

TIÊU CHUẨN NGÀNH

28TCN 159:2000

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

Paralytic shellfish poisons (PSP) 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 liệt cơ (sau đây gọi tắt là PSP) 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 1 mg/100g.

2 Phương pháp tham chiếu

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

3 Nguyên tắc

3.1 Độc tố PSP trong thịt nhuyễn thể hai mảnh vỏ gồm có các thành phần sau:

- Saxitoxin (ký hiệu là STX), neosaxitoxin (ký hiệu là neoSTX), decarbamoylsaxitoxin (ký hiệu là dcSTX);
- Các hợp chất thuộc nhóm gonyautoxin (gồm có các chất có ký hiệu từ GTX1 đến GTX6);
- Các hợp chất thuộc nhóm N-sulforcarbamoyl-11-hydroxysulfat (gồm các chất có ký hiệu từ C1 đến C4);
- Các hợp chất nhóm decarbamoylgonyautoxin (gồm các chất có ký hiệu là dcGTX1 đến dcGTX4);

3.2 Các hợp chất trên không có tính huỳnh quang và không hấp thụ ánh sáng tử ngoại. Nhưng khi bị oxy hoá trong môi trường kiềm bởi axit periodic sẽ tạo thành dẫn xuất có tính huỳnh quang và có thể đo dễ dàng với đầu dò huỳnh quang.

Để có thể xác định riêng các hợp chất nhóm C (gồm có các chất có ký hiệu là C1, C2, C3 và C4) phải thực hiện thêm quá trình thủy giải dịch chiết bằng axit clohydric nồng độ 0,1N trước khi đưa vào hệ thống HPLC. Sau quá trình thủy giải, các hợp chất C1 sẽ chuyển đổi thành GTX2, C2 sẽ chuyển đổi thành GTX3. So sánh sắc ký đồ của dịch chiết trước và sau khi thủy giải để xác định hàm lượng của C1, C2.

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

4.1 Thiết bị và dụng cụ

4.1.1 Hệ thống HPLC với đầu dò huỳnh quang có độ nhạy cao.

4.1.2 Cột sắc ký loại RP C8, kích thước L x id là 150 mm x 4,6 mm có chứa hạt silica gel.

4.1.3 Hệ thống phản ứng sau cột gắn ngay sau cột sắc ký: Xem sơ đồ cách lắp đặt hệ thống phản ứng sau cột theo Hình 1.

4.1.4 Màng lọc mao quản kích thước 0,45 µm.

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 Micropipet có thang đo từ 10 µl đến 1000 µl.

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 Tetrahydrofuran loại dùng cho HPLC.

4.2.4 Axit octanesulfonic loại dùng cho phân tích.

4.2.5 Axit axetic băng loại dùng cho phân tích.

4.2.6 Axit clohydric loại dùng cho phân tích.

4.2.7 Muối axetat natri khan.

4.2.8 Axit periodic dạng tinh thể ngậm 2 phân tử nước ($\text{HIO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), loại dùng cho phân tích.

4.2.9 Axit phosphoric đậm đặc loại dùng cho phân tích, độ tinh khiết 98%.

4.2.10 Các dung dịch chuẩn STX, NEO, GTX1, GTX2, GTX3, GTX4, dcGTX2, dcGTX3, dcSTX và các dung dịch được pha chính xác có nồng độ từ 0,1 đến 1 mg/ml.

4.2.11 Mẫu thịt nhuyễn thể hai mảnh vỏ chuẩn đã biết hàm lượng PSP.

4.3 Dung dịch thử

4.3.1 Pha động HPLC

4.3.1.1 Pha động 1: 98,5 % dung dịch chứa muối octanesulfonat natri nồng độ 11 mM, axit phosphoric nồng độ 40 mM đã được chỉnh pH về 6,9 với hydroxit amon (NH_4OH) và 1,5 % tetrahydrofuran.

4.3.1.2 Pha động 2: 83,5 % dung dịch chứa muối octanesulfonat natri nồng độ 11 mM, axit phosphoric nồng độ 40mM đã được chỉnh pH về 6,9 với hydroxit amon), 15,0 % acetonitrile và 1,5 % tetrahydrofuran.

4.3.1.3 Pha động 3: 98,5 % dung dịch axit phosphoric nồng độ 40mM đã được chỉnh pH về 6,9 với hydroxit amon và 1,5 % tetrahydrofuran.

4.3.2 Tác nhân oxi hoá trong hệ thống phản ứng sau cột: Dung dịch chứa axit periodic nồng độ 10mM và hydroxit amon 550 mM.

4.3.3 Tác nhân axit hoá trong hệ thống phản ứng sau cột: Axit axetic nồng độ 1 M.

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 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 và thủy giải độc tố từ mẫu thử

5.2.1 Tách chiết

5.2.1.1 Cân chính xác 1,0 g mẫu thịt nhuyễn thể đã được đồng nhất vào một ống ly tâm dung tích 15 ml. Thêm 1,0 ml axit axetic nồng độ 0,03 N vào ống rồi đặt vào máy siêu âm. Sau đó, ly tâm với tốc độ 5 000 vòng/phút trong thời gian 10 phút rồi lọc lấy dịch trên màng lọc mao quản.

5.2.1.2 Để kiểm tra độ thu hồi của phương pháp, sử dụng 1 g mẫu thịt nhuyễn thể chuẩn và thực hiện qui trình giống như với mẫu thử.

5.2.2 Thủy giải các độc tố thuộc nhóm N-sulfocarbamoyl

Các độc tố thuộc nhóm C được thủy giải bằng cách đun nóng 150 ml của dung dịch chiết đã chuẩn bị theo Điều 5.2.1 với 37 ml axit clohydric nồng độ 1,0 N ở nhiệt độ 90°C trong 15 phút. Sau khi làm nguội hỗn hợp đến nhiệt độ trong phòng, thêm 75 ml dung dịch muối axetat natri (CH_3COONa) nồng độ 1N rồi đưa phân tích trên hệ thống HPLC.

5.3 Phân tích độc tố trên HPLC

5.3.1 Điều kiện phân tích

- Cột sắc ký HPLC;
- Chế độ gradient theo qui định trong Bảng 1;
- Tốc độ dòng 1,2 ml/phút;
- Thể tích mỗi lần bơm là 10 ml;
- Bước sóng cài đặt cho đầu dò huỳnh quang: Ex: 330 nm và Em: 395 nm.

5.3.2 Điều kiện trong hệ thống phản ứng sau cột

- Tác nhân oxy hoá: Đặt tốc độ dòng là 0,3 ml/phút;
- Nhiệt độ phản ứng trong ống teflon thể tích 1 ml là 50 °C;
- Tác nhân axit hoá: Đặt tốc độ dòng là 0,4 ml/phút.

Bảng 1 - Chế độ gradient

Thời gian (phút)	Pha động 1 (%)	Pha động 2 (%)	Pha động 3 (%)
0	50	0	50
10	50	0	50
12	0	100	0
35	0	100	0
36	100	0	0
47	100	0	0
48	50	0	50
57	50	0	50

5.3.3 Qui trình phân tích

5.3.3.1 Bơm các dung dịch PSP chuẩn nồng độ từ 0,1 đến 1m g/ml vào HPLC. Xây dựng đường chuẩn dựa trên độ hấp thụ nhận được. 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 PSP 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.

5.3.3.2 Bơm các dung dịch mẫu đã chuẩn bị theo Điều 5.2 vào HPLC. Mỗi dung dịch mẫu được bơm 2 lần. Tính độ hấp thụ trung bình cho mỗi dung dịch mẫu theo diện tích pic tương ứng.

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

5.4 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 PSP. 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

6.1 Hàm lượng của từng loại độc tố PSP (ngoại trừ độc tố nhóm C) trong mẫu thử nhuyễn thể hai mảnh vỏ được tính theo công thức sau:

$$C_{PSP} = 2 \times x \times x \times F$$

Trong đó:

- C_{PSP} là hàm lượng của độc tố PSP có trong mẫu thử (m g/100g 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 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 của dung dịch mẫu thử trước khi đưa vào HPLC.

6.2 Hàm lượng độc tố PSP nhóm C

Hàm lượng độc tố C_1 = Hàm lượng độc tố GTx_2 (sau quá trình thủy giải) - **Hàm lượng độc tố GTx_2** (trước quá trình thủy giải).

Hàm lượng độc tố C_2 = Hàm lượng độc tố GTx_3 (sau quá trình thủy giải) - **Hàm lượng độc tố GTx_3** (trước quá trình thủy giải).

6.3 Hàm lượng độc tố PSP tổng cộng trong thịt nhuyễn thể hai mảnh vỏ bằng tổng hàm lượng của các loại độc tố đã định lượng được.