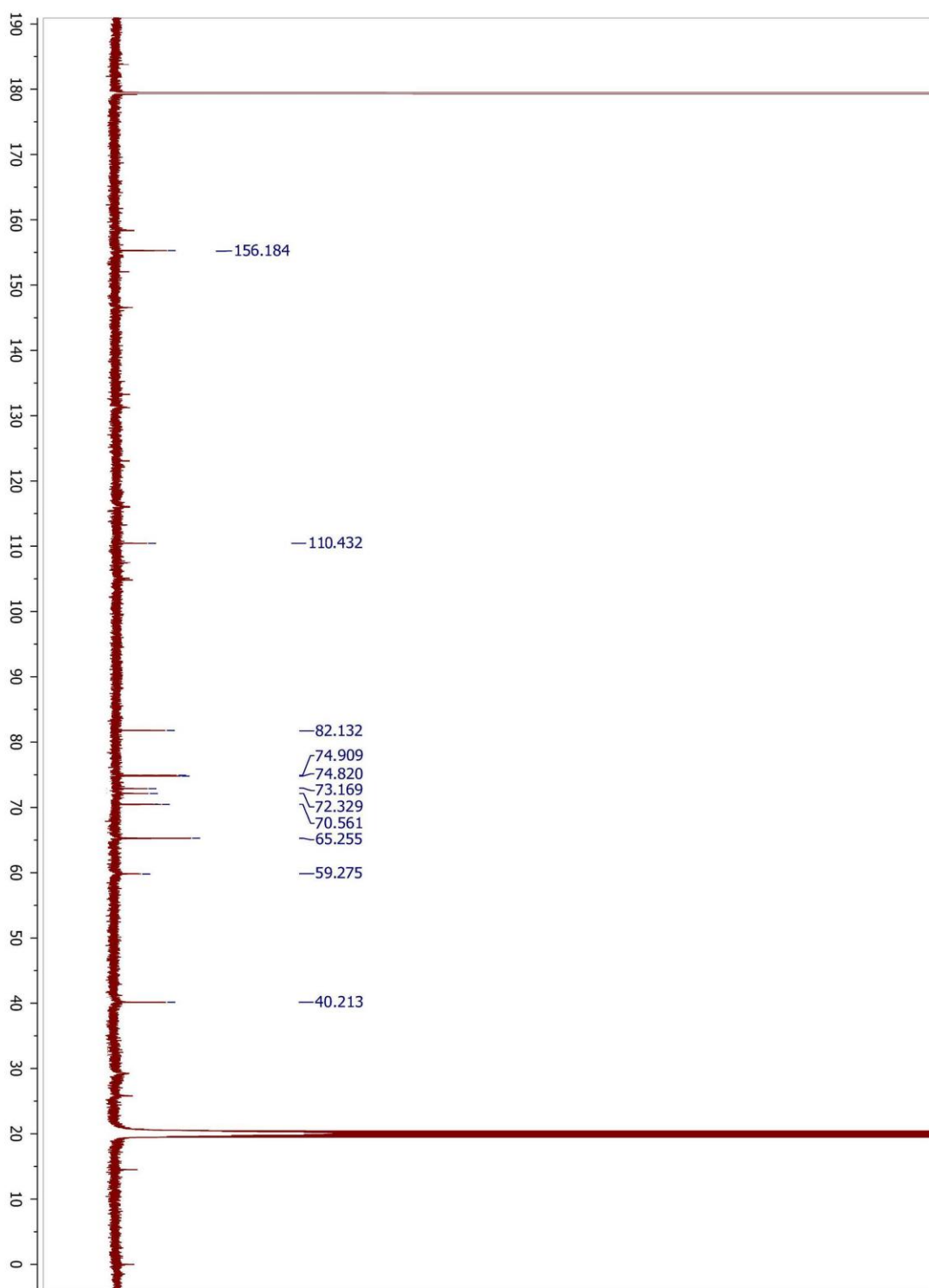


Phổ khối lượng phân giải cao HR ESI FTICR MS

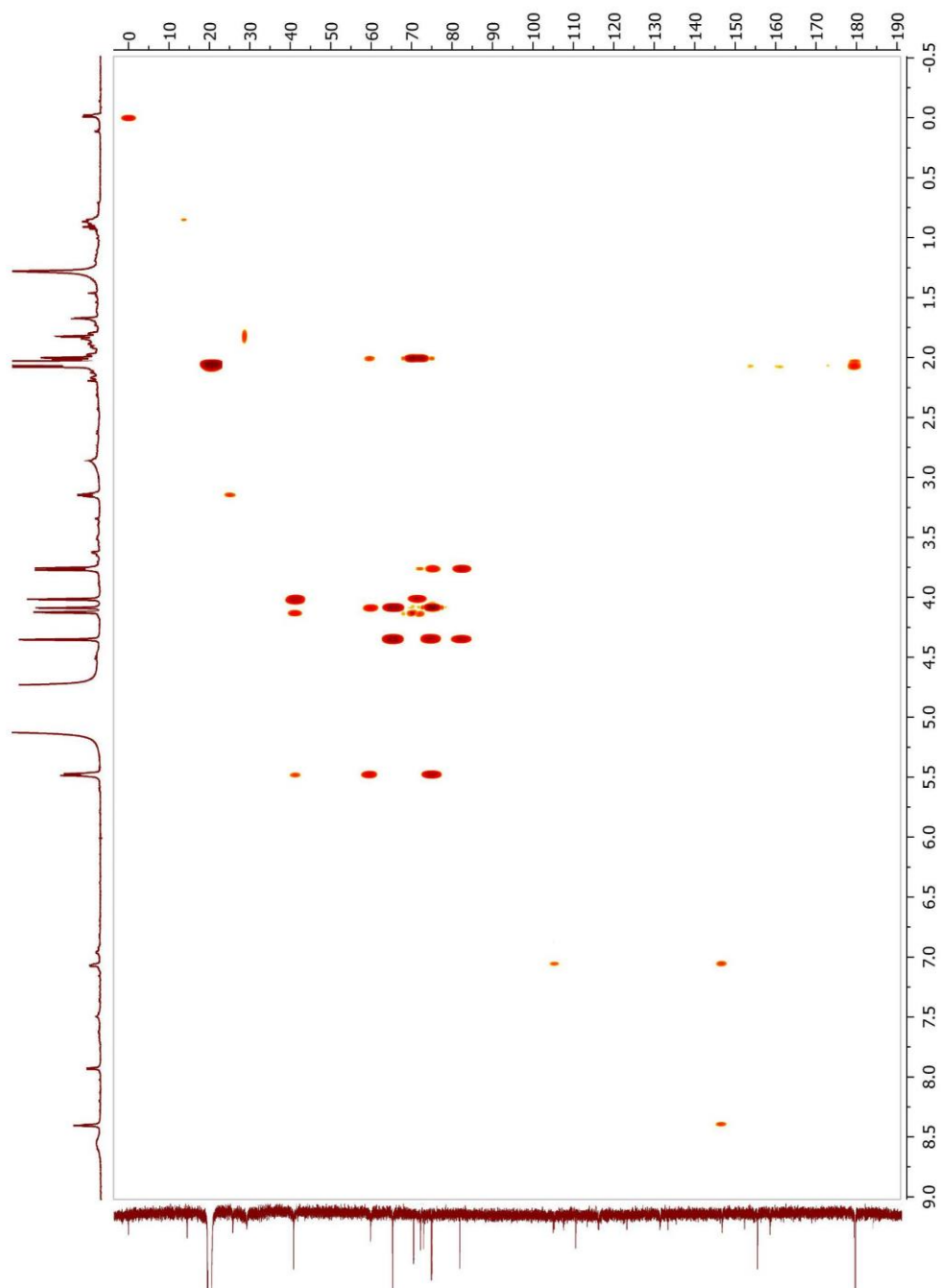
Phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR



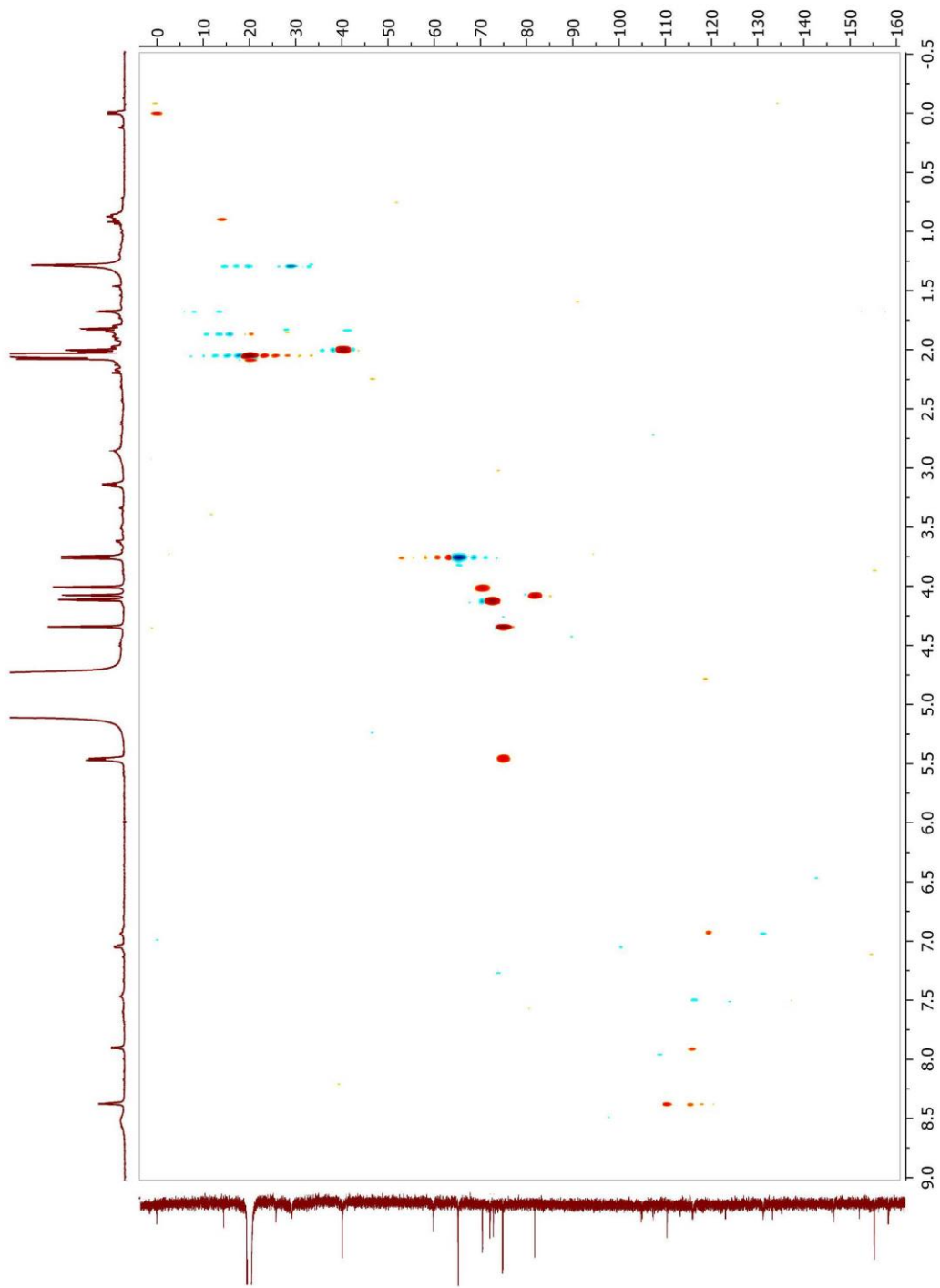
Phổ NMR ^1H của 6-epiTTX



Phổ NMR ^{13}C của 6-epiTTX



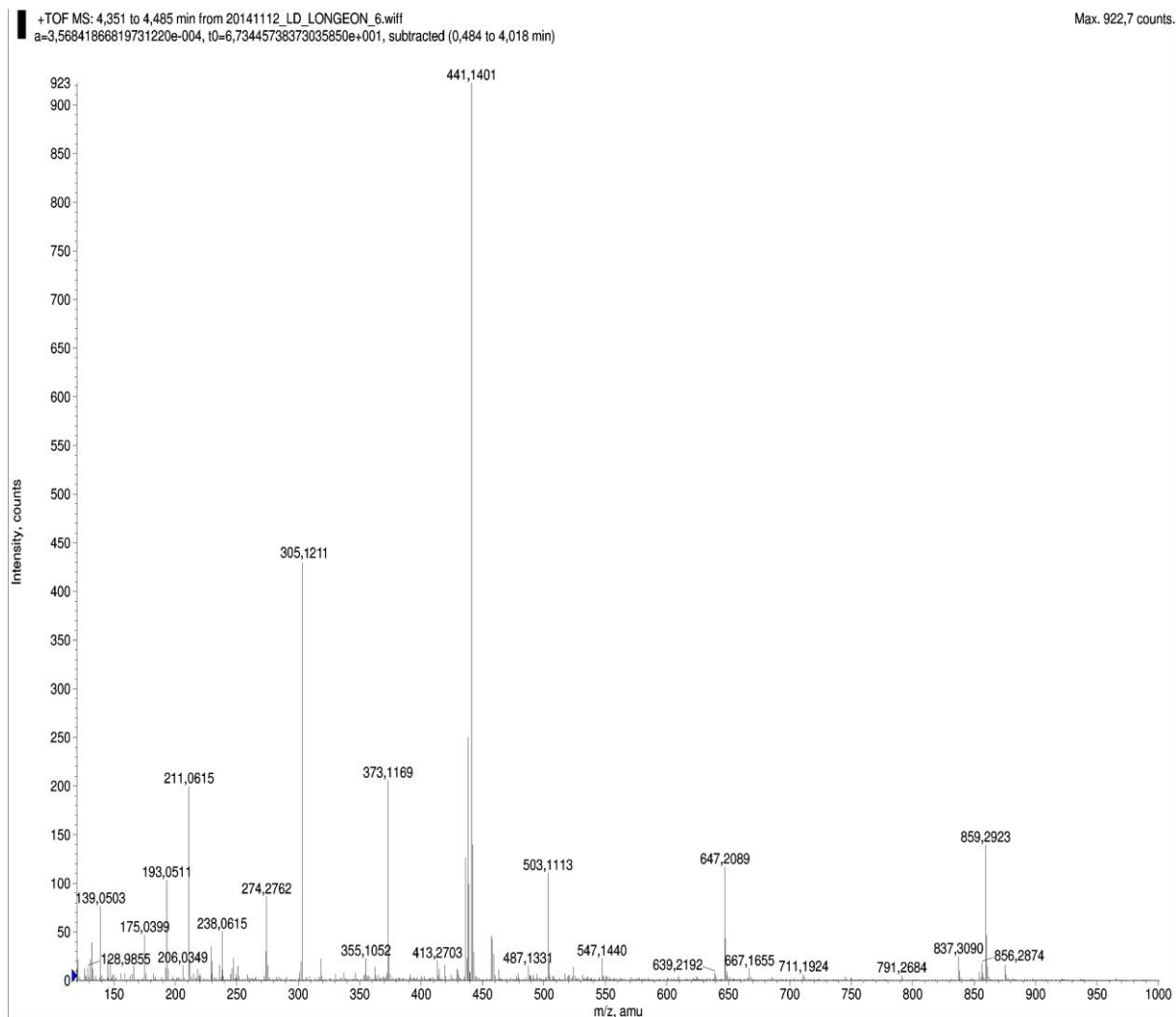
Phổ NMR HMBC của 6-epiTTX



Phổ NMR HSQC của 6-epiTTX

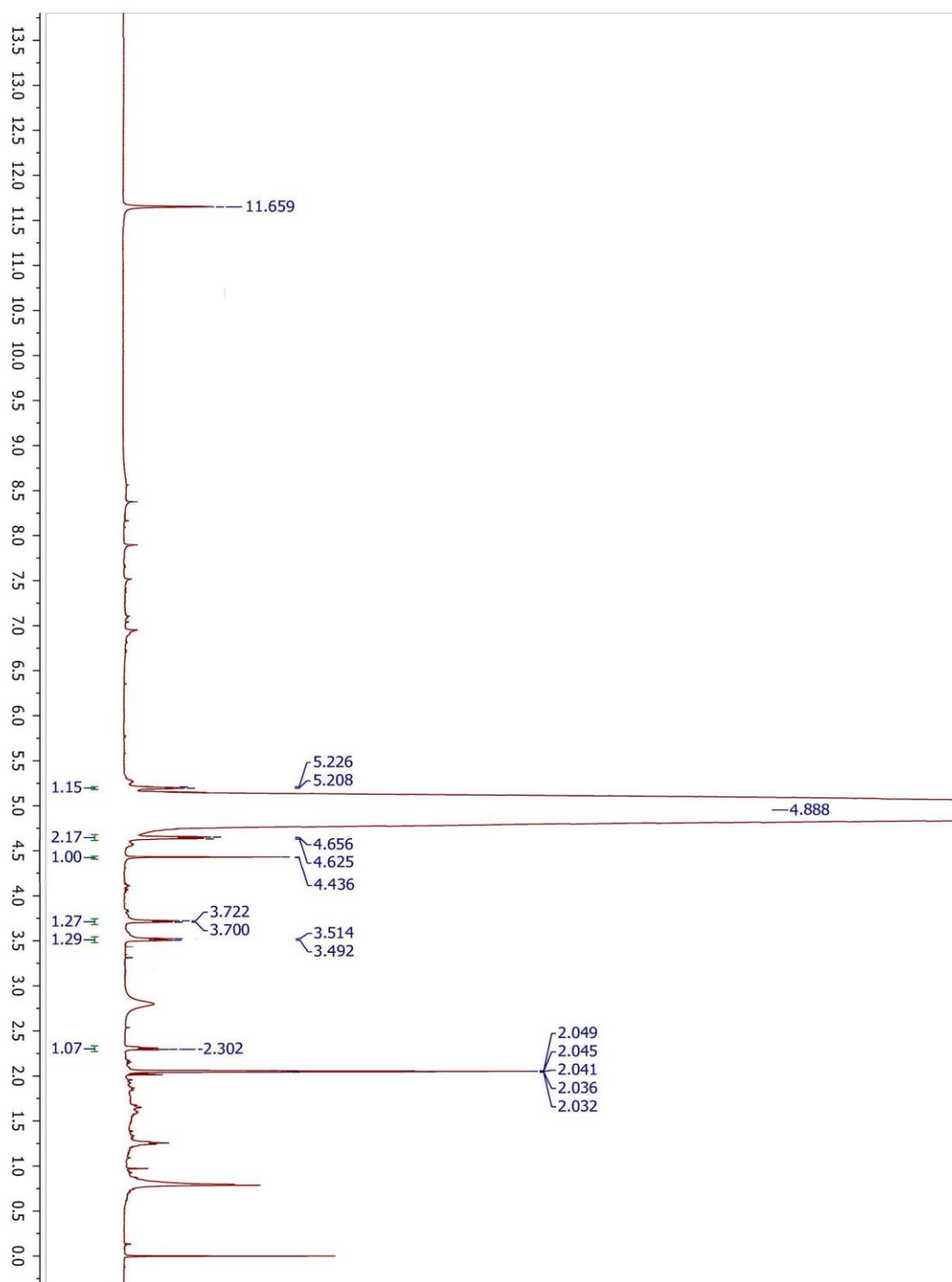
2.3. Bộ dữ liệu nhận dạng 5-deoxytetradotoxin

Phổ khối phân giải cao HR ESI FTICR MS

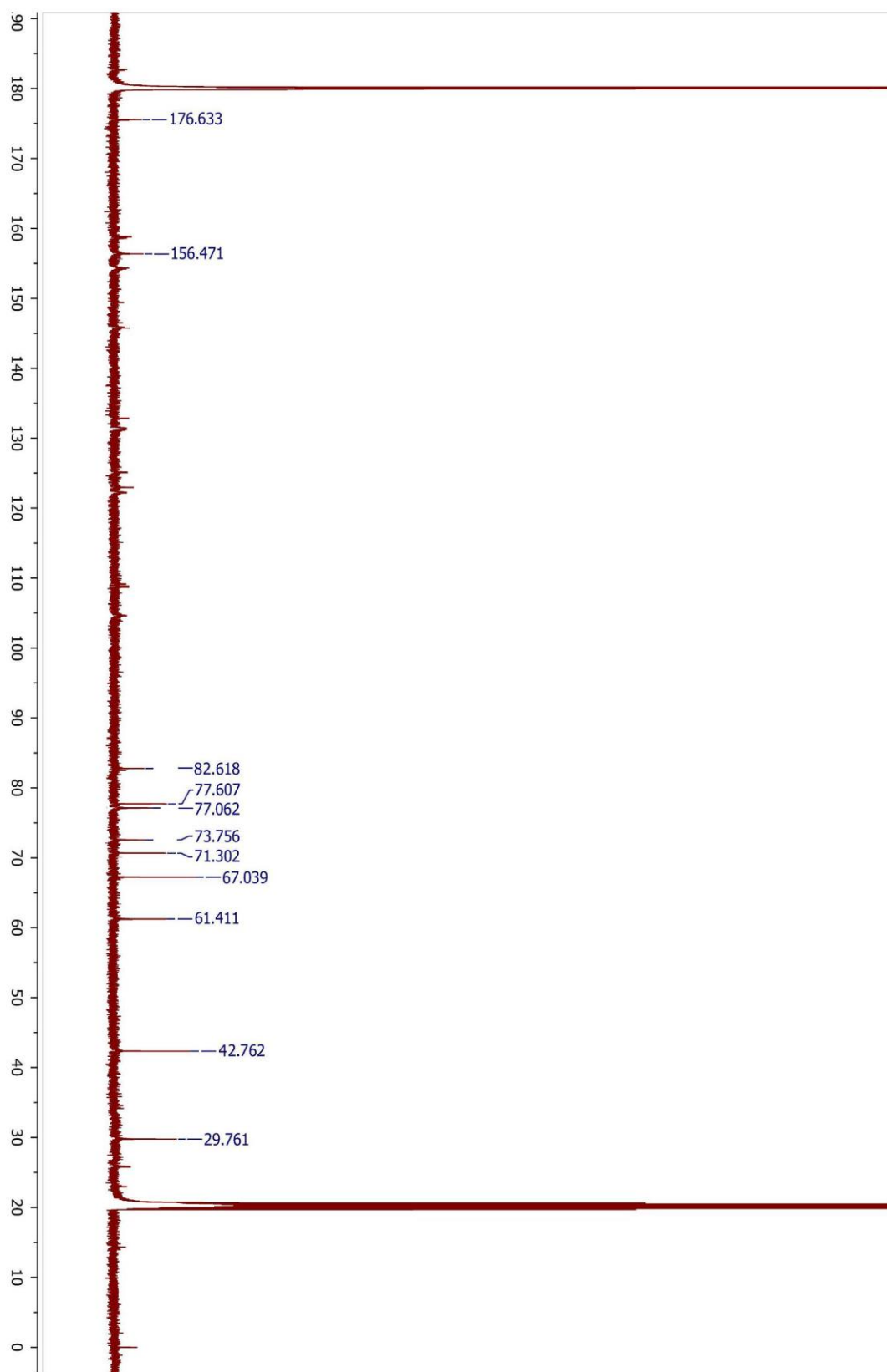


Phổ khối phân giải cao FTICR MS

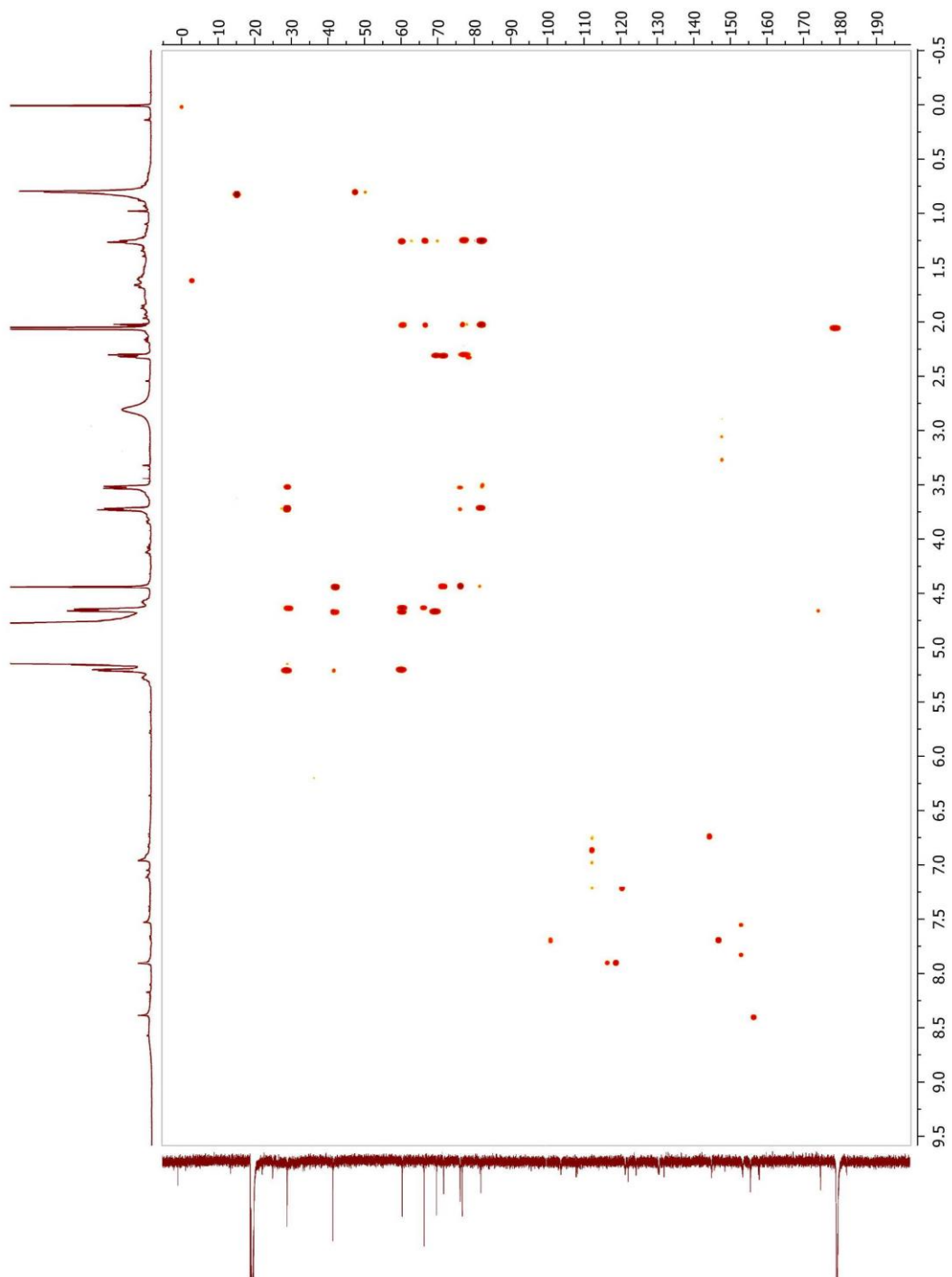
Phổ NMR của 5-deoxyTTX



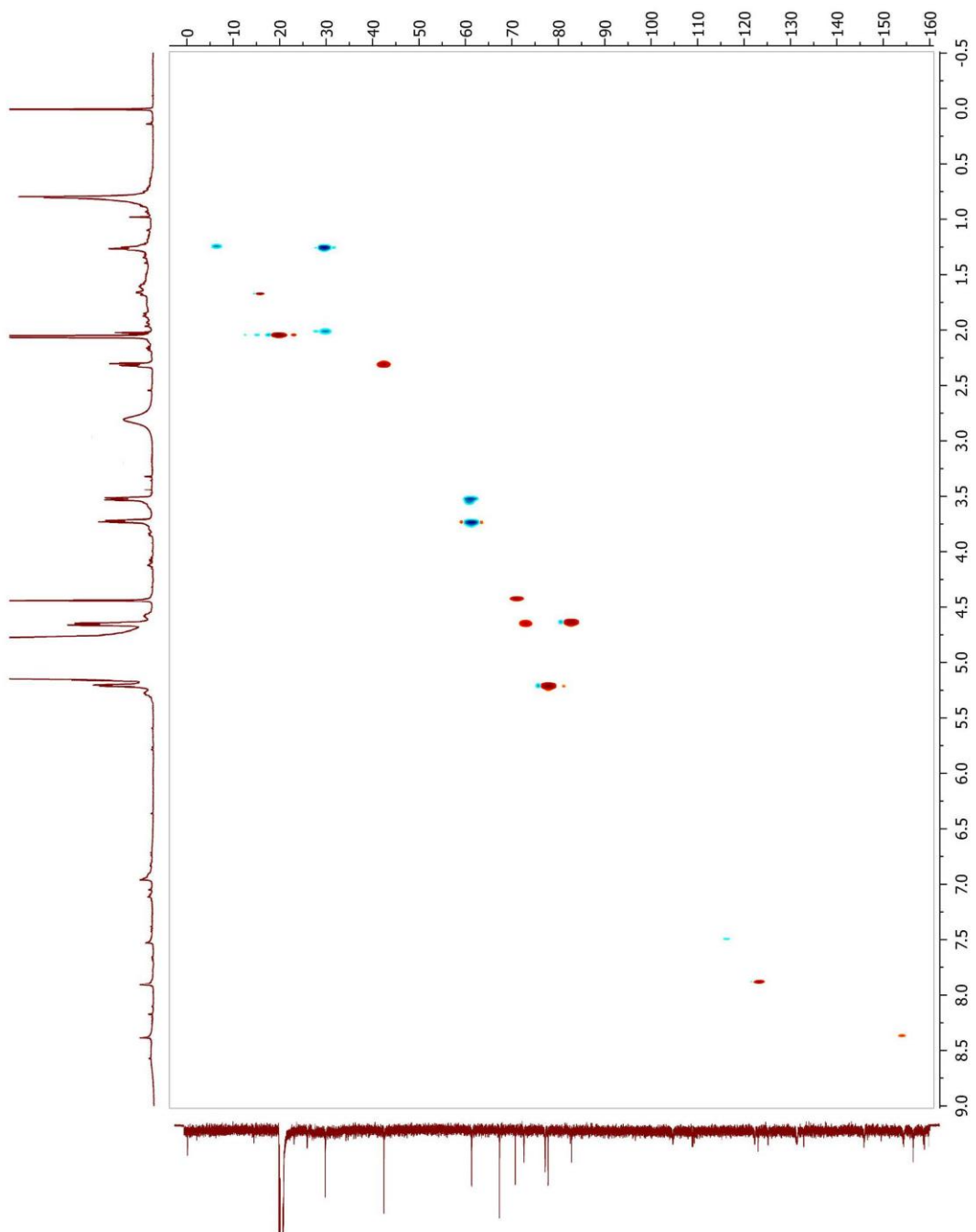
Phổ NMR ^1H của 5-deoxyTTX



Phổ NMR ^{13}C của 5-deoxyTTX



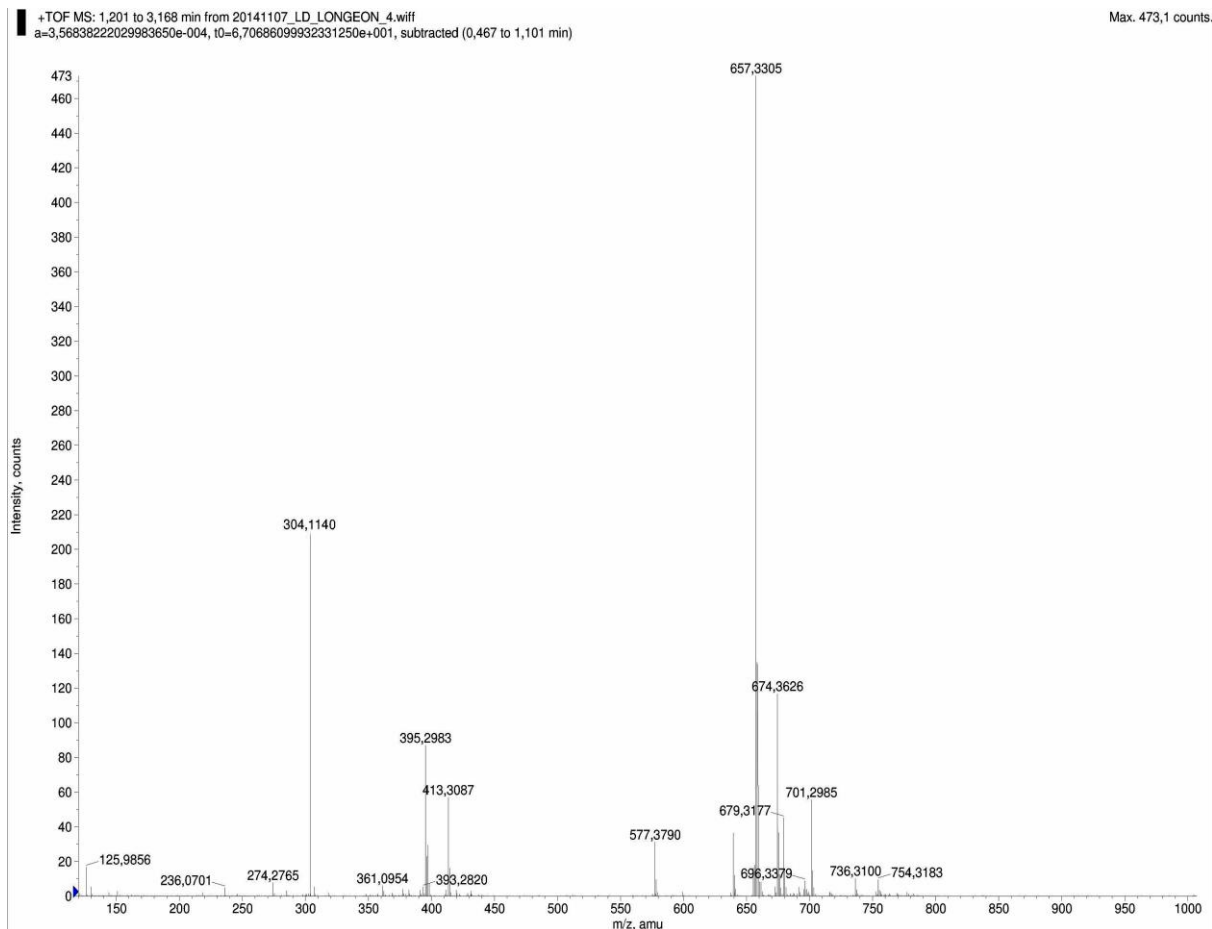
Phổ NMR HMBC của 5-deoxyTTX



Phổ NMR HSQC của 5-deoxyTTX

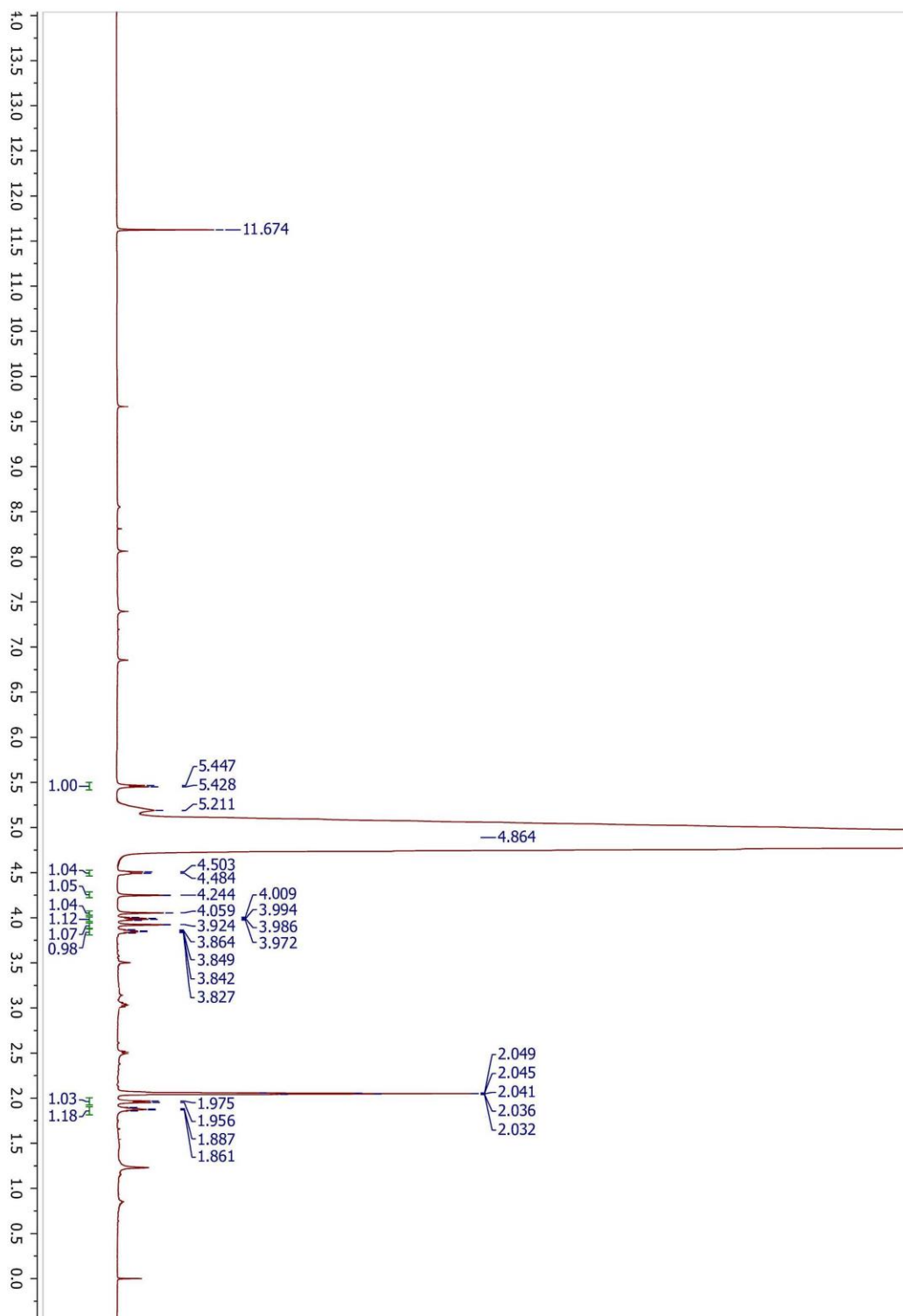
2.4. Bộ dữ liệu nhận dạng 6-deoxytetradotoxin

Phổ khối phân giải cao ESI FTICR MS

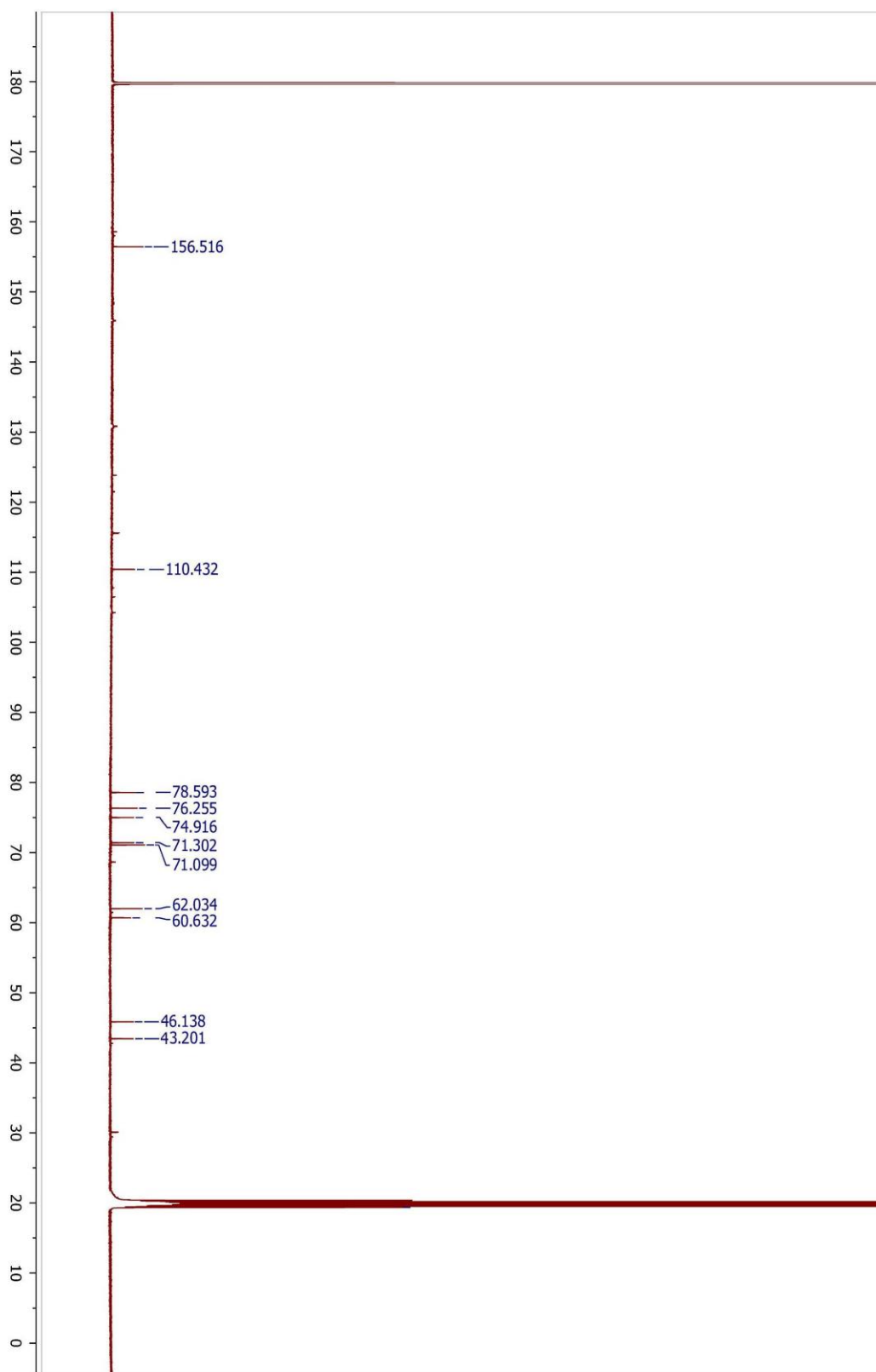


Phổ khối phân giải cao ESI FTICR MS của 6-deoxyTTX

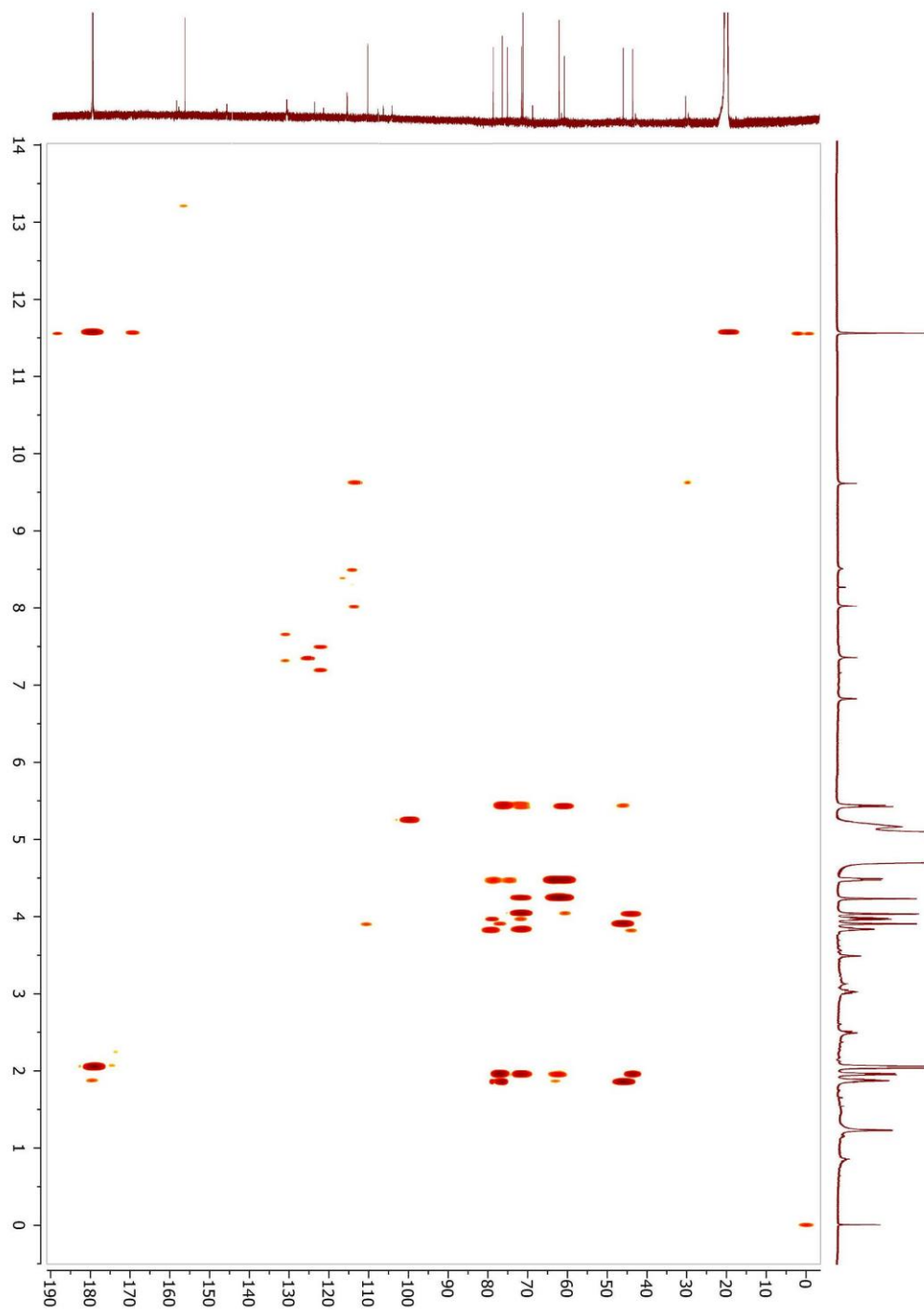
Phổ NMR của 6-deoxyTTX



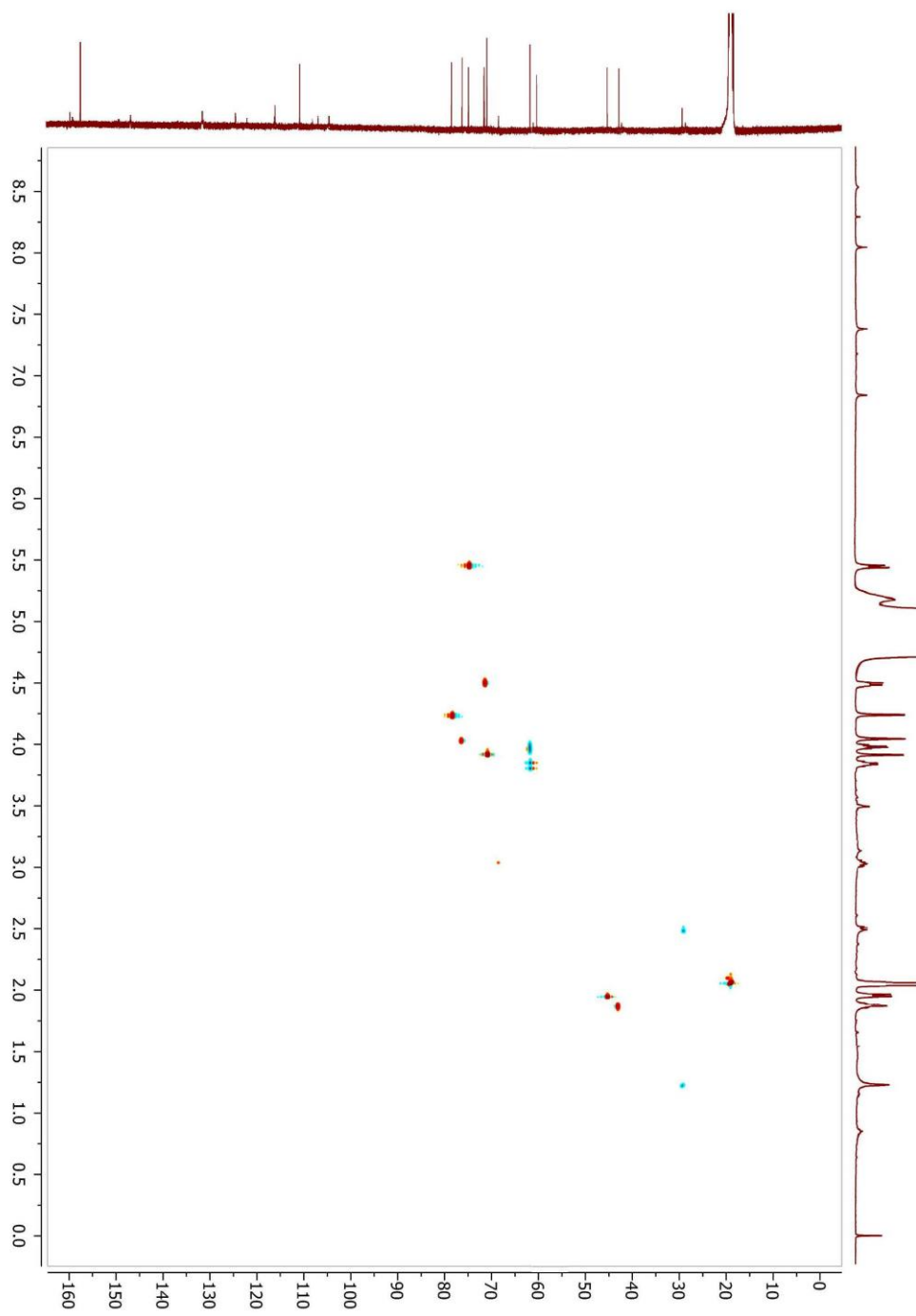
Phổ NMR ^1H của 6-deoxyTTX



Phổ NMR ^{13}C của 6-deoxyTTX



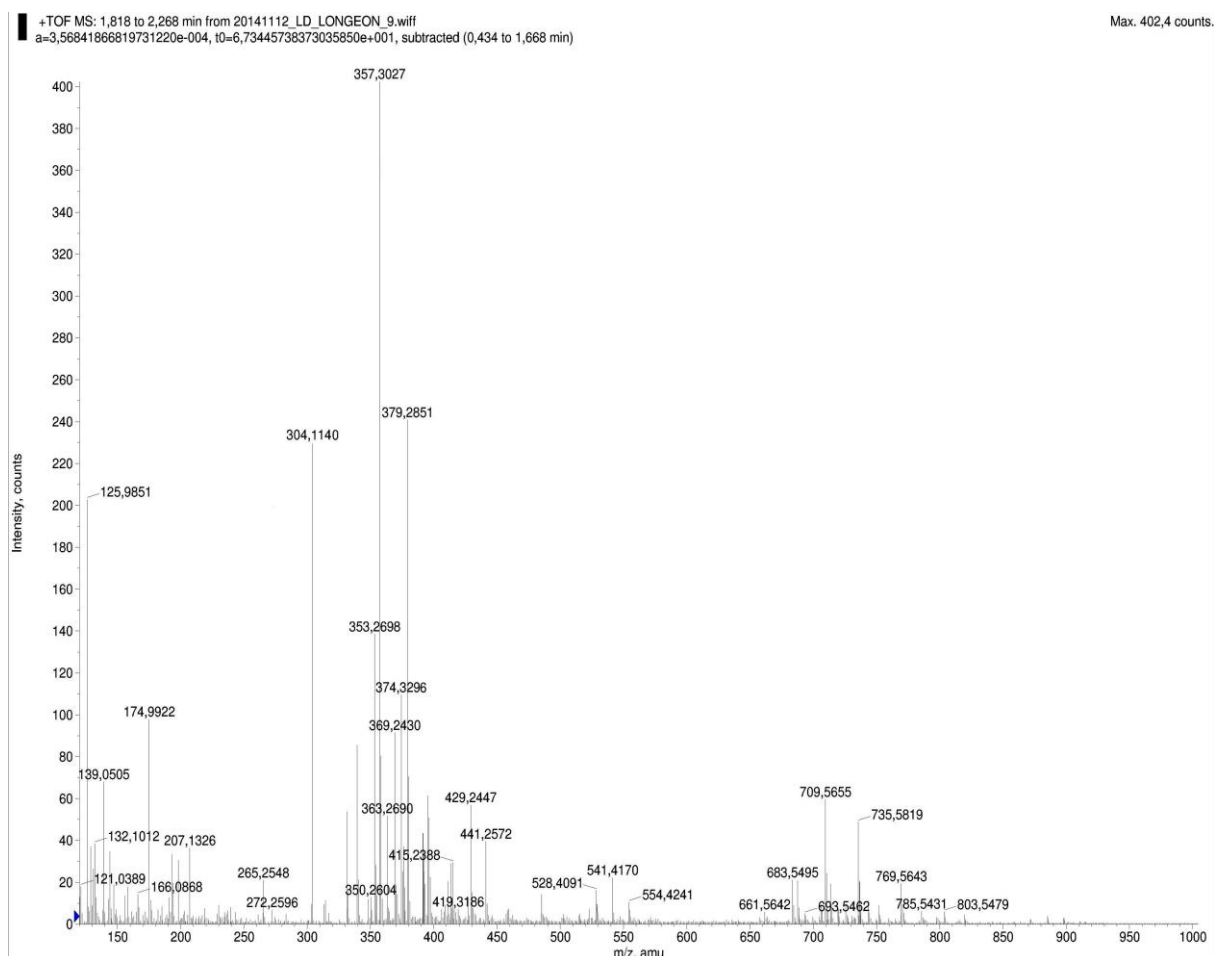
Phổ NMR HMBC của 6-deoxyTTX



Phổ NMR HSQC của 6-deoxyTTX

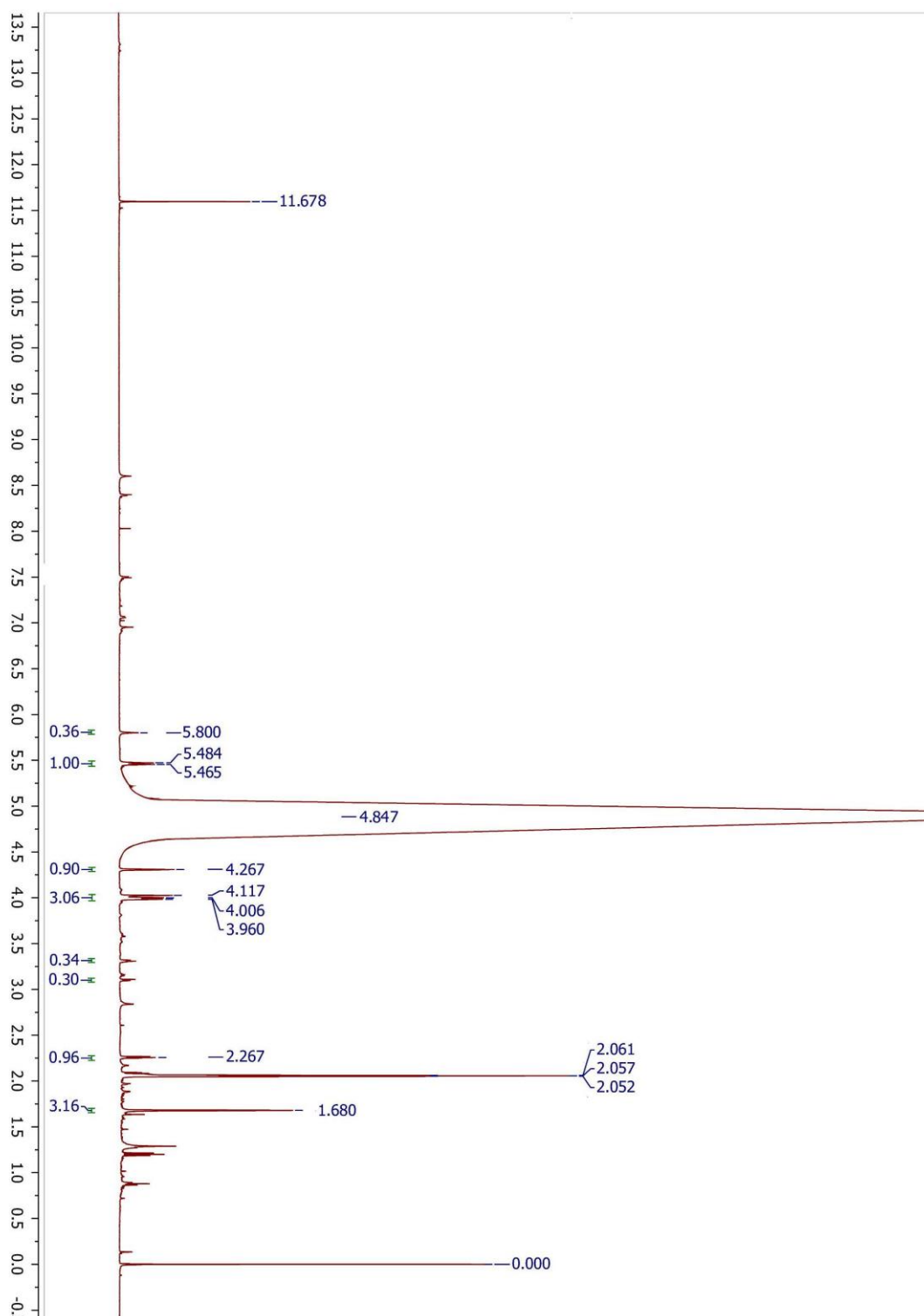
2.5. Bộ dữ liệu nhận dạng *11-deoxyTetrodotxin*

Phổ khối phân giải cao ESI FTICR MS

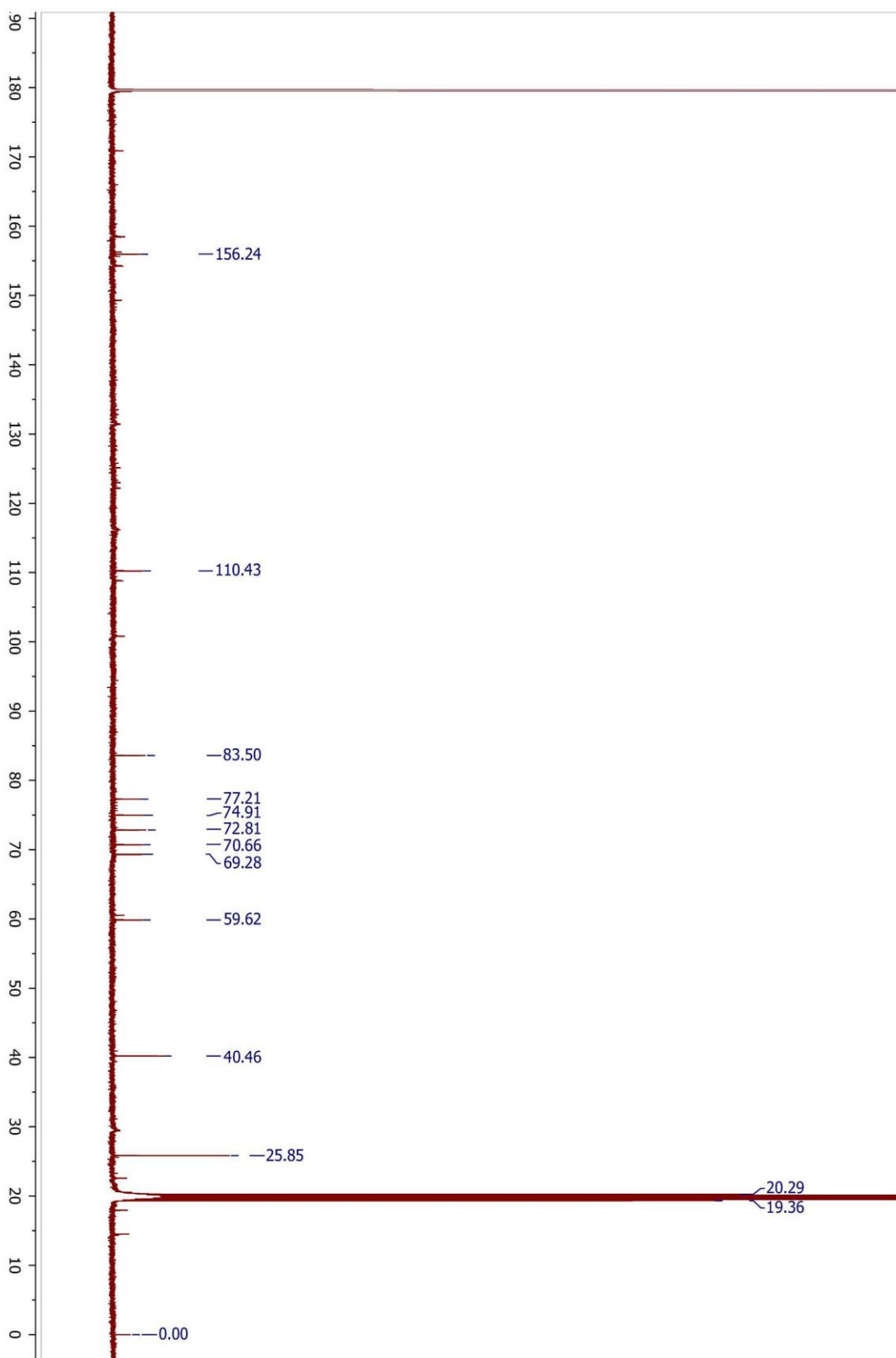


Phổ ESI FTICR của *11-deoxyTTX*

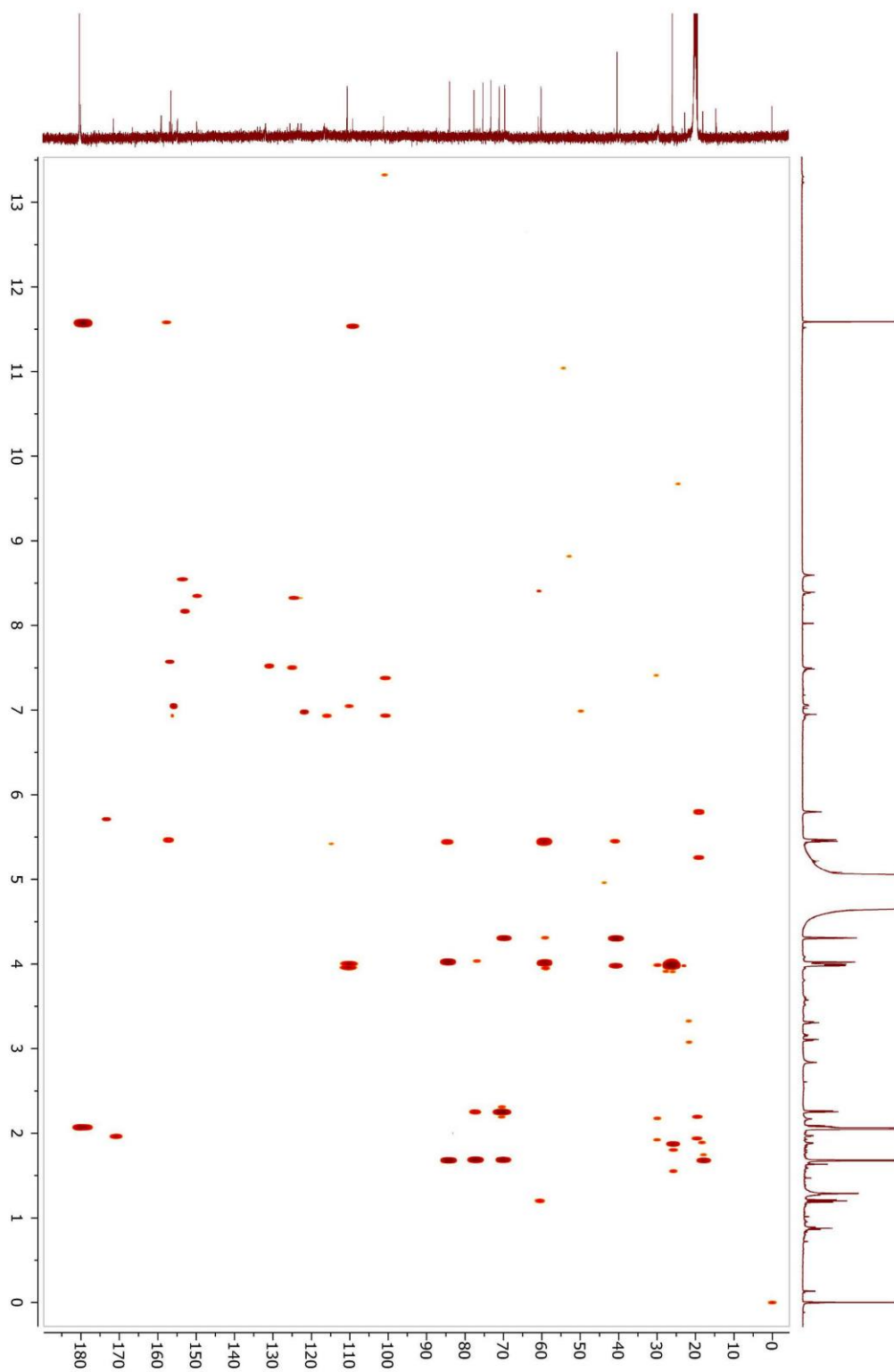
Phổ NMR của 11-deoxyTetrodotxin



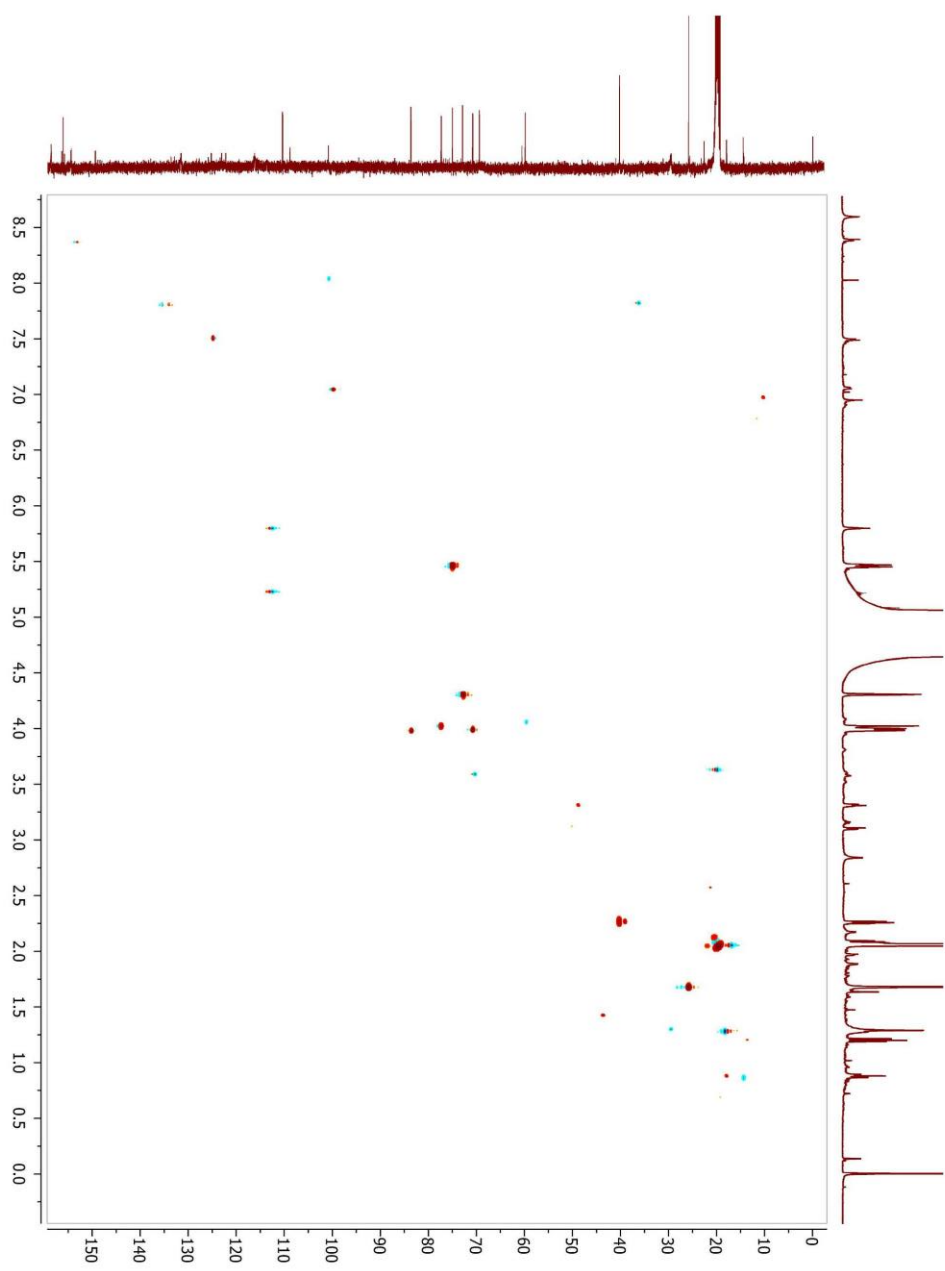
Phổ NMR ^1H của 11-deoxyTTX



Phổ NMR ^{13}C của 11-deoxyTTX



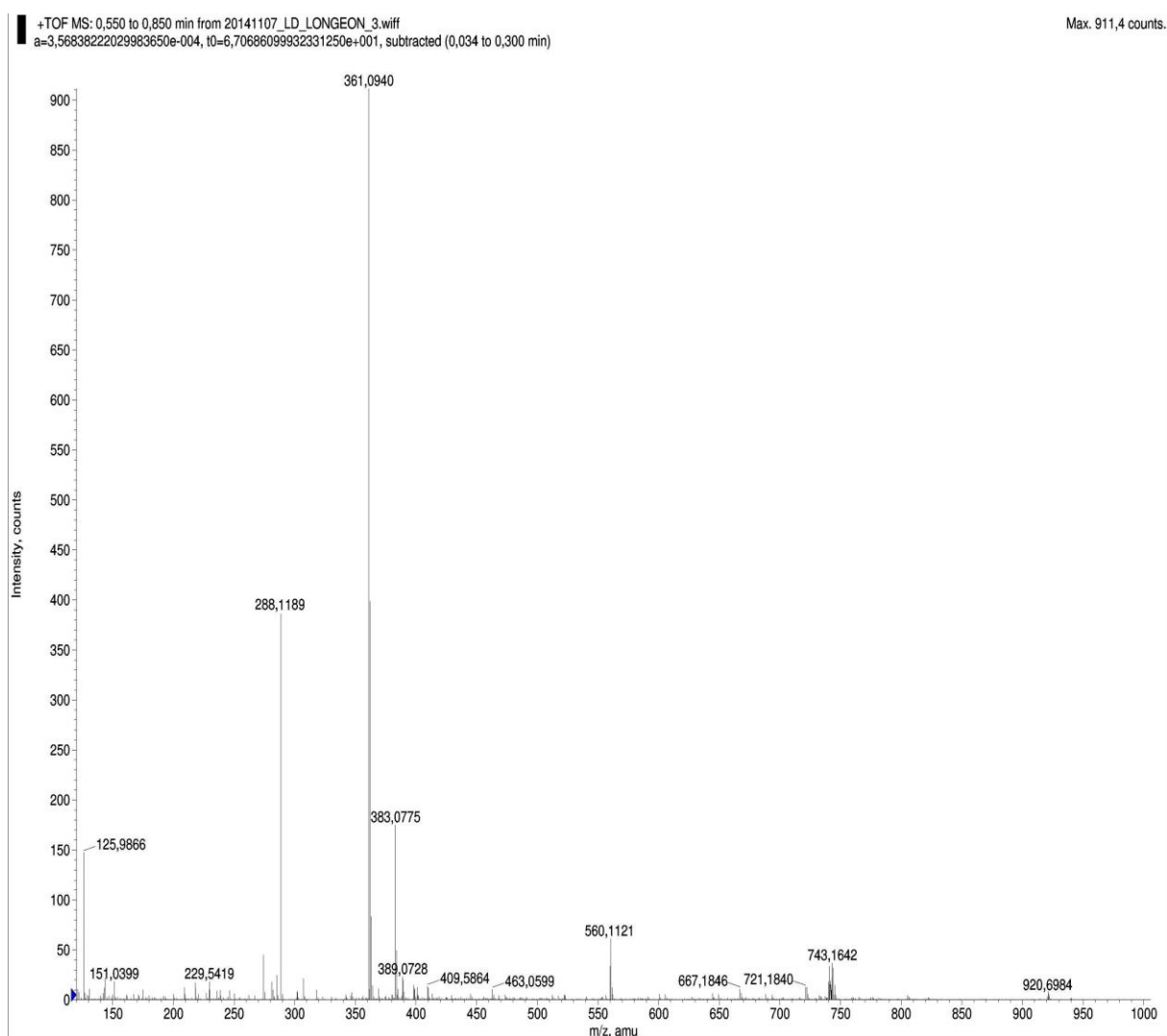
Phổ NMR HMBC của 11-deoxyTTX



Phổ NMR HSQC của 11-deoxyTTX

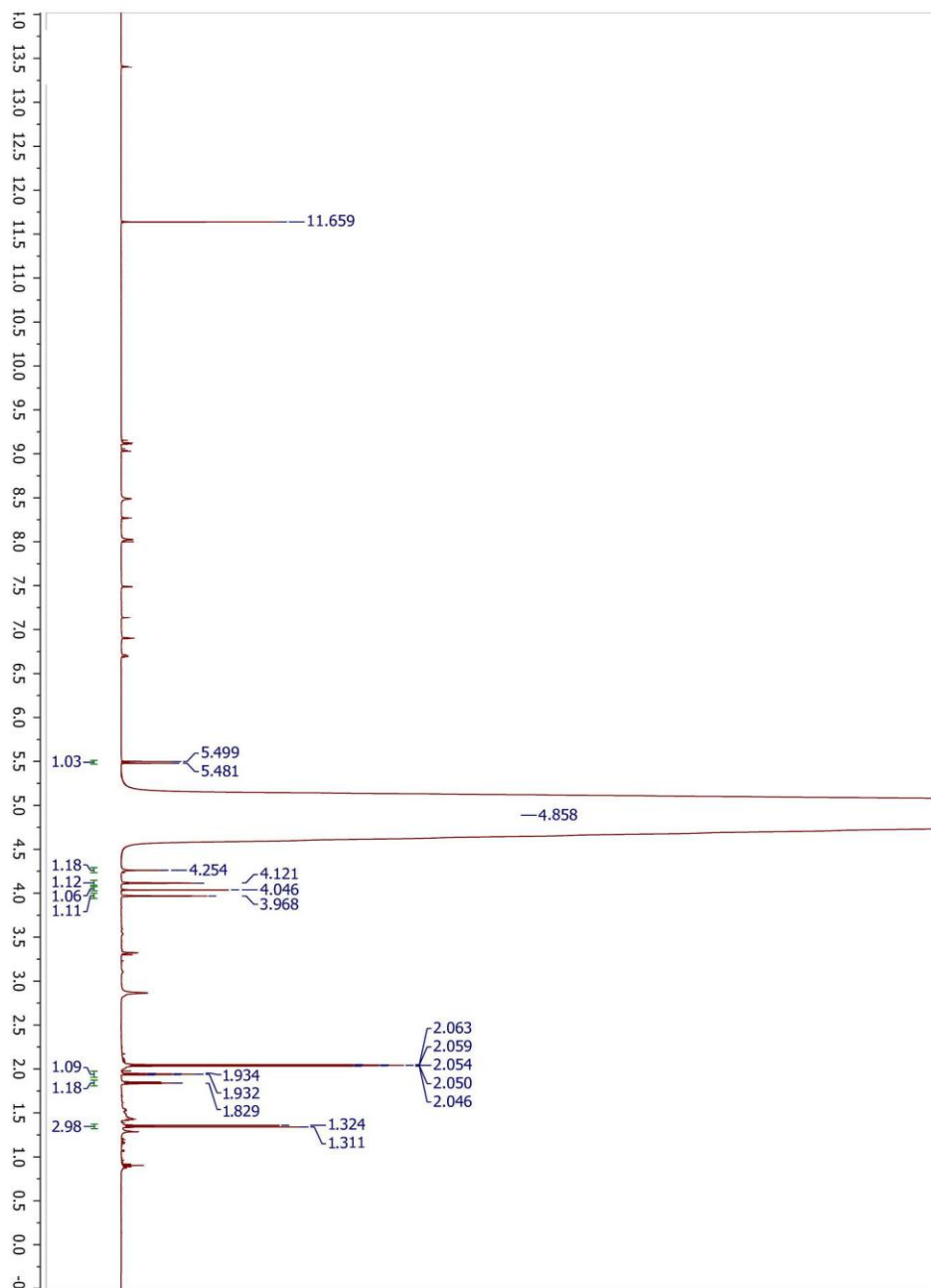
2.6. Bộ dữ liệu nhận dạng *6,11-dideoxyTetrodotoxin*

