

TIÊU CHUẨN NGÀNH

28TCN 157:2000

ĐỘC TỔ GÂY MẤT TRÍ NHỚ TRONG THỊT NHUYỄN THỂ HAI MẢNH VỎ - PHƯƠNG PHÁP
ĐỊNH LƯỢNG BẰNG SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

*Amnestic shellfish poisons (ASP) in bivalve mollusc flesh - Method for quantitative
analysis by high performance liquid chromatography*

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp xác định hàm lượng độc tố gây mất trí nhớ (sau đây gọi tắt là ASP) trong thịt nhuyễn thể hai mảnh vỏ bằng máy sắc ký lỏng hiệu năng cao (sau đây gọi tắt là HPLC). Giới hạn phát hiện của phương pháp nằm trong khoảng 0,2 ppm.

2 Phương pháp tham chiếu

Tiêu chuẩn xây dựng theo phương pháp chuẩn số 959.08 của Hiệp hội các nhà hoá học phân tích (AOAC) xuất bản năm 1995 và phương pháp nêu trong Sổ tay hướng dẫn số 33 của Ủy ban Hải dương học Quốc tế.

3 Nguyên tắc

Do khả năng hấp thụ ánh sáng tử ngoại, hàm lượng độc tố ASP (tính theo lượng axit domoic) trong thịt nhuyễn thể hai mảnh vỏ được xác định trên hệ thống HPLC dùng đầu dò tử ngoại khả kiến (sau đây gọi tắt là UV) ở bước sóng 242 nm theo phương pháp ngoại chuẩn.

4 Thiết bị, dụng cụ, hoá chất, chất chuẩn và dung dịch thử

4.1 Thiết bị, dụng cụ

4.1.1 Hệ thống HPLC với đầu dò UV.

4.1.2 Cột sắc ký loại RP C18, kích thước L x id là 25 cm x 4,6 mm có chứa hạt silica gel đường kính 5 - 10 m m.

4.1.3 Màn lọc mao quản kích thước 0,45 m m.

4.1.4 Rây cỡ số 5.

4.1.5 Máy nghiền đồng thể tốc độ 10 000 vòng/phút.

4.1.6 Cân phân tích có độ chính xác 0,0001 g.

4.1.7 Máy ly tâm tốc độ 5 000 vòng/phút.

4.1.8 Máy siêu âm.

4.1.9 Cột trao đổi anion SAX, dung tích 3 ml chứa khoảng 500 mg hạt silica gel đã được hoạt hoá với silan amon bậc 4, LC-8.

4.2 Hoá chất, chất chuẩn

4.2.1 Nước cất loại dùng cho HPLC.

4.2.2 Axetonitril loại dùng cho HPLC.

4.2.3 Methanol loại dùng cho HPLC.

4.2.4 Axit clohydric loại dùng cho phân tích.

4.2.5 Axit trifloaxetic (sau đây gọi tắt là TFA) loại tinh khiết quang học.

4.2.6 Axit citric ngậm 1 phân tử nước, loại dùng cho phân tích.

4.2.7 Tri amon citric loại dùng cho phân tích.

4.2.8 Axit domoic chuẩn độ tinh khiết 98 %.

4.2.9 Mẫu thịt nhuyễn thể hai mảnh vỏ chuẩn, khối lượng 100m g/g.

4.3 Dung dịch thử

4.3.1 Pha động của HPLC

Pha 100 ml axetonitril với khoảng 400 ml nước cất, sau đó cho thêm 1,0 ml TFA và định mức đến 1000 ml bằng nước cất. Loại bỏ khí hoà tan trong pha động bằng cách để trong máy siêu âm khoảng 10 phút.

4.3.2 Dung môi chiết: Pha hỗn hợp nước và methanol theo tỷ lệ 1:1 về thể tích.

4.3.3 Dung dịch đệm muối citrat, 0,5 M, pH 3,2

Hoà tan 40,4 g axit citric và 14,0 g triamon citric với 400 ml nước cất. Sau đó, thêm 50 ml axetonitril và định mức đến 500 ml bằng nước cất.

