

TIÊU CHUẨN NGÀNH

28TCN 158:2000

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

Diarrhetic shellfish poisons (DSP) in bivalve molluscs 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 tiêu chảy (sau đây gọi tắt là DSP) trong thịt nhuyễn thể 2 mảnh vỏ bằng máy sắc ký lỏng hiệu năng cao (sau đây gọi tắt là HPLC).

2 Phương pháp tham chiếu

Tiêu chuẩn xây dựng theo phương pháp nêu trong Sổ tay hướng dẫn số 33 của Ủy ban Hải dương học Quốc tế.

3 Nguyên tắc

Độc tố DSP trong thịt nhuyễn thể hai mảnh vỏ ở các dạng dẫn xuất axit okadeic (OA), dinophysistoxin-1 (DTX-1) và dinophysistoxin-2 (DTX-2) chứa nhóm chức carboxyl, được chuyển sang dạng huỳnh quang bằng phản ứng ester hoá với 9-anthryl-diazomethan (ADAM) và được định lượng trên hệ thống HPLC dùng đầu dò huỳnh quang.

4 Thiết bị, dụng cụ, hoá chất và chất chuẩn

4.1 Thiết bị và dụng cụ

4.1.1 Hệ thống HPLC với đầu dò huỳnh quang.

4.1.2 Cột sắc ký kích thước L x id là 25 cm x 4,6 mm, có chứa hạt RP-18 octadecylsilica đường kính 5 m m.

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

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

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

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

4.1.7 Máy siêu âm

4.1.8 Cột tách chiết lỏng rắn (sau đây gọi tắt là cột SPE), dung tích 7ml chứa hạt silica gel đường kính 40m m.

4.1.9 Lọ thuỷ tinh màu nâu nhỏ, dung tích 1,5 ml, có nút xoáy và vòng đệm bằng nhựa teflon, đã được rửa kỹ bằng axeton và sấy khô qua đêm trong tủ sấy ở nhiệt độ 70°C.

4.1.10 Micropipete có thang đo từ 10 ml đến 1000 ml.

4.2 Hoá chất và 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 Hexan loại dùng cho HPLC

4.2.5 Ethanol khan loại dùng cho phân tích

4.2.6 Diethyl ete loại dùng cho phân tích

4.2.7 Clorofom loại dùng cho phân tích

4.2.8 Alumin đã được hoạt hoá ở nhiệt độ 450° C qua đêm.

4.2.9 Hạt silica gel đường kính 40m m đã sấy ở nhiệt độ 130° C không ít hơn 24 giờ.

4.2.10 9-anthryl-diazomethan chứa trong lọ thuỷ tinh nhỏ màu nâu, mỗi lọ chứa 2 mg ADAM được bảo quản ở nhiệt độ - 80° C.

4.2.11 Axit 7-O- axetyl okadaic chuẩn (sau đây gọi tắt là AcOA).

4.2.12 Axit deoxycolic (sau đây gọi tắt là DCA) chuẩn, độ tinh khiết 98 %.

4.2.13 Axit okadaic chuẩn (sau đây gọi tắt là OA).

4.2.14 Mẫu thịt nhuyễn thể hai mảnh vỏ chuẩn đã biết hàm lượng DSP.

4.3 Dung dịch thử

4.3.1 Dung dịch ADAM

Hoà tan 2 mg ADAM trong 1 ml methanol dưới ánh sáng vàng và bảo quản trong tối ở nhiệt độ - 80° C. Chú ý, chỉ chuẩn bị và sử dụng dung dịch ADAM trong vòng 24 giờ.

4.3.2 Dung dịch AcOA: Hoà tan 100 mg AcOA trong 1 ml methanol.

4.3.3 Dung dịch DCA: Hoà tan 3,5 mg DCA trong 100 ml methanol.

4.3.4 Dung dịch OA

Pha chính xác dung dịch chất chuẩn OA trong methanol thành các dung dịch có nồng độ lần lượt là 1,0; 2,5; 5,0 và 12,5 mg/ml.

4.3.5 Dung dịch chuẩn

Cho chính xác 400 ml của một trong các loại nồng độ dung dịch OA (4.3.4) với 140 ml dung dịch DCA (4.3.3), 50 ml dung dịch AcOA (4.3.2) và 110 ml methanol vào một lọ thuỷ tinh nhỏ màu nâu. Nếu không có dung dịch AcOA, có thể thay bằng 50 ml methanol.

