

R

BỘ Y TẾ
TỔNG CÔNG TY DƯỢC VIỆT NAM
TRUNG TÂM NGHIÊN CỨU VÀ PHÁT TRIỂN KH-CN DƯỢC

BÁO CÁO TỔNG KẾT ĐỀ TÀI NGHIÊN CỨU KHOA HỌC

NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT
NẤM MEN GIÀU SELEN
(QUY MÔ PHÒNG THÍ NGHIỆM)

Mã số: KCB 02

Chủ nhiệm đề tài:
TS. NGUYỄN QUANG THƯỜNG

Hà Nội, 2002

e

**BỘ Y TẾ
TỔNG CÔNG TY DƯỢC VIỆT NAM
TRUNG TÂM NGHIÊN CỨU VÀ PHÁT TRIỂN KH-CN DƯỢC**

**NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT
NẤM MEN GIÀU SELEN
(QUY MÔ PHÒNG THÍ NGHIỆM)**

Mã số: KCB 02

Chủ nhiệm đề tài:

TS. NGUYỄN QUANG THƯỜNG

Những người thực hiện chính:

1. PGS.TSKH. LÊ THÀNH PHƯỚC
2. PGS.TS. NGUYỄN THỊ NGỌC DAO
3. TS. PHẠM VĂN NGUYỄN
4. KS. NGUYỄN VĂN THƯỜNG
5. TS. NGUYỄN TRỌNG THÔNG
6. TS. VŨ MẠNH HÙNG
7. BS. NGUYỄN BÍCH LUYỆN
8. DS. NGUYỄN THỊ THƠM

Hà Nội, 2002

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Selen là nguyên tố vi lượng cần thiết cho cơ thể; khoảng bốn chục năm trước, vai trò của selen trong sinh học đã được nhiều nhà khoa học chú ý. Trong lĩnh vực chăn nuôi gia súc, người ta nhận thấy nếu thức ăn thiếu selen thì súc vật mắc các bệnh loạn dưỡng cơ, tăng tiết dịch...

Kết quả nghiên cứu dịch tễ học ở Nhật Bản, New Zeland, Trung Quốc... cho thấy, tại một số địa phương nếu hàm lượng selen trong khẩu phần ăn thấp thì tỷ lệ người dân mắc bệnh ung thư, bệnh tim mạch (bệnh Keshan Trung Quốc)... cao hơn nơi khác. Sự thiếu hụt selen làm giảm hoạt tính của enzym glutathionperoxydaza, làm chậm quá trình sinh tổng hợp coenzym Q và giảm hoạt hoá vitamin E... Đây là những chất chống oxy hoá quan trọng, giúp cơ thể loại bỏ các gốc tự do, các peroxit độc hại; như vậy selen thực sự tham gia vào việc tăng cường hệ thống oxy hoá của cơ thể; sự thiếu hụt selen dẫn tới khả năng bị mắc các bệnh ung thư, tim mạch, viêm thấp khớp, suy giảm miễn dịch, suy thoái võng mạc mắt... Tới nay người ta thấy selen có liên quan tới 40 bệnh ở người.

Từ những thử nghiệm bổ sung selen cho động vật, sau đó được nghiên cứu áp dụng trên người cho thấy triển vọng khắc phục được sự thiếu hụt selen. Người ta tạo ra nhiều chế phẩm chứa selen sử dụng cho dự phòng và điều trị bệnh. Thoạt đầu người ta dùng selen vô cơ, ví dụ: selenit natri... Tuy vậy, có ý kiến cho rằng cần phải thận trọng với độc tính của selen vô cơ, vì nếu dùng quá liều có thể gây tai biến. Về độc tính của selen vô cơ đã được nhiều nhà khoa học phân tích. Theo Viện sỹ Kudrin A.N (1982) khi tiêm Natri selenit cho động vật thì dải liều có tác dụng điều trị là từ 10 đến 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ thể trọng, liều độc cấp là 6,26 mg/kg (= 6260 $\mu\text{g}/\text{kg}$), như thế thuốc có độ an toàn tương đối rộng. Hiện nay trên thị trường thuốc có một số chế phẩm như: chế phẩm Plenyl của Hãng UPSA (Pháp), thành phần có các vitamin, khoáng vi lượng và 25 μg selenit natri; chế phẩm Lycored (Ấn độ) thành phần có vitamin A, vitamin E và 70 μg selen dioxit.

Những nghiên cứu cho thấy selen dạng hữu cơ có sinh khả dụng và độ an toàn cao hơn selen vô cơ. Do đó, trong khoảng thời gian gần đây có nhiều công trình nghiên cứu tìm các nguồn selen ở dạng hữu cơ. Người ta tiến hành tìm selen trong cây cối, song hàm lượng các hợp chất hữu cơ chứa selen trong cây thay đổi theo mùa, theo địa lý thổ nhưỡng cho nên gặp nhiều trở ngại. Việc tổng hợp hoá học các hợp chất hữu cơ chứa selen thành công nhất là chất Ebselelen, hiện đang được nhắc nhiều với khả năng ứng dụng trong tim mạch, viêm khớp.

Hướng nuôi cấy nấm men trong môi trường có selen vô cơ được nhiều nhà khoa học quan tâm, đã thành công sớm và có nhiều chế phẩm nhất.

Ở Nhật Bản, Yamada Koichi (1977) đã nuôi cấy *Saccharomyces Uvarum*, nhiệt độ 30°C trong 3 ngày ở môi trường Malt có nồng độ selen 10 $\mu\text{g}/\text{l}$ ml môi trường, đã thu được những nấm men có hàm lượng selen 2000 $\mu\text{g}/\text{lg}$ sinh khối khô. Wantanabe (1980) đã nuôi cấy *S. Cerevisiae* ở 26°C, điều kiện hiếu khí, trong

môi trường chứa selen, sinh khối thu được có độc tính thấp, sản phẩm được dùng để phòng bệnh thiếu selen cho gà.

Ở Trung Quốc, Huang Xiang Xian và cộng sự (1988) đã nuôi cấy những nấm men *S. Cerevisiae* trong môi trường có từ 3-10 μg selen/1ml, ở 28°C trong 24 giờ, đã thu được những sinh khối nấm men có hàm lượng từ 935 - 1100 μg selen/1g sinh khối khô.

Ở Đức, Pháp, Canada nhiều hãng đã thành công trong việc nuôi cấy nấm men giàu selen để làm thuốc cho người hoặc dùng trong chăn nuôi.

Người ta đã nghiên cứu và xác định nấm men giàu selen có thành phần chủ yếu là selenomethionin. Nguyên liệu nấm men giàu selen có mặt trong khá nhiều chế phẩm thuốc được dùng để dự phòng và điều trị các bệnh ung thư, tim mạch, phòng chống lão hoá.... Những chế phẩm thuốc đó là:

Tại Đức có Protecton với thành phần:	vitamin C	500mg,
	vitamin E	400IU,
	β -Caroten	15mg,
	selen trong nấm men	50 μg .

Ở Pháp, Celnium là dạng men bia nuôi trong môi trường đặc biệt chứa selen. Thuốc dùng để thay đổi cơ địa cho bệnh nhân.

Hiện nay các chế phẩm nang mềm của Hàn Quốc nhập vào Việt Nam có thành phần giống Protecton, với nhiều biệt dược như: Saylom, Belaf, Cigelton, Youngton, Selelans, Keromax.

Ở Việt Nam, Đặng Hồng Thuý - Đỗ Thu Huyền - Từ Minh Koóng (1992) đã nuôi cấy nấm men trong bình nón 500ml chứa 50ml môi trường đặt trên máy lắc quay tròn với tốc độ 220 vòng/phút, ở nhiệt độ 30°C trong 48 giờ. Thành phần môi trường là cao ngô, đường kính, KH_2PO_4 , MgSO_4 và $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Nồng độ selen trong môi trường là 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Đã thu được những nấm men chứa 126 - 171 μg selen trong 1 gam sinh khối khô.

Năm 1996, nhóm nghiên cứu ở bộ môn Vô cơ - Hoá lý trường Đại học Dược Hà nội đã nuôi cấy nấm men *Saccharomyces cerevisiae* trong môi trường selenit natri đã thu được những nấm men có hàm lượng selen từ 150 đến 500 μg selen trong 1 gam sinh khối khô, có hoạt tính chống oxy hoá khá tốt. Hiệu suất tạo sinh khối nấm men và hàm lượng selen trong nấm men phụ thuộc nhiều vào thành phần, pH môi trường, thời gian và nhiệt độ nuôi cấy.... Vì vậy cần phải có những nghiên cứu tiếp nối nhằm giải quyết những vấn đề này.

Năm 1997, Bộ Y tế cho phép nhóm nghiên cứu chúng tôi thực hiện đề tài cấp Bộ "*Nghiên cứu sản xuất thử một số chế phẩm chứa selen, antioxydant dùng trong lão khoa*". Ngày 28/4/1999 đề tài được báo cáo nghiệm thu ở cấp cơ sở. Song do thời gian đó đề tài không được xét duyệt đề cương, nên nội dung nghiên cứu quá rộng; đồng thời có một số vấn đề cần phải làm rõ hơn như: phương pháp xác định chính xác hàm lượng selen trong nấm men, liệu có lẫn selen vô cơ trong chế phẩm không... Vì thế Hội đồng không bỏ phiếu nghiệm thu. Hội đồng

kiến nghị Bộ Y tế cho phép được rút gọn nội dung nghiên cứu, tập trung vào nghiên cứu sản xuất nấm men giàu selen và đề nghị Bộ Y tế cấp thêm kinh phí, cho phép đề tài kéo dài thêm một năm để hoàn thiện các vấn đề mà Hội đồng đã yêu cầu. Do chủ nhiệm đề tài chuyển công tác sang Tổng Công ty Dược Việt Nam có làm đơn đề nghị và được sự đồng ý của Trường Đại học Dược Hà Nội, ngày 5/9/2001 Bộ Y tế đã có Công văn số 7119/YT-K2ĐT cho phép chuyển cơ quan chủ trì đề tài từ Trường Đại học Dược Hà Nội sang Trung tâm Nghiên cứu và phát triển Khoa học - Công nghệ Dược, thuộc Tổng Công ty Dược Việt Nam (Phụ lục 1).

Theo Quyết định số 4333/2001/QĐ-BYT ngày 19/10/2001 của Bộ Y tế, đề tài đã được cấp thêm kinh phí và có tên chính thức là: "*Nghiên cứu sản xuất nấm men giàu selen*" (Phụ lục 2).

II. MỤC TIÊU ĐỀ TÀI

Đề tài "*Nghiên cứu sản xuất nấm men giàu selen* (quy mô phòng thí nghiệm)" tập trung thực hiện 3 mục tiêu cụ thể sau:

- 1- Nghiên cứu ổn định phương pháp sản xuất nấm men giàu selen.
- 2- Xây dựng tiêu chuẩn kỹ thuật của nấm men giàu selen.
- 3- Đánh giá độc tính cấp và bán cấp của nấm men giàu selen.

III. PHƯƠNG PHÁP VÀ ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

III.1- PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU VÀ NƠI THỰC HIỆN:

Trong quá trình thực hiện đề tài, chúng tôi đã sử dụng các phương pháp nghiên cứu sau:

III.1.1- Phương pháp chế tạo nấm men giàu selen

Dựa vào khả năng của các tế bào nấm men có thể chuyển selen vô cơ có trong môi trường nuôi cấy thành dạng hợp chất selen hữu cơ trong tế bào nấm men, chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* được nuôi cấy ở môi trường A.I. Giukova [1], có bổ sung thêm natri selenit (P.A). Quá trình nuôi cấy và thu hoạch nấm men được thực hiện tại Phòng thí nghiệm Lên men, Viện Công nghệ Sinh học.

III.1.2- Các phản ứng định tính selen trong nấm men

Các phản ứng định tính selen trong nấm men được xây dựng dựa vào phản ứng của I^- khử Se (IV) hoặc Se(VI) về dạng selen nguyên tố có màu đỏ, khi có mặt urê [2]

III.1.3- Phương pháp định lượng selen trong nấm men:

- Theo Phụ lục số 3 trang 3001 của Dược điển Mỹ (USP) 23[3]

- Nguyên tắc của phương pháp:

Selen trong mẫu được đốt trong bình kín cỡ hẹp chứa oxy, hấp thụ bằng HNO_3 30% để chuyển về Se(IV), cho phản ứng tiếp với thuốc thử đặc hiệu là 2-3 diaminonaphtalen tạo ra sản phẩm piroselenol; chất này được chiết bằng cyclohexan và đo cường độ hấp thụ ở 380nm. Lượng selen trong mẫu tính được, khi tiến hành đồng thời so sánh với mẫu chuẩn và đối chứng với mẫu trắng.

Quá trình nghiên cứu ứng dụng phương pháp định lượng selen được thực hiện tại Bộ môn Vô cơ-Hoá lý và Phòng TN Trung tâm, Trường ĐH Dược Hà Nội.

III.1.4- Phương pháp đo hoạt tính chống oxy hoá invitro:

Xác định hoạt tính chống oxy hoá invitro theo phương pháp của C.G. Blagodarov (1987) [4]. Thí nghiệm được thực hiện tại Bộ môn Vô cơ-Hoá lý.

III.1.5- Xác định độc tính cấp và bán cấp: Tiến hành theo phương pháp của W.B. Abraham (1987) và Turner A (1965) [6, 7]. Thí nghiệm được thực hiện tại Bộ môn Dược lý của Học Viện Quân Y và Bộ môn Dược lý, Trường Đại học Y Hà Nội.

III.2- NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG TIỆN NGHIÊN CỨU:

III.2.1. Dụng cụ:

- Máy quang phổ UV-vis 725 Trung Quốc và Carry IE - Varian USA của Trường Đại học Dược Hà Nội
- Máy ly tâm Hermle Z320 (Đức)
- Thiết bị lên men BioFlo-5000 USA của Viện Công nghệ Sinh học
- Lò nung Electrotherm
- Tủ sấy của Hãng Shellab.
- Cân phân tích độ chính xác 1/10mg.
- pH mét của Hãng Metron-774

III.2.2. Hoá chất:

- Natri Selenit PA của Đức
- Acid Thiobarbituric, Hãng Sigma
- 2-3 Diaminonaphtalen PA của Pháp
- HNO_3 , NH_4OH , KI, Hydroxylamin, urê ... đạt P hoặc PA.
- Selen kim loại PA, 99,70%

III.2.3. Vật liệu:

- Nấm men *Saccharomyces cerevisiae* nhập từ Thụy Điển do xưởng bia KALTENECKER của Công ty Dụng cụ cơ khí xuất khẩu cung cấp.

- Chuột nhất trắng loài Swiss nặng 20 ± 2 gam do Viện Vệ sinh dịch tễ Hà Nội cung cấp.

IV. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

IV.1- NGHIÊN CỨU CHẾ TẠO NẤM MEN GIÀU SELEN:

IV.1.1- Lựa chọn điều kiện nuôi cấy nấm men:

Quá trình chế tạo nấm men giàu selen được xây dựng trên nguyên tắc: nấm men được nuôi cấy trong môi trường có selen vô cơ như một nguyên tố vi lượng, tế bào nấm men sẽ đồng hoá, chuyển selen vi lượng vào thành phần amino acid, protit. Sau thời gian nuôi cấy nhất định, tiến hành thu hoạch sinh khối nấm men.

Trong các nghiên cứu trước đây, để có thể lựa chọn được một quy trình nuôi cấy nấm men thích hợp, chúng tôi đã tiến hành một số thí nghiệm sau:

- Về chủng nấm men: Chúng tôi xuất phát từ 2 chủng là *Saccharomyces carlbergensis* M.11 do Phòng Kỹ thuật nhà máy bia Piatchigo cung cấp; chủng *Saccharomyces cerevisiae* do Xưởng bia Văn phòng TW Đảng, Nhà máy bia Hà Nội và gần đây do Xưởng bia Kaltenecker cung cấp. Cả hai chủng đều được nuôi cấy ở một số môi trường và trong các điều kiện khác nhau, mỗi chủng đều có những ưu việt riêng, việc chọn chủng *S.cerevisiae* chủ yếu là do nguồn cung cấp ổn định.
- Về môi trường nuôi cấy: Căn cứ vào các tài liệu tham khảo, chúng tôi đã sử dụng một số môi trường nuôi cấy sau:

- Môi trường ①: thành phần có saccharoza 5%, $\text{NH}_4\text{Cl} + \text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0,1M, pH = 7,0.

- Môi trường ②: theo công thức của Giukova gồm hỗn hợp các đường fructoza, mantoza, glucoza...khoảng 10%, protein, acid amin, pH = 6,5-7,0.

Chúng tôi đã nuôi cấy hai chủng nấm men ở 02 môi trường trên, trong đó chủng *S.cerevisiae* thích hợp với môi trường Giukova hơn. Thành phần cụ thể của môi trường đã được chúng tôi cải tiến nhằm phù hợp với điều kiện Việt Nam (như chọn loại đường và loại acid amin).

- Việc bổ sung selen vào môi trường nuôi cấy: Chúng tôi đã tiến hành khảo sát ảnh hưởng của selen cho vào môi trường nuôi cấy đối với hiệu suất tạo sinh khối nấm men và hàm lượng selen trong nấm men. Kết quả nghiên cứu cho thấy: với nồng độ selen trong môi trường nuôi cấy dưới $100\mu\text{g}/\text{ml}$ thì nấm men phát triển bình thường; khi nồng độ trên $100\mu\text{g}/\text{ml}$ thì hiệu suất tạo sinh khối thấp, sự tăng sinh rất chậm. Việc chọn nồng độ selen bổ sung vào môi trường khoảng $10\mu\text{g}/\text{ml}$ là phù hợp với chủng nấm men *S. cerevisiae*.
- Về các thông số kỹ thuật khác: Ngoài một số điều kiện cơ bản trên, chúng tôi cũng đã khảo sát để lựa chọn các thông số như tốc độ thổi khí oxy, nhiệt độ và thời gian nuôi cấy. Kết quả cho thấy ở nhiệt độ khoảng $25-30^{\circ}\text{C}$, tốc độ thổi khí cao là rất thuận lợi cho sự phát triển nấm men. Kết quả lựa chọn được trình bày tại bảng 1.
- Việc nuôi cấy nấm men đòi hỏi khá nghiêm ngặt về điều kiện vệ sinh môi trường để tránh nhiễm khuẩn. Khí thổi vào bình nuôi cấy phải là khí sạch.

IV.1.2- Tiến hành nuôi cấy:

1- Chuẩn bị nguyên vật liệu:

* Môi trường nuôi cấy nấm men có thành phần theo công thức của

A.I. Giukova, bao gồm:	Saccaroza	6%
	Acid amin	0,3%
	Mantosa	3,5%
	Nước cất vừa đủ	

Sau khi pha chế đem tiệt trùng 120°C trong 20'

* Lượng selen đưa vào môi trường được pha từ Natri Selenit PA của Đức với nồng độ khoảng $10\mu\text{g}/\text{ml}$.

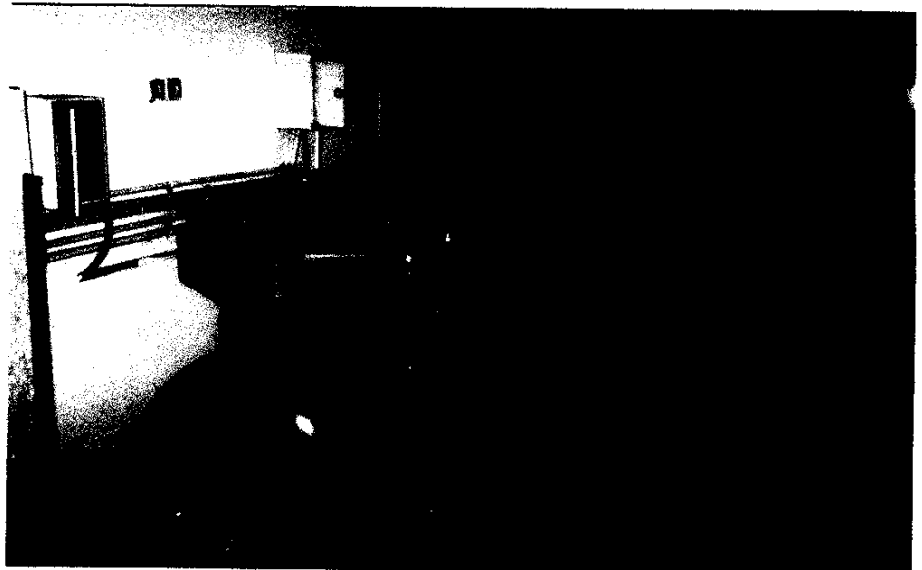
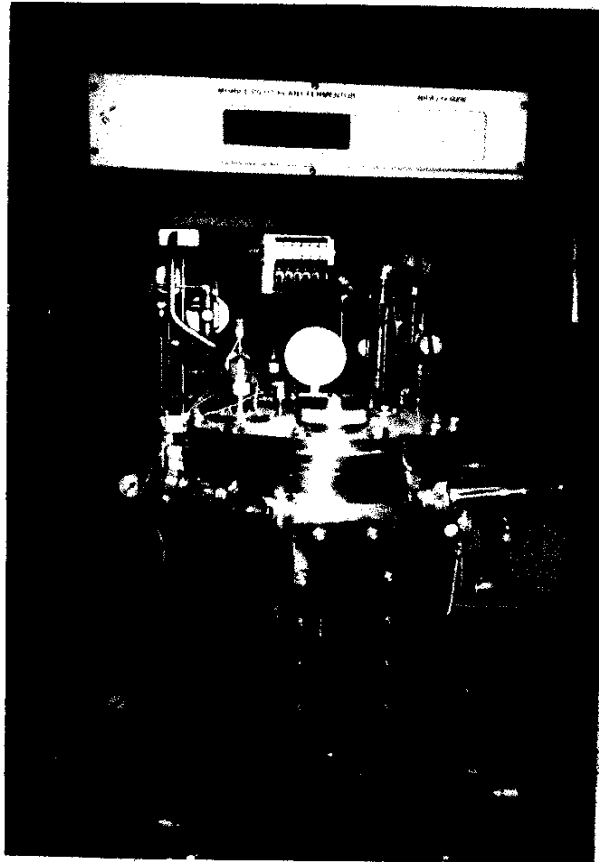
* Nấm men *Saccharomyces cerevisiae* được nhân lên và hoạt hoá ở nhiệt độ $5^{\circ}\text{C} - 10^{\circ}\text{C}$ trong khoảng 10 giờ.

2- Chuẩn bị thiết bị lên men:

Thiết bị lên men tự động là máy BioFlo-5000, có dung tích 80 lít của Phòng thí nghiệm Lên men, Viện Công nghệ Sinh học thuộc Trung tâm Khoa học tự nhiên và Công nghệ Quốc gia (Hình 1).

Trước khi tiến hành nuôi cấy, phòng lên men được vệ sinh sạch sẽ, máy vận hành tự động theo chương trình để thực hiện chế độ tiệt trùng ở 120°C trong 20 phút. Sau khi thiết bị nguội trở lại mới nạp môi trường nuôi cấy và men giống.

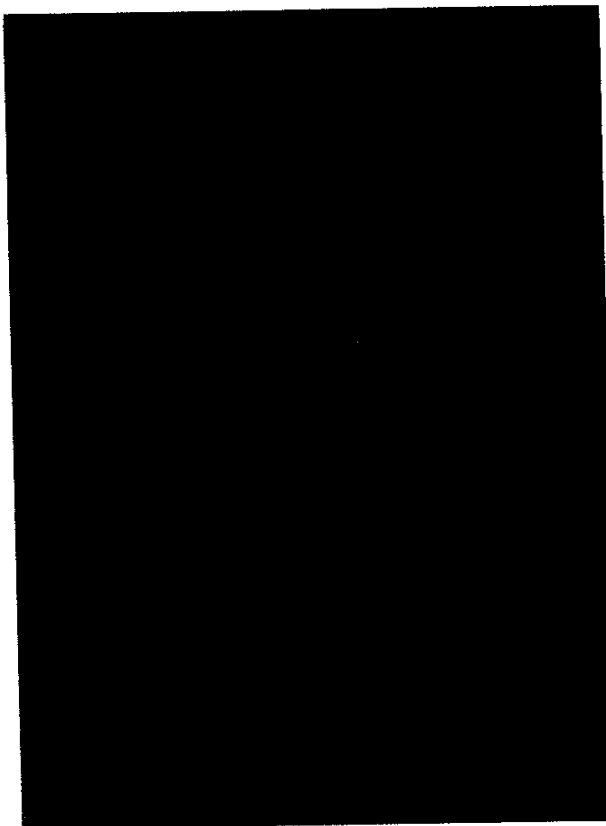
Đặt các chế độ: pH, tốc độ thổi oxy, nhiệt độ và thời gian nuôi cấy như trình bày ở bảng 1.



Hình 1. Thiết bị lên men Bio Flo 5000 USA, dung tích 80 lít

3- Tiến hành nuôi cấy và thu hoạch nấm men:

Các mẻ lên men được cán bộ chuyên trách - Kỹ sư Nguyễn Văn Thường - Phòng TN Lên men Viện Công nghệ sinh học, trực tiếp thực hiện (Hình 2)



Hình 2. Thực hiện nuôi cấy nấm men.

Các thông số cho các mẻ nuôi cấy được nêu ở bảng 1 sau:

Bảng 1. Các thông số về chế độ nuôi cấy nấm men

TT	Ngày tháng	Thể tích môi trường (lít)	Chế độ nuôi cấy
1	16-10-1999	15	pH : 6,5 - 7 Nhiệt độ (°C) : 30 Tốc độ thổi khí : 200 ml/phút Thời gian nuôi cấy : 24 ^h Lượng giống cấy : khoảng 10%
2	19-05-2000	16	
3	22-05-2000	15	
4	07-02-2001	14	
5	18-02-2001	28	

Việc thu hoạch nấm men được tiến hành ở Phòng thí nghiệm Enzym của Viện Công nghệ Sinh học như sau: tất cả nấm men và môi trường sau khi kết thúc nuôi cấy được chuyển vào phòng lạnh $0^{\circ} - 5^{\circ}\text{C}$, để lắng tách và tiến hành ly tâm, rửa bằng HCl 0,01N và sau đó bằng NaOH 0,01N, tiến hành 3 lần như vậy rồi rửa bằng nước.

Quá trình làm khô sinh khối nấm men được tiến hành qua nhiều giai đoạn, trước hết là loại bớt nước trong phòng lạnh, sau đó dần mỏng và thổi không khí sạch nhằm làm tăng nhanh sự bay hơi nước. Khi sinh khối đạt tới một độ ẩm nhất định, chúng tôi mới nâng dần nhiệt độ qua nhiều mức từ 50°C đến 90°C . Cuối cùng sấy khô ở 105°C trong 30 phút. Đóng gói trong túi PE hai lần, bảo quản ở nơi khô mát.

IV.1.3- Kết quả:

Quy trình nuôi cấy nấm men do chúng tôi xây dựng đã được Viện Công nghệ Sinh học tiến hành thẩm định. Viện đã xác nhận các điều kiện, chế độ nuôi cấy mà chúng tôi lựa chọn là phù hợp với quá trình nuôi cấy nấm men *Saccharomyces cerevisiae* (Phụ lục 3).

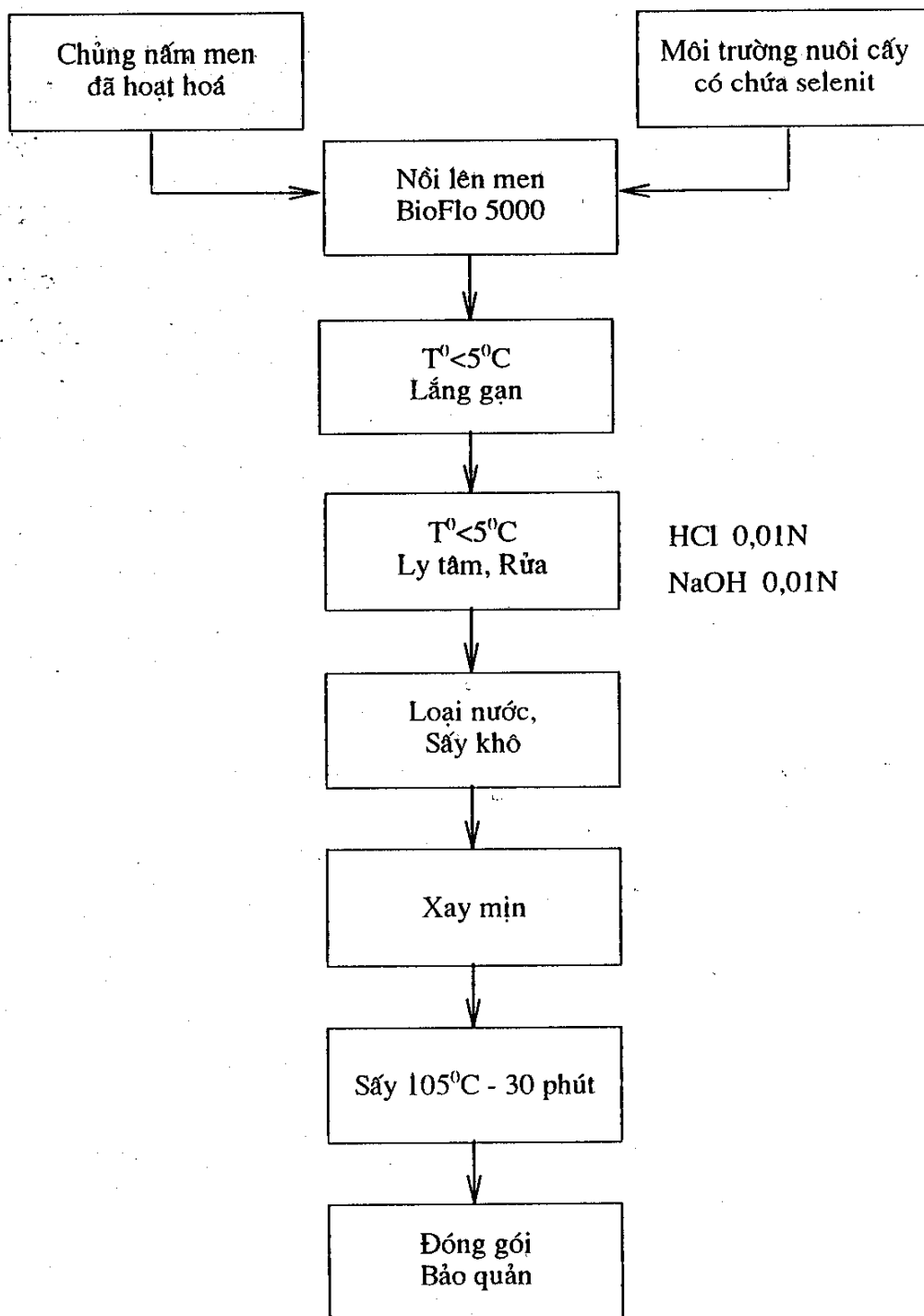
Sau khi thẩm định, chúng tôi đã mời một số cán bộ của Viện Công nghệ Sinh học tham gia thực hiện đề tài.

Việc nuôi cấy nấm men được tiến hành với thể tích môi trường nuôi cấy từ 15 lít đến 28 lít, sản phẩm thu được là những lượng sinh khối nấm men khá ổn định. Chế phẩm ở dạng bột khô, tơi, màu vàng hoặc trắng xám đồng nhất. Hàm lượng selen khoảng từ 400 phần triệu tới 600 phần triệu (Phụ lục 4).

Qua 5 mẻ (bảng 1) và một số mẻ thực hiện vào Quý I năm 2002 cho thấy quy trình tương đối ổn định, hiệu suất tạo sinh khối nấm men khoảng 0,3-0,5kg/mẻ.

Toàn bộ quy trình chế tạo nấm men được trình bày theo sơ đồ sau:

Sơ đồ các giai đoạn chế tạo nấm men giàu selen



IV.2- NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG TIÊU CHUẨN CHẤT LƯỢNG CỦA NẤM MEN GIÀU SELEN:

Trước năm 1998, chúng tôi đã không tìm được tài liệu hướng dẫn kỹ thuật xác định hàm lượng selen trong chế phẩm thuốc. Mãi tới năm 1998-1999, Cục Quản lý Dược và Hội đồng Dược điển Việt Nam mới có được phần phụ lục bổ sung về cách định lượng selenium (trang 3001, phụ lục số 3 - Dược điển Mỹ 23) mà nhiều hãng áp dụng để định lượng các thuốc chứa selen.

Hiện tại chúng tôi cũng không có được những chuyên luận riêng về tiêu chuẩn chất lượng của nấm men giàu selen của các nước trên Thế giới. Vì vậy, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu một số chỉ tiêu sau đây, với mục tiêu xây dựng tiêu chuẩn cơ sở cho chế phẩm nấm men giàu selen do chúng tôi sản xuất. Các thí nghiệm được thực hiện tại Bộ môn Vô cơ-Hoá lý, Trường ĐH Dược HN và Phòng Hoá lý II, Viện Kiểm nghiệm.

IV.2.1- Định tính selen trong nấm men:

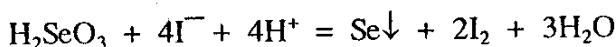
Để phát hiện selen trong các mẫu sinh học, người ta thường sử dụng một số phương pháp định tính sau:

- Phương pháp khử selen(IV), selen(VI) về selen nguyên tố. Tác nhân khử là Iodid, acid thiocyanic...
- Phương pháp tạo phức: với một số thuốc thử (ví dụ: O-diamin thơm...)
- Phương pháp động học xúc tác.

Trong các thí nghiệm định tính selen dưới đây, chúng tôi sử dụng phương pháp khử selen (IV) về selen nguyên tố, tác nhân khử là Kali Iodid.

1- Nguyên tắc của phản ứng:

Selen trong mẫu được acid HNO_3 chuyển thành acid selenơ. Chất này được I^- khử thành selen nguyên tố kết tủa có màu đỏ. Phản ứng xảy ra như sau:



2- Tiến hành:

Cân một lượng nấm men chứa khoảng 0,1mg selen, cho vào bình nón 100ml, thêm 10ml HNO_3 30% (TT). Đun nóng 60°C trong 10 phút, thêm 10mg urê đun sôi để nguội, thêm 20ml dung dịch KI 10% (TT). Dung dịch phản ứng sẽ có màu từ vàng - vàng cam - đỏ tới tùy thuộc vào nồng độ selen.

3- Kết quả định tính selen trong nấm men:

- Với cùng điều kiện (nhiệt độ, HNO_3 30%, thời gian đun nóng) khối lượng nấm men thay đổi thì hỗn hợp phản ứng có màu từ vàng cam tới nâu đen như sau:

Bảng 2. Màu của hỗn hợp phản ứng theo khối lượng nấm men

Thí nghiệm	Khối lượng (g)	T ^o chiết (°C)	Thời gian (phút)	Màu của hỗn hợp phản ứng
1.	0,2	60	20	Vàng cam
2	0,3	60	20	Nâu đỏ
3	0,5	60	20	Xám đen

- Tiến hành với cùng khối lượng nấm men là 0,3g, dùng HNO₃ 30%, chiết cùng ở 60°C, nhưng thay đổi thời gian chiết từ 10 phút đến 30 phút, các dung dịch phản ứng có màu cũng thay đổi từ vàng cam đến đỏ tối như sau:

Bảng 3. Sự thay đổi màu phản ứng theo thời gian chiết

Thí nghiệm	Thời gian chiết (phút)	Màu của hỗn hợp phản ứng
1	10	Vàng cam
2	20	Nâu đậm
3	30	Đỏ tối

Như vậy, để có được sự chuyển màu đặc trưng của selen từ nâu đậm → đỏ tối → đen xám trong phản ứng định tính, chúng tôi chọn mẫu nấm men có khối lượng 0,3g, dung môi chiết là HNO₃ 30%, nhiệt độ 60°C và thời gian chiết khoảng 20 phút.

IV.2.2- Định tính selen từ môi trường nuôi cấy bám vào nấm men:

Muối Na₂SeO₃ dễ tan trong nước, do đó cần xác định xem muối này từ môi trường nuôi cấy có còn bám dính vào bề mặt tế bào nấm men hay không, chúng tôi đã tiến hành các thí nghiệm sau:

Thí nghiệm 1: cân 2g nấm men, đưa vào bình nón 100ml, thêm 20ml nước cất, lắc kỹ 15 phút, để yên 30 phút. Lọc lấy dịch trong, tiến hành làm phản ứng định tính selen như đã nêu.

Thí nghiệm 2: cân 2g nấm men, đưa vào bình nón 100ml cùng với 20ml nước cất, đun ở 60°C trong 15 phút, lắc kỹ, để yên 30 phút. Lọc lấy dịch trong, tiến hành làm phản ứng định tính selen.

Kết quả được trình bày ở bảng 4:

Bảng 4. Màu của phản ứng định tính theo cách chiết

TT	Cách chiết	Màu của hỗn hợp phản ứng
1	Không đun	Vàng nhạt, trong suốt
2	Đun ở 60°C	Vàng nhạt, trong suốt

Nhận xét: Như vậy, tuy đã đun nóng tới 60°C trong 15 phút nhằm làm tăng khả năng hoà tan của Na₂SeO₃, chúng tôi cũng không phát hiện được sự bám dính của Natri selenit ở bên ngoài tế bào nấm men.

IV.2.3- Xác định giới hạn muối selen hoà tan ở ngoài tế bào nấm men:

Mặc dù với phản ứng định tính đã không tìm thấy muối selen hoà tan bám dính ở ngoài tế bào nấm men, nhưng vì nấm men được nuôi cấy trong môi trường có selen vô cơ, do đó cần phải xác định giới hạn của sự bám dính này để đưa vào tiêu chuẩn chất lượng của chế phẩm nấm men giàu selen. Chúng tôi đã tiến hành thí nghiệm sau:

1- Tiến hành:

Cân chính xác 2,5g nấm men, thêm 20ml nước cất, lắc đều. Để yên 30 phút. Thỉnh thoảng lắc nhẹ. Ly tâm, lọc lớp nước phía trên. Pha loãng dung dịch tới 25ml (dung dịch A).

- *Dung dịch thử:* 10ml dung dịch A, thêm 0,05g urê và 10ml dung dịch Kali iodid 10% (TT). Lắc đều, thêm nước vừa đủ 25ml.

- *Dung dịch chuẩn:* Lấy 10ml dung dịch gốc có lượng selen 2µg/ml. Tiến hành như dung dịch thử.

Đo mật độ quang của dung dịch chuẩn và dung dịch thử ở bước sóng 550nm.

2- Kết quả: Giá trị mật độ quang của mẫu thử và mẫu chuẩn được trình bày tại bảng 5:

Bảng 5. Giá trị mật độ quang của mẫu thử và mẫu chuẩn

Mẫu số	D _{mẫu thử}	D _{mẫu chuẩn}
1	0,085	0,150
2	0,050	0,155
3	0,060	0,145
4	0,030	0,160
5	0,085	0,125
TB	0,062 ± 0,024	0,147 ± 0,014

Như vậy, lượng selen hoà tan bám dính ở ngoài tế bào nấm men thấp hơn nhiều so với mẫu chứng có lượng selen là $2\mu\text{g/ml}$, vì thế chúng tôi chọn giới hạn lượng selen hoà tan bám dính ở ngoài tế bào nấm men nhỏ hơn 20 phần triệu.

IV.2.4- Định lượng selen trong nấm men:

Đối với tất cả các thuốc có chứa selen ở dạng nấm men như: **Belaf, Saylom, Youngton, Cigelton...** hàm lượng selen có trong chế phẩm đều được các Hãng xác định theo USP 23 (Mỹ). Vì vậy chúng tôi đã lựa chọn phương pháp này để định lượng selen có trong nấm men giàu selen do chúng tôi sản xuất.

1- Nguyên tắc của phương pháp:

Các mẫu thuốc chứa selen được vô cơ hoá bằng phương pháp đốt trong bình chứa oxy. Các chất sau khi đốt cháy hoàn toàn được hấp thụ bằng dung dịch HNO_3 30%. Dùng NH_4OH điều chỉnh về $\text{pH} = 2,0 \pm 0,2$. Cho hỗn hợp này phản ứng với thuốc thử rất nhạy và đặc hiệu là 2-3 Diaminonaphtalen, có thêm Hydroxylamin, trong điều kiện tránh ánh sáng. Sau khoảng 100 phút, phản ứng của selen (IV) với thuốc thử tạo ra Piazoselenol. Chất này được chiết bằng Cyclohexan, có độ hấp thụ ở 380nm. Dùng phép đo quang, so sánh với dung dịch chứa selen chuẩn, suy ra hàm lượng selen trong mẫu đo.

2- Tiến hành:

Cách pha các dung dịch selen gốc, dung dịch chuẩn, dung dịch thử, dung dịch thuốc thử 2-3diaminonaphtalen và cách vô cơ hoá mẫu, mẫu trắng được thực hiện theo Phụ lục 3, trang 3001, USP23.

Mẫu thử được vô cơ hoá trong bình cổ hẹp chứa 1 lít oxy. Khối lượng mẫu đốt thường từ 100 - 200mg (tùy từng thí nghiệm).

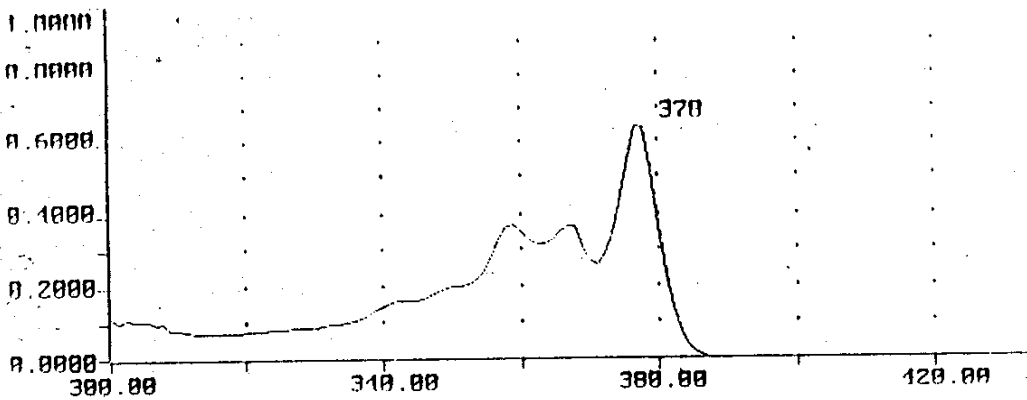
Tiến hành đồng thời mẫu chuẩn, mẫu thử, mẫu trắng đưa vào bình chiết tách quang hoá thấp, thêm 200mg Hydroxylamin hydrochlorid, lắc cho tan. Thêm 5ml dung dịch thuốc thử 2-3diaminonaphtalen, đậy nút, lắc đều. Để ở nhiệt độ phòng 100 phút. Thêm chính xác 5ml cyclohexan, ly tâm để loại nước.

Đo độ hấp thụ phân cyclohexan ở mẫu chuẩn, mẫu thử và đối chiếu là mẫu trắng.

3- Kết quả:

a- Xác định λ_{max} của phép đo:

Dùng dung dịch selen chuẩn, tiến hành thử phản ứng tạo phức piazoselenol, khảo sát sự thay đổi mật độ quang theo bước sóng ánh sáng hấp thụ. Kết quả phổ hấp thụ có $\lambda_{\text{max}} = 378\text{nm}$ được trình bày ở hình 3.



Hình 3. Phổ hấp thụ của Piazoselenol

b- *Xác định độ đúng của phương pháp:*

Dùng phương pháp thêm chuẩn selen. Bằng cách thêm lần lượt 1, 2, 3, 4, 5 microgam selen chuẩn vào dung dịch chế phẩm, sau khi đã vỡ cơ hoá chứa sẵn một lượng a microgam selen. Tiến hành xác định selen theo phương pháp của USP 23. Kết quả của phép đo mật độ quang và hàm lượng selen được lập thành bảng 6 sau:

Bảng 6. Giá trị mật độ quang và hàm lượng selen trong mẫu đo

Lượng selen (μ)	5,06	6,06	7,06	8,06	9,06	10,06
D	0,442	0,503	0,549	0,689	0,740	0,854

Dựa vào phương pháp bình phương tối thiểu, ta có phương trình hồi quy sau:

$$y = 0,08317X + 0,000724$$

$$r = 0,9999$$

Các đại lượng để đánh giá độ đúng của phương pháp được trình bày ở bảng 7:

Bảng 7. Độ đúng của phương pháp xác định selen

TT	Lượng cố sẵn a (µg)	Lượng thêm vào (µg)	D $\lambda_{\max}=378^{nm}$	Lượng tìm thấy b (µg)	X Lượng thu hồi		Số liệu thống kê
					b-a (µg)	%	
1	5,06	0,00	0,442				$X_{TB} = 96,3\%$ $S = 11,90$ $RSD = 12,5\%$
2	5,06	1,00	0,503	6,04	0,98	98,0	
3	5,06	2,00	0,549	6,59	1,53	76,5	
4	5,06	3,00	0,689	8,28	3,22	107,3	
5	5,06	4,00	0,740	8,89	3,83	95,8	
6	5,06	5,00	0,840	10,26	5,20	104,0	

So sánh hai dãy lượng thêm vào và lượng thu hồi theo giá trị t thực nghiệm (t_{in}), chúng tôi có $t_{in} = 0,036$. So với lý thuyết $t_{tt} = 2,31$. Như vậy $t_{in} > t_{tt}$. Vậy, sự sai khác giữa hai đại lượng selen chuẩn thêm vào và lượng selen tìm được là hoàn toàn không có ý nghĩa thống kê. Nghĩa là phương pháp này có thể tin cậy được.

c- Xác định độ lặp lại của phương pháp:

Cùng một mẫu nấm men, chúng tôi tiến hành khảo sát độ lặp lại của phương pháp, bằng cách cân chính xác khoảng 100mg nấm men, với số lượng 8 mẫu. Dem vô cơ hoá trong bình đốt oxy và tiến hành xác định hàm lượng selen theo phương pháp đã nêu. Kết quả trình bày ở bảng 8 sau:

Bảng 8. Độ lặp lại của phương pháp định lượng selen trong nấm men

TT	Khối lượng mẫu (mg)	D $\lambda_{\max}=378$	X µgSe/1g	Chỉ số thống kê
1	100,8	0,436	432,7	$X_{TB} = 470,8$ $S = 30,07$ $S_{X_{TB}} = \frac{S}{\sqrt{n}} = \frac{30,07}{2,645} = 11,37$ $RSD = \frac{S}{X_{TB}} = 0,064$ $\frac{tS}{\sqrt{n}} = 2,365 \times 11,37 = 26,89$
2	101,2	0,475	469,6	
3	101,0	0,449	444,7	
4	100,8	0,506	502,3	
5	100,7	0,485	480,1	
6	100,8	0,441	435,0	
7	100,3	0,502	498,9	
8	100,4	0,505	503,1	

Từ bảng trên ta thấy rằng sai số tương đối của phép đo là 5,7%.

Kết quả cho thấy độ lặp lại của phương pháp là chấp nhận được.

d- Hàm lượng selen trong các mẫu nấm men:

Định lượng hàm lượng selen trong các mẫu nấm men đã chế tạo được, theo phương pháp USP 23, chúng tôi thu được kết quả nêu ở bảng 9 sau:

Bảng 9. Hàm lượng selen trong một số mẫu nấm men

Mẫu số	Số lần xác định	Hàm lượng selen (phần triệu)
1	10	470,8 ± 26,9
2	10	390,2 ± 24,4
3	9	400,1 ± 30,2
4	8	625,0 ± 45,8
5	10	551,5 ± 29,7

$$X_{TB} = 487,5$$
$$S = 100,5$$

Như vậy có thể tạo ra được những nấm men có hàm lượng selen từ 400 đến 600 phần triệu trong điều kiện thí nghiệm.

IV.2.5- Độ ẩm của nấm men giàu selen:

Mẫu nấm men giàu selen sau khi thu hoạch, đã rửa sạch, sấy ở 105°C trong 30 phút, được đóng gói 2 lần trong túi P.E. Sau một tháng để ở nhiệt độ phòng, xác định độ ẩm theo ĐĐVN II, tập 3, phụ lục 3.16. Kết quả nêu ở bảng 10:

Bảng 10. Độ ẩm của một số mẫu nấm men giàu selen

TT	Khối lượng mẫu (g)	Thời gian sấy	Nhiệt độ	Độ ẩm (%)
1	1,4570	8 ^h	105°C	1,75
2	3,2264	9 ^h	105°C	1,75
3	4,4631	9 ^h	105°C	1,89

Như vậy, khối lượng bị mất do làm khô của nấm men giàu selen sau 1 tháng bảo quản là 1,80%

IV.2.6- Tro sunfat của nấm men giàu selen:

Xác định tro sunfat của các mẫu nấm men đã thu được theo ĐĐVN II, tập 3, phụ lục trang 471. Kết quả nêu ở bảng 11 sau:

Bảng 11. Tro sunfat của một số mẫu nấm men giàu selen

TT	Mẫu số	Khối lượng mẫu (g)	Độ tro (%)
1	1	1,0252	8,67
2		1,0004	8,65
3		2,0009	8,68
4	2	1,1687	8,31
5		1,3178	8,02
6		1,4275	8,14
7	3	1,0042	8,11
8		1,0003	8,31
9		1,0095	8,29

Độ tro trung bình của các mẫu là 8,36%, từ đó chúng tôi lựa chọn chỉ tiêu tro sunfat không quá 10%.

IV.2.7- Xác định kim loại nặng trong nấm men giàu selen

Các mẫu nấm men, sau khi thu hoạch đóng gói được đem xác định lượng chì theo DDVN II, tập 3, phụ lục: Phương pháp 4. Kết quả nêu ở bảng 12 sau:

Bảng 12. Kết quả thử chì ở các mẫu nấm men

Mẫu	Khối lượng mẫu (g)	Màu của ống thử so với mẫu	Kết luận
1	1,00	Không màu	Đạt
	2,00	Nhạt hơn	Đạt
2	1,00	Không màu	Đạt
	2,00	Nhạt hơn	Đạt
	3,00	Đậm hơn	Không đạt
3	2,00	Nhạt hơn	Đạt
	3,00	Nhạt hơn	Đạt

Như vậy, khi cân khối lượng mẫu từ 2g trở xuống để thử chì thì tất cả các mẫu đều đạt tiêu chuẩn. Chúng tôi chọn chỉ tiêu kim loại nặng không quá 20 phần triệu.

IV.2.8- Tiêu chuẩn chất lượng của nấm men giàu selen:

1- Nội dung tiêu chuẩn kỹ thuật:

Căn cứ vào các kết quả nghiên cứu, qua tài liệu tham khảo và được sự hướng dẫn của Viện Kiểm nghiệm Bộ Y tế, chúng tôi tiến hành xây dựng tiêu chuẩn cơ sở cho nấm men giàu selen (đặt tên là **BioSelen**).

Nội dung tiêu chuẩn kỹ thuật gồm 5 chỉ tiêu:

a- *Tính chất*: Bột khô, toi, màu vàng nhạt hoặc trắng xám đồng nhất

b- *Thử tinh khiết*:

- Tro sunfat: không quá 10%

- Kim loại nặng: không quá 20 phần triệu

- Muối selen hoà tan: không quá 20 phần triệu (tính theo selen)

c- *Mất khối lượng do làm khô*: không quá 8,0%

d- *Định tính*: chế phẩm phải có phản ứng định tính của selen.

e- *Định lượng*: hàm lượng selen trong chế phẩm phải từ 400 +600 phần triệu, tính theo chế phẩm khan.

Đồng thời đã xây dựng 5 phương pháp thử cho 5 chỉ tiêu này. (Phụ lục 5).

2- Kiểm định mẫu nấm men đã chế tạo theo tiêu chuẩn cơ sở:

Chúng tôi đã gửi mẫu nấm men chế tạo tới Viện Kiểm nghiệm - Bộ Y tế, để xin kiểm tra chất lượng theo tiêu chuẩn cơ sở. Kết quả phiếu kiểm nghiệm số 287 của Viện Kiểm nghiệm ký ngày 27/10/2000 xác nhận: Chế phẩm BioSelen là nấm men giàu selen ở mẫu số 4 do chúng tôi chế tạo, đạt các chỉ tiêu của tiêu chuẩn cơ sở. (Phụ lục 4)

3- Thẩm định tiêu chuẩn cơ sở đã ban hành:

Để có các tài liệu làm hồ sơ cho việc xin phép đăng ký lưu hành BioSelen, tiêu chuẩn cơ sở nguyên liệu nấm men giàu selen đã được Viện Kiểm nghiệm - Bộ Y tế thẩm định. Trong Phiếu kiểm nghiệm số 202 VKN-TCH, ngày 31/5/2001, Viện Kiểm nghiệm - Bộ Y tế đã kết luận:

- Nhất trí với tiêu chuẩn cơ sở

- Mẫu gửi ngày 18/3/2001 đạt chất lượng theo TCCS (Phụ lục 6).

IV.3- NGHIÊN CỨU ĐỘC TÍNH CỦA NẤM MEN GIÀU SELEN:

IV.3.1- Độc tính cấp:

Chuột nhắt trắng 100 con, chia mỗi lô 10 con. Từng lô được uống nấm men giàu selen với mức liều tăng dần. Theo dõi số chuột chết ở các nhóm trong thời gian 72 giờ tính từ sau khi uống thuốc.

Kết quả nghiên cứu được trình bày ở bảng 13:

Bảng 13. Kết quả thử độc tính cấp của nấm men giàu selen

Lô	Số chuột	Liều (g/kg)	Số chuột chết sau 72 giờ
1	10	05,0	0
2	10	7,50	0
3	10	10,0	0
4	10	12,5	0
5	10	15,0	1
6	10	17,5	3
7	10	20,0	6
8	10	22,5	7
9	10	25,0	8
10	10	27,5	10

Tính toán kết quả theo phương pháp của P.Z.Livschitch (1968) ta thu được các số liệu sau:

Bảng 14. Giá trị LD₅₀ của nấm men giàu selen

LD ₅₀ (g/kg)	Sai số chuẩn	Khoảng tin cậy
17,5	0,79	1,62

Như vậy, bằng đường uống đã xác định LD₅₀ = 17,50 ± 1,62 g/kg.

IV.3.2- Thử độc tính bán cấp:

1- Trên chuột nhắt trắng:

Sau 30 ngày uống thuốc thử, chuột vẫn ăn uống bình thường, lông mượt mà hơn so với nhóm chứng. Chuột ở lô chứng và 2 lô uống thuốc thử liều 20μg và 40μg selen/kg thể trọng/ngày, có trọng lượng đều tăng cao rõ rệt. Nhưng không có sự khác nhau giữa nhóm chứng và nhóm trị.

Bảng 15. Trọng lượng của chuột trong 30 ngày uống thuốc

Nhóm	n	Cân nặng (g)			P so với chứng
		Trước uống thuốc	Sau uống thuốc 14 ngày	Sau uống thuốc 30 ngày	
Chứng	10	18,8 ± 0,34	21,7 ± 0,42	26,1 ± 0,26	
Trị I	10	21,1 ± 0,7	24,8 ± 0,8	24,4 ± 0,6	> 0,05
Trị II	10	18,7 ± 0,25	23,4 ± 0,5	23,5 ± 0,9	> 0,05

2- Độc tính bán cấp trên thỏ:

a- Tình trạng chung:

Trong suốt thời gian uống thuốc thỏ vẫn ăn uống bình thường, lông mượt mà, phân không có sự thay đổi đặc biệt.

b- Cân nặng:

Thỏ được cân trước, trong và sau khi uống thuốc. Kết quả cho thấy trọng lượng thỏ ở cả 3 nhóm đều có xu hướng tăng lên, nhưng không có sự khác biệt trước và sau khi uống thuốc giữa các nhóm:

Bảng 16. Trọng lượng thỏ sau 30 ngày uống thuốc

Nhóm	n	Cân nặng (g)			P so với nhóm chứng
		Trước uống thuốc	Sau uống thuốc 14 ngày	Sau uống thuốc 30 ngày	
Chứng	10	2,14 ± 0,08	2,11 ± 0,07	2,20 ± 0,07	
Trị I 20µg selen	9	2,15 ± 0,06	2,22 ± 0,07	2,15 ± 0,09	> 0,05
Trị II 40µg selen	10	2,07 ± 0,07	2,15 ± 0,09	2,14 ± 0,09	> 0,05

c- Chức phận tạo máu:

- Số lượng hồng cầu và huyết sắc tố:

Theo dõi số lượng hồng cầu và huyết sắc tố trước, trong và sau uống thuốc 30 ngày cho thấy thuốc không ảnh hưởng đến số lượng hồng cầu và số lượng huyết sắc tố. Kết quả được tóm tắt ở bảng 17, 18

Bảng 17. Số lượng hồng cầu của thỏ sau 30 ngày uống thuốc

Nhóm	n	Số lượng HC (triệu/mm ³)			
		Trước uống thuốc	Sau uống thuốc 14 ngày	Sau uống thuốc 30 ngày	P so với nhóm chứng
Chứng	10	5,24 ± 0,16	4,90 ± 0,15	5,40 ± 0,14	
Trị I 20µg selen	9	5,12 ± 0,12	4,80 ± 0,14	4,98 ± 0,15	> 0,05
Trị II 40µg selen	10	5,00 ± 0,13	5,12 ± 0,21	4,90 ± 0,18	> 0,05

Bảng 18. Số lượng huyết sắc tố của thỏ sau 30 ngày dùng thuốc

Nhóm	n	Hb (g/100ml)			
		Trước uống thuốc	Sau uống thuốc 14 ngày	Sau uống thuốc 30 ngày	P so với nhóm chứng
Chứng	10	11,2 ± 0,42	10,5 ± 0,53	10,7 ± 0,73	
Trị I 20µg selen	9	10,7 ± 0,54	10,1 ± 0,46	10,1 ± 0,76	> 0,05
Trị II 40µg selen	10	10,0 ± 0,64	9,52 ± 0,66	9,87 ± 0,57	> 0,05

▪ Số lượng bạch cầu:

Số lượng bạch cầu của thỏ được tóm tắt ở bảng 19 cho thấy không có sự thay đổi có ý nghĩa thống kê ở từng nhóm và giữa các nhóm với nhau:

Bảng 19. Số lượng bạch cầu thỏ sau 30 ngày uống thuốc

Nhóm	n	Số lượng BC (nghìn/mm ³)			
		Trước uống thuốc	Sau uống thuốc 14 ngày	Sau uống thuốc 30 ngày	P so với nhóm chứng
Chứng	10	8,30 ± 0,19	8,25 ± 0,18	8,20 ± 0,21	
Trị I 20µg selen	9	8,50 ± 0,26	7,99 ± 0,22	8,10 ± 0,24	> 0,05
Trị II 40µg selen	10	8,00 ± 0,36	8,00 ± 0,38	8,00 ± 0,29	> 0,05

▪ Công thức bạch cầu:

Công thức bạch cầu được đánh giá trước, trong và sau uống thuốc thử 30 ngày. Kết quả ở bảng 20 cho thấy công thức bạch cầu ở cả 3 nhóm thay đổi không có ý nghĩa thống kê:

Bảng 20. Công thức bạch cầu thỏ sau 30 ngày uống thuốc

Nhóm	n	Loại bạch cầu (%)	Trước uống thuốc	Sau uống thuốc 14 ngày	Sau uống thuốc 30 ngày	P so với nhóm chứng
Chứng	10	Trung tính	25,5 ± 3,6	29,4 ± 3,4	32,5 ± 4,1	
		lympho	74,5 ± 3,7	70,6 ± 3,4	67,3 ± 4,6	
		Mono	0	0,13	0	
		Acid	0	0	0,13	
Trị I 20 µg selen	9	Trung tính	20,2 ± 2,7	22,3 ± 4,4	32,1 ± 5,5	> 0,05
		lympho	79,4 ± 2,8	77,1 ± 4,3	67,5 ± 5,4	> 0,05
		Mono	0	0,14	0,22	> 0,05
		Acid	0,44	0,22	0,1	> 0,05
Trị II 40 µg selen	10	Trung tính	24,1 ± 4,4	27,4 ± 2,9	23,7 ± 3,2	> 0,05
		lympho	75,6 ± 4,4	71,5 ± 3,0	74,4 ± 4,1	> 0,05
		Mono	0,14	0,14	0,28	> 0,05
		Acid	0,14	0	0,14	> 0,05

d. Chức năng gan:

▪ Các transaminase:

Để đánh giá ảnh hưởng tới nhu mô gan, các transaminase trong máu đã được định lượng. Kết quả được tóm tắt ở bảng 21, 22 cho thấy năm men chứa selen không làm thay đổi lượng transaminase trong máu thỏ có ý nghĩa thống kê:

Bảng 21. Sự thay đổi nồng độ SGPT trong máu thỏ sau 30 ngày uống thuốc

Nhóm	n	SGPT (UI/I)			P so với nhóm chứng
		Trước uống thuốc	Sau uống thuốc 14 ngày	Sau uống thuốc 30 ngày	
Chứng	10	64,75 ± 5,4	66,60 ± 3,9	57,55 ± 7,2	
Trị I 20µg selen	9	70,60 ± 6,9	57,30 ± 4,3	64,30 ± 15,8	> 0,05
Trị II 40µg selen	10	79,44 ± 16,5	60,11 ± 7,2	66,50 ± 13,4	> 0,05

Bảng 22. Sự thay đổi lượng SGOT trong máu thỏ sau 30 ngày uống thuốc

Nhóm	n	SGOT (UI/l)			
		Trước uống thuốc	Sau uống thuốc 14 ngày	Sau uống thuốc 30 ngày	P so với nhóm chứng
Chứng	10	57,75 ± 3,2	61,5 ± 3,4	59,4 ± 14	
Trị I 20µg selen	9	53,30 ± 2,4	65,1 ± 7,8	60,01 ± 23,3	> 0,05
Trị II 40µg selen	10	72,11 ± 13,68	74,4 ± 10	68,4 ± 11	> 0,05

• Định lượng cholesterol:

Qua định lượng cholesterol cho thấy nấm men chứa selen không làm thay đổi có ý nghĩa lượng cholesterol trong máu. Kết quả được tóm tắt ở bảng 23:

Bảng 23. Nồng độ cholesterol trong máu thỏ sau 30 ngày uống thuốc

Nhóm	n	Cholesterol (g/l)			
		Trước uống thuốc	Sau uống thuốc 14 ngày	Sau uống thuốc 30 ngày	P so với nhóm chứng
Chứng	10	0,60 ± 0,12	1,2 ± 0,2	0,89 ± 0,11	
Trị I 20µg selen	9	0,82 ± 0,12	1,4 ± 0,2	1,04 ± 0,14	> 0,05
Trị II 40µg selen	10	0,96 ± 0,18	1,1 ± 0,12	0,99 ± 0,1	> 0,05

• Định lượng bilirubin:

Kết quả ở bảng 24 cho thấy thuốc thử không làm thay đổi lượng bilirubin trong máu thỏ có ý nghĩa thống kê:

Bảng 24. Nồng độ bilirubin trong máu thỏ sau 30 ngày uống thuốc

Nhóm	n	Bilirubin (µmol/ml)			
		Trước uống thuốc	Sau uống thuốc 14 ngày	Sau uống thuốc 30 ngày	P so với nhóm chứng
Chứng	10	6,3 ± 1,9	6,0 ± 0,5	6,0 ± 0,2	
Trị I 20µg selen	9	6,6 ± 1,2	6,0 ± 0,6	6,1 ± 0,4	> 0,05
Trị II 40µg selen	10	7,4 ± 0,4	6,2 ± 0,6	6,4 ± 0,6	> 0,05

e- Chức năng thận:

Để đánh giá ảnh hưởng của thuốc đến chức năng thận, tiến hành định lượng creatinin trong máu thỏ. Kết quả ở bảng 25 cho thấy thuốc thử làm thay đổi lượng creatinin trong máu thỏ không có ý nghĩa thống kê:

Bảng 25. Nồng độ creatinin trong máu thỏ sau 30 ngày uống thuốc

Nhóm	n	Creatinin ($\mu\text{mol/ml}$)			
		Trước uống thuốc	Sau uống thuốc 14 ngày	Sau uống thuốc 30 ngày	P so với nhóm chứng
Chứng	10	162 \pm 4,9	151 \pm 5,8	157 \pm 5,4	
Trị I 20 μg selen	9	172 \pm 4,5	167 \pm 6,0	170 \pm 7,7	> 0,05
Trị II 40 μg selen	10	181 \pm 7,3	154 \pm 7,2	164 \pm 6,6	> 0,05

f- Cấu trúc vi thể của gan và thận:

Quan sát những thay đổi hình thái vi thể của gan và thận thỏ trên kính hiển vi quang học, sau 30 ngày uống thuốc liên tục thấy có một số kết quả như sau:

▪ Cấu trúc vi thể gan:

- Đối với lô chứng: cấu trúc gan bình thường, ranh giới giữa các tiểu thùy rõ. Khoảng cửa không xung huyết. Các tế bào gan bình thường.

- Đối với lô uống thuốc thử: nhìn chung đa số thỏ có cấu trúc gan bình thường: các tiểu thùy rõ - tế bào gan bình thường, song ở 2 lô uống thuốc thử có một số thỏ có thay đổi cấu trúc gan biểu hiện tế bào gan bị thoái hoá hốc, tĩnh mạch tiểu thùy và tĩnh mạch cửa giãn rộng và ứ máu (6/19 thỏ).

▪ Cấu trúc vi thể thận:

- Ở lô chứng: cấu trúc vi thể vùng vỏ và vùng tuỷ không có sự thay đổi bất thường.

- Lô trị: đa số thỏ có cấu trúc vùng vỏ và vùng tuỷ như lô chứng, song có một số thỏ có sự thay đổi cấu trúc vi thể của thận. Sự thay đổi này không có sự khác nhau giữa liều 20 μg selen/kg và 40 μg selen/kg thể trọng. Biểu hiện sự thay đổi cấu trúc vi thể thận là:

- + Các mao mạch giãn rộng (thỏ số 14, 17, 24, 25).
- + Ống góp và quai Henle giãn rộng (thỏ số 17).
- + Tổn thương tiểu cầu thận (mất khoang Bowman) (thỏ số 9).
- + Ống lượn giáp vỏ thận có tế bào bị thoái hoá hốc (thỏ số 24).

3- Nhận xét chung về độc tính bán cấp:

Theo dõi độc tính bán cấp trên chuột nhắt và thử cho thấy chế phẩm nấm men giàu selen đã không làm thay đổi tình trạng chung, thân trọng, chức năng khả năng tạo máu cũng như chức năng gan thận của chuột và thỏ.

V. BÀN LUẬN

V.1. Về sản xuất nấm men giàu selen:

Việc nghiên cứu sản xuất các nấm men giàu selen đã trải qua một quá trình khá lâu. Vì hiệu suất tạo sinh khối nấm men và hàm lượng selen trong nấm men phụ thuộc vào nhiều yếu tố: giống nấm men, điều kiện nuôi cấy (nhiệt độ, pH, thành phần môi trường...) và thiết bị nuôi cấy, do đó việc lựa chọn chế độ và điều kiện thực hiện quy trình nuôi cấy nấm men có ý nghĩa quan trọng. Trước đây, việc nuôi cấy được chúng tôi thực hiện trên thiết bị tự chế nên hiệu suất tạo sinh khối thấp, hàm lượng selen chưa thật ổn định. Từ năm 1999, được sự giúp đỡ của Viện Công nghệ Sinh học, quá trình nuôi cấy nấm men được thực hiện trên thiết bị BioFlo 5000, có thể nói đây là thiết bị nghiên cứu nuôi cấy nấm men vào loại hiện đại nhất ở Việt Nam. Chính nhờ có thiết bị này mà chúng tôi đã xác định được chế độ nuôi cấy thích hợp, đảm bảo ổn định trong suốt quá trình nuôi cấy và với lượng thể tích môi trường khá lớn từ 15 - 28 lít. Cụ thể, nồng độ selen trong môi trường nuôi cấy nấm men khoảng 10 μ g/ml; pH = 6,5 - 7; nhiệt độ là 30 $^{\circ}$ C; lượng không khí được thổi vào nhiều với tốc độ 200ml/phút và đảm bảo là khí sạch.

Việc thu hoạch nấm men được thực hiện qua nhiều công đoạn: lắng gạn, rửa, làm khô. Đa số các giai đoạn được thực hiện ở nhiệt độ dưới 5 $^{\circ}$ C, mục đích để đảm bảo tế bào nấm men không tiếp tục sinh sản, dễ sa lắng và không bị phá vỡ màng. Giai đoạn này nếu xử lý tốt thì việc làm khô ở giai đoạn sau mới đảm bảo thu được sinh khối khô, tơi, màu vàng nhạt hoặc trắng xám.

Trong quá trình nuôi cấy nấm men, thì việc phá bọt khi nấm men sinh sản phải rất chú ý, nếu không bọt tràn theo đường ống dẫn ra ngoài sẽ ảnh hưởng tới hiệu suất tạo sinh khối nấm men.

Với thiết bị BioFlo 5000 dung tích 80lit, chúng tôi đã thu được các thông số kỹ thuật cần thiết cho việc mở rộng quy mô sản xuất cỡ 1-2 kg/mẻ. Mặt khác, với trình độ công nghệ trong nước hiện có, các nhà kỹ thuật có thể chế tạo được thiết bị lên men tương tự như BioFlo 5000; do đó việc sản xuất nấm men giàu selen là có tính khả thi.

V.2. Về tiêu chuẩn chất lượng của nấm men giàu selen:

Chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu xây dựng tiêu chuẩn chất lượng của nấm men giàu selen trên cơ sở quy định chung của Dược điển Việt Nam và tham khảo Dược điển Mỹ USP 23.

Vì nấm men được nuôi cấy trong môi trường có Natri selenit, do đó chúng tôi thấy cần phải xác định giới hạn lượng muối selen hoà tan bám dính ở ngoài tế bào nấm men, giới hạn này được quy định nhỏ hơn 20 phần triệu đảm bảo độ an toàn cao nếu selen vô cơ được coi là có tác dụng độc hại; đồng thời cũng là cơ sở để đảm bảo lượng selen trong sinh khối nấm men nằm trong tế bào nấm men.

Các chỉ tiêu độ ẩm, tro sunfat, kim loại nặng được xác định và lựa chọn giới hạn theo quy định của Dược điển Việt Nam.

Phân phương pháp định lượng selen được xây dựng theo Phụ lục 3 của USP23, chúng tôi đã khảo sát độ đúng, độ lặp lại của phương pháp, các kết quả cho thấy phương pháp có độ đúng, độ tin cậy cần thiết và có thể áp dụng được trong điều kiện của Việt Nam. Chúng tôi đã sử dụng phương pháp này để định lượng 5 mẫu chế phẩm nấm men giàu selen do chúng tôi sản xuất; đồng thời chúng tôi đã kết hợp với Phòng Hoá lý II, Viện Kiểm nghiệm cùng kiểm định phương pháp và sau đó được Viện chấp nhận sử dụng để định lượng hàm lượng selen trong nấm men do chúng tôi sản xuất.

Để đảm bảo nấm men đã sản xuất có được hoạt tính sinh học như các chế phẩm cùng loại, chúng tôi đã tiến hành khảo sát HTCO theo phương pháp C. G. Blagdarov (1968) và nghiên cứu khả năng chống viêm trên mô hình thí nghiệm cấy viêm amian vào da chuột [9]. Kết quả được trình bày ở Phụ lục 7 cho thấy nấm men do chúng tôi sản xuất có HTCO khá tốt và có tác dụng chống viêm.

V.3. Về việc xác định độc tính của nấm men:

Độc tính cấp của chế phẩm nấm men giàu selen được Bộ môn Dược lý Học Viện Quân Y tiến hành khảo sát ngẫu nhiên ở các lô mẻ khác nhau. LD₅₀ được xác định là $17,5 \pm 1,6$ g/kg trên chuột nhắt trắng bằng đường uống. Kết quả nghiên cứu đó cho thấy nấm men rất ít độc.

Độc tính bán cấp trên chuột nhắt và thỏ được thực hiện tại Bộ môn Dược lý Trường Đại học Y Hà Nội. Súc vật thí nghiệm được cho uống nấm men giàu selen liên tục trong 30 ngày, với liều gấp 20 lần và 40 lần liều dùng lâm sàng của một số chế phẩm chứa selen (như: Belaf, Saylom, Protecton, Celnium), kết quả theo dõi cho thấy:

- Tình trạng chung, thân trọng, chức năng và khả năng tạo máu cũng như chức năng gan thận của chuột, thỏ không thay đổi.

- Ở một vài con thỏ uống dung dịch nấm men chứa selen thấy có biểu hiện thay đổi cấu trúc gan và cấu trúc thận, song những thay đổi này

chưa đủ làm thay đổi các chỉ số sinh hoá ở máu. Theo chúng tôi, sở dĩ có hiện tượng này là do chức năng bù trừ của hai cơ quan gan và thận. Từ kết quả thay đổi vi thể gan và thận ở một số thỏ, chúng tôi cho rằng: không nên dùng liều quá cao trên 4 μ g selen/kg thể trọng và nên dùng từng đợt khoảng 20 - 30 ngày, nghỉ một đợt 1 - 2 tuần rồi mới dùng lại. Thận trọng ở những bệnh nhân có dấu hiệu suy gan, thận và nên theo dõi chức năng gan, thận thường xuyên khi dùng lâu dài các chế phẩm chứa selen. Mặt khác để đánh giá được đầy đủ độc tính bán cấp của nấm men trên gan, cần xác định thêm một số chỉ tiêu khác, đặc biệt là xác định γ FT.

VI. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

- 1- **Đối với mục tiêu 1** "Nghiên cứu ổn định phương pháp sản xuất nấm men giàu selen":
 - Đã xác định được điều kiện và các thông số kỹ thuật cho quá trình nuôi cấy nấm men *Saccharomyces cerevisiae* với hiệu suất tạo sinh khối 0,3-0,5 kg/m³. Quy trình nuôi cấy ổn định và có thể triển khai ở quy mô lớn hơn.
 - Đã nuôi cấy nhiều mẻ, thu được 03 kg nấm men giàu selen đạt TCCS về màu sắc, độ ẩm, tro sunfat, kim loại nặng và có hàm lượng selen 400-600 phần triệu.
- 2- **Đối với mục tiêu 2** "Xây dựng tiêu chuẩn kỹ thuật của nấm men giàu selen":
 - Đã xây dựng tiêu chuẩn cơ sở để kiểm tra chất lượng nấm men giàu selen (gọi tên là BioSelen) với 05 chỉ tiêu, được Viện Kiểm nghiệm thẩm định và nhất trí với TCCS.
 - Các chế phẩm BioSelen do chúng tôi sản xuất đều đạt các chỉ tiêu của TCCS (Phụ lục 4,6).
- 3- **Về mục tiêu 3** "Đánh giá độc tính cấp và bán cấp của nấm men giàu selen":
 - Độc tính cấp của nấm men giàu selen: LD₅₀ = 17,5 \pm 1,6g/kg trên chuột nhắt trắng bằng đường uống. Nấm men giàu selen rất ít độc.
 - Về độc tính bán cấp của nấm men giàu selen: với các liều gấp 20 lần và 40 lần liều lâm sàng của chế phẩm Belaf, Youngton dùng cho người, tiến hành trên chuột và thỏ cho thấy: nấm men giàu selen chưa làm thay đổi tình trạng chung về thể trạng, chức năng tạo máu, chức năng gan thận của súc vật thí nghiệm.
- 4- **Kết luận chung:**

BioSelen do chúng tôi sản xuất là sinh khối nấm men chứa selen, được cố định ở trong tế bào nấm men. BioSelen đạt chất lượng TCCS và rất ít độc, có HTCO và có tác dụng chống viêm (Phụ lục 7). BioSelen là nguyên liệu tốt để sản xuất các chế phẩm thuốc kiểu Belaf, Youngton, Cigelton dùng điều trị và

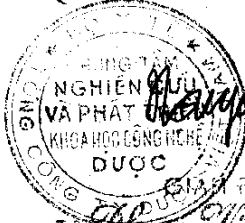
dự phòng các bệnh ung thư, tim mạch, viêm khớp, lão hoá.... và sử dụng trong chăn nuôi.

Đề nghị Bộ Y tế cho phép thử nghiệm lâm sàng chế phẩm BioSelen và cho phép chúng tôi được thực hiện dự án sản xuất thử nghiệm chế phẩm BioSelen, nhằm tạo ra một nguyên liệu làm thuốc có giá trị.

Hà Nội, ngày 8 tháng 5 năm 2002

CƠ QUAN CHỦ TRÌ ĐỀ TÀI

CHỦ NHIỆM ĐỀ TÀI



TS. Nguyễn Quang Thường

VII. TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] A. I. Giukova (1975)
Technologichexki Trebovanhie K. mikroorganizmam primenhiuemum vo pyvovarennom proizvodxtve
- [2] Brock Haus (1971)
ABC - Chimie, pp. 1274 - 1277
- [3] USP XXIII (1995)
Supplement 3, page 3001
- [4] C. G. Blagodarov et all (1987)
Opredelenhie antiokixlichenoi akchivnoxchi khimichexkix xoedinhenhii
Khimico - pharmacebchichexski jurnal No. 3, 292 - 299.
- [5] Đặng Hồng Thuý, Đỗ Thu Huyền, Từ Minh Koóng (1992)
Phân lập, tuyển chọn các chủng nấm men ở Việt Nam có khả năng đồng
hoá selen.
Tập chí Dược học số 4, trang 9 - 12.
- [6] W. B. Abraham (1987)
Techniques of animal and clinical toxicology
Med. Pub. Chicago, pp. 55 - 68
- [7] A. Turner (1965)
Screening Methods in Pharmacology
Acad. Press, New York - Lodon, pp. 66 - 68.
- [8] Bộ Y tế CHXHCNVN quy định về nghiên cứu dược lý các thuốc y học cổ
truyền dân tộc, 1966. QĐ 371/QĐ-BYT.
- [9] Ducrot R.; Julou L. (1995)
Screening Methods in Pharmacology
Acad. Press, New York - Lodon, pp. 114 - 115.

MỤC LỤC

I.	Đặt vấn đề	2
II.	Mục tiêu đề tài	4
III.	Phương pháp và đối tượng nghiên cứu	4
III.1-	Phương pháp nghiên cứu	4
	III.1.1- Phương pháp chế tạo nấm men giàu selen	
	III.1.2- Các phản ứng định tính selen trong nấm men	
	III.1.3- Phương pháp định lượng selen trong nấm men	
	III.1.4- Phương pháp đo hoạt tính chống oxy hoá invitro	
	III.1.5- Xác định độc tính cấp và bán cấp	
III.2-	Nguyên vật liệu và phương tiện nghiên cứu	5
	III.2.1. Dụng cụ	
	III.2.2. Hoá chất	
	III.2.3. Vật liệu	
IV.	Kết quả nghiên cứu	6
IV.1-	Nghiên cứu chế tạo các nấm men giàu selen	6
	IV.1.1- Nguyên tắc nuôi cấy	
	IV.1.2- Tiến hành	
	IV.1.3- Kết quả	
IV.2-	Nghiên cứu xây dựng tiêu chuẩn kỹ thuật của nấm men giàu selen	12
	IV.2.1- Định tính selen trong nấm men	
	IV.2.2- Định tính selen từ môi trường nuôi cấy bám vào nấm men	
	IV.2.3- Xác định giới hạn muối selen hoà tan ở ngoài tế bào nấm men	
	IV.2.4- Định lượng selen trong nấm men	
	IV.2.5- Độ ẩm của nấm men giàu selen	
	IV.2.6- Tro sunfat của nấm men giàu selen	
	IV.2.7. Xác định kim loại nặng trong nấm men giàu selen	
	IV.2.8- Tiêu chuẩn kỹ thuật của nấm men giàu selen	
IV.3.	Nghiên cứu độc tính của nấm men giàu selen	20
	IV.3.1. Độc tính cấp	
	IV.3.2. Độc tính bán cấp	
V.	Bàn luận	27
VI.	Kết luận và đề nghị	29
VII.	Tài liệu tham khảo	31

BỘ Y TẾ
Số: 119 /YT- K2ĐT

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

Trích yếu: VI v chuyển cơ quan
chủ trì đề tài

Hà Nội, ngày 01 tháng 09 năm 2001

Kính gửi: - Trường Đại học Dược Hà nội
- TS Nguyễn Quang Thường -
Trung tâm Nghiên cứu Phát triển KHCN Dược .
- Trung tâm Nghiên cứu Phát triển KHCN Dược .
- Tổng Công ty Dược Việt nam

Phúc đáp công văn số : 54/ĐHD-QLKH ngày 09/02/2001 của Trường Đại học Dược Hà nội về việc chuyển cơ quan chủ trì đề tài , công văn số 04/TTCND-KH ngày 18/04/2001 của Trung tâm Nghiên cứu phát triển Khoa học Công nghệ Dược (NCPTKHCN Dược) về việc xin tiếp nhận quản lý đề tài KHCN cấp Bộ năm 2000- 2001 - Trên cơ sở biên bản họp về đề tài KHYD 02-12 / Trường đại học Dược Hà nội ngày 06/06/2001 giữa Bộ Y Tế (Vụ KHĐT) - Trường Đại học Dược Hà nội - Đại diện đề tài KHYD 02-12 (TS Nguyễn Quang Thường - Chủ nhiệm đề tài) và các ý kiến của các nghiên cứu viên , xác nhận của phòng tài chính kế toán - trường Đại học Dược Hà nội về các thủ tục tài chính của đề tài , Bộ Y tế có ý kiến như sau :

1- Đồng ý để Chủ nhiệm Đề tài chuyển cơ quan chủ trì từ trường Đại học Dược Hà nội sang Trung tâm NCPTKHCN Dược đối với 02 đề tài cấp Bộ :

* Nghiên cứu triển khai một số phương pháp xác định gốc tự do của Ô .xy và các chất chống Ô .xy hoá trong cơ thể (KHYD 02-14)

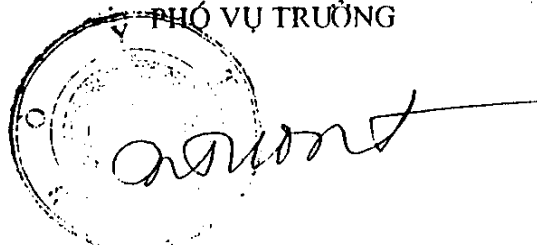
* Nghiên cứu một số chế phẩm chứa men giàu Selem (KHYD 02- 12)

2- Đề nghị các Cơ quan Chủ trì đề tài và Chủ nhiệm đề tài thực hiện việc quản lý nghiên cứu khoa học công nghệ theo đúng các quy định hiện hành .

Nơi nhận:

- Như trên
- Lưu K2ĐT
- Lưu trữ.

TL. BỘ TRƯỞNG BỘ Y TẾ
KT.VỤ TRƯỞNG VỤ KHOA HỌC ĐÀO TẠO
PHÓ VỤ TRƯỞNG



PGS.TS. Nguyễn Văn Tường

V/v: Thông báo kinh phí
KHCNMT ngành Y tế
đợt 2 năm 2001

Hà Nội, ngày 22 tháng 10 năm 2001

Kính gửi: THỦ TRƯỞNG CÁC ĐƠN VỊ NGHIÊN CỨU TRIỂN KHAI
TRỰC THUỘC BỘ Y TẾ

Do là thời điểm bắt đầu kế hoạch 5 năm, ngân sách khoa học công nghệ năm 2001 được Bộ Khoa học Công nghệ và Môi trường phân bổ cho các Bộ/ngành theo 3 đợt. Dựa trên ngân sách khoa học công nghệ được giao và kế hoạch khoa học công nghệ do các đơn vị đề xuất, sau khi đã cân đối các vấn đề ưu tiên phát triển khoa học công nghệ của ngành Y tế, lãnh đạo Bộ Y tế đã ký Quyết định số 433/QĐ-BYT ngày 19/10/2001 phê duyệt kế hoạch chi tiết phân bổ kinh phí khoa học công nghệ ngành Y tế đợt 2.

Thực hiện Quyết định nói trên, Vụ Khoa học Đào tạo Bộ Y tế thông báo kế hoạch phân bổ kinh phí khoa học công nghệ của đơn vị theo bản thông báo đính kèm và hướng dẫn một số nội dung thực hiện như sau:

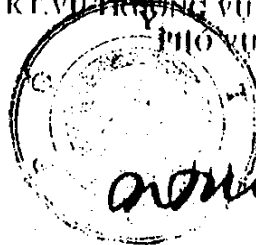
1. Các đơn vị khẩn trương chỉ đạo các chủ nhiệm đề tài/dự án chuẩn bị đề cương và dự toán kinh phí các nhiệm vụ được giao, gửi về Vụ Khoa học Đào tạo Bộ Y tế và Vụ Tài chính kế toán Bộ Y tế trước ngày 30/10/2001 để được cấp kinh phí.
2. Các nội dung nghiên cứu của giai đoạn trước đã hoàn tất, yêu cầu các đơn vị khẩn trương tổ chức nghiệm thu, tổng kết, báo cáo Bộ Y tế.
3. Các đơn vị khẩn trương tổng hợp tình hình chi tiêu tài chính của các nhiệm vụ, khẩn trương chỉ đạo, hỗ trợ, tạo điều kiện cho các chủ nhiệm đề tài/dự án triển khai các nội dung còn lại, giải ngân và thanh quyết toán theo đúng các quy định hiện hành của Bộ Tài chính về quản lý tài chính khoa học công nghệ.

Bộ Y tế yêu cầu thủ trưởng các đơn vị nghiên cứu triển khai trực thuộc Bộ Y tế, chủ nhiệm các chương trình/đề tài/dự án khoa học công nghệ các cấp thực hiện đầy đủ các nội dung hướng dẫn trên đây.

NƠI NLIÊN

Như trên
BT Đỗ Nguyễn Phương (để báo cáo)
TT Lê Ngọc Trung (để báo cáo)
LƯU K2ĐT, TCKT, KH
Linh thư

TL, BỘ TRƯỞNG BỘ Y TẾ
KT, VỤ TRƯỞNG VỤ KHOA HỌC ĐÀO TẠO
PHÓ VỤ TRƯỞNG



TRẦN VĂN NGUYỄN VĂN HƯỜNG

Hà Nội, ngày 19 tháng 10 năm 2001

**QUYẾT ĐỊNH CỦA BỘ TRƯỞNG BỘ Y TẾ
VỀ VIỆC PHÊ DUYỆT KẾ HOẠCH CHI TIẾT PHÂN BỐ
KINH PHÍ KHOA HỌC CÔNG NGHỆ NGÀNH Y TẾ ĐỢT 2 NĂM 2001**

BỘ TRƯỞNG BỘ Y TẾ

- Căn cứ Nghị định số 68/CP ngày 11/10/1993 của Chính phủ quy định về chức năng, nhiệm vụ, quyền hạn và tổ chức bộ máy Bộ Y Tế.
- Căn cứ công văn số 75/BKHCNMT-KH ngày 08/01/2001 của Bộ Khoa học Công nghệ và Môi trường về việc hướng dẫn nội dung kế hoạch KHCNMT năm 2001 của các Bộ/Tổng cục.
- Căn cứ công văn số 1870/BKHCNMT-KH ngày 26/6/2001 của Bộ Khoa học Công nghệ và Môi trường về việc hướng dẫn nội dung kế hoạch KHCNMT năm 2001 (giai đoạn 2) của các Bộ/Tổng cục.
- Căn cứ công văn số 2747/BKHCNMT-KH ngày 28/9/2001 của Bộ Khoa học Công nghệ và Môi trường về việc hướng dẫn nội dung kế hoạch KHCNMT năm 2001 (giai đoạn 3) của các Bộ/Tổng cục.
- Xét đề nghị của Ông Vụ trưởng Vụ Khoa học Đào tạo, Ông Vụ trưởng Vụ Tài chính Kế toán, Ông Vụ trưởng Vụ Kế hoạch.

QUYẾT ĐỊNH

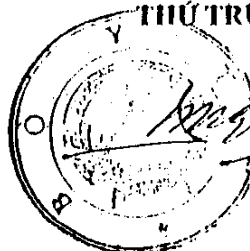
- Điều 1:** Phê duyệt kế hoạch chi tiết phân bổ kinh phí nghiên cứu khoa học và công nghệ năm 2001 đợt 2 cho các đơn vị nghiên cứu triển khai trực thuộc Bộ Y tế theo bản kế hoạch kèm theo.
- Điều 2:** Vụ Khoa học Đào tạo có nhiệm vụ thông báo nội dung nghiên cứu triển khai năm 2001 cho từng đơn vị để các nội dung nhiệm vụ được thực hiện theo đúng đề cương/kế hoạch đã được xét duyệt.
- Điều 3:** Các đơn vị căn cứ vào đề cương được duyệt và kinh phí được giao, lập dự toán chi tiết theo mục lục ngân sách gửi về Vụ Tài chính Kế toán để được cấp phát. Vụ Tài chính kế toán có nhiệm vụ cấp kinh phí theo như đã ghi trong Quyết định này theo đúng qui định của Luật Ngân sách.
- Điều 4:** Vụ Khoa học Đào tạo, Vụ Tài chính kế toán có trách nhiệm hướng dẫn các đơn vị, chủ nhiệm đề tài hoàn thiện các hồ sơ quản lý hành chính và chỉ cấp tài chính khi đã đầy đủ hồ sơ theo qui định hiện hành.
- Điều 5:** Các Ông Chánh Văn phòng, Vụ trưởng Vụ Khoa học Đào tạo, Vụ trưởng Vụ Tài chính kế toán, Vụ trưởng Vụ Kế hoạch, thủ trưởng các đơn vị, chủ nhiệm các chương trình, dự án, đề tài cấp Nhà nước, cấp Bộ chịu trách nhiệm thi hành Quyết định này.

NƠI NHIẬN:

- Như điều 1,5
- Lưu K2ĐT
- Lưu TCKT, KH
- BT Đỗ Nguyễn Phương (để báo cáo)
- Các đ/c Thủ trưởng
- Lưu trữ

KT. BỘ TRƯỞNG BỘ Y TẾ

THỦ TRƯỞNG



LÊ NGỌC TRỌNG

THÔNG BÁO KINH PHÍ KHOA HỌC CÔNG NGHỆ ĐỢT 2 NĂM 2001
Theo Quyết định số 4333/QĐ-BYT ngày 19 tháng 10 năm 2001 của Bộ trưởng Bộ Y tế
(Thông báo này kèm theo công văn 813/ Y.T-K2ĐT ngày 22 tháng 10 năm 2001)

**TRUNG TÂM NGHIÊN CỨU VÀ PHÁT TRIỂN KHOA HỌC CÔNG NGHỆ DƯỢC
TỔNG CÔNG TY DƯỢC VIỆT NAM**

stt	Tên nhiệm vụ	Thời gian thực hiện	Kinh phí 2001	Ghi chú
1	Nghiên cứu triển khai một số phương pháp xác định gốc tự do và các chất chống oxy hóa trong cơ thể	2001	20	KCB-02
2	Nghiên cứu sản xuất chế phẩm nấm men giàu selen	2001	30	KCB-02
	Tổng số		50	

Nguyen

Hà Nội, ngày 04 tháng 6 năm 1999

BIÊN BẢN THẨM ĐỊNH

Để có cơ sở tiếp tục hợp tác nghiên cứu về những nấm men giàu Selen,
Chúng tôi gồm:

I. PGS, PTS, NGUYỄN NGỌC ĐẠO - VIỆN PHÓ - VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

* Ks: Nguyễn Văn Thường - CBNC Phòng Di Truyền.

* Ks. Nguyễn Ngọc Quý - CBNC Phòng enzym học.

Thuộc Trung tâm Khoa học Tự Nhiên và Công nghệ Quốc gia.

Đại diện bên A

II. PTS. NGUYỄN QUANG THƯỜNG - CHỦ NHIỆM ĐỀ TÀI NGHIÊN CỨU CẤP BỘ VỀ NHỮNG NẤM MEN GIÀU SELEN, CÓ MÃ SỐ: KHYD-02-12, TRƯỜNG ĐẠI HỌC DƯỢC - HÀ NỘI.

DS - Nguyễn Thị Thơm - Bộ môn cơ hoá lý - Đại học Dược - Hà Nội.

Đại diện bên B.

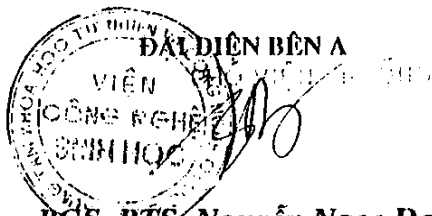
Hai bên đã đồng ý thoả thuận với nhau:

* Triển khai thí nghiệm thẩm định kết quả nuôi cấy những nấm men giàu selen, theo cách nuôi cấy của bên B. Các thí nghiệm được thực hiện từ ngày 19/5/1999 đến ngày 02/6/1999 tại phòng thí nghiệm lên men vi sinh của Viện Công Nghệ Sinh Học, thuộc Trung Tâm Khoa Học Tự Nhiên và Công Nghệ Quốc Gia. Các kết quả thí nghiệm thẩm định đã cho thấy rằng:

- Cách nuôi cấy nấm men của bên B đã đạt hiệu suất khá cao, là không dưới 350gam nấm men khô tính cho 10lít môi trường nuôi cấy.

- Cách nuôi cấy này là thích hợp, có khả năng sản xuất lớn ở Việt Nam.

* Hai bên nhất trí đề nghị với Bộ Y Tế, Bộ Khoa Học Công Nghệ Môi Trường và hai cơ quan chủ quản là Trường Đại học Dược Hà Nội và Viện Công Nghệ Sinh Học - Trung tâm Khoa học tự nhiên và Công Nghệ Quốc gia cần đầu tư thêm kinh phí và tạo điều kiện, để các cán bộ trong nhóm nghiên cứu của hai cơ quan hợp tác nghiên cứu mạnh mẽ hơn, theo đề cương cùng soạn thảo, để đề tài này sớm có sản phẩm ứng dụng.



PGS, PTS. Nguyễn Ngọc Dao

Ks. Nguyễn Văn Thường

ĐẠI DIỆN BÊN B

PTS. Nguyễn quang Thường

Ds. Nguyễn Thị Thơm

BỘ Y TẾ
 VIỆN KIỂM NGHIỆM
 18 Hai Bà Trưng, Hà Nội
 ĐT: 2 55471, 2 55341

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
 Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

PHIẾU KIỂM NGHIỆM

Số: 287

Kết quả kiểm nghiệm chỉ có giá trị với mẫu đem thử

Mẫu để kiểm nghiệm: Bioselin

Nơi sản xuất: Trung tâm nghiên cứu và phát triển khoa học Công nghệ được

Số lô, số DK, hạn dùng: Mẫu số 4

Người và nơi gửi mẫu: nt

Nơi lấy mẫu:

Yêu cầu KN (ghi rõ nội dung, số, ngày, tháng, KTCL

năm của công văn hay giấy tờ kèm theo)

Ngày, tháng, năm nhận mẫu 13/10/2000 Số đăng ký KN 30G 310

Người nhận mẫu DS Lê Thị Tư

Thứ theo TCCS

Tình trạng mẫu khi nhận và khi mở niêm phong để KN

Chế phẩm đóng trong hai lần túi PE hàn kín

Trong túi có nhãn viết tay rõ ràng.

Yêu cầu

Kết quả

1. Tính chất :

Phải đạt theo quy định

Đúng

2. Thử tính khiết :

2.1. Tro sulfat: Không quá 10,0%

Đạt (6,3%)

2.2. Kim loại nặng : Không quá 20 phần triệu.

Đạt

2.3. Muối Selen hoà tan: không quá 20 phần triệu (tính theo Selen kim loại)

Đạt

3. Mất khối lượng do làm khô :

Không quá 8,0%

Đạt (4,7%)

4. Định tính : Chế phẩm phải có phản ứng định tính của Selen.

Đúng

5. Định lượng :

Hàm lượng Selen trong chế phẩm phải từ 400,0 - 600,0 phần triệu tính theo chế phẩm khan.

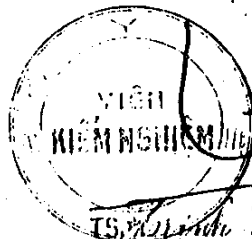
Đạt (533,1 ppm)

KẾT LUẬN

Mẫu thử đạt yêu cầu chất lượng theo tiêu chuẩn cơ sở.

Hà Nội, ngày 27 tháng 10 năm 2000

KT Viện trưởng
PHÓ VIỆN TRƯỞNG



TIÊU CHUẨN CƠ SỞ

NHÓM R

TỔNG CÔNG TY DƯỢC VIỆT NAM	BIOSELEN (Nguyên liệu)	04-CPT-001-2000
TRUNG TÂM NC & PT KHCN DƯỢC		Có hiệu lực từ ngày ký.

Quyết định ban hành số:..... ngày .. tháng .. năm 2004.

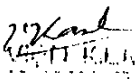
Bioselen là nấm men *Saccharomyces* đã được làm giàu thêm Selen. Hàm lượng Selen hữu cơ trong nấm đã được ổn định.

I- YÊU CẦU KỸ THUẬT:

- 1.1- Tính chất: Bột khô tơi, màu vàng nhạt hoặc trắng xám, đồng nhất.
- 1.2- Thử tinh khiết:
- 1.2.1- Tro sulfat: Không quá 10,0%.
- 1.2.2- Kim loại nặng: Không quá 20 phần triệu.
- 1.2.3- Muối selen hoà tan: Không quá 20 phần triệu (tính theo selen).
- 1.3- Mất khối lượng do làm khô: Không quá 8,0%.
- 1.4- Định tính: Chế phẩm phải cho phản ứng định tính của selen.
- 1.5- Định lượng: Hàm lượng selen trong chế phẩm phải từ 400 + 600 phần triệu, tính theo chế phẩm khan.

II- PHƯƠNG PHÁP THỬ:

- 2.1- Tính chất: Bằng cảm quan, chế phẩm phải đạt các yêu cầu đã nêu.
- 2.2- Thử tinh khiết:
- 2.2.1- Tro sulfat: Thử theo DDVN II, tập 3 - Phụ lục tr. 471.
Sử dụng 0,5g chế phẩm.
- 2.2.2- Kim loại nặng: Thử theo DDVN II, tập 3 - Phụ lục : phương pháp 4
Sử dụng 1g chế phẩm và 1ml dung dịch ion chì mẫu 10 phần triệu.
- 2.2.3- Muối selen hoà tan:
- a/. Thuốc thử: Theo DDVN II, tập 3.
- Dung dịch iod 0,1N (TT).
 - Ure (TT).
 - Dung dịch kali iodid 10% (TT).
 - Hồ tinh bột (CT).


 TRUNG TÂM NC & PT KHCN DƯỢC
 ĐẠI TUẦN 2004

b/. Tiến hành:

Cân chính xác khoảng 2,5g chế phẩm, thêm 20ml nước cất và lắc đều. Để 30 phút, thỉnh thoảng lắc nhẹ. Ly tâm, lọc lớp nước phía trên.

Thêm vào dịch lọc 2ml dung dịch hồ tinh bột (CT) và thêm dung dịch iod 0,1N (TT) đến khi dung dịch có màu xanh nhạt bền (lắc kỹ khi thêm iod), pha loãng dung dịch thu được tới 25ml (dung dịch A).

+ Dung dịch thử: 10ml dung dịch A, thêm 0,05g ure và 10ml dung dịch kali iodid 10% (TT), lắc đều và thêm nước vừa đủ 25ml.

+ Dung dịch chuẩn: lấy 10ml dung dịch chuẩn gốc trong mục định lượng và tiến hành như dung dịch thử.

Đo mật độ quang của dung dịch chuẩn ở bước sóng 550nm, cốc đo dày 1cm, mẫu trắng: nước cất.

Đo mật độ quang của dung dịch thử ở bước sóng 550nm, cốc đo dày 1cm, mẫu trắng: pha loãng dung dịch A 2,5 lần bằng nước cất.

Yêu cầu: Mật độ quang của dung dịch thử không lớn hơn của dung dịch chuẩn.

2.3- Mất khối lượng do làm khô: Thử theo DDVN II, tập 3 - Phụ lục 3.16. (0,5g chế phẩm, 100 + 105°C, đến khối lượng không đổi).

2.4- Định tính:

2.4.1- Thuốc thử: Theo DDVN II, tập 3.

- Dung dịch acid nitric 30% (TT)
- Dung dịch kali iodid 10% (TT)
- Ure (TT)
- Hồ tinh bột (CT)

2.4.2- Tiến hành:

Lấy 1,0g chế phẩm, thêm 10ml dung dịch acid nitric 30% (TT), đun nóng 60°C trong 15 phút. Để nguội, thêm 10ml nước cất, lắc đều, lọc. Thêm vào dịch lọc 20mg ure (TT), đun sôi, để nguội. Thêm tiếp 20ml dung dịch kali iodid 10% (TT) và 0,5ml hồ tinh bột (CT). Dung dịch sẽ có màu xanh đen.

2.5- Định lượng:

2.5.1- Thuốc thử: Theo DDVN II, tập 3.

- Dung dịch acid nitric 30% (TT).
- Dung dịch acid nitric 3% (TT).
- Hydroxylamin hydroclorid (TT).
- Cyclohexan (TT).
- Selen kim loại (TT).
- Dung dịch diaminonaphthalen: hoà tan 100mg 2,3-diaminonaphthalen và 500mg hydroxylamin hydroclorid trong dung dịch acid hydrocloric 0,1N vừa đủ 100ml (dung dịch này được chuẩn bị để sử dụng trong ngày).


KIỂM NGHIỆM
ĐÃ THẨM ĐỊNH

2.5.2- Tiến hành:

- Dung dịch chuẩn gốc: Cân chính xác khoảng 40,0mg selen kim loại đã biết hàm lượng vào bình định mức dung tích 500ml, thêm 200ml dung dịch acid nitric 30% (TT), lắc kỹ để hoà tan (có thể làm nóng nhẹ trong cách thủy). Thêm nước vừa đủ đến vạch, lắc đều. Pha loãng 5ml dung dịch thu được thành 200ml bằng nước cất. Mỗi ml dung dịch chuẩn gốc chứa 2 μ g selen.

Dung dịch chuẩn: 5ml dung dịch chuẩn gốc, thêm 25ml dung dịch acid nitric 3% (TT) và 25ml nước cất.

Dung dịch thử: tiến hành đốt trong bình oxy (Hình 1) theo quy trình sau:

- Cân chính xác khoảng 12mg chế phẩm (tương ứng khoảng 10 μ g selen) và gói trong giấy lọc không tro theo hình 2 và kẹp vào đầu đốt ở nắp

- Cho vào bình đốt 25ml dung dịch acid nitric 3% (TT) làm chất hấp phụ và làm ẩm cổ bình bằng nước cất.

- Cho vòi oxy cao trên mực chất lỏng trong bình khoảng 2cm, thổi khí oxy đồng thời lắc trong 1 phút, sau đó đặt ngay bình bằng nút mài.

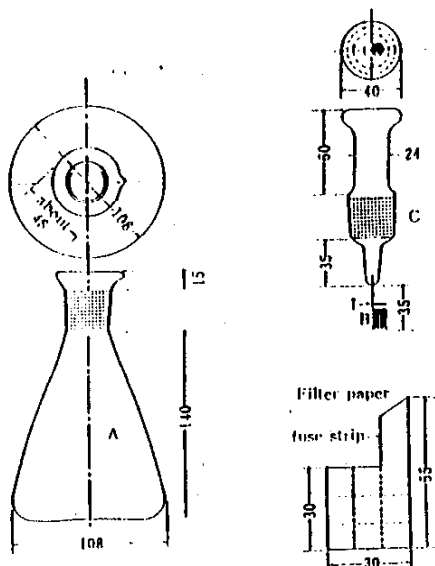
- Châm ngòi đốt và đặt ngay nắp bình thay nút mài, cố định nắp cẩn thận. Thêm nước vào vành Rim (để tạo seal).

- Sau khi quá trình cháy kết thúc, lắc mạnh để khói hấp phụ hết (khoảng 5 phút).

- Cho một lượng nhỏ nước vào Rim và nhấc nắp bình đốt ra (có thể làm nóng bình bằng cách đặt trong nồi cách thủy 60 $^{\circ}$ C vài phút để cân bằng áp suất trong và ngoài bình).

- Chuyển dung dịch vào cốc có mỏ dung tích 150ml, tráng rửa bình và nắp bằng nước cất 3 lần x 10ml, gộp các dịch rửa vào cốc.

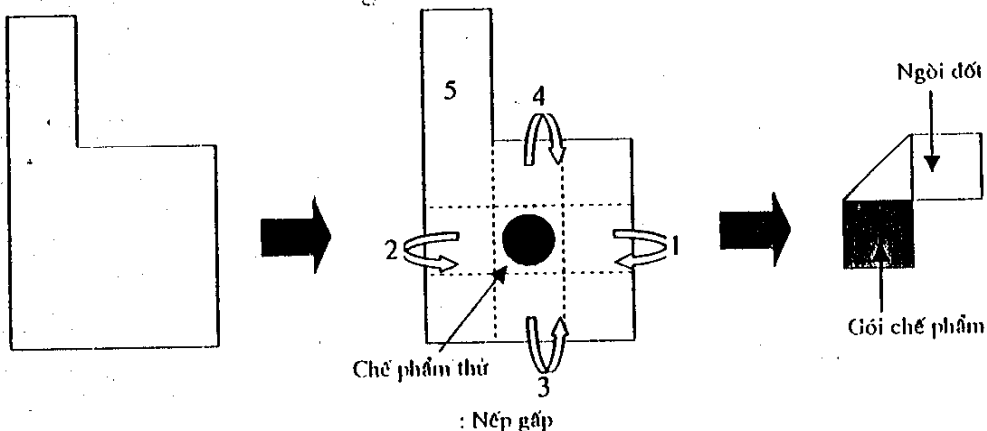
Dung dịch trắng: 25ml dung dịch acid nitric 3% (TT) và 30ml nước cất.



Hình 1: Bình đốt oxy.

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM
HÀ NỘI

TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM
HÀ NỘI



Hình 2: Cách gói chế phẩm để đốt trong bình oxy.


- Tiến hành phản ứng màu với các dung dịch trắng, chuẩn và thử như sau:
 - Thêm dung dịch amoniac 5M (TT) để điều chỉnh $\text{pH} = 2,0 \pm 0,2$ và pha loãng thành 60ml bằng nước cất. Chuyển các dung dịch vào các bình gạt riêng rẽ, tráng cốc bằng nước cất 2 lần x 10ml và gộp các dịch trắng vào bình gạt.
 - Thêm 400mg hydroxylamin hydroclorid, lắc để hoà tan và ngay lập tức thêm 10ml dung dịch diamionaphthalen, đậy nắp bình và lắc đều. Để yên ở nhiệt độ phòng 100 phút.
 - Thêm 10ml cyclohexan và lắc kỹ trong 2 phút.
 - Để lắng, loại bỏ lớp nước lấy lớp cyclohexan.
 - Đo mật độ quang của các dịch chiết cyclohexan thu được từ bình thử và chuẩn ở bước sóng 380nm, cốc đo dày 1cm với mẫu trắng là dịch cyclohexan từ bình trắng.

Hàm lượng (phần triệu) selen của chế phẩm được tính theo công thức:

$$X \text{ (ppm)} = \frac{D_T \times m_C \times 250 \times 100}{D_C \times m_T \times (100 - a)}$$

Trong đó:

- D_T ; D_C : Mật độ quang của mẫu thử và mẫu chuẩn.
- m_C : Khối lượng selen kim loại 100% pha dung dịch chuẩn gốc (g)
- m_T : Khối lượng chế phẩm thử (g).
- a : Độ ẩm của chế phẩm (%).


 VIỆN KỸ THUẬT
ĐÃ THĂM ĐỊNH

III- ĐÓNG GÓI, GHI NHÃN, BẢO QUẢN:

- Chế phẩm được đóng trong 2 lần túi P.E, hàn kín. Túi 01kg.
- Nhãn đúng quy chế.
- Bảo quản: nơi khô mát, tránh ánh sáng.
- Hạn dùng: 36 tháng.

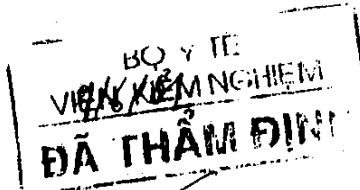
Hà Nội, ngày 18 tháng 4 năm 2004

GIÁM ĐỐC



GIÁM ĐỐC

TS. Phạm Văn Quý



VIỆN TRƯỞNG



PG.S.TS.

Phạm Văn Quý

BỘ Y TẾ
VIỆN KIỂM NGHIỆM

48 Hai Bà Trưng - Hà Nội
ĐT: 2.55471, 2 55341

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

PHIẾU KIỂM NGHIỆM

Kết quả kiểm nghiệm chỉ có giá trị với mẫu đem thử.

Số: 202 VKN - TCH

Mẫu để kiểm nghiệm: **Bioselen (Nguyên liệu)**
Nơi sản xuất: **Trung tâm NC và PT KHCN Dược**
Số lô, số ĐK, hạn dùng: **18. 3. 2001**
Người và nơi gửi mẫu: **NT**
Nơi lấy mẫu:
Yêu cầu KN: *(Ghi rõ số, ngày tháng, năm của công văn hay giấy tờ kèm theo)* **KTCL, xét duyệt TC.**
Ngày tháng năm nhận mẫu: **18/4/2001** Số đăng ký KN: **31 TCH 177.**
Người nhận mẫu: **Đỗ Thanh**
Thủ theo: **TCCS**
Tình trạng mẫu khi mở niêm phong để kiểm nghiệm:
Chế phẩm đóng trong 2 lần túi PE hàn kín. Trồng túi có nhãn viết tay rõ ràng.

YÊU CẦU

KẾT QUẢ

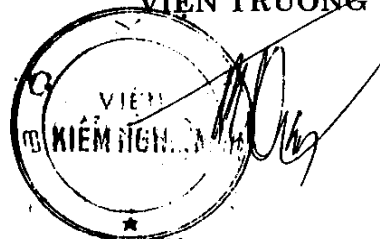
1. Tính chất: Phải đạt theo quy định.	Đạt
2. Thử tinh khiết:	
2.1. Tro sulphat: Không được quá 10,0%.	Đạt (6,4%)
2.2. Kim loại nặng: Không được quá 20 phần triệu.	Đạt
2.3. Muối selen hoà tan: Không được quá 20 phần triệu (tính theo selen).	Đạt
3. Mất khối lượng do sấy khô: Không được quá 8,0%.	Đạt(4,6%)
4. Định tính: Chế phẩm phải có phản ứng định tính của selen.	Đúng
5. Định lượng: Hàm lượng selen trong chế phẩm phải từ 400 - 600 phần triệu, tính theo chế phẩm khan.	Đạt (551,4 p.triệu)

Kết luận:

- Nhất trí với tiêu chuẩn cơ sở.
- Mẫu thử đạt yêu cầu chất lượng theo tiêu chuẩn cơ sở.

Hà Nội, ngày 31 tháng 5 năm 2001

VIỆN TRƯỞNG



PGS.TS. *Nguyễn Văn Sơn*

TÍNH CHẤT CHỐNG OXY HOÁ, CHỐNG VIÊM CỦA NẤM MEN GIÀU SELEN (BIOSELEN)

HOẠT TÍNH CHỐNG OXY HOÁ CỦA CÁC NẤM MEN (HTCO):

Để tiến hành xác định HTCO của các mẫu nấm men, chúng tôi tạo dịch chiết nước nấm men như sau:

Cân chính xác 1 gam nấm men, thêm 5ml H₂O. Đun sôi trong vòng 15 - 20 phút. Mỗi ống nghiệm lấy 0,5ml dịch chiết để tiến hành xác định HTCO invitro theo phương pháp của C.G. Blagdarov (1968) đã nêu. Kết quả nêu ở bảng A:

Bảng A. Hoạt tính chống oxy hoá invitro của các nấm men giàu selen

Lô TN	Số mẫu đo	Hàm lượng MDA ($1,56 \cdot 10^{-5}M$)		% HTCO
		Chứng	Thử	
1	11	$0,235 \pm 0,009$	$0,123 \pm 0,006$	47,7
2	8	$0,245 \pm 0,008$	$0,133 \pm 0,012$	45,8
3	10	$0,290 \pm 0,060$	$0,148 \pm 0,050$	48,9

Như vậy HTCO của các nấm men giàu selen đã chế tạo là khoảng 45 - 50%.

TÍNH CHẤT CHỐNG VIÊM CỦA NHỮNG NẤM MEN GIÀU SELEN:

Dùng phương pháp cấy những viên amian vào lưng của chuột ở 3 lô thí nghiệm:

- Lô 1: làm chứng (cấy sợi amian, nuôi bình thường).
- Lô 2: giống lô chứng nhưng cho uống nấm men có hàm lượng selen tương ứng với liều 20 µg/kg cân nặng/ngày.
- Lô 3: giống lô chứng và cho uống nấm men có hàm lượng selen tương ứng với liều 40 µg/kg cân nặng/ngày. Uống liên tục trong 5 ngày.

Sau 5 ngày, xác định khối lượng cân nặng các khối viên amian của 3 lô chuột. Kết quả trình bày ở bảng sau:

Bảng B.

TT	Khối lượng viên amian (gam)		
	Lô 1	Lô 2	Lô 3
1	34	17	22
2	25	15	16
3	29	18	18
4	47	23	17
5	22	28	13
6	24	15	15
7	41		

Xử lý thống kê, áp dụng công thức tính t (test student), chúng tôi có bảng sau:

Bảng C.

Lô TN	Số cá thể	Khối lượng trung bình	Độ lệch chuẩn	t	P
Lô chứng	7	31,7	± 3,6		
Lô 2	6	19,3	± 2,1	2,862	< 0,05
Lô 3	6	16,8	± 1,2	3,689	< 0,01

Từ kết quả ở bảng, cho thấy:

- Các năm men giàu selen có tác dụng làm giảm kích thước của khối viêm do amian gây ra rất rõ rệt.

- Với liều năm men có hàm lượng selen tương ứng với 20 µg/kg thể trọng, năm men có tác dụng làm giảm 39,2% (với P<0,05).

- Với liều năm men có hàm lượng selen tương ứng với 40 µg/kg thể trọng, đã có tác dụng làm giảm đi 47,0% (với P<0,01).

Như vậy, năm men giàu selen có tác dụng chống viêm.