4.3.4 Các dung dịch chuẩn

Pha chính xác axit domoic chuẩn thành các dung dịch chuẩn có nồng độ từ 0,1 - 10 m g/ml bằng hỗn hợp dung dịch axetonitril và nước theo tỷ lệ 1:10 về thể tích.

5 Phương pháp tiến hành

5.1 Chuẩn bị mẫu

5.1.1 Rửa sạch vỏ của nhuyễn thể trước khi mở để lấy thịt. Rửa nhanh thịt nhuyễn thể trong nước cất để loại bỏ cát sạn và các tạp chất khác. Khi lấy, phải tránh làm dập nát thịt nhuyễn thể.

5.1.2 Cân khoảng 150 g thịt nhuyễn thể và cho lên rây cỡ số 5, để yên trong 5 phút để loại bỏ hết nước. Sau đó, mẫu được nghiền trong máy nghiền đồng thể cho đến khi đồng nhất hoàn toàn.

5.2 Tách chiết độc tố từ mẫu thử

5.2.1 Phương pháp tách chiết ASP cùng với độc tố gây liệt cơ (theo AOAC - 1995)

5.2.1.1 Cân khoảng 100,0 g thịt nhuyễn thể đã được đồng nhất hoá theo Điều 5.1.2 vào một cốc dung tích 500 ml. Thêm 100 ml axit clohydric nồng độ 0,1 N rồi khuấy đều và kiểm tra độ pH bằng giấy đo pH hoặc pH kế. Độ pH phải nhỏ hơn 4, tốt nhất là 3. Điều chỉnh pH nếu cần thiết theo qui định tại Điều 5.2.1.2.

5.2.1.2 Điều chỉnh độ pH

a. Giảm độ pH bằng cách thêm từng giọt axit clohydric nồng độ 5 N rồi khuấy đều.

b. Tăng độ pH bằng cách cho thêm từng giọt dung dịch hydroxit natri nồng độ 0,1 N. Khi thêm hydroxit natri, phải khuấy mạnh và liên tục để tránh hiện tượng kiềm hoá cục bộ.

5.2.1.3 Đun sôi hỗn hợp trong 5 phút, sau đó để nguội đến nhiệt độ trong phòng. Kiểm tra lại độ pH của hỗn hợp và điều chỉnh độ pH đến khoảng từ 2 đến 4 (chú ý pH không được vượt quá 4,5).

5.2.1.4 Chuyển hỗn hợp sang ống đong dung tích 250 ml rồi thêm nước tới vạch 200 ml. Sau đó, hỗn hợp được ly tâm với tốc độ 3000 vòng/phút trong thời gian 10 phút. Lọc lớp nước trong phía trên qua màng lọc (4.1.3). Dung dịch trong sau khi qua lọc được bơm vào HPLC.

Chú thích:

1. Quá trình chiết độc tố và phân tích trên hệ thống HPLC phải được thực hiện trong vòng 24 giờ.
2. Phương pháp này đơn giản nhưng độ chính xác không cao, vì axit domoic đã bị phân hủy một phần trong môi trường axit và chỉ được sử dụng trong trường hợp hàm lượng axit domoic nhỏ hơn 5 ppm. Khi hàm lượng axit domoic lớn hơn 5 ppm, phải kiểm chứng lại bằng phương pháp Quilliam dưới đây.

5.2.2 Phương pháp Quilliam: Tách chiết bằng hỗn hợp methanol và nước theo IOC-1995

5.2.2.1 Cân khoảng 4,0 g mẫu đã được đồng nhất hoá theo Điều 5.1.2 cho vào một ống ly tâm. Thêm 16,0 ml dung môi chiết methanol và nước (4.3.2).

5.2.2.2 Đồng nhất hoá hỗn hợp bằng máy nghiền đồng thể với tốc độ 10 000 vòng/phút trong thời gian 3 phút. Sau đó, hỗn hợp được ly tâm với tốc độ 3 000 vòng/phút trong thời gian 10 phút. Lọc lớp nước trong phía trên qua màng lọc (4.1.3). Dung dịch trong sau khi qua lọc được tinh chế theo phương pháp qui định tại Điều 5.3.