Phổ khối phân giải cao ESI FTICR MS

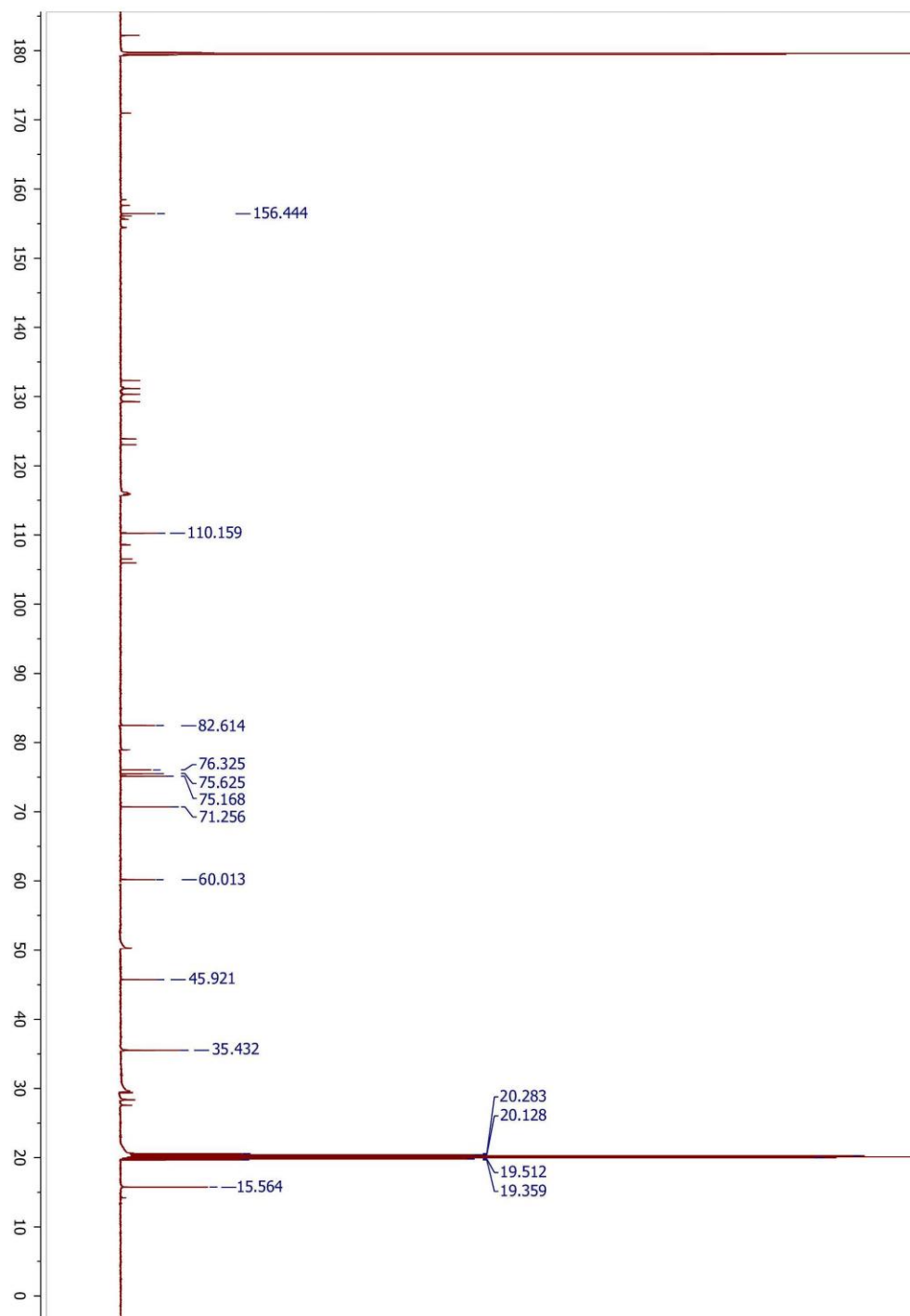


Phổ ESI FTICR MS của 6,11-dideoxyTTX

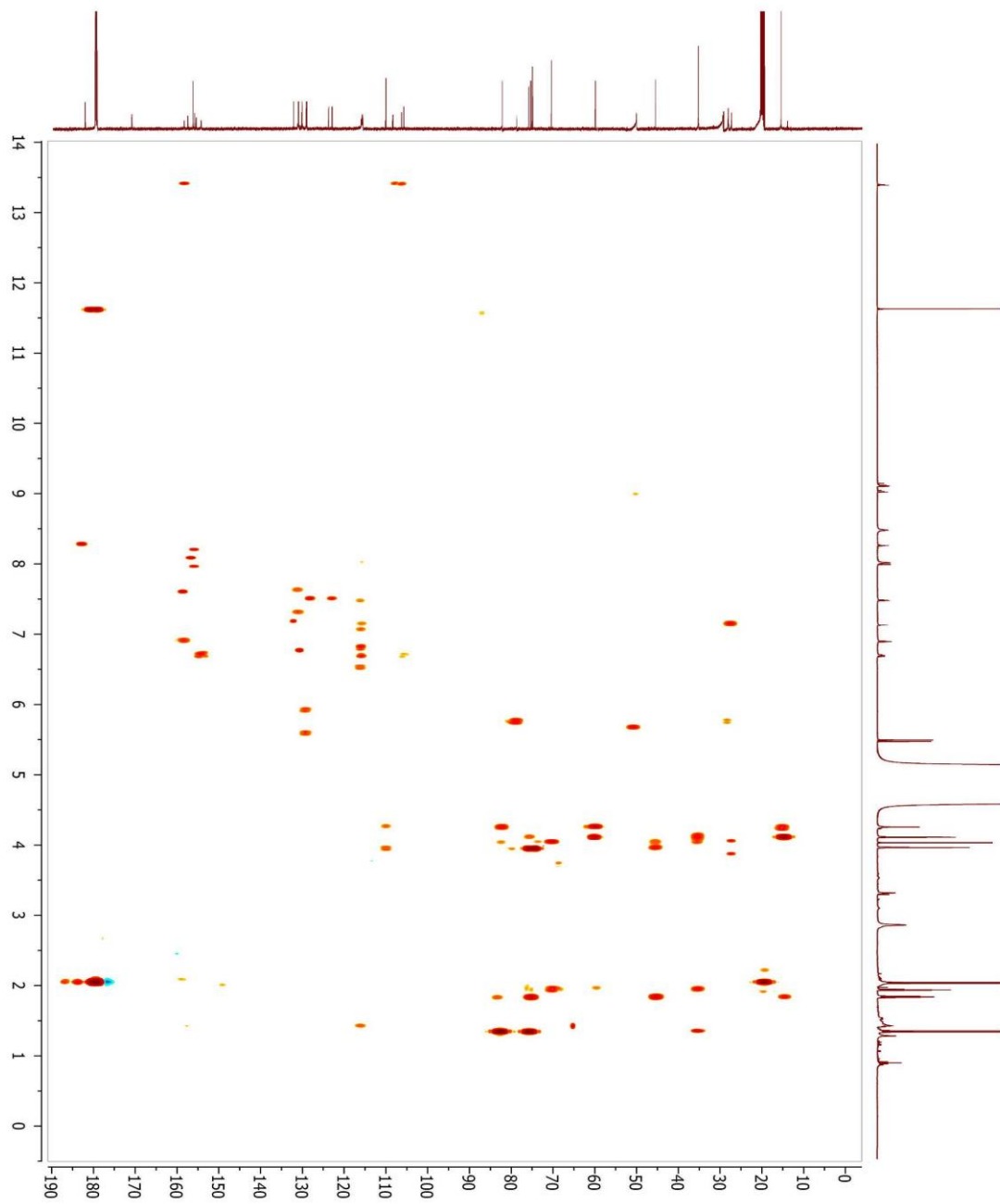
Phổ NMR



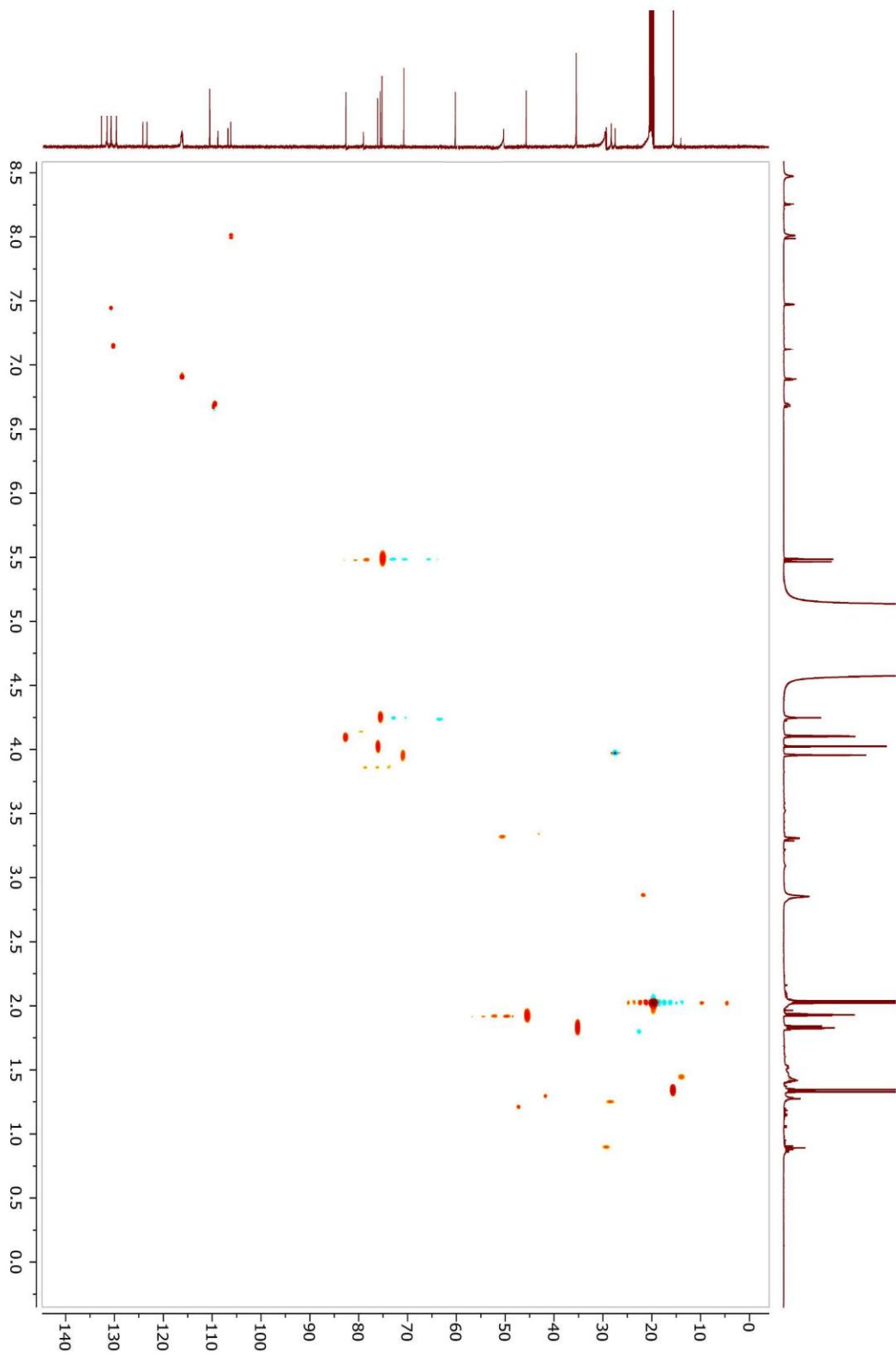
Phổ NMR ^1H của 6,11-dideoxyTTX



Phổ NMR ¹³C của 6,11-dideoxyTTX



Phổ NMR HMBC của 6,11-dideoxyTTX



Phổ NMR HSQC của 6,11-dideoxyTTX
PL-57

PHỤ LỤC 3. CHẤT CHUẨN *TETRODOTOXIN*

Phụ lục 3.1. *Tetrodotoxin* tinh khiết

3.1.1. Ảnh chụp lọ *tetrodotoxin* tinh khiết



Tetrodotoxin tinh khiết
Lô sản xuất: TTX-NC01.13
Hàm lượng: 98,27% $C_{11}H_{17}N_3O_8$ tính theo dạng khan

3.1.2. Phiếu kiểm nghiệm tetrodotoxin tinh khiết



BỘ Y TẾ
VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TRUNG ƯƠNG
 48 Hai Bà Trưng - Hà Nội - Việt Nam
 ĐT: 84.4.38252791 - Fax: 84.4.38256911

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
 Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

PHIẾU KIỂM NGHIỆM

Số:

Mẫu để kiểm nghiệm: TETRODOTOXIN TINH CHẾ
Nơi sản xuất: Việt Nam
Số lô, ngày SX: Lô: TTX-NC01.13 Ngày SX:
Hạn dùng: **Số ĐK:**
Người và nơi gửi mẫu: Dương Minh Tân
Yêu cầu KN (ghi rõ nội dung, số, ngày, tháng, năm của công văn hay giấy tờ kèm theo):
 Kiểm tra chất lượng
Ngày, tháng, năm nhận mẫu: 05/05/2014 **Số đăng ký KN:** NC4.3
Người nhận mẫu: Trịnh Thị Quy
Thử theo: Tiêu chuẩn cơ sở
Tình trạng mẫu khi nhận và mở niêm phong để kiểm nghiệm:
 Bột đựng trong lọ đậy nút, niêm phong kín. Nhãn ghi rõ ràng.