4.3.6 Dung dịch clorofom có chứa 1,15 % ethanol

Cho 50 g alumin hoạt hoá vào trong một cột thuỷ tinh khô (kích thước L x id là 35 cm x 21 mm) có khoá chặn bằng nhựa teflon. Rót clorofom qua cột rồi loại bỏ 10 ml clorofom ban đầu qua cột. Hứng lấy 50 ml clorofom tiếp theo vào trong bình định mức dung tích 50 ml có chứa sẵn 575 ml ethanol khan.

5 Phương pháp tiến hành

5.1 Chuẩn bị mẫu

5.1.1 Rửa sạch vỏ 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 chính xác một lượng thịt nhuyễn thể (ký hiệu là W_1) sao cho có được khối lượng phần nội tạng khoảng 20g. Tách phần nội tạng của nhuyễn thể ra cho lên rây cỡ số 5 rồi để yên trong 5 phút để loại bỏ hết nước. Cân chính xác lượng nội tạng này (ký hiệu là W_2). 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 Cân chính xác khoảng 2,0 g nội tạng nhuyễn thể (ký hiệu là W_3) đã được đồng nhất hoá theo Điều 5.1.2 cho vào một ống ly tâm có dung tích 50 ml. Thêm chính xác vào ống 114 ml dung dịch AcOA và 7,886 ml hỗn hợp dung dịch methanol và nước theo tỷ lệ 80:20 về thể tích. Nếu không có dung dịch AcOA thì cho vào ống ly tâm lượng chính xác 8,0 ml hỗn hợp dung dịch methanol và nước theo tỷ lệ 80: 20 về thể tích.

5.2.2 Đồng nhất hoá hỗn hợp trong ống bằng máy nghiền đồng thể với tốc độ từ 6 000 đến 10 000 vòng/phút trong 3 phút. Sau đó, đặt ống ly tâm vào bể nước của máy siêu âm khoảng 10

phút. Ly tâm hỗn hợp với tốc độ 5 000 vòng/phút trong 10 phút rồi gạn phần dung dịch trong ống sang một lọ thủy tinh nhỏ màu nâu.

5.3 Tinh chế dung dịch chiết

5.3.1 Cho chính xác 5,0 ml dung dịch đã chuẩn bị theo Điều 5.2.2 vào một ống ly tâm dung tích 15 ml. Tiến hành chiết 2 lần với n-hexan (mỗi lần cho vào 5 ml và lắc mạnh trong khoảng 30 giây), sau đó loại bỏ lớp n-hexan.

5.3.2 Thêm 1 ml nước và 6 ml clorofom vào ống ly tâm. Lắc mạnh ống trong khoảng 30 giây để trộn đều. Chuyển lớp clorofom ở phía dưới vào một ống nghiệm dung tích 50 ml.

5.3.3 Lớp dung dịch còn lại trong ống ly tâm được tách chiết lần nữa với 6 ml clorofom rồi tiếp tục chuyển lớp clorofom này vào ống nghiệm nói trên.

5.3.4 Làm bay hơi dung dịch trong ống nghiệm có clorofom đến khô bằng dòng khí nitơ. Hoà tan cặn còn lại bằng cách cho 200 ml dung dịch DCA và 800 ml methanol vào trong ống rồi lắc đều. Chuyển dung dịch trong ống nghiệm vào một lọ thủy tinh nhỏ màu nâu.

5.4 Tạo dẫn xuất huỳnh quang với ADAM

5.4.1 Chuẩn bị 3 lọ thủy tinh nhỏ màu nâu. Sau đó, cho 35,0 ml dung dịch đã chuẩn bị theo Điều 5.3.4 vào lọ thứ nhất (mẫu thử), 35,0 ml dung dịch chuẩn (4.3.5) vào lọ thứ hai (mẫu chuẩn) và 35,0 ml methanol vào lọ thứ ba (mẫu trắng). Cho thêm vào mỗi lọ 100 ml dung dịch ADAM (chú ý: phải sử dụng ánh sáng vàng trong giai đoạn này để tránh ADAM bị phân hủy). Đậy chặt các lọ và để trong bể nước của máy siêu âm ở nhiệt độ khoảng 37° C trong 10 phút. Sau đó, tiếp tục lưu giữ các lọ ở nhiệt độ 37° C trong bóng tối với thời gian 2 giờ.

5.4.2 Làm khô dung môi trong các lọ thủy tinh bằng dòng khí nitơ hay máy ly tâm chân không. Hoà tan cặn trong các lọ bằng 300 ml hỗn hợp dung dịch clorofom và n-hexan theo tỷ lệ 1:1 về thể tích.