5.3 Tinh chế dung dịch chiết

5.3.1 Điều kiện hoá cột SAX

Cho lần lượt 6,0 ml methanol, 3,0 ml nước và 3,0 ml hỗn hợp methanol và nước theo tỷ lệ 1:1 về thể tích qua cột SAX. Sau khi điều kiện hoá cột phải giữ mức dung môi trong cột cao hơn mặt trên của phần nhồi cột.

5.3.2 Tinh sạch dịch chiết

5.3.2.1 Cho 5,0 ml dung dịch chiết đã qua lọc ở Điều 5.2.2 chảy từ từ qua cột SAX đã được hoạt hoá với tốc độ chảy khoảng 1 giọt/giây. Loại bỏ dịch qua cột.

5.3.2.2 Cho 5,0 ml hỗn hợp axetonitril và nước theo tỷ lệ 1:9 về thể tích đi qua cột với tốc độ 1 giọt/giây. Thêm 0,5 ml dung dịch đệm muối citrat (4.3.3) khi mức dung dịch rửa xuống gần bề mặt gel của cột. Loại bỏ dịch qua cột.

5.3.3 Thu hồi độc tố

Cho 2 ml dung dịch đệm muối citrat đi qua cột và hứng dung dịch chảy qua cột SAX bằng ống đong dung tích 2 ml cho tới vạch định mức. Dung dịch chiết thu được để phân tích trên HPLC.

Chú thích: Không được để khô cột trong quá trình tinh chế dung dịch chiết.

5.4 Phân tích độc tố trên HPLC

5.4.1 Điều kiện phân tích

- a. Cột sắc ký HPLC;
- b. Pha động;
- c. Chế độ đẳng nhiệt ở 40 °C;
- d. Tốc độ dòng trong khoảng từ 1,0 đến 1,5 ml/phút;
- đ. Thể tích mỗi lần bơm là 20 µl;
- e. Bước sóng cài đặt cho đầu dò UV là 242 nm.

5.4.2 Qui trình phân tích

5.4.2.1 Bơm các dung dịch axit domoic chuẩn nồng độ từ 0,1 đến 10,0 µg/ml vào HPLC và xây dựng đường chuẩn dựa trên độ hấp thụ của dung dịch chuẩn. Nếu đường chuẩn có độ tuyến tính tốt và đi qua gốc tọa độ thì trong các lần phân tích sau này, chỉ sử dụng 1 dung dịch chuẩn có hàm lượng gần với hàm lượng có trong mẫu. Đường chuẩn lúc này được xây dựng từ độ hấp thụ của dung dịch sử dụng và gốc tọa độ.

5.4.2.2 Bơm các dịch chiết thu được vào HPLC. Mỗi dịch chiết được bơm 2 lần và xác định độ hấp thụ trung bình cho mỗi dịch chiết.

5.4.2.3 Bơm các dung dịch chuẩn vào HPLC với tần số 2 giờ bơm 1 lần.

5.5 Yêu cầu về độ tin cậy của phép phân tích

1. Độ lặp lại của 2 lần bơm

Độ lệch chuẩn (CVs) tính theo độ hấp thụ của 2 lần bơm liên tiếp của cùng một dịch chuẩn phải nhỏ hơn 0,5 %.

2. Độ thu hồi (R)

Độ thu hồi được xác định bằng cách sử dụng 5 mẫu chuẩn đã biết chính xác hàm lượng độc tố ASP. Độ thu hồi tính được phải nằm trong khoảng từ 85 % đến 115 %, độ thu hồi trung bình phải lớn hơn 90 %.

6 Tính kết quả

Hàm lượng ASP (axit domoic) trong mẫu thử thịt nhuyễn thể hai mảnh vỏ được tính theo công thức sau:

$$C_{ASP} = \frac{A_S}{A_C} \times C_C \times F$$

Trong đó:

- C_{ASP} là hàm lượng của độc tố ASP có trong mẫu thử (m g/g thịt);
- A_S là độ hấp thụ trung bình của dung dịch mẫu thử tính theo diện tích pic;
- A_C là độ hấp thụ trung bình của dung dịch chuẩn có nồng độ là C_C , tính theo diện tích pic;
- C_C là nồng độ của dung dịch chuẩn (m g/ml);
- W_S là khối lượng của mẫu thử (g);
- F là hệ số pha loãng dịch chiết trước khi bơm vào HPLC.