CHỈ TIÊU VÀ TIÊU CHUẨN ÁP DỤNG	KẾT QUẢ	YÊU CẦU
1. Tinh chất	Bột kết tinh trắng, sẫm màu ở 220°C, không phân hủy.	Bột kết tinh trắng hoặc gần trắng, sẫm màu ở khoảng 220°C không kèm phân hủy.
2. Định tính Phương pháp LC/MS/MS	Đúng	Sắc ký đồ của dung dịch thử phải có pic với thời gian lưu và phổ MS/MS giống với thời gian lưu và phổ MS/MS của TTX trong sắc ký đồ của dung dịch chuẩn.
3. Mất khối lượng do làm khô Phương pháp TGA	Đạt (0,12%)	Không quá 0,5%
4. Định lượng Phương pháp LC/MS/MS	Đạt (98,27%)	Hàm lượng Tetrodotoxin (C ₁₂ H ₁₇ N ₃ O ₈) trong chế phẩm phải không ít hơn 95,0%, tính theo chế phẩm đã sấy khô.

Hà Nội, ngày 26 tháng 5 năm 2014
 VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TRUNG ƯƠNG
Đoàn Cao Sơn

Các bản trích, sao kết quả này sẽ không có giá trị nếu không có sự đồng ý của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương
 VKN/BM/25.03

1/1

Phụ lục 3.2. Chất chuẩn đối chiếu hoá học phòng thử nghiệm *tetrodotoxin*

3.2.1. Ảnh chụp một số lọ chuẩn *tetrodotoxin* 0,1mg/ml



LỌ CHUẨN *TETRODOTOXIN* 0,1MG/LỌ

Số lượng: 100 lọ

Lô sản xuất: TTL.DTDL.2015

Hàm lượng: 99,9% $C_{11}H_{17}N_3O_8$ so với hàm lượng ghi trên nhãn

3.2.2. Chứng chỉ phân tích



BỘ Y TẾ
VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TRUNG ƯƠNG
48 Hai Bà Trưng - Hà Nội - Việt Nam
ĐT: 84.4.38252791 - Fax: 84.4.38256911

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

CHỨNG CHỈ PHÂN TÍCH *Certificate of Analysis*

CHUẨN CHÍNH
Reference Substance

TETRODOTOXIN

1,0 ml dung dịch chứa 0,1 mg tetrodotoxin ($C_{11}H_{17}N_3O_8$) trong đệm citrat pH 4,8

SKS: TTX.DTDL.2015

- I. **Mục đích sử dụng:** Chuẩn chính Tetrodotoxin SKS: TTX.DTDL.2015 được sử dụng cho các thử nghiệm hóa lý và sinh học

Intended use: The Reference Substance for Tetrodotoxin Control No. TTX.DTDL.2015 is intended to be used in physicochemical and biological tests.

- II. **Mô tả:** Dung dịch trong suốt, không màu.

Description: A clear, colourless solution.

- III. **Kết quả phân tích:** Tiến hành song song với chuẩn Tetrodotoxin Sigma Aldrich lô: 038K1804, mỗi lọ chứa 1mg tetrodotoxin và 5 mg đệm citrate pH, có hàm lượng 99,0 %.

Analytical data: The Tetrodotoxin Sigma Aldrich batch: 038K1804 was used as Standard. Each vial contains 1 mg tetrodotoxin and 5 mg citrate buffer, assay 99.0 %.

1. Định tính LC/MS
Identifications : Trong phần định lượng, thời gian lưu của pic chính và phổ MS thu được từ dung dịch thử phải giống với thời gian lưu của pic chính và phổ MS thu được từ dung dịch chuẩn.

The retention time of the major peak and MS spectra of the assay preparation corresponds to that of the standard preparation as obtained in the Assay.

2. Định lượng (LCMS/MS)
Assay : 99,9 % $C_{11}H_{17}N_3O_8$ so với hàm lượng ghi trên nhãn
Độ không đảm bảo đo mở rộng $U = \pm 0,09$ %, hệ số phủ $k = 2$ ở độ tin cậy 95 %.

99.9 % $C_{11}H_{17}N_3O_8$ of the stated amount. Expanded uncertainty of the certified value $U = \pm 0.09$ %, using a coverage factor $k = 2$ at level of confidence approximately 95 %.

VKN/BM/20.03
Tetrodotoxin SKS: TTX.DTDL.2015

1/2

Ngày ban hành: 19/9/2014

IV. **Hướng dẫn sử dụng:** Không sấy trước khi dùng
Direction for use: Do not dry before use

V. **Bảo quản:** Nhiệt độ -20°C , tránh ánh sáng.
Storage: Keep container protected from light, preferably at the temperature -20°C .

Hà Nội, ngày 05 tháng 11 năm 2015
VIỆN TRƯỞNG
Director



Đoàn Cao Sơn

PHỤ LỤC 4. BỘT ĐÔNG KHÔ TTX NỒNG ĐỘ 0,1%

Phụ lục 4.1. *Tetrodotoxin* thô



HỢP CHẤT TTX THÔ $\geq 80\%$
Lô sản xuất: NC02
Khối lượng: 17,7 mg
Hàm lượng 81,19% $C_{11}H_{17}N_3O_8$ tính theo nguyên trạng

Phụ lục 4.2. Bột đông khô TTX 0,1%

4.2.1. Ảnh chụp lọ bột đông khô



BỘT ĐÔNG KHÔ TETRODOTOXIN NỒNG ĐỘ 0,1%

Lô sản xuất: TTX.BND.01

Số lượng: 10 lọ

Hàm lượng: 0,103% $C_{11}H_{17}N_3O_8$ theo dạng khan

4.2.2. Phiếu kiểm nghiệm



BỘ Y TẾ
VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TRUNG ƯƠNG

48 Hai Bà Trưng - Hà Nội - Việt Nam
ĐT: 84.4.38252791 - Fax: 84.4.38256911

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

PHIẾU KIỂM NGHIỆM

Số:

Mẫu để kiểm nghiệm: BỘT ĐỒNG KHỔ TETRODOTOXIN 0,1%
Nơi sản xuất: Việt Nam
Số lô, ngày SX: Lô: TTX.BND.01 Ngày SX:
Hạn dùng
Người và nơi gửi mẫu: Dương Minh Tân

Yêu cầu KN (ghi rõ nội dung, số, ngày, tháng, năm của công văn hay giấy tờ kèm theo):

Kiểm tra chất lượng

Ngày, tháng, năm nhận mẫu: 15/10/2014 **Số đăng ký KN:** NC4.5

Người nhận mẫu: Trịnh Thị Quy

Thư theo: Tiêu chuẩn cơ sở

Tình trạng mẫu khi nhận và mở niêm phong để kiểm nghiệm:

Bột xộp đọng trong lọ thủy tinh nút kín. Nhân ghi rõ ràng.

CHỈ TIÊU VÀ TIÊU CHUẨN ÁP DỤNG	KẾT QUẢ	YÊU CẦU
1. Hình thức	Bột xộp, màu trắng.	Bột xộp màu trắng hoặc trắng ngà.
2. Định tính <i>Phương pháp LC/MS/MS</i>	Đúng	Sắc ký đồ của dung dịch thử phải có pic với thời gian lưu và phổ MS/MS giống với thời gian lưu của pic và phổ trong sắc ký đồ của dung dịch chuẩn.
3. Độ mất khối lượng do làm khô <i>ĐVN IV</i>	Đạt (1,12%)	≤ 1,5 %.
4. Định lượng <i>Phương pháp LC/MS/MS</i>	Đạt (0,103%)	Hàm lượng Tetrodotoxin (C ₁₁ H ₁₇ N ₃ O ₈) trong chế phẩm phải từ 0,09 % đến 0,12%.

Hà Nội, ngày 31 tháng 10 năm 2014

VIỆN TRƯỞNG
KIỂM NGHIỆM
THUỐC
TRUNG ƯƠNG

Đoàn Cao Sơn

VKN/BM/25.03

1/1

Các bản trích, sao kết quả này sẽ không có giá trị nếu không có sự đồng ý của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

4.2.3. Tiêu chuẩn chất lượng bột đông khô

BỘ Y TẾ	TIÊU CHUẨN CHẤT LƯỢNG	Số tiêu chuẩn:
VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TRUNG ƯƠNG	BỘT ĐÔNG KHÔ TETRODOTOXIN NỒNG ĐỘ 0,1%	Có hiệu lực từ:

I. Yêu cầu kỹ thuật

1.1. Công thức bào chế

Công thức bào chế cho 1 lọ

TTX thô (hàm lượng TTX $\geq 80\%$).....tương ứng với.... 1 mg TTX

Dung dịch lactose 20% (kl/tt) 5 mL

Đệm citratevừa đủ.....10 mL

1.2. Yêu cầu chất lượng

TT	Chỉ tiêu	Yêu cầu
1	Hình thức	Bột xốp, màu trắng hoặc trắng ngà
2	Định tính	Phải thể hiện các phép thử định tính của tetrodotoxin.
3	Hàm lượng nước	Không quá 1,5 %
4	Định lượng	Hàm lượng tetrodotoxin trong chế phẩm phải đạt từ 0,09 đến 0,11%, tính theo chế phẩm khan.

II. Phương pháp thử

2.1. Hình thức

Thử bằng cảm quan, chế phẩm phải đạt yêu cầu đã nêu.

2.2. Định tính

Phương pháp sắc ký lỏng khối phổ

Theo phần định lượng, sắc ký đồ của dung dịch chế phẩm phải cho pic chính có thời gian lưu và phổ khối 2 lần (MS^2) giống với thời gian lưu và phổ khối 2 lần (MS^2) của pic tetrodotoxin trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn.

2.3. Hàm lượng nước

Thử theo ĐĐVN IV, phụ lục 10.3. Cân khoảng 1 g chế phẩm.

2.4. Định lượng

Phương pháp sắc ký lỏng khối phổ LC/MS/MS

* Dung môi, hóa chất

- Methanol HPLC
- Acid acetic băng PA

- Amoni acetat PA

* *Điều kiện sắc ký*

- Thiết bị: Máy sắc ký lỏng khối phổ Thermo Scientific TSQ quantum Ultra
- Cột: Alltech Apollo C8; 5µm; 250 x 4,6mm hoặc cột tương đương
- Pha động: Dung dịch đệm acetat - methanol (30 : 70)
(Dung dịch đệm acetat: Dung dịch chứa 15 mM amoni acetat và 15mM acid acetic băng).
- Tốc độ dòng: 450 µl/phút
- Thể tích tiêm: 10 µl
- Điều kiện khối phổ
 - + Nguồn: ESI với chế độ ion dương
 - + Khí: Sheath Gas (SG): 20, Khí hỗ trợ Auxiliary Gas (AG): 10
 - + Thế ion hóa: 3200V
 - + Nhiệt hóa hơi: 200°C
 - + Nhiệt độ mao quản: 360°C
 - + Chế độ quét SRM: m/z = 320 → 162 với mức năng lượng va chạm Collision Energy = 32V.

* *Chuẩn bị mẫu:*

- *Dung dịch chuẩn:* Dung dịch tetrodotoxin chuẩn có nồng độ chính xác khoảng 2,5 µg/ml trong pha động
- *Dung dịch thử:* Cân chính xác khoảng 63 mg chế phẩm vào bình 25,0ml, thêm 15 ml pha động, lắc siêu âm 10 – 15 phút. Để nguội, thêm pha động vừa đủ 25,0 ml, lọc qua màng lọc 0,45 µm.
- *Mẫu trắng:* Dung môi pha mẫu.

* *Tiến hành:*

Tiến hành tiêm lần lượt các dung dịch mẫu trắng, dung dịch mẫu chuẩn, dung dịch mẫu thử vào hệ thống sắc ký, ghi lại diện tích pic.

* *Tính kết quả*

Hàm lượng tetrodotoxin (C₁₂H₁₇N₃O₈) trong chế phẩm được tính theo công thức:

$$X_{(\%)} = \frac{S_t}{S_c} \cdot C_c \cdot \frac{25}{m_t} \cdot 100$$

Trong đó:

S_t: Diện tích pic tetrodotoxin thu được trên sắc ký đồ của dung dịch thử

S_c: Diện tích pic tetrodotoxin thu được trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn

C_c: Nồng độ C₁₂H₁₇N₃O₈ trong dung dịch chuẩn (mg/ml).

m_t: Lượng mẫu thử đã cân để pha dung dịch thử (mg).

III. Đóng gói, ghi nhãn, bảo quản

3.1. Đóng gói, ghi nhãn

Đóng gói dạng lọ chứa 1,0 g chế phẩm.

Nhãn ghi rõ ràng, đúng quy chế.

3.2. Bảo quản

Nhiệt độ bảo quản: 2-8°C, tránh ánh sáng trực tiếp.