

BỘ THỦY SẢN**QUYẾT ĐỊNH của Bộ trưởng Bộ Thủy sản số 03/2004/QĐ-BTS ngày 01/3/2004 về việc ban hành Tiêu chuẩn cấp Ngành.****BỘ TRƯỞNG BỘ THỦY SẢN**

Căn cứ Nghị định số 43/2003/NĐ-CP ngày 02 tháng 5 năm 2003 của Chính phủ quy định chức năng, nhiệm vụ, quyền hạn và cơ cấu tổ chức của Bộ Thủy sản;

Theo đề nghị của Vụ trưởng Vụ Khoa học, Công nghệ,

QUYẾT ĐỊNH:

Điều 1. Ban hành kèm theo Quyết định này 08 Tiêu chuẩn cấp Ngành sau đây:

1. 28 TCN194:2004: Các chất chuyển hóa thuộc nhóm Nitrofurán trong thủy sản và sản phẩm thủy sản - Phương pháp định lượng bằng sắc ký lỏng khối phổ - khối phổ.
2. 28 TCN195:2004: Thuốc trừ sâu gốc Phospho hữu cơ trong thủy sản và sản phẩm thủy sản - Phương pháp định lượng bằng sắc ký khí.
3. 28 TCN196:2004: Sulfonamid trong

sản phẩm thủy sản - Phương pháp định lượng bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao.

4. 28 TCN197:2004: Penicillin trong sản phẩm thủy sản - Phương pháp định lượng bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao.

5. 28 TCN198:2004: Histamin trong sản phẩm thủy sản - Phương pháp định lượng bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao.

6. 28 TCN199:2004: Salmonella trong sản phẩm thủy sản - Phương pháp định tính bằng kỹ thuật Polymerase Chain Reaction.

7. 28 TCN200:2004: Vibrio cholerae trong sản phẩm thủy sản - Phương pháp định tính.

8. 28 TCN201:2004: Sản phẩm thủy sản đông lạnh - Còi điệp.

Điều 2. Các tiêu chuẩn có hiệu lực thực hiện sau 15 ngày, kể từ ngày đăng Công báo với hình thức áp dụng như sau:

- Khuyến khích áp dụng 07 tiêu chuẩn về các phương pháp kiểm tra cho các phòng kiểm nghiệm khi tiến hành kiểm tra chất lượng hàng thủy sản.

- Khuyến khích áp dụng Tiêu chuẩn 28TCN 201:2004 cho các cơ sở chế biến thủy sản đông lạnh. Riêng chỉ tiêu vi sinh (Điều 4.6) là phải bắt buộc áp dụng.

Điều 3. Chánh Văn phòng Bộ; Thủ trưởng các Vụ, Cục; Chánh Thanh tra Bộ; Giám đốc các Sở Thủy sản, Sở Nông nghiệp và Phát triển nông thôn có quản

lý thủy sản; Thủ trưởng các đơn vị có phòng kiểm nghiệm và Giám đốc các cơ sở chế biến nói tại Điều 2 chịu trách nhiệm thi hành Quyết định này./.

KT. BỘ TRƯỞNG BỘ THỦY SẢN

Thủ trưởng

Nguyễn Việt Thắng

TIÊU CHUẨN NGÀNH 28 TCN 194: 2004

**CÁC CHẤT CHUYỂN HÓA THUỘC
NHÓM NITROFURAN TRONG THỦY
SẢN VÀ SẢN PHẨM THỦY SẢN -
PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG
BẰNG SẮC KÝ LỎNG KHỐI
PHỔ - KHỐI PHỔ**

*Residues of metabolites of nitrofurans
group in fishery products - Method for
quantitative analysis by LC/MS/MS*

(ban hành kèm theo Quyết định số
03/2004/QĐ-BTS ngày 01/3/2004 của
Bộ trưởng Bộ Thủy sản).

1. Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định hàm lượng của các chất chuyển hóa thuộc nhóm nitrofuran gồm furazolidon, furaltadon, nitrofurantoin và nitrofurazon trong thủy sản và sản phẩm

thủy sản. Giới hạn phát hiện của phương pháp là 1 µg/kg.

2. Phương pháp tham chiếu

Tiêu chuẩn này được xây dựng dựa theo phương pháp của Viện Kiểm soát Chất lượng sản phẩm nông nghiệp Hà Lan (RIKILT).

3. Giải thích thuật ngữ và các từ viết tắt

3.1. Giải thích thuật ngữ

Trong Tiêu chuẩn này, các thuật ngữ dưới đây được hiểu như sau:

3.1.1. *Dư lượng liên kết với mô* là các chất tồn dư do có các liên kết đồng hóa trị với các đại phân tử trong cơ thể động vật.

3.1.2. *Ion sơ cấp (precursor ion)* là ion được tạo ra và chọn lọc sau giai đoạn MS thứ nhất, thông thường, nhưng không nhất thiết nó là một ion phân tử mang điện dương.

3.1.3. *Ion thứ cấp (product ion)* là ion được tạo ra và chọn lọc trong giai đoạn MS thứ hai, ion này được sinh ra từ ion sơ cấp trong quá trình phân ly do va chạm.

3.2. Các từ viết tắt

3.2.1. LC/MS/MS: Sắc ký lỏng/khối phổ/khối phổ.

3.2.2. CID (Collision induced dissociation): phân ly do va chạm.

3.2.3. ESI (Electron spray ionization):
ion hóa bằng phun điện tử.

3.2.4. HPLC: Sắc ký lỏng hiệu năng
cao.

4. Nguyên tắc

Dư lượng liên kết với mô của các chất chuyển hóa nhóm nitrofurán trong sản phẩm thủy sản được thủy phân bằng axit clohydric loãng để thu được mạch nhánh của các chất nhóm nitrofurán. Các mạch nhánh này được dẫn xuất hóa bằng 2-nitrobenzaldehyt. Định tính và định lượng các chất dẫn xuất bằng LC/MS/MS bằng cách sử dụng các đồng vị đơteri như chất chuẩn nội.

5. Thiết bị, dụng cụ, hóa chất, dung dịch

5.1. Thiết bị, dụng cụ

5.1.1. Cân phân tích, độ chính xác
0,01 mg.

5.1.2. Cân phân tích, độ chính xác
0,01 g.

5.1.3. Máy nghiền.

5.1.4. Máy ly tâm.

5.1.5. Tủ ấm (có thể điều chỉnh được ở
khoảng nhiệt độ $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$).

5.1.6. Hệ thống cân bằng khí Nitơ.

5.1.7. Máy lắc Vortex.

5.1.8. Màng lọc PTFE, 13 mm, $0,45\mu\text{m}$.

5.1.9. Giấy thử pH.

5.1.10. Pipet 100 μl .

5.1.11. Hệ thống LC/MS/MS:

- Hệ thống sắc ký lỏng: Water Alliance 2690 hoặc tương đương gồm bơm và hệ thống tiêm mẫu;

- Cột bảo vệ pha đảo C18 (Sy mmetry Sentry Guard hoặc tương đương), kích thước $20 \times 3,9 \text{ mm}$;

- Cột C18 (Sy mmetry hoặc tương đương) kích thước $150 \times 3,0 \text{ mm}$, $5\mu\text{m}$,

- Đầu dò khối phổ dạng bốn cực với giao diện ESI (Triple quadrupole Micromass Quattro Ultima hoặc tương đương).

5.1.12. Ống ly tâm 14 ml, polypropylen hoặc thủy tinh, có nắp đậy.

5.1.13. Máy lắc ống nghiệm.

5.1.14. Lọ đựng mẫu cho HPLC.

5.1.15. Bình định mức 10 ml, 20 ml, 100 ml.

5.1.16. Dụng cụ thủy tinh thông thường.

5.1.17. Máy lắc đảo đầu (Heidolf REAX2) hoặc tương đương.

5.2. Hóa chất

Hóa chất phải là loại tinh khiết được sử dụng để phân tích gồm:

5.2.1. Metanol.

5.2.2. Axit clohydric (HCl) 32%.

5.2.3. 2-nitrobenzalđehyt ($C_7H_5NO_3$) viết tắt là NBA.

5.2.4. Natri phosphat ngậm nước $Na_3PO_4 \cdot 12H_2O$.

5.2.5. Natri hydroxyt khan (NaOH).

5.2.6. Etyl axetat ($CH_3COOC_2H_5$).

5.2.7. Axit axetic (CH_3COOH).

5.2.8. Axetonitril (CH_3CN).

5.2.9. Metanol -d, 99,5% D.

5.2.10. Nước.

5.3. Chất chuẩn.

5.3.1. 3-amino-2-oxazolidinon (AOZ).

5.3.2. 5-metylmorfolino-3-amino-2-oxazolidinon (AMOZ).

5.3.3. 1-amino-hyđantoin hydroclorit (AHD).

5.3.4. Semicarbazit (SEM) hydroclorit.

5.3.5. 3-amino-2-oxazolidinon- d_4 hydroclorit (AOZ- d_4).

5.3.6. 5-metylmorfolino-3-amino-2-oxazolidinon- d_5 (AMOZ- d_5).

5.3.7. 1-amino-hyđantoin hydroclorit- d_2 (AHD- d_2).

5.3.8. 3-((2-nitrophenyl)metylen)-amino-2-oxazolidinon (NPAOZ).

5.3.9. 5-metylmorfolino-3-((2-nitrophenyl)metylen)-3-amino-2-oxazolidinon (NPAMOZ).

5.3.10. 1-((2-nitrophenyl)metylen)-amino-hyđantoin (NPAHD).

5.3.11. (2-nitrophenyl) metylensemicarbazit (NPSEM).

5.4. Chuẩn bị các dung dịch

5.4.1. Axit clohydric 0,2M: hòa tan 20 ml HCl (5.2.2) trong 1000 ml nước (5.2.10).

5.4.2. Natri hydroxit 2M: hòa tan 80g NaOH khan (5.2.5) vào 1000 ml nước (5.2.10).

5.4.3. 2-nitrobenzalđehyt (NBA) 100 mM trong metanol nồng độ 0,1M: hòa tan 1,51g NBA (5.2.3) vào 100 ml metanol (5.2.1).

5.4.4. Natri phosphat 0,3M: hòa tan 11,4 g $Na_3PO_4 \cdot 12H_2O$ (5.2.4) vào 100 ml nước (5.2.10).

5.4.5. Dung môi hòa tan mẫu: trộn 50 ml axetonitril (5.2.8), 450 ml nước (5.2.10) và 0,5 ml axit axetic (5.2.7).

5.4.6. Pha động A: trộn 1 ml axit axetic (5.2.7) với 1000 ml nước (5.2.10), lọc qua màng lọc 0,45 μ m (5.1.8).

5.4.7. Pha động B: trộn 900 ml axetonitril (5.2.8) với 100 ml nước (5.2.10) và 1 ml axit axetic (5.2.7), lọc qua màng lọc 0,45 μ m (5.1.8).

5.5. Các dung dịch chuẩn

5.5.1. Các dung dịch chuẩn gốc.

5.5.1.1. Dung dịch chuẩn gốc AOZ, AMOZ, AHD, SEM, AOZ- d_4 , AMOZ- d_5 , NPAOZ, NPAMOZ, NPAHD, NPSEM (50mg/l trong metanol).

Cân chính xác từ khoảng 1 đến 5 mg \pm 0,02mg các chất chuẩn nói trên. Chuẩn bị các dung dịch chuẩn gốc bằng cách hòa tan trong metanol (5.2.1), lưu ý đến độ tinh khiết của chất chuẩn.

5.5.1.2. Dung dịch chuẩn gốc AHD-d₂ (50mg/l trong metanol-d).

Cân chính xác từ khoảng 1 đến 5 mg \pm 0.02mg các chất chuẩn nói trên. Chuẩn bị các dung dịch chuẩn gốc bằng cách hòa tan trong metanol-d (5.2.9), lưu ý đến độ tinh khiết của chất chuẩn.

5.5.2. Hỗn hợp các dung dịch chuẩn.

5.5.2.1. Hỗn hợp MM1 (1mg/l trong metanol) gồm AOZ, AMOZ, AHD, SEM.

Lấy 200 μ l từ mỗi dung dịch gốc AOZ, AMOZ, AHD, SEM (5.5.1.1) cho vào bình định mức 10 ml, định mức đến vạch với metanol (5.2.1).

5.5.2.2. Hỗn hợp IS1 (1 mg/l trong metanol-d) gồm AOZ-d₄, AMOZ-d₅, AHD-d₂.

Lấy 200 μ l từ mỗi dung dịch gốc AOZ-d₄, AMOZ-d₅ (5.5.1.1) và AHD-d₂ (5.5.1.2) cho vào bình định mức 10 ml, định mức đến vạch với metanol-d (5.2.9).

5.5.2.3. Hỗn hợp NP1 (1mg/l trong metanol) gồm NPAOZ, NPAMOZ, NPAHD, NPSEM.

Lấy 460 μ l dung dịch gốc NPAOZ (5.5.1.1), 332 μ l dung dịch gốc NPAMOZ (5.5.1.1), 432 μ l dung dịch gốc NPAHD

(5.5.1.1) và 554 μ l dung dịch gốc NPSEM (5.5.1.1) cho vào bình định mức 10 ml. Định mức đến vạch với metanol (5.2.1).

5.5.3. Pha loãng các hỗn hợp dung dịch chuẩn

5.5.3.1. Hỗn hợp chuẩn MM2 (50 μ g/l trong metanol) gồm AOZ, AMOZ, AHD, SEM.

Lấy 1,00 ml hỗn hợp chuẩn MM1 (5.5.2.1) cho vào bình định mức 20 ml, định mức đến vạch với metanol (5.2.1).

5.5.3.2. Hỗn hợp chuẩn nội IS2 (50 μ g/l trong metanol-d) gồm AOZ-d₄, AMOZ-d₅, AHD-d₂

Lấy 1,00 ml hỗn hợp chuẩn IS1 (5.5.2.2) cho vào bình định mức 20 ml, định mức đến vạch với metanol-d (5.2.9).

5.5.3.3. Hỗn hợp chuẩn NP2 (100 μ g/l trong metanol) gồm NPAOZ, NPAMOZ, NPAHD, NPSEM.

Lấy 2,00 ml hỗn hợp chuẩn NP1 (5.5.2.3) cho vào bình định mức 20 ml, định mức đến vạch với metanol (5.2.1).

5.5.4. Dung dịch chuẩn làm việc của các dẫn xuất nitrophenyl - WS1 (1 μ g/l)

Lấy 1,00 ml hỗn hợp chuẩn NP2 (5.5.3.3) cho vào bình định mức 1000 ml, định mức đến vạch với dung môi hòa tan mẫu (5.4.5).

Tất cả các dung dịch chuẩn phải được bảo quản trong bóng tối ở nhiệt độ 4°C. Các dung dịch chuẩn gốc có thể sử dụng

trong 1 năm. Các hỗn hợp chuẩn có thể sử dụng trong 1 tháng. Dung dịch chuẩn làm việc (5.5.4) có thể sử dụng trong 1 tuần.

6. Phương pháp tiến hành

6.1. Chuẩn bị mẫu

6.1.1. Mẫu thử nghiệm

Cân chính xác $1,0 \pm 0,05$ g mẫu cần kiểm nghiệm đã được đồng nhất bằng máy nghiền (5.1.3) cho vào ống ly tâm 14 ml (5.1.12). Bổ sung 40 μ l hỗn hợp chuẩn nội IS2 (5.5.3.2), đồng nhất và để yên trong 15 phút.

6.1.2. Mẫu kiểm soát chất lượng

6.1.2.1. Mẫu kiểm soát âm tính: mẫu trắng không chứa AOZ, AMOZ, AHD và SEM

Cân chính xác $1,0 \pm 0,05$ g mẫu trắng (đã được chứng nhận), bỏ vào ống ly tâm 14 ml (5.1.12). Bổ sung 40 μ l hỗn hợp chuẩn nội IS2 (5.5.3.2) và để yên trong 15 phút. Sau đó, tiến hành thủy phân và dẫn xuất hóa theo quy định tại Điều 6.2.1.

6.1.2.2. Mẫu kiểm soát dương tính: mẫu trắng được bổ sung AOZ, AMOZ, AHD và SEM

Cân chính xác 4 phần có khối lượng $1,0 \pm 0,05$ g mẫu trắng (đã được chứng nhận), bỏ vào 4 ống ly tâm 14 ml (5.1.12). Bổ sung các dung dịch chuẩn theo cách ghi trong Bảng 1 rồi để yên trong 15 phút. Sau đó, tiếp tục thủy phân và dẫn xuất hóa theo quy định tại Điều 6.2.1.

Bảng 1. Chuẩn bị mẫu kiểm soát dương tính

Nồng độ trong mẫu (μ g/kg)	Hỗn hợp chuẩn mm ² (5.5.3.1) (μ l)	Hỗn hợp chuẩn nội IS2 (5.5.3.2) (μ l)
0,5	10	40
1	20	40
2	40	40
5	100	40

6.1.2.3. Mẫu kiểm soát độ thu hồi: mẫu trắng bổ sung các chất dẫn xuất nitrophenyl của AOZ, AMOZ, AHD và SEM chuẩn.

Cân chính xác 2 phần có khối lượng 1,0

$\pm 0,05$ g mẫu trắng (đã được chứng nhận), bỏ vào 2 ống ly tâm 14 ml (5.1.12). Bổ sung 40 μ l dung dịch chuẩn nội IS2 (5.5.3.2) rồi để yên trong 15 phút. Sau đó, tiếp tục thủy phân và dẫn xuất hóa theo quy định tại Điều 6.2.1.

Sau khi làm bay hơi etyl axetat (6.2.3), thêm vào một mẫu 20 μ l hỗn hợp chuẩn NP2 (5.5.3.3) và 480 μ l dung môi hòa tan mẫu (5.4.5). Thêm vào một mẫu khác 50 μ l hỗn hợp chuẩn NP2 (5.5.3.3) và 450 μ l dung môi hòa tan mẫu (5.4.5). Sau đó, tiến hành chuẩn bị mẫu phân tích (6.2.4) với công đoạn lọc.

6.2. Xử lý mẫu

Chú thích: Vì các chất dẫn xuất nitrophenyl rất nhạy với ánh sáng nên toàn bộ quy trình xử lý mẫu phải được tiến hành dưới ánh sáng yếu (ánh sáng vàng).

6.2.1. Thủy phân và dẫn xuất hóa

Thêm 5 ml axit clohydric 0,2M (5.4.1) và 50 μ l dung dịch 2-NBA trong metanol (5.4.3) vào các ống nghiệm chứa mẫu (6.1.1; 6.1.2.1; 6.1.2.2; 6.1.2.3). Đậy nắp ống và lắc bằng tay để phân tán mẫu. Đặt lên máy lắc ống nghiệm (5.1.13) rồi đặt cả hệ thống vào trong tủ ấm. Ủ mẫu qua đêm ở nhiệt độ $37 \pm 2^\circ\text{C}$.

6.2.2. Trung hòa

Sau khi làm nguội, thêm 500 μ l dung dịch Na_3PO_4 0,3M (5.4.4) vào mẫu. Lắc mẫu bằng tay. Điều chỉnh pH về $7 \pm 0,5$ bằng dung dịch NaOH 2M (5.4.2), kiểm tra pH bằng giấy thử pH (5.1.9). Lắc bằng tay và để yên trong 5 phút. Kiểm tra lại pH và điều chỉnh thêm nếu cần thiết.

6.2.3. Chiết

Thêm 4 ml etyl axetat (5.2.6) vào mẫu đã điều chỉnh pH. Chiết mẫu bằng cách đặt trên máy lắc đảo đầu (5.1.17) trong 20 phút. Ly tâm mẫu trong 10 phút ở tốc độ 2000 vòng/phút. Chuyển lớp hữu cơ ở phía trên sang một ống ly tâm 14 ml (5.1.12) sạch. Lặp lại bước chiết bằng cách thêm 4 ml etyl axetat (5.2.6) vào phần mẫu còn lại, đóng nắp ống ly tâm rồi đặt trên máy lắc đảo đầu (5.1.17) trong 20 phút. Ly tâm mẫu trong 10 phút ở tốc độ 3500 vòng/phút. Lấy lớp hữu cơ và kết hợp với phần hữu cơ đã lấy ở lần đầu rồi làm bay hơi cho đến khô ở nhiệt độ 45°C với hệ thống cô bằng khí nitơ (5.1.6) với tốc độ dòng khí chậm.

Chú thích: tổng thể tích phần hữu cơ phải lớn hơn 6 ml, nếu không phải chiết thêm một lần nữa.

6.2.4. Chuẩn bị mẫu phân tích

Hòa tan cạn khô bằng 500 μ l dung môi hòa tan mẫu (5.4.5), lắc trên máy lắc Vortex (5.1.7) trong 20 giây. Lọc dịch đục qua màng lọc 13 mm, 0,45 μm (5.1.8) và thu dịch lọc vào lọ vial cho HPLC (5.1.14).

6.2.5. Phân tích trên LC/MS/MS

6.2.5.1. Điều kiện máy LC

a) Tốc độ: 0,4 ml/phút;

b) Thể tích mẫu tiêm: 50 μ l;

c) Nhiệt độ cột: 40°C ;

d) Toàn bộ thời gian phân tích: 22 phút;

đ) Pha động: chế độ gradien theo Bảng 2.

Bảng 2. Điều kiện gradien dung môi của máy LC

Thời gian (phút)	Pha động A (5.4.6) (%)	Pha động B (5.4.7) (%)
0	90	10
1	90	10
14	55	45
16	10	90
18	10	90
19	90	10

6.2.5.2. Điều kiện của đầu dò MS

- a) Tỷ số chia: xấp xỉ 1: 2
 b) Kiểu ion hóa: ESI, dương
 c) Điện thế mao quản: 2,7 kv
 d) Điện thế khối nón: 30 v
 đ) Nhiệt độ nguồn: 120°C
 e) Nhiệt độ khử dung môi: 300°C
 g) Tốc độ dòng khí khử dung môi: 500 l/h

h) Tốc độ khí qua khối nón: 200 l/h

i) Khí gây phân ly bằng va chạm: Argon, $p = 3,2 \cdot 10^{-3}$ bar.

6.2.5.3. Điều kiện phân ly MS/MS

NPAOZ, NPAMOZ, NPAHD và NPSEM bị phân ly thành các ion thứ cấp liên quan đến cấu trúc. Các chất đồng vị đánh dấu được sử dụng làm chất chuẩn nội cũng có cách phân ly tương tự (Bảng 3).

Bảng 3. Các điều kiện phân ly MS/MS

Thành phần	Ion sơ cấp (m/z)	Ion thứ cấp (m/z)	Thời gian lưu (s)	Năng lượng va chạm (eV)	Cửa số (phút)
NPAMOZ	335 ± 0,5	262 ± 0,5	0,3	15	0,0 - 8,5
		<u>291 ± 0,5</u>	0,3	15	0,0 - 8,5
NPAMOZ-d ₅	340 ± 0,5	296 ± 0,5	0,3	15	0,0 - 8,5
NPAHD	249 ± 0,5	<u>134 ± 0,5</u>	0,2	15	8,5 - 13,0
		178 ± 0,5	0,2	15	8,5 - 13,0
NPAHD-d ₂	251 ± 0,5	<u>134 ± 0,5</u>	0,2	15	8,5 - 13,0
NPSEM	209 ± 0,5	<u>166 ± 0,5</u>	0,2	10	8,5 - 13,0
		192 ± 0,5	0,2	10	8,5 - 13,0
NPAOZ	236 ± 0,5	104 ± 0,5	0,3	17	13,0 - 18,0
		<u>134 ± 0,5</u>	0,3	17	13,0 - 18,0
NPAOZ-d ₄	240 ± 0,5	<u>134 ± 0,5</u>	0,3	17	13,0 - 18,0

Chú thích: Các ion thứ cấp có cường độ cao nhất được gạch chân.

6.2.6. Kiểm tra hiệu năng của hệ thống LC/MS/MS

Tiêm dung dịch chuẩn làm việc $1\mu\text{g/l}$ (5.5.4). Xác định tỷ lệ tín hiệu/nhiều (S/N) đối với bước chuyển có cường độ thấp nhất. Tỷ lệ S/N phải lớn hơn 6. Lặp lại bước tiêm để kiểm tra sự lặp lại của thời gian lưu, diện tích pic và tỷ lệ các ion.

6.2.7. Trình tự tiêm mẫu

Các mẫu sẽ được phân tích theo trình tự sau:

- a) Dung môi trắng;
- b) Mẫu kiểm soát âm tính (6.1.2.1);
- c) Mẫu kiểm soát dương tính (6.1.2.2);
- d) Mẫu kiểm soát độ thu hồi (6.1.2.3);
- đ) Dung môi trắng;
- e) Mẫu cần kiểm nghiệm (6.2.4);
- g) Dung môi trắng;
- h) Mẫu kiểm soát âm tính (6.1.2.1);
- i) Mẫu kiểm soát dương tính (6.1.2.2).

7. Tính kết quả

7.1. Tính tỷ số ion theo công thức sau:

$$R (\%) = \frac{100 \times A_1}{A_2} \quad (1)$$

Trong đó: - R là tỷ số ion (%).

- A_1 là diện tích của pic ion thứ cấp có cường độ thấp nhất.

- A_2 là diện tích của pic ion thứ cấp có cường độ cao nhất.

7.2. Tính độ lệch tương đối của tỷ số ion theo công thức sau:

$$\Delta R (\%) = \frac{R_s - R_m}{R_m} \times 100 \quad (2)$$

Trong đó:

- ΔR là độ lệch tương đối giữa tỷ số ion của chất cần phân tích trong mẫu kiểm với tỷ số ion trung bình của chất đó trong mẫu kiểm soát dương tính có nồng độ $1\mu\text{g/kg}$ và cao hơn (%).

- R_s là tỷ số ion của chất cần phân tích trong mẫu kiểm (1).

- R_m là tỷ số ion trung bình của chất cần phân tích trong mẫu kiểm soát dương tính có nồng độ $1\mu\text{g/kg}$ và cao hơn (%) (1).

7.3. Tính thời gian lưu tương đối theo công thức sau:

$$R_{rt} = \frac{R_t}{R_{t_{IS}}} \quad (3)$$

Trong đó: - R_{rt} là thời gian lưu tương đối.

- R_t là thời gian lưu của chất cần phân tích.

- $R_{t_{IS}}$ là thời gian lưu của chất chuẩn nội (đối với NPSEM thì NPAHD- d_2 là chất chuẩn nội).

7.4. Tính độ lệch chuẩn của thời gian lưu tương đối theo công thức sau:

$$\Delta Rrt (\%) = \frac{Rrt_s - Rrt_m}{Rrt_m} \times 100 \quad (4)$$

Trong đó: - ΔRrt là độ lệch tương đối giữa Rrt của chất cần phân tích trong mẫu kiểm so với Rrt của chất đó trong mẫu kiểm soát dương tính (%).

- Rrt_s là thời gian lưu tương đối của chất cần phân tích trong mẫu kiểm.

- Rrt_m là thời gian lưu tương đối trung

bình của chất cần phân tích trong mẫu kiểm soát dương tính.

7.5. Chất cần phân tích được khẳng định là có mặt khi các yêu cầu sau được thỏa mãn:

a) Tỷ lệ tín hiệu/nhiều cho mỗi ion phải không nhỏ hơn 3:1.

b) Mức dung sai tối đa cho phép của các cường độ ion tương đối, sử dụng nhiều loại kỹ thuật khối phổ theo quy định trong Bảng 4.

Bảng 4. Mức dung sai tối đa cho phép của các cường độ ion tương đối

Cường độ tương đối (% của pic cơ sở)	LC-MS, LC-MSn (tương đối)
Lớn hơn 50%	± 20%
Từ lớn hơn 20 đến 50%	± 25%
Từ lớn hơn 10 đến 20%	± 30%
Không lớn hơn 10%	± 50%

7.6. Tính hệ số tín hiệu cho từng chất cần phân tích theo công thức sau:

$$RF = \frac{Sp}{Sp_{IS}} \quad (5)$$

Trong đó: - RF là hệ số tín hiệu.

- Sp là tổng diện tích pic của các ion thứ cấp của chất cần phân tích.

- Sp_{IS} là diện tích pic của ion thứ cấp của chất chuẩn nội (đối với NPSEM, NPAHD-d₂ được sử dụng làm chất chuẩn nội).

7.7. Tính lượng chất cần phân tích có mặt trong mẫu kiểm theo công thức sau:

$$X = \frac{RF \cdot b}{a}$$

Trong đó: - X là lượng chất cần phân tích có trong mẫu kiểm ($\mu\text{g}/\text{kg}$). (*)

- RF là hệ số tín hiệu (công thức 5).

- b là độ dụng của đường chuẩn tính theo phương pháp hồi quy tuyến tính.

- a là độ dốc của đường chuẩn tính theo phương pháp hồi quy tuyến tính. (**)

Chú thích: (*): tính theo khối lượng chất chuyển hóa chưa bị dẫn xuất hóa.

(**): dụng đồ thị tín hiệu của mẫu kiểm soát dương tính với nồng độ chất chuẩn bổ sung và áp dụng hồi quy tuyến tính.

Phụ lục A
(tham khảo)

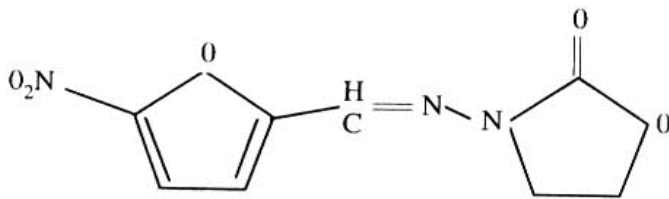
Sự chuyển hóa của các chất thuộc nhóm nitrofuran

Dược chất

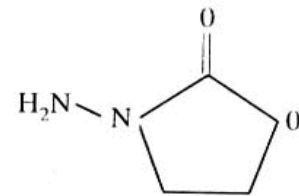
Chất chuyển hóa

Parent molecule

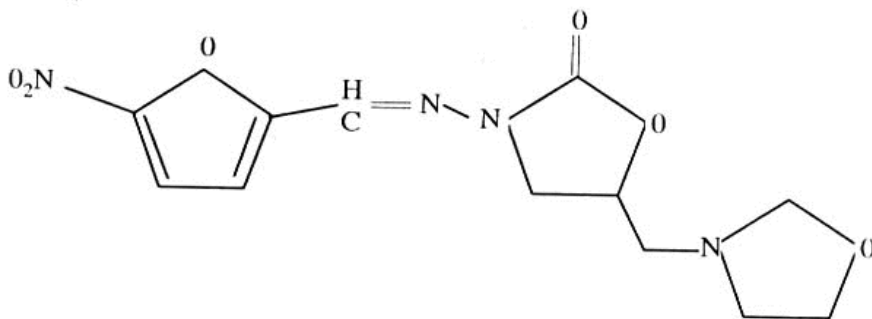
Free residue



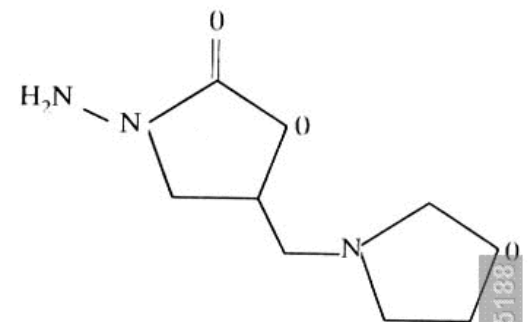
Furazolidone



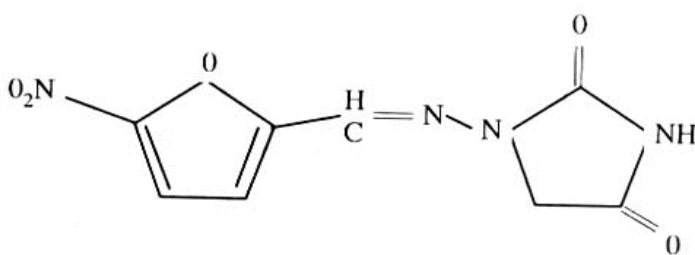
3-amino-2-oxazolidinone
AOZ



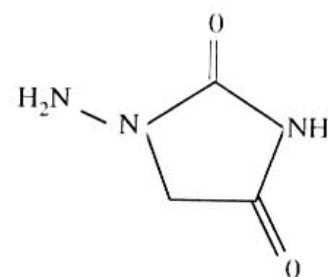
Furaltadone



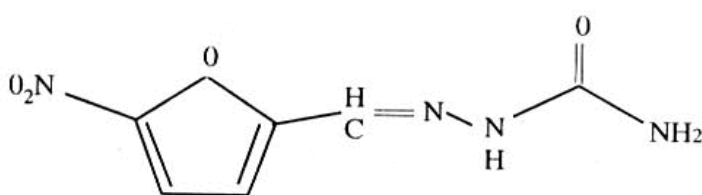
3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidinone
AMOZ



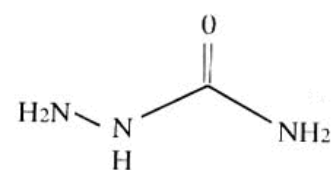
Nitrofurantoin



1-aminohydantoin
AHD



Nitrofurazone



Semicarbazide
SEM

TIÊU CHUẨN NGÀNH 28 TCN 195: 2004**THUỐC TRỪ SÂU GỐC PHOSPHO HỮU CƠ TRONG THỦY SẢN VÀ SẢN PHẨM THỦY SẢN - PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG BẰNG SẮC KÝ KHÍ**

Organophosphorus pesticides residues in fish and fishery products - Method for quantitative analysis by Gas Chromatography

(ban hành kèm theo Quyết định số 03/2004/QĐ-BTS ngày 01/3/2004 của Bộ trưởng Bộ Thủy sản).

1. Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định hàm lượng các thuốc trừ sâu gốc phospho hữu cơ (sau đây gọi tắt là OP) gồm 5 loại thuốc trừ sâu chính: dimethoate, chlorfenvinphos, chlorpyrifos, methidathion và phosmet trong thủy sản và sản phẩm thủy sản bằng hệ thống sắc ký khí (sau đây gọi tắt là GC). Giới hạn phát hiện của phương pháp từ 0,2 đến 1 µg/kg.

2. Phương pháp tham chiếu

Tiêu chuẩn này được xây dựng dựa theo phương pháp "So sánh các kỹ thuật làm sạch trong các phương pháp phân tích chọn lọc dư lượng các thuốc trừ sâu OP trong nhuyễn thể" đăng trong "Journal of AOAC international" phần 79, số 1, trang 123 - 131, năm 1996.

3. Nguyên tắc

Thuốc trừ sâu OP trong mẫu thủy sản được chiết tách ra bằng hỗn hợp axetonitril - axeton. Dịch chiết được làm sạch trên cột silicagel, sau đó được chiết tách làm 2 phân đoạn. Hàm lượng các thuốc trừ sâu OP trong các phân đoạn chiết được xác định trên hệ thống GC với 2 đầu dò: đầu dò bắt giữ điện tử (sau đây gọi tắt là ECD) và đầu dò ion hóa nhiệt phát hiện nitơ-phospho (sau đây gọi tắt là NPD).

4. Thiết bị, dụng cụ, hóa chất, dung dịch thử và dung dịch chuẩn**4.1. Thiết bị và dụng cụ**

4.1.1. Máy sắc ký khí với đầu dò ECD và NPD.

4.1.2. Cột sắc ký thủy tinh (có van khóa), kích thước L x ID là 150 x 5 mm và 50 x 20 mm.

4.1.3. Cột mao quản (cho máy GC): loại HP Ultra 2, kích thước L x ID = 25 m x 0,2 mm, độ dày lớp pha tĩnh là 0,33 µm hoặc tương đương.

4.1.4. Máy cô quay chân không.

4.1.5. Máy nghiền đồng thể.

4.1.6. Máy trộn cao tốc.

4.1.7. Tủ sấy.

4.1.8. Lò nung.

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

09685181

LawSoft * Tel: +84-8-3845 6684 * www.ThuVienPhapLuat.com

4.1.10. Các dụng cụ thủy tinh, bình định mức.

4.2. Hóa chất

Hóa chất phải là loại tinh khiết được sử dụng để phân tích, gồm:

4.2.1. Hexan loại dùng cho GC.

4.2.2. Etyl axetat loại dùng cho HPLC.

4.2.3. Sunfat natri dạng hạt, được làm khô bằng sấy qua đêm ở nhiệt độ 350° C và giữ trong chai thủy tinh.

4.2.4. Axeton loại dùng cho GC.

4.2.5. Axetonitril loại dùng cho GC.

4.2.6. Khí mang: heli loại dùng cho GC.

4.2.7. Bông thủy tinh (SUPELCO, 2-0411).

4.2.8. Silicagel cỡ hạt 60 mesh: silica-60 (Merck, Darmstadt, Germany).

4.2.9. Silicagel đã được hoạt hóa: cân một lượng silicagel (4.2.8), rửa sạch bằng diclometan rồi cho vào trong chén sứ và để trong tủ sấy ở nhiệt độ 120°C trong vòng 12 giờ. Sau đó, dùng giấy thiếc bọc kín miệng chén sứ rồi để lại vào tủ sấy ở nhiệt độ 120°C trước khi sử dụng.

4.2.10. Xelit

4.2.11. Các chất chuẩn thuốc trừ sâu OP (Promochem, Wesel, Germany): dimethoate, chlorfenvinphos (đồng phân E+Z), chlorpyrifos, methidathion và phosmet.

4.3. Dung dịch thử và dung dịch chuẩn.

4.3.1. Dung dịch rửa giải: hỗn hợp gồm dung dịch axetonitril và axeton theo tỷ lệ về thể tích là 9:1 được pha trước khi sử dụng.

4.3.2. Chuẩn bị các dung dịch chuẩn thuốc trừ sâu OP trong axeton từ các chất chuẩn tinh khiết (lớn hơn 99%). Tùy theo nồng độ thuốc trừ sâu có trong ống chuẩn, dùng bình định mức và lượng axeton thích hợp.

Chú thích: Các chuẩn phải được bảo quản ở nhiệt độ - 20°C.

4.3.3. Chuẩn thu hồi: pha các chuẩn của các OP trong dung môi axeton để có hàm lượng trong khoảng 0,005 - 50 µg/ml.

4.3.4. Dung dịch chuẩn trung gian: pha loãng các chuẩn ban đầu (4.3.2) trong axeton được các chuẩn trung gian.

4.3.5. Dung dịch chuẩn công tác: các chuẩn công tác được chuẩn bị từ các chuẩn trung gian (4.3.4) được pha loãng trong hexan (4.2.1) để bơm vào GC.

5. Phương pháp tiến hành

5.1. Chuẩn bị mẫu thử

5.1.1. Cân chính xác 5 g mẫu (ký hiệu m) đã được nghiền bằng máy nghiền đồng thể (4.1.5) rồi cho vào cốc thủy tinh có mỏ. Thêm 1 g xelit (4.2.10), 30 g sunfat natri khan (4.2.3) rồi nghiền đều. Tiếp

tục thêm vào 150 ml hỗn hợp dung dịch axetonitril-axeton theo tỷ lệ về thể tích là 9:1 (4.3.1) rồi trộn hỗn hợp trong 3 phút trong máy trộn cao tốc (4.1.6) để chiết lấy các thuốc trừ sâu từ mẫu. Sau đó, lọc dung dịch bằng giấy lọc.

5.1.2. Sản phẩm chiết được cô đặc trên máy cô quay đến khoảng 5 ml, sau đó cô tiếp cho đến khô trên máy cô quay (4.1.4) trong chế độ chân không ở nhiệt độ 40°C. Thêm vào dịch thu được 1 ml hexan (4.2.1) rồi làm sạch dịch chiết theo Điều 5.4.

5.2. Chuẩn bị mẫu trắng

Mẫu trắng được định nghĩa là mẫu thủy sản đã được xác định không có chứa thuốc trừ sâu gốc OP. Tiến hành chuẩn bị mẫu trắng giống như chuẩn bị đối với mẫu thử theo quy định tại Điều 5.1.

5.3. Chuẩn bị mẫu để xác định độ thu hồi

Thêm 1 ml dung dịch chuẩn có hàm lượng từ 0,005 đến 50µg/ml vào 5 g mẫu trắng, trộn đều mẫu bằng máy nghiền đồng thể (4.1.5). Tiến hành chuẩn bị mẫu giống như chuẩn bị đối với mẫu thử theo quy định tại Điều 5.1.

5.4. Làm sạch dịch chiết

5.4.1. Chuẩn bị cột

Gồm: bông thủy tinh (4.2.7), 1,3 g silicagel đã được hoạt hóa (4.2.9), 1 g sunfat natri khan (4.2.3). Trước khi tiến

hành phân tích, cho vào cột 5 ml etyl axetat (4.2.2) và sau đó là 5 ml hexan (4.2.1).

5.4.2. Làm sạch dịch chiết.

5.4.2.1. Chuyển dịch thu được tại các Điều 5.1.2, Điều 5.2 và Điều 5.3 vào các cột sắc ký đã được chuẩn bị (5.4.1).

5.4.2.2. Rửa dung dịch trong cột với 5 ml hexan, sau đó với 2 ml hỗn hợp hexan-etyl axetat theo tỷ lệ về thể tích là 95:5. Tiếp theo, rửa giải với 8 ml hỗn hợp hexan-etyl axetat theo tỷ lệ về thể tích là 50:50 rồi tách lấy phân đoạn 1. Sau đó, tiếp tục rửa giải với 5 ml etyl axetat rồi tách lấy phân đoạn 2. Tốc độ rửa giải phải luôn điều chỉnh đạt 10 giọt/phút.

5.4.2.3. Thu các phân đoạn chiết vào các bình thủy tinh đáy tròn của máy cô quay chân không (4.1.4). Tiến hành cô trên máy cô quay cho đến khô. Sau đó, thêm chính xác 1 ml hexan vào từng bình, lắc cho tan đều rồi hút để bơm vào máy GC theo Điều 5.5.

5.5. Tiến hành phân tích trên GC

5.5.1. Điều kiện phân tích

a) Máy sắc ký khí sử dụng đầu dò ECD và NPD, chọn chế độ bơm tự động, mỗi lần một lượng 2µl theo chế độ tiêm không chia.

b) Chế độ nhiệt của hệ thống GC:

- Nhiệt độ của buồng tiêm: 270°C.

- Nhiệt độ đầu dò ECD: 300°C, tốc độ dòng N₂: 60 ml/phút.

- Nhiệt độ đầu dò NPD: 270°C, tốc độ dòng He: 30 ml/phút, H₂: 3 ml/phút, không khí: 100 ml/phút.

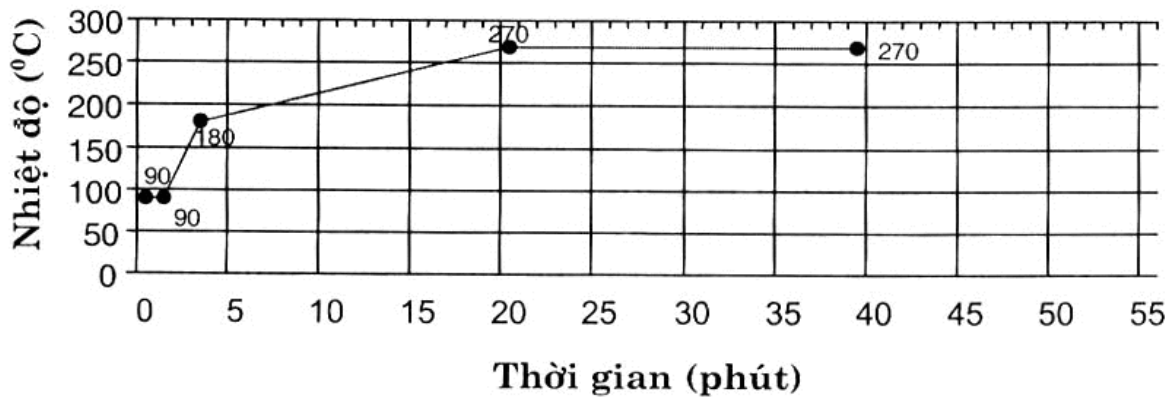
- Chương trình nhiệt độ cột (mô tả chi tiết trong Biểu đồ 1): Duy trì ở 90°C trong 1 phút; tăng 30°C/phút, lên tới

180°C; tăng 4°C/phút, lên tới 270°C và duy trì ở 270°C trong 20 phút.

c) Cột sắc ký: Cột mao quản HP Ultra 2, chất nhồi cột chứa 5% metylsilicol, chiều dài 25 m, đường kính trong 0,2 mm, độ dày lớp pha tĩnh 0,33 μm.

d) Khí: Khí mang: heli, tốc độ 0,5 ml/phút.

Biểu đồ 1 - CHƯƠNG TRÌNH NHIỆT ĐỘ



5.5.2. Tiến hành phân tích

5.5.2.1. Tiêm các dung dịch chuẩn công tác (4.3.5) vào máy GC theo thứ tự từ nồng độ thấp đến cao. Mỗi dung dịch tiêm 2 lần, tính diện tích pic trung bình. Dựng đường chuẩn biểu thị mối quan hệ giữa các diện tích pic thu được và nồng độ từng loại thuốc trừ sâu theo quan hệ tuyến tính bậc 1 (phương trình $y = ax + b$).

5.5.2.2. Tiêm dung dịch mẫu thử, dung dịch mẫu trắng, dung dịch xác định độ thu hồi đã được làm sạch (5.4.2.3) vào hệ

thống GC. Mỗi dung dịch mẫu tiêm 2 lần. Tính giá trị trung bình.

5.6. Yêu cầu về độ tin cậy của phép phân tích

5.6.1. Độ lặp lại của 2 lần tiêm

Độ lệch chuẩn (CV_s) tính theo diện tích pic sắc ký của 2 lần tiêm cùng một dung dịch chuẩn phải nhỏ hơn 0,5%.

5.6.2. Độ thu hồi (R)

Độ thu hồi được xác định bằng cách sử dụng 10 mẫu trắng đã được bổ sung một lượng dung dịch chuẩn để tính được hàm lượng chính xác. Độ thu hồi tính được

phải nằm trong khoảng từ 70 đến 110% (tùy theo hàm lượng OP có trong mẫu).

5.6.3. Đường chuẩn của mỗi cấu tử phải có độ tuyến tính tốt, hệ số tương quan hồi quy tuyến tính (R^2) phải lớn hơn hoặc bằng 0,99.

6. Tính kết quả

Hàm lượng từng loại thuốc trừ sâu có trong mẫu được tính trên cơ sở đường chuẩn thu được tại Điều 5.5.2.1. Với đường chuẩn ở dạng $y = ax + b$, hàm lượng từng loại thuốc trừ sâu có trong mẫu được tính theo công thức sau:

$$C (\mu\text{g}/\text{kg}) = \frac{(Y - b)}{a} \times F$$

Trong đó:

- C là nồng độ từng loại thuốc trừ sâu có trong mẫu, tính theo $\mu\text{g}/\text{kg}$.

- Y là hiệu số giữa diện tích pic của dịch chiết và diện tích pic có trong mẫu trắng tiêm vào GC, tính theo đơn vị diện tích.

- a, b là các thông số của đường chuẩn $y = ax + b$, được xác định theo Điều 5.5.2.1.

- F là hệ số pha loãng mẫu và có giá trị bằng tỷ số giữa thể tích phân đoạn dịch chiết thu được sau khi làm sạch (5.4.2.3) và khối lượng mẫu m (5.1.1) sử dụng.

TIÊU CHUẨN NGÀNH 28 TCN 196: 2004

SULFONAMIT TRONG SẢN PHẨM THỦY SẢN - PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG BẰNG SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

Sulfonamits in fishery products - Method for quantitative analysis by High Performance Liquid Chromatography

(ban hành kèm theo Quyết định số 03/2004/QĐ-BTS ngày 01/3/2004 của Bộ trưởng Bộ Thủy sản).

1. Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định hàm lượng nhóm chất sulfonamit (gồm: sulfadiazin, sulfathiazol, sulfamerazin, sulfamethazin, sufamethoxy-piridazin, sulfacloropyridazin, sulfadoxin, sulfamethoxazol, sulfadimethoxin và sulfachinoxalin) trong sản phẩm thủy sản bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (sau đây gọi tắt là HPLC). Giới hạn phát hiện của phương pháp nhỏ hơn 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

2. Phương pháp tham chiếu

Tiêu chuẩn này được xây dựng dựa theo phương pháp xác định hàm lượng các chất nhóm sulfonamit của Trung tâm nghiên cứu Nestle (Determination of Sulfonamide residues/Jean-Marc Diserens and Marie-Claude Savoy-Perroud/Quality and Safety Assurance Department/Nestle' Research Center).

3. Nguyên tắc

Các chất nhóm sulfonamid có trong mẫu sản phẩm thủy sản được chiết tách bằng hỗn hợp axetonitril và điclorometan. Dịch chiết sau khi cô cạn cho tác dụng với dung dịch fluorescamin để tạo dẫn xuất huỳnh quang. Hàm lượng các dẫn xuất được xác định trên hệ thống HPLC với đầu dò huỳnh quang theo phương pháp ngoại chuẩn.

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

4.1. Thiết bị, dụng cụ

4.1.1. Hệ thống HPLC với đầu dò huỳnh quang.

4.1.2. Cột sắc ký pha đảo C18, kích thước cột L x ID: 250 x 3 mm, kí hiệu 100-5 C18 AB, loại Nucleosil.

4.1.3. Máy nghiền đồng thể, tốc độ 6 000 - 30 000 vòng/phút (KCH-1000).

4.1.4. Bể điều nhiệt hoạt động ở nhiệt độ 20 -100°C (GRANT Y14).

4.1.5. Máy lắc, tốc độ 50 - 500 vòng/phút (IKA ® KS 260 basic).

4.1.6. Máy ly tâm tốc độ 5 000 vòng/phút (Sigma 4K15).

4.1.7. Máy rung trộn mẫu (HWASHIN technology Co. 250VM).

4.1.8. Bình khí nitơ tinh khiết 99,999 %.

4.1.9. Ống ly tâm thủy tinh dung tích: 15, 25 và 50 ml.

4.1.10. Pasteur pipet với quả bóp cao su.

4.1.11. Pipet định mức 5 và 10 ml.

4.1.12. Bình định mức dung tích: 10; 20; 25; 100; 500 và 1000 ml.

4.1.13. Giấy lọc 0,45 µm.

4.1.14. Cốc có mỏ dung tích 250 ml.

4.2. Hóa chất

Hóa chất phải là loại tinh khiết được sử dụng để phân tích, gồm:

4.2.1. Axetonitril (CH_3CN) dùng cho HPLC.

4.2.2. Điclorometan (CH_2Cl_2) dùng cho HPLC.

4.2.3. Metanol (CH_3OH) dùng cho HPLC.

4.2.4. Axeton dùng cho HPLC.

4.2.5. Nước cất dùng cho HPLC.

4.2.6. Axit phosphoric (H_3PO_4) đậm đặc dùng cho HPLC.

4.2.7. Dinatri hydro phosphat (Na_2HPO_4).

4.2.8. Axit xitric.

4.2.9. Natri hydroxit (NaOH).

4.2.10. Tác nhân tạo dẫn xuất fluorescamin (Floram).

4.2.11. Chuẩn các chất nhóm sulfonamid.

4.2.12. Chuẩn nội sulfanilamid.

4.3. Dung dịch thử và dung dịch chuẩn

4.3.1. Các dung dịch natri hydroxit

4.3.1.1. Dung dịch natri hydroxit 10 M: hòa tan 40 g NaOH (4.2.9) trong nước cất (4.2.5) để có 100 ml.

4.3.1.2. Dung dịch natri hydroxit 1 M: hòa tan 4 g NaOH (4.2.9) trong nước cất (4.2.5) để có 100 ml.

4.3.1.3. Dung dịch natri hydroxit 0,1 M: pha loãng 1 ml dung dịch NaOH 1 M (4.3.1.2) trong nước cất (4.2.5) để có 10 ml.

4.3.2. Dung dịch axetonitril/ H_3PO_4 pH = 6,0

Cho 80 ml axetonitril (4.2.1) và 20 ml H_3PO_4 0,02 M (4.3.8.1) vào cốc 250 ml. Dung dịch này được để nguội tới nhiệt độ trong phòng. Dùng dung dịch natri hydroxit 1 M (4.3.1.2) hoặc dung dịch natri hydroxit 0,1 M (4.3.1.3) chỉnh pH = $6,0 \pm 0,1$.

4.3.3. Dung dịch đệm xitrat 0,5 M, pH = 3,0

Hòa tan 10,5 g axit xitric (4.2.8) với 100 ml nước cất (4.2.5), chỉnh pH = $3,0 \pm 0,1$ bằng dung dịch natri hydroxit 10 M (4.3.1.1), dung dịch natri hydroxit 1 M (4.3.1.2) và dung dịch natri hydroxit 0,1 M (4.3.1.3).

4.3.4. Dung dịch đệm cho sự tạo dẫn xuất: trộn theo thể tích gồm 6 phần axetonitril/ H_3PO_4 pH = 6,0 (4.3.2) với 4 phần dung dịch đệm xitrat 0,5 M, pH = 3,0 (4.3.3).

4.3.5. Dung dịch fluorescamin 10 mg/ml: hòa tan 50 mg tác nhân tạo dẫn xuất fluorescamin (4.2.10) trong 5 ml axeton (4.2.4).

4.3.6. Các chất thuộc nhóm sulfanilamit

4.3.6.1. Dung dịch chuẩn nội sulfanilamit 1 mg/ml: hòa tan 10 mg chuẩn nội sulfanilamit (4.2.12) trong 10 ml metanol (4.2.3).

4.3.6.2. Dung dịch chuẩn nội sulfanilamit 50 μ g/ml: hút 1 ml sulfanilamit 50 mg/ml (4.3.6.1) vào bình định mức 20 ml rồi định mức tới vạch bằng metanol (4.2.3).

4.3.6.3. Dung dịch chuẩn nội sulfanilamit 5 μ g/ml: pha loãng 1 ml sulfanilamit 50 μ g/ml (4.3.6.2) với nước cất (4.2.5) để có 10 ml.

4.3.7. Các dung dịch chuẩn

4.3.7.1. Dung dịch chuẩn gốc các sulfonamid 100 μ g/ml: cân lần lượt 10,0 mg từng loại các chất nhóm sulfonamid (4.2.11). Sau đó, hòa tan rồi định mức đến vạch 100 ml bằng metanol (4.2.3).

4.3.7.2. Dung dịch chuẩn các sulfonamid trung gian 1000 ng/ml: hút chính xác 1,0 ml dung dịch chuẩn gốc các sulfonamid 100 μ g/ml (4.3.7.1) vào các bình định mức 100 ml. Sau đó, định mức đến vạch bằng metanol (4.2.3).

4.3.7.3. Các dung dịch chuẩn sulfonamid

để dựng các đường chuẩn: 0; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; và 10,0 ng/ml).

Hút lần lượt 0; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 và 5,0 dung dịch các sulfonamid 1000 ng/ml (4.3.7.2) vào bình định mức 500 ml. Sau đó, định mức tới vạch bằng metanol (4.2.3).

4.3.8. Pha động

4.3.8.1. Dung dịch H_3PO_4 0,02 M: hòa tan 2,3 g H_3PO_4 85% (4.2.6) với nước cất (4.2.5) rồi định mức thành 1000 ml.

4.3.8.2. Hỗn hợp dung dịch metanol và axetonitril (tỷ lệ 1:1): hòa tan 500 ml metanol (4.2.3) trong 500 ml axetonitril (4.2.1).

5. Phương pháp tiến hành

5.1. Chuẩn bị mẫu thử

5.1.1. Nghiền ít nhất 200 g mẫu bằng máy nghiền đồng thể (4.1.3). Cân chính xác 5,0 g mẫu đã được nghiền (ký hiệu W) cho vào ống ly tâm thủy tinh 25 ml (4.1.9).

5.1.2. Thêm 10 ml axetonitril (4.2.1) và 2,5 ml điclorometan (4.2.2) vào ống ly tâm thủy tinh 25 ml có chứa 5,0 g mẫu thử (5.1.1). Sau đó, lắc ống trong 10 phút trên máy lắc (4.1.5). Tiếp theo ly tâm trong 10 phút ở tốc độ 6 000 vòng/phút.

5.1.3. Dùng pasteur pipet hút lớp trên vào bình định mức 25 ml (4.1.12). Thực hiện lại bước chiết ở Điều 5.1.2 rồi gom tất cả phần dịch chiết vào bình định mức

25 ml (4.1.12); làm đầy tới vạch định mức bằng axetonitril (4.2.1).

5.1.4. Hút chính xác 10 ml dịch chiết ở Điều 5.1.3. cho vào ống nghiệm thủy tinh 15 ml (4.1.9) để bay hơi tới cạn khô bằng dòng khí nitrogen (4.1.8) ở nhiệt độ 50°C trên bể điều nhiệt (4.1.4).

5.2. Chuẩn bị mẫu trắng

Mẫu trắng là mẫu thủy sản đã được xác định không có các chất nhóm sulfonamid. Tiến hành chuẩn bị mẫu trắng như chuẩn bị đối với mẫu thử theo quy định tại Điều 5.1.

5.3. Chuẩn bị mẫu để xác định độ thu hồi 100 ng/g

Thêm chính xác 500 μ l dung dịch các chuẩn sulfonamid trung gian 1000 ng/ml (4.3.7.2) vào 5g mẫu trắng. Tiến hành chuẩn bị mẫu xác định độ thu hồi 100 ng/g như chuẩn bị đối với mẫu thử theo quy định tại Điều 5.1.

5.4. Chuẩn bị dung dịch dựng đường chuẩn

Hút chính xác 10 ml lần lượt các dung dịch chuẩn sulfonamid để dựng các đường chuẩn (4.3.7.3) vào ống nghiệm thủy tinh 15 ml. Sau đó, cho dung dịch bay hơi tới cạn khô dưới dòng khí nitrogen (4.1.8) ở nhiệt độ 50°C trên bể điều nhiệt (4.1.4). Tiếp tục thực hiện bước tạo dẫn xuất huỳnh quang quy định tại Điều 5.5.

5.5. Tạo dẫn xuất huỳnh quang

Thêm vào các ống nghiệm chứa mẫu đã chuẩn bị tại các Điều 5.1.4, 5.2 và 5.3 các dung dịch gồm: 1 ml dung dịch đệm tạo dẫn xuất (4.3.4), 20 µl dung dịch chuẩn nội sulfanilamit 5 µg/ml (4.3.6.3) và 0,2 ml dung dịch fluorescamin 10 mg/ml (4.3.5). Sau đó, để cho phản ứng khoảng 30 - 50 phút ở nhiệt độ trong phòng, rồi lọc qua giấy lọc 0,45 µm

(4.1.13). Lấy 10 µl dung dịch này tiêm vào hệ thống HPLC.

5.6. Tiến hành phân tích trên HPLC

5.6.1. Điều kiện phân tích

a) Cột sắc ký: cột Nucleosil 250 x 3 mm 100-5 C18 AB (4.1.2).

b) Chương trình pha động: theo quy định trong Bảng 1.

Bảng 1. Chương trình pha động

Thời gian	Dung dịch H ₃ PO ₄ 0,02 M	Hỗn hợp dung dịch metanol và axetonitril (tỷ lệ 1:1)
Bắt đầu	60	40
20 phút	60	40
25 phút	50	50
39 phút	50	50
40 phút	45	55
50 phút	45	55
51 phút	60	40
58 phút	60	40

c) Tốc độ dòng: 0,6 ml/phút.

d) Thể tích tiêm: 10 µl.

đ) Bước sóng kích thích: $\lambda = 405$ nm.

e) Bước sóng phát xạ: $\lambda = 495$ nm.

5.6.2. Ổn định cột sắc ký trong 30 phút tại chế độ làm việc.

5.6.3. Tiêm các dung dịch chuẩn đã được tạo dẫn xuất huỳnh quang (5.5). Dựng đường chuẩn giữa tỷ số diện tích pic các chuẩn sulfonamit/diện tích pic chuẩn nội sulfanilamit và nồng độ theo quan hệ tuyến tính bậc nhất (phương trình $Y = ax + b$).

5.6.4. Tiêm các dịch mẫu trắng, dịch

mẫu xác định độ thu hồi và dịch mẫu thử đã tạo dẫn xuất huỳnh quang (5.5) vào hệ thống HPLC, mỗi mẫu 2 lần. Xác định tỷ số diện tích pic sulfonamit/sulfanilamit. Tính toán kết quả theo Điều 6.

5.7. Yêu cầu về độ tin cậy của phép phân tích

5.7.1. Độ lặp lại của 2 lần tiêm

Độ lệch chuẩn (CV_s) tính theo diện tích pic sắc ký của 2 lần tiêm cùng một dung dịch chuẩn phải nhỏ hơn 0,5%.

5.7.2. Độ thu hồi (R)

Độ thu hồi được xác định cho mỗi lần

chạy mẫu phải nằm trong khoảng 60 - 70 %.

6. Tính kết quả

Hàm lượng sulfonamid có trong mẫu được tính theo công thức sau:

$$M (\mu\text{g}/\text{kg}) = C \times \frac{V}{W}$$

Trong đó:

- M là hàm lượng sulfonamid có trong mẫu, tính theo $\mu\text{g}/\text{kg}$;
- C là nồng độ của từng chất thuộc nhóm sulfonamid thu được (5.6.4), tính theo ng/ml ;
- V là thể tích cuối cùng của dung dịch mẫu thử (5.5), tính theo ml;
- W là khối lượng mẫu thử (5,0 g).

TIÊU CHUẨN NGÀNH 28 TCN 197: 2004

PENICILLIN TRONG SẢN PHẨM THỦY SẢN - PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG BẰNG SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

Penicillins in fishery products - Method for quantitative analysis by High Performance Liquid Chromatography

(ban hành kèm theo Quyết định số 03/2004/QĐ-BTS ngày 01/3/2004 của Bộ trưởng Bộ Thủy sản).

1. Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định hàm lượng các chất thuộc nhóm penicilin (gồm penicilin G, penicilin V, amoxicilin, ampicilin, oxacilin, cloxacilin, dicloxacilin và nafcilin) trong thủy sản và sản phẩm thủy sản bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (sau đây gọi tắt là HPLC).

Giới hạn phát hiện của phương pháp: penicilin G là $3 \mu\text{g}/\text{kg}$; penicilin V là $3 \mu\text{g}/\text{kg}$; amoxicilin là $10 \mu\text{g}/\text{kg}$; ampicilin là $4 \mu\text{g}/\text{kg}$; oxacilin là $3 \mu\text{g}/\text{kg}$; cloxacilin là $5 \mu\text{g}/\text{kg}$; dicloxacilin là $11 \mu\text{g}/\text{kg}$ và nafcilin là $7 \mu\text{g}/\text{kg}$.

2. Phương pháp tham chiếu

Tiêu chuẩn này được xây dựng dựa theo phương pháp xác định hàm lượng các chất thuộc nhóm penicilin trong sản phẩm thủy sản của Phòng Kiểm nghiệm AFSSA (Pháp).

3. Nguyên tắc

Quá trình thử nghiệm gồm 4 giai đoạn sau:

- a) Chiết các chất thuộc nhóm penicilin ra khỏi mẫu sản phẩm thủy sản bằng dung dịch đệm photphat pH = 9.
- b) Làm sạch và cô đặc dịch chiết trên cột chiết pha rắn C18.
- c) Tạo dẫn xuất với anhydrit benzoic ở nhiệt độ 50°C , sau đó với 1,2,4 - triazole và clorua thủy ngân ở nhiệt độ 65°C .
- d) Định lượng bằng sắc ký lỏng hiệu

năng cao với đầu dò UV ở bước sóng 325 nm theo phương pháp ngoại chuẩn.

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

4.1. Thiết bị, dụng cụ

4.1.1. Hệ thống HPLC gồm:

- a) Bơm HPLC;
- b) Đầu dò UV;
- c) Bộ phận tiêm mẫu tự động;
- d) Cột pha đảo C_8 dài 150 mm, đường kính 3,9 mm, kích thước hạt 5 μm ;
- đ) Tiên cột C_8 dài 4 mm, đường kính 4 mm, kích thước hạt 5 μm và
- e) Hệ thống xử lý số liệu (Thermo Separation Products) gồm giao diện (loại SN4000), máy tính, phần mềm điều khiển thiết bị và xử lý sắc ký (loại PC1000 phiên bản 3.03).

4.1.2. Máy lắc ống nghiệm (Vortex).

4.1.3. Máy khuấy từ (NUOVA7).

4.1.4. Máy khuấy quay (Rheax).

4.1.5. Máy ly tâm lạnh (GR 4.11).

4.1.6. Máy đo pH (Accumet 10).

4.1.7. Máy ly tâm siêu tốc lạnh (MR 1822).

4.1.8. Máy nghiền đồng thể (Siemens)

4.1.9. Bể siêu âm (Bransonic 220).

4.1.10. Bể điều nhiệt hoạt động ở nhiệt độ 50 và 65°C (Polytest).

4.1.11. Bơm chân không cho hệ chiết pha rắn (N79KN18).

4.1.12. Thiết bị lọc với màng lọc HVLP 0,45 μm .

4.1.13. Cân phân tích, $d = 0,1\text{mg}$ (A 120S).

4.1.14. Cột chiết pha rắn Bond Elut C18, dung tích 6 ml, 500 mg.

4.1.15. Hệ chiết pha rắn (VAC - ELUT).

4.1.16. Dụng cụ phân phối dung môi loại 10 và 20 ml.

4.1.17. Cốc có mỏ các loại dung tích: 50, 100, 250, 500 và 1000 ml.

4.1.18. Bình định mức thủy tinh các loại dung tích: 10 ml, 30 ml, 1 lít và 2 lít.

4.1.19. Bình định mức thủy tinh màu nâu các loại dung tích: 25, 50 và 100 ml.

4.1.20. Ống nghiệm thủy tinh các loại.

4.1.21. Pipet tự động các loại: 100, 200, 1000 và 5000 μl và đầu hút pipetman.

4.1.22. Ống ly tâm có nút dung tích: 5 và 50 ml.

Chú thích: có thể dùng các loại thiết bị, dụng cụ tương đương khác.

4.2. Hóa chất

4.2.1. Chuẩn natri penicilin G dạng axit 93,4%, (SIGMA Chemical).

4.2.2. Chuẩn penicilin V dạng axit 89,8%, (SIGMA Chemical).

4.2.3. Chuẩn amoxicilin trihydrat 86,3% dạng axit, (SIGMA Chemical).

- 4.2.4. Chuẩn ampicilin natri 92,2% dạng axit, (SIGMA Chemical).
- 4.2.5. Chuẩn oxacilin natri 85,5% dạng axit, (SIGMA Chemical).
- 4.2.6. Chuẩn nafcilin natri 82,8% dạng axit, (SIGMA Chemical).
- 4.2.7. Chuẩn cloxacilin natri 87,8% dạng axit, (SIGMA Chemical).
- 4.2.8. Chuẩn dicloxacin natri 95,3% dạng axit, (SIGMA Chemical).
- 4.2.9. Nước cất loại dùng cho HPLC (Alpha - Q Millipore).
- 4.2.10. Axetonitril.
- 4.2.11. Metanol.
- 4.2.12. Isooctan.
- 4.2.13. Anhydrit benzoic ((C₆H₅CO)₂O).
- 4.2.14. Hydrophotphat đinatri khan (Na₂HPO₄).
- 4.2.15. Hydrophotphat mononatri dihydrat (NaH₂PO₄·2H₂O).
- 4.2.16. Thiosulfat natri pentahydrat (Na₂S₂O₃·5H₂O).
- 4.2.17. Clorua natri (NaCl).
- 4.2.18. Tetrabutyla mmonium hydro-sulfat (C₁₆H₃₇NO₄S).
- 4.2.19. 1,2,4-triazole (C₂H₃N₃).
- 4.2.20. Clorua thủy ngân (HgCl₂).
- 4.2.21. Natri hydroxit (NaOH).
- 4.3. Dung dịch thử và dung dịch chuẩn
- 4.3.1. Chuẩn bị dung dịch đệm photphat 0,1 mol/l pH = 6,0
- Hòa tan các chất gồm: 9,938 g Na₂HPO₄ (4.2.14); 20,278 g NaH₂PO₄·2H₂O (4.2.15); 7,788 g Na₂S₂O₃·5H₂O (4.2.16); 13,582 g C₁₆H₃₇NO₄S (4.2.18) trong 800 ml nước cất (4.2.9) rồi định mức đến vạch để có 2 lít. Sau đó, lọc dung dịch qua màng lọc Milipore 0,45 μm (4.1.12).
- Chú thích:* dung dịch có thể bảo quản được trong 5 ngày ở nhiệt độ từ +2°C đến +8°C.
- 4.3.2. Chuẩn bị 1 lít pha động (tỷ lệ 65:35): trộn 350 ml axetonitril (4.2.10) trong 650 ml dung dịch đệm photphat 0,1 mol/l pH = 6,0 (4.3.1).
- Chú thích:* chuẩn bị pha động hàng ngày hoặc phối trộn qua bơm HPLC.
- 4.3.3. Chuẩn bị dung dịch NaOH 5 mol/l: hòa tan 20,0 g NaOH (4.2.21) trong 100 ml nước cất (4.2.9).
- 4.3.4. Chuẩn bị dung dịch NaOH 2 mol/l: hòa tan 4,0 g NaOH (4.2.21) trong 50 ml nước cất (4.2.9).
- 4.3.5. Chuẩn bị dung dịch chiết (đệm photphat 0,1 mol/l pH = 9): hòa tan 14,196 g Na₂HPO₄ khan (4.2.14) trong nước cất (4.2.9) rồi định mức để có 1 lít dung dịch.

Chú thích: chuẩn bị dung dịch chiết hàng tuần và giữ ở nhiệt độ trong phòng.

4.3.6. Chuẩn bị dung dịch NaCl 2%: hòa tan 20,0 g NaCl (4.2.17) trong nước cất (4.2.9) để có 1 lít dung dịch.

4.3.7. Chuẩn bị dung dịch rửa giải (tỷ lệ 50:50) trên cột C18: trộn 50 ml nước cất (4.2.9) và 50 ml axetonitril (4.2.10).

Chú thích: chuẩn bị dung dịch hàng ngày.

4.3.8. Chuẩn bị dung dịch đệm pH = 8 để pha chất chuẩn: dùng dung dịch NaOH 5 mol/l (4.3.3) chỉnh 250 ml dung dịch đệm photphat 0,1 mol/l pH = 6 (4.3.1) tới pH = 8.

Chú thích: chuẩn bị dung dịch hàng tuần.

4.3.9. Chuẩn bị dung dịch (tỷ lệ 50:50) để hòa tan các chất chuẩn: trộn 50 ml dung dịch đệm photphat 0,1 mol/l pH = 8 (4.3.8) trong 50 ml axetonitril (4.2.10).

Chú thích: chuẩn bị dung dịch hàng ngày.

4.2.10. Chuẩn bị dung dịch anhydrit benzoic 0,2 mol/l: hòa tan 2,262 g anhydrit benzoic (4.2.13) vào 50 ml axetonitril (4.2.10) rồi định mức tới vạch trong bình thủy tinh màu.

Chú thích: dung dịch bảo quản trong chai màu nâu, tránh ánh sáng.

4.2.11. Chuẩn bị dung dịch clorua thủy

ngân 0,1 mol/l: hòa tan 0,2715 g HgCl₂ (4.2.20) trong 10 ml nước cất (4.2.9).

Chú thích: dung dịch rất độc, tránh để da tiếp xúc trực tiếp với clorua thủy ngân HgCl₂.

4.2.12. Chuẩn bị dung dịch cho phản ứng tạo dẫn xuất

Hòa tan 13,78 g 1,2,4-triazol (4.2.19) với 60 ml nước cất (4.2.9) trong cốc 100 ml (4.1.17), thêm 10 ml HgCl₂ 0,1 mol/l (4.3.11). Dùng NaOH 0,5 mol/l (4.3.3) chỉnh pH = 9,0 + 0,5. Sau đó, chuyển toàn bộ sang bình định mức màu nâu (4.1.19) rồi định mức đến 100 ml bằng nước cất (4.2.9).

Chú thích:

- Dung dịch thu được bão hòa HgCl₂ và có màu trắng đục, để tối ưu quá trình tạo dẫn xuất dung dịch phải được điều chế trước khi sử dụng ít nhất 24 giờ và phải khuấy mạnh trước mỗi lần sử dụng.

- Bảo quản dung dịch phản ứng tạo dẫn xuất ở nhiệt độ +4°C, nơi tránh ánh sáng. Dung dịch bền trong 3 tháng.

4.3.13. Chuẩn bị dung dịch gốc amoxicillin 0,5 g/l (SM1)

Cân chính xác 0,0579 g chuẩn amoxicilin trihydrat (4.2.3) có 86,3% hoạt tính vào cốc có mỏ (4.1.17), hòa tan bằng nước cất (4.2.9). Sau đó, chuyển toàn bộ dung dịch vào bình định mức màu nâu (4.1.19)

rồi định mức bằng nước cất (4.2.9) để có 100 ml.

4.3.14. Chuẩn bị dung dịch gốc penicilin G 0,5 g/l (SM2)

Cân chính xác 0,0535 g chuẩn penicