

**ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI**  
**TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC TỰ NHIÊN**

-----  
**Vũ Anh Tuấn**

**ĐÁNH GIÁ ĐỘC TÍNH CỦA SODIUM BENZOATE,  
PROPYL GALLATE, TARTRAZINE, AMARANTH,  
MONOSODIUM GLUTAMATE VÀ FORMALDEHYDE  
TRÊN MÔ HÌNH PHÁT TRIỂN PHÔI CÁ NGỰA VẼN**

Chuyên ngành: Sinh học Thực nghiệm

Mã số: 60420114

**LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC**

**NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC: PGS. TS. Nguyễn Lai Thành**  
**TS. Hoàng Thị Mỹ Hạnh**

Hà Nội – 2015

## MỞ ĐẦU

Phụ gia thực phẩm là nhóm hợp chất được sử dụng hàng ngày, được thêm vào thực phẩm một cách có chủ đích nhằm cải thiện màu sắc, hương vị, độ ngon; bổ sung dinh dưỡng cũng như bảo quản thực phẩm với thời gian lâu hơn. Tuy nhiên, nhiều nghiên cứu cho thấy rằng một số chất có mặt, góp phần gây ô nhiễm nguồn nước đặc biệt nghiên cứu của McCann năm 2007 và Bonnie năm 2017 cho thấy rằng, sự ảnh hưởng kết hợp của các chất phụ gia có liên quan đến hội chứng tăng động, giảm tập trung ở cả trẻ em và người trưởng thành. Sự cấp thiết của việc đánh giá độc tính các chất phụ gia thực phẩm đòi hỏi sự ra đời của một phương pháp kiểm nghiệm nhanh chóng, chính xác và ít tốn kém.

Trong các mô hình được sử dụng để đánh giá độc tính hóa chất, mô hình sử dụng phôi cá ngựa vằn (*Danio rerio*) nổi lên với nhiều ưu điểm. Việc sử dụng phôi cá ngựa vằn không bị ràng buộc bởi các quy định nghiêm ngặt đối với động vật thí nghiệm, phôi có thể được chủ động sản xuất với số lượng lớn, sự phát triển phôi sớm và hình thành cơ quan ở cá ngựa vằn rất giống với các động vật có xương sống khác nhưng tốc độ phát triển nhanh hơn, phôi cá trong suốt cho phép quan sát được sự ảnh hưởng của hóa chất trong suốt quá trình phát triển phôi sớm. Bộ gen cá ngựa vằn cũng có nhiều điểm tương đồng cao với con người. Vì thế mô hình này ngày càng nhận được sự chú ý của các nhà khoa học trong thử nghiệm độc tính.

Do sự cần thiết của việc đánh giá độc tính các phụ gia thực phẩm cùng những ưu điểm nổi bật của mô hình phôi cá ngựa vằn như đã nêu trên, chúng tôi thực hiện đề tài: “**Đánh giá độc tính của sodium**

*benzoate, propyl gallate, Tartrazine, amaranth, monosodium glutamate và formaldehyde trên mô hình phát triển phôi cá ngựa vằn*” nhằm mục tiêu đánh giá độc tính của các phụ gia thực phẩm đang được sử dụng là Sodium benzoate, Propyl gallate, Tartrazine, Amaranth, Monosodium glutamate cùng với một chất phụ gia đã bị cấm sử dụng là Formaldehyde thông qua hình thái, sức sống và nhịp tim.

## **CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN**

### **1.1. Thực trạng sử dụng hóa chất**

Hóa chất được sản xuất ra trên toàn cầu đang tăng lên nhanh chóng cả về số hợp chất và sản lượng tạo ra mỗi năm. Cùng với những lợi ích đối với nền kinh tế, nhiều hóa chất cũng có thể là mối nguy hại tiềm tàng với sức khỏe con người và môi trường. Việc sử dụng các chất chưa biết độc tính có thể gây ra những hậu quả nghiêm trọng như việc sử dụng thalidomide dẫn đến hàng ngàn trường hợp chết non hoặc khuyết tật bẩm sinh hay việc sử dụng DDT đã đe dọa đến sức khỏe của rất nhiều động vật hoang dã và cả con người... Do đó, việc đánh giá ảnh hưởng của các hóa chất là rất cần thiết, đòi hỏi phải có các phương pháp kiểm định toàn diện ở nhiều mức độ.

### **1.2. Phụ gia thực phẩm**

Phụ gia thực phẩm là nhóm hợp chất được sử dụng hàng ngày, được thêm vào thực phẩm một cách có chủ đích nhằm cải thiện màu sắc, hương vị, độ ngon; bổ sung dinh dưỡng cũng như bảo quản thực phẩm với thời gian lâu hơn. Ước tính trên thị trường có hơn 2.500 chất phụ gia khác nhau đang được sử dụng trong thực phẩm và có thể chia thành sáu nhóm chính là chất bảo quản, chất phụ gia bổ sung dinh dưỡng, chất tạo màu, chất điều vị, các chất hỗ trợ chế biến và nhóm

các chất khác Tuy nhiên, xét cho cùng chúng vẫn có bản chất là các chất hóa học vì vậy việc sử dụng nhóm chất này đang gây nhiều tranh cãi. Nhiều nghiên cứu cho thấy rằng một số chất có mặt, góp phần gây ô nhiễm nguồn nước. Tác động của một số chất đến sức khỏe con người cũng đã được tìm hiểu qua nghiên cứu của McCann năm 2007 và Bonnie năm 2017. Kết quả cho thấy rằng, sự ảnh hưởng kết hợp của các chất phụ gia có liên quan đến hội chứng tăng động, giảm tập trung ở cả trẻ em và người trưởng thành.

Luận văn tiến hành đánh giá độc tính của 6 chất là sodium benzoate, propyl gallate, tartrazine, amaranth, monosodium glutamate và formaldehyde. Sodium benzoate được sử dụng trong thực phẩm với vai trò là chất bảo quản, giúp chống lại sự ảnh hưởng của vi sinh vật tuy nhiên Nhiều nghiên cứu chỉ ra rằng Sodium benzoate có tiềm năng thấp gây ra chứng mê đay, ảnh hưởng đáng kể đến sợi trục tế bào thần kinh và các nút thần kinh từ đó gây độc thần kinh ở ấu thể cá ngựa vằn. Propyl gallate được sử dụng với vai trò là chất chống oxy hóa trong các loại thực phẩm chứa hàm lượng chất béo cao tuy nhiên nhiều nghiên cứu cho thấy gây ảnh hưởng xấu tới hệ thống tạo máu, được đề nghị xếp vào nhóm gây độc cho sinh vật thủy sinh; khả năng gây ung thư, đột biến của nó vẫn đang gây tranh cãi. Tartrazine được dùng để tạo màu vàng cho thực phẩm, đồ uống tuy nhiên, nhiều báo cáo đã được công bố về việc Tartrazine có thể gây ra một số phản ứng tiêu cực khi sử dụng như gây ra bệnh hen suyễn, đau nửa đầu hoặc lupus và nhiều ý kiến trái ngược về tác động gây đột biến của Tartrazine. Amaranth (E123) là chất tạo màu đỏ cho thực phẩm; khi cho chuột mẹ uống Amaranth thì phôi chuột có dấu hiệu chậm phát triển cùng với một số bất thường về tim, phổi và xương; khả năng gây đột biến của

chất này cũng là chủ đề được bàn luận nhiều. Monosodium glutamate (E621) có tác dụng làm tăng cường vị ngọt đặc trưng (vị Umami) cho món ăn; nó lại bị cho là gây ra sự thay đổi đáng kể hành vi của chuột. Formaldehyde (E240) đã từng được sử dụng trong công nghiệp thực phẩm, giúp bảo quản thực phẩm khô, khử trùng hộp đựng, phơi nhiễm với chất này gây ảnh hưởng không nhỏ đến môi trường và sức khỏe con người: có thể gây ung thư biểu mô vòm họng, bệnh bạch cầu tủy.

### **1.3. Các mô hình đánh giá độc tính hóa chất**

Việc xác định độc tính hóa chất cho đến nay vẫn đang gặp phải nhiều thách thức. Thứ nhất, số lượng lớn các hóa chất đã được đăng kí trên thị trường cùng với những hóa chất mới được tổng hợp chưa được đánh giá độc tính một cách kỹ lưỡng, chưa kể đến khả năng tương tác giữa các chất có thể gây ra những ảnh hưởng kết hợp khó đoán trước, do đó đòi hỏi sự ra đời các phương pháp kiểm nghiệm nhanh chóng và ít tốn kém. Thứ hai, cho đến nay vẫn chưa có một mô hình hoàn hảo để dự đoán tác động của hóa chất đối với cơ thể người. Mô hình gần nhất với con người là thử nghiệm trên động vật có vú thì không thể thực hiện trên quy mô lớn do các vấn đề chi phí và các rào cản bảo vệ động vật. Mô hình thực hiện trên tế bào nuôi cấy lại không mang tính đại diện cho toàn bộ cơ thể phức tạp, không đánh giá được ảnh hưởng của các sản phẩm chuyển hóa trong cơ thể [12], thử nghiệm trên động vật không xương sống thì lại có sự khác biệt rất lớn với con người về các mặt di truyền, sinh lý, chuyển hóa.

Trong các mô hình được sử dụng để đánh giá độc tính hóa chất, mô hình sử dụng phôi cá ngựa vằn (*Danio rerio*) nổi lên với nhiều ưu điểm. Phôi cá ngựa vằn 4-5 ngày sau thụ tinh vẫn chưa được coi là động vật do đó không bị ràng buộc bởi các quy định nghiêm ngặt đối

với động vật thí nghiệm, phôi có thể được chủ động sản xuất với số lượng lớn, sự phát triển phôi sớm và hình thành cơ quan ở cá ngựa vằn rất giống với các động vật có xương sống khác nhưng tốc độ phát triển nhanh hơn nhiều: chỉ sau 3 ngày từ phôi đã phát triển thành ấu thể; phôi cá trong suốt cho phép quan sát được sự ảnh hưởng của hóa chất trong suốt quá trình phát triển phôi sớm, bộ gen cá ngựa vằn cũng có nhiều điểm tương đồng với động vật có xương sống cao hơn, đặc biệt có trên 12 nghìn gen tương đồng với con người. Ngoài ra, mô hình phôi cá ngựa vằn không chỉ có thể đưa ra dự đoán nguy cơ đối với sức khỏe con người mà còn cho phép đánh giá các ảnh hưởng đến môi trường nói chung. Vì thế mô hình này ngày càng nhận được sự chú ý của các nhà khoa học trong thử nghiệm độc tính.

Do sự cần thiết của việc đánh giá độc tính các phụ gia thực phẩm cùng những ưu điểm nổi bật của mô hình phôi cá ngựa vằn như đã nêu trên, chúng tôi thực hiện đề tài: “***Đánh giá độc tính của sodium benzoate, propyl gallate, Tartrazine, amaranth, monosodium glutamate và formaldehyde trên mô hình phát triển phôi cá ngựa vằn***” nhằm mục tiêu đánh giá độc tính của các phụ gia thực phẩm đang được sử dụng là Sodium benzoate, Propyl gallate, Tartrazine, Amaranth, Monosodium glutamate cùng với một chất phụ gia đã bị cấm sử dụng là Formaldehyde. Kết quả đề tài này góp phần bổ sung thông tin cho nguồn dữ liệu độc tính của các chất được nghiên cứu.

## **CHƯƠNG 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **2.1. Đối tượng**

Đối tượng nghiên cứu là phôi cá ngựa vằn (*Danio rerio*) do cá ngựa vằn trưởng thành được lựa chọn qua 2 - 3 thế hệ tại phòng Công

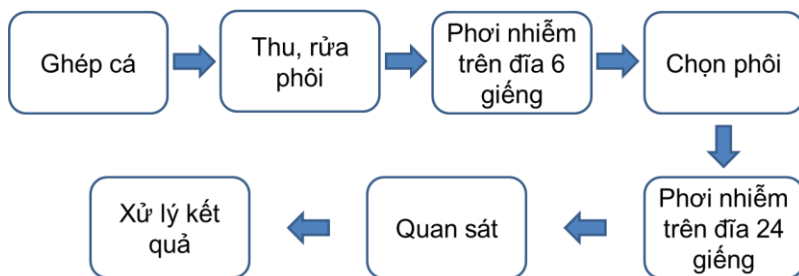
nghe Tế bào động vật – khoa Sinh học – Trường Đại học Khoa học Tự Nhiên đê ra

## 2.2. Dụng cụ, thiết bị, hóa chất

Luận văn sử dụng các dụng cụ, thiết bị và hóa chất từ các hãng sản xuất lớn, đảm bảo chất lượng. 5 loại hóa chất thử nghiệm được sử dụng từ dạng bột là Sodium benzoate, Propyl gallate, Amaranth, Tartrazine, Monosodium glutamate và từ dạng dung dịch là Formaldehyde.

## 2.3. Quy trình thí nghiệm

Thí nghiệm của chúng tôi được xây dựng dựa theo hướng dẫn thử nghiệm độc tính hóa chất trên phôi cá ngựa vằn của Tổ chức hợp tác và phát triển kinh tế (OECD 236 công bố ngày 26/7/2013) và hướng dẫn đánh giá chất lượng nước thải theo ISO 15088:2007. Quy trình gồm các bước như sơ đồ hình 1.



Hình 1: Quy trình thí nghiệm

Sau khi thu và rửa phôi, việc phơi nhiễm với hóa chất được tiến hành sớm nhất có thể trên đĩa 6 giếng, mỗi giếng chứa 1 nồng độ. Việc chọn phôi được tiến hành dưới kính hiển vi để lựa chọn phôi phát

triển bình thường, phân cắt đồng đều. phôi đã chọn được chuyển sang phôi nhiễm trên đĩa 24 giếng có nồng độ tương ứng, mỗi đĩa chứa 1 nồng độ, mỗi giếng cho 1 phôi. Cứ sau 24 giờ, phôi được quan sát và so sánh với hình thái đối chứng theo một số tiêu chí về hình thái và sức sống. Tỷ lệ phôi còn sống cũng như tỷ lệ phôi dị dạng được xử lý hồi quy theo phương trình Sigmoidal:

$$Y = Bottom + \frac{(Top - Bottom)}{1 + 10^{(\log \frac{XC50}{X}) - HillSlope}}$$

để từ đó tính các chỉ số độc học như giá trị LC50 – nồng độ gây chết 50% phôi thí nghiệm và EC50 – nồng độ gây ảnh hưởng đến 50% phôi hoặc ấu thể. Ngoài ra, Chỉ số NOEC (No Observed Effect Concentration) cho biết nồng độ hóa chất thí nghiệm cao nhất không có ảnh hưởng đáng kể đến phôi thí nghiệm và chỉ số LOEC (Lowest observed effect concentration) cho biết nồng độ thấp nhất tác động đáng kể đến phôi thí nghiệm theo các tiêu chí về hình thái được rút ra từ những nồng độ thí nghiệm.

Bên cạnh đó, thí nghiệm đánh giá tác động đến nhịp tim cũng được tiến hành. Sau khi phôi nhiễm trên đĩa 6 giếng, nhịp tim được ghi lại dưới dạng các video sau đó được đếm và so sánh. Phần mềm GraphPad Prism 6.07 được sử dụng cho tất cả các phép so sánh thống kê và hồi quy.

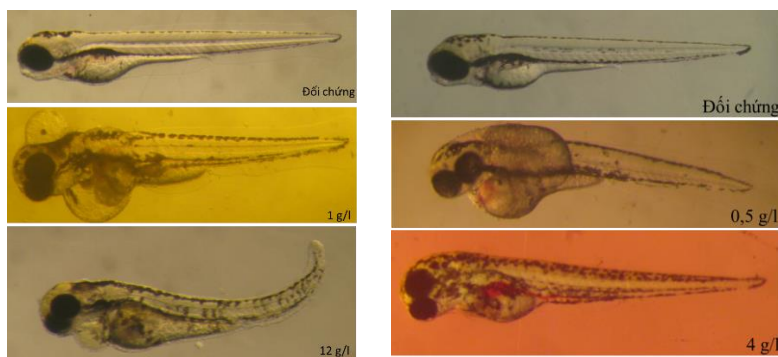
## **CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

### **3.1. Sự ảnh hưởng đến hình thái và sức sống**

#### **3.1.1. Sự ảnh hưởng đến hình thái**

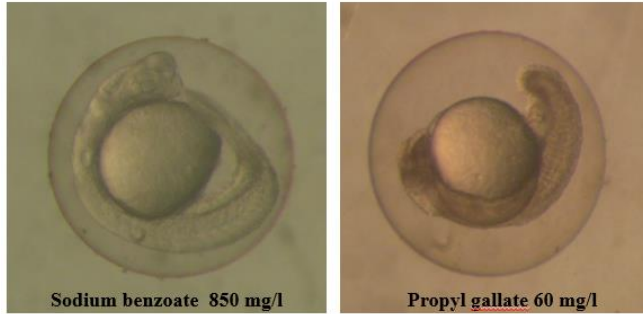


Hai đại diện của nhóm chất tạo màu là Amaranth và Tartrazine đều gây ra các kiểu dị dạng như phù noãn hoàng, phù đầu, cong vẹo trục cơ thể, hoại tử và tụ máu. Hiện tượng thú vị quan sát được là nồng độ thấp gây ra mức độ dị dạng cao hơn nồng độ cao. Tartrazine gây tụ máu nhiều từ thời điểm 48 giờ sau thụ tinh và ở 96 giờ, hiện tượng phù tim và cong đuôi chỉ được quan sát do ảnh hưởng bởi nồng độ cao trong dải. Amaranth ít gây tụ máu hơn (Hình 2).



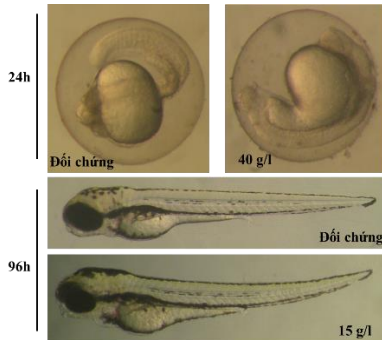
Hình 2. Phôi phơi nhiễm với Tartrazine (trái) và Amaranth (phải)

Ngoài vài kiểu dị dạng thường gặp như phù màng tim, phù màng noãn hoàng, cong đuôi thì hai đại diện của nhóm chất bảo quản là Sodium benzoate và Propyl gallate gây hiện tượng hoại tử là nhiều nhất. Propyl gallate gây hoại tử nhiều ở nồng độ cao trong dải thí nghiệm từ thời điểm 24 giờ sau thụ tinh còn Sodium benzoate nồng độ cao không gây biến đổi nhiều đến hình thái phôi giai đoạn này (Hình 3).



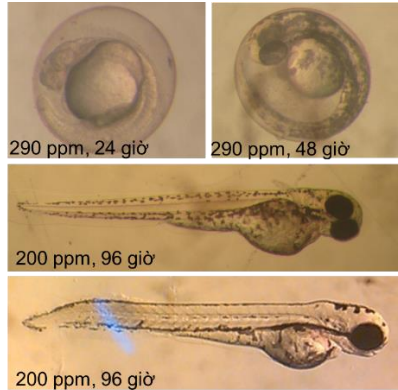
Hình 3. Phôi sau 24 giờ phơi nhiễm với Sodium benzoate và Propyl gallate

Ở thời điểm 24 giờ, Monosodium glutamate là chất duy nhất trong số các chất thử nghiệm có dấu hiệu làm chậm sự phát triển phôi thí nghiệm ở nồng độ cao trong dải. Sau 96 giờ phơi nhiễm, phôi bị cong nhẹ trục cơ thể, hoại tử và phù màng bao tim (Hình 4).



Hình 4. Phôi phơi nhiễm với Monosodium glutamate

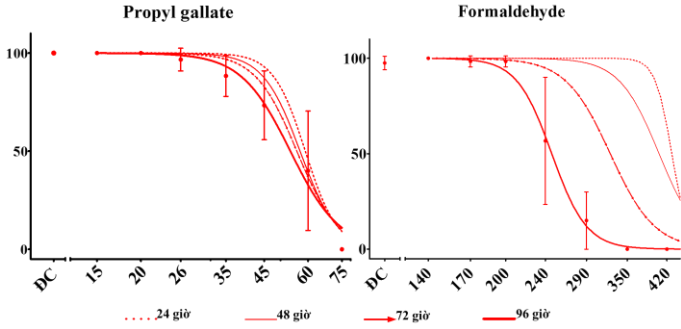
Sau 24 giờ phơi nhiễm, Formaldehyde làm hình thành một lớp màng kín sát lấy phôi, lớp màng này thường vỡ ở 48 giờ do chuyển động của phôi. Sau 96 giờ, phôi thường bị hoại tử và noãn hoàng xù xì (Hình 5).



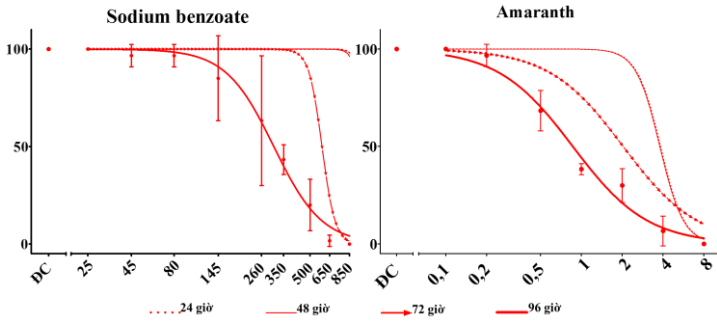
Hình 5. Phôi cá ngựa vằn phơi nhiễm với Formaldehyde

### 3.1.2. Sự ảnh hưởng đến sức sống

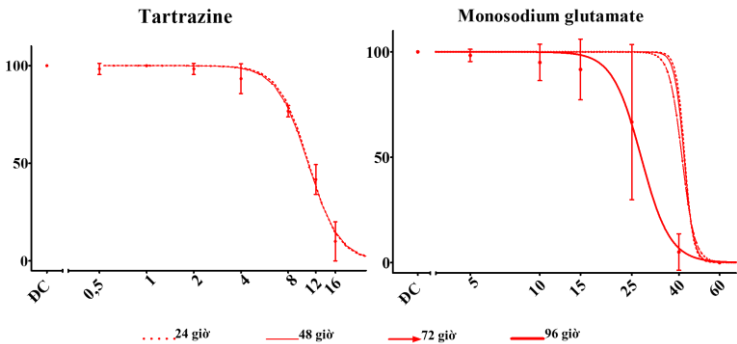
Các chất đều gây ảnh hưởng nhất định đến sức sống của phôi. So với thời điểm 24 giờ sau thụ tinh, khi phơi nhiễm tiếp tục đến thời điểm 96 giờ, các chất đều làm tăng tỷ lệ phôi chết tuy nhiên thời điểm làm tăng nhiều của các chất có sự khác biệt. Propyl gallate và Formaldehyde làm tăng đều tỷ lệ chết qua các thời điểm quan sát (hình 6), Sodium benzoate và Amaranth làm tăng nhiều từ thời điểm 72 giờ sau thụ tinh (Hình 7) còn tartrazine và Monosodium glutamate thời điểm ghi nhận có sự tăng nhiều là 96 giờ (Hình 8).



Hình 6. Tỷ lệ phiêu còn sống khi sau khi phơi nhiễm với Propyl gallate và Formaldehyde



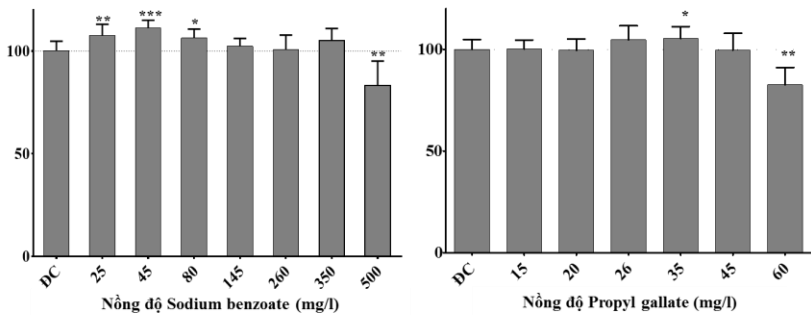
Hình 7. Tỷ lệ phiêu còn sống khi sau khi phơi nhiễm với Sodium benzoate và Amaranth

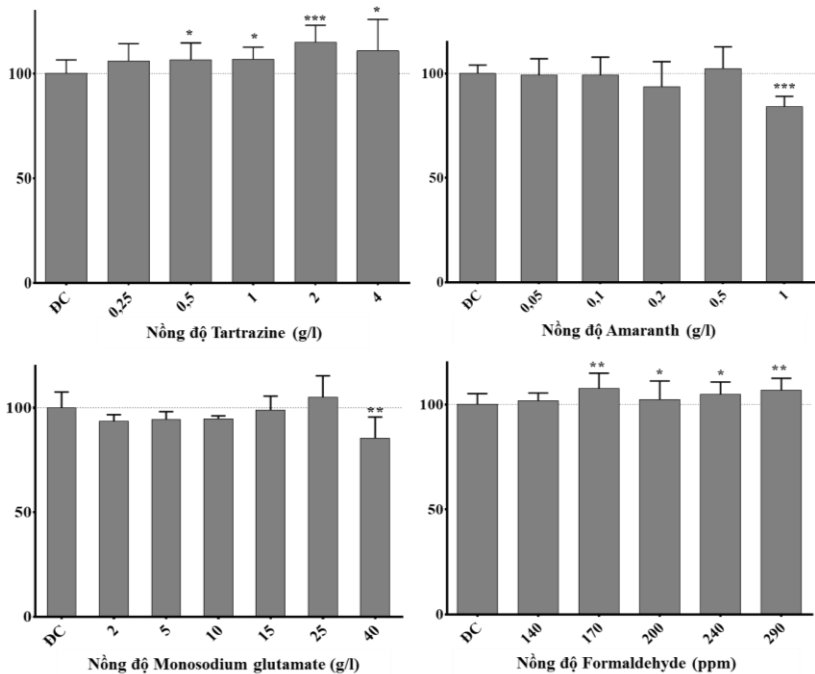


Hình 8. Tỷ lệ phôi còn sống khi sau khi phơi nhiễm với tartrazine và Monosodium glutamate

### 3.2. Sự ảnh hưởng đến nhịp tim

Các chất đều gây ảnh hưởng nhất định đến nhịp tim phôi/ấu thể cá ngựa vằn. Formaldehyde và Tartrazine là hai chất làm tăng nhịp tim ở hầu hết các nồng độ thí nghiệm, Sodium benzoate làm tăng nhịp tim ở nồng độ thấp và làm giảm nhịp tim ở nồng độ cao trong khi các chất còn lại chỉ gây giảm nhịp tim ở nồng độ cao (Hình 9).



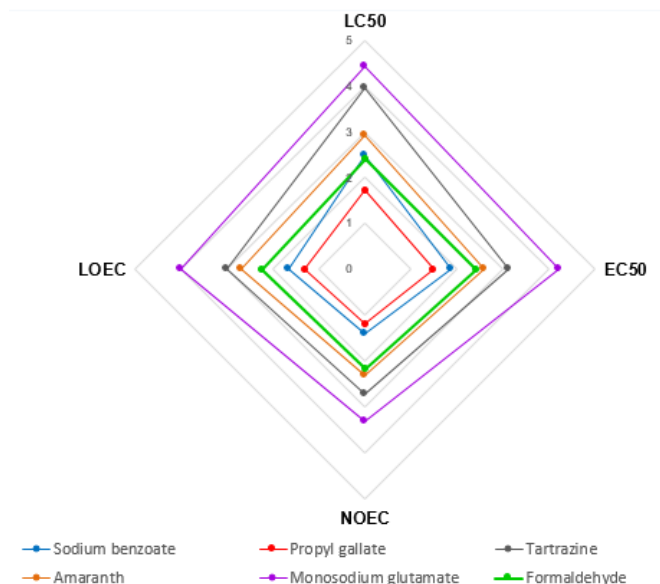


Hình 9. Ảnh hưởng của các chất đến nhịp tim ấu thể

### 3.3. Độc tính của các chất

Các giá trị độc học tính bằng phần mềm là giá trị LC50 – nồng độ gây chết 50% phôi thí nghiệm và EC50 – nồng độ gây ảnh hưởng đến 50% phôi hoặc ấu thể cũng như các chỉ số NOEC (No Observed Effect Concentration) cho biết nồng độ hóa chất thí nghiệm cao nhất không có ảnh hưởng đáng kể đến phôi thí nghiệm và chỉ số LOEC (Lowest observed effect concentration) cho biết nồng độ thấp nhất tác động đáng kể đến phôi thí nghiệm được rút ra từ dải nồng độ thực nghiệm của các chất được thể hiện ở Hình 10. Kết quả cho thấy rằng

Propyl gallate là chất có tất cả các chỉ số thấp nhất chứng tỏ đây là chất có độc tính cao nhất; Monosodium glutamate có các chỉ số cao nhất chứng tỏ đây là chất có độc tính thấp nhất.



Hình 10. Các chỉ số độc học thu được

Từ giá trị NOEC thu được của các chất, chỉ số ADI (Acceptable Daily Intake – lượng phụ gia được phép sử dụng hàng ngày) có thể tính bằng cách chia NOEC thu được từ những thí nghiệm trên động vật cho một số phù hợp để giảm rủi ro có thể xảy ra cho con người. thông thường, số đó là 100 (giả thuyết rằng con người nhạy cảm hơn động vật thí nghiệm 10 lần và sự chênh lệch mức độ nhạy cảm với hóa chất trong quần thể người là 10 lần). Kết quả được thể hiện ở bảng 1.

Hóa chất	E211	E310	E102	E123	E621	E240
NOEC (mg/l)	25	15	500	100	2000	140
ADI (mg/kg/ngày)	0,25	0,15	5	1	20	1,4

## **KẾT LUẬN**

Từ các kết quả thu được, chúng tôi đưa ra một số kết luận như sau:

- Các phụ gia thử nghiệm đều ảnh hưởng đến hình thái phôi. Các dị dạng quan sát được là phù màng bao tim, phù màng noãn hoàng, phù đầu, hoại tử đầu, hoại tử noãn hoàng, tụ máu và cong vẹo trục cơ thể.
- Tartrazine và Formaldehyde làm tăng nhịp tim ở các nồng độ thí nghiệm, Amaranth và Monosodium glutamate làm giảm nhịp tim ở nồng độ cao còn Sodium benzoate Propyl gallate vừa làm tăng, vừa làm giảm nhịp tim.
- Độc tính của các chất theo thứ tự giảm dần lần lượt là Propyl gallate > Formaldehyde > Sodium benzoate > Amaranth > Tartrazine > Monosodium glutamate.
- Giá trị ADI thu được của Sodium benzoate, Propyl gallate, Tartrazine, Amaranth và Monosodium glutamate lần lượt là 0,25; 0,15; 5; 1 và 20 mg/kg/ngày



## **KIẾN NGHỊ**

Từ những kết quả trên, chúng tôi đưa ra một số kiến nghị sau:

- Cần có quy định nghiêm ngặt về liều lượng sử dụng Propyl gallate trong thực phẩm.
- Với những chất có tiềm năng độc tính thì thực hiện ở mức độ chuyên sâu hơn như sự tác động đến hành vi ấu tể hay sự biểu hiện gen, protein. Với những chất có mức độ độc tính không cao thì tiến hành đánh giá tác động phối hợp với các chất khác vì trong thực phẩm thường chứa nhiều loại phụ gia.
- Nghiên cứu chuyên sâu hơn về cơ chế ảnh hưởng của các chất đặc biệt là Tartrazine.

Tiến hành thử nghiệm trên phôi đã được loại bỏ lớp màng phôi để việc đánh giá chính xác hơn