5.5 Tinh chế dẫn xuất bằng cột SPE

5.5.1 Hoạt hoá cột SPE

Cho lần lượt 6 ml clorofom và 3ml hỗn hợp dung dịch clorofom và n-hexan theo tỷ lệ 1:1 về thể tích đi qua cột SPE. Không được để cột khô trong quá trình hoạt hoá. Sau khi hoạt hoá, phải giữ mức dung môi trong cột cao hơn mặt gel của cột nhồi.

5.5.2 Tinh chế dẫn xuất ADAM

5.5.2.1 Cho dung dịch dẫn xuất ADAM đã chuẩn bị theo Điều 5.4.2 qua cột SPE đã chuẩn bị theo Điều 5.5.1 với tốc độ 1 giọt/giây. Loại bỏ dung dịch đi qua cột.

5.5.2.2 Rửa cột lần lượt bằng 5 ml hỗn hợp dung dịch clorofom và n-hexan theo tỷ lệ 1:1 về thể tích và 5 ml clorofom chứa 1,15 % ethanol (4.3.6). Loại bỏ dung dịch rửa đi qua cột.

5.5.3 Thu hồi dẫn xuất ADAM

Cho 5ml hỗn hợp dung dịch methanol và clorofom theo tỷ lệ 1:9 về thể tích qua cột SPE rồi hứng lấy dung dịch đi qua cột. Làm khô dung dịch thu được bằng dòng khí nitơ. Hoà tan cặn trong 500 ml methanol và đem phân tích trên HPLC.

5.6 Phân tích độc tố trên HPLC

5.6.1 Điều kiện phân tích

- a. Cột sắc ký HPLC;
- b. Pha động: hỗn hợp dung dịch acetonitril và nước theo tỷ lệ 8:2 về thể tích;
- c. Chế độ đẳng nhiệt ở 40° C;
- d. Tốc độ dòng 1,0 ml/phút;
- đ. Thể tích mỗi lần bơm là 10 ml;

e. Bước sóng cài đặt cho đầu dò huỳnh quang: Ex: 254 nm và Em: 410 nm.

5.6.2 Quy trình phân tích

5.6.2.1 Bơm các dẫn xuất ADAM của các dung dịch DSP chuẩn đã chuẩn bị theo Điều 5.5 vào HPLC và xây dựng đường chuẩn dựa trên độ hấp thụ nhận được theo diện tích pic. 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 DSP gần với hàm lượng có trong mẫu thử. Đường chuẩn lúc này được xây dựng từ độ hấp thụ của dung dịch sử dụng và gốc tọa độ.

5.6.2.2 Bơm các dẫn xuất ADAM của mẫu thử và mẫu trắng đã chuẩn bị theo các Điều 5.4 và 5.5 vào HPLC. Mỗi mẫu được bơm 2 lần. Tính độ hấp thụ trung bình cho mỗi mẫu theo diện tích pic sau khi đã trừ đi độ hấp thụ của mẫu trắng.

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

5.7 Yêu cầu về độ tin cậy của phép phân tích

5.7.1 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%.

5.7.2 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 DSP. 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 độc tố DSP (OA hoặc DTX-1 hoặc DTX-2) trong mẫu thử thịt nhuyễn thể hai mảnh vỏ được tính theo công thức sau:

6.1 Trong trường hợp có sử dụng AcOA

$$C_{DSP} = 2 \times x \times x$$

6.2 Trong trường hợp không sử dụng AcOA

$$C_{DSP} = 2 \times x \times x$$

Trong đó:

- C_{DSP} là hàm lượng của một loại độc tố DSP có trong mẫu thử (m g/g thịt);
- A_S là độ hấp thụ trung bình của độc tố có trong mẫu thử, tính theo diện tích pic;
- A_C là độ hấp thụ trung bình của độc tố có trong dung dịch chuẩn nồng độ là C_C , tính theo diện tích pic;
- A_{IS} là độ hấp thụ trung bình của AcOA có trong dung dịch mẫu thử, tính theo diện tích pic;
- A_{IC} là độ hấp thụ trung bình của AcOA có trong dung dịch chuẩn, tính theo diện tích pic;
- W_1 là khối lượng mẫu thử thịt nhuyễn thể (g);
- W_2 là khối lượng phần nội tạng thu được từ W_1 (g) thịt nhuyễn thể;
- W_3 là khối lượng phần nội tạng của nhuyễn thể lấy để phân tích (g);
- C_C là nồng độ của độc tố cần xác định trong dung dịch chuẩn (m g/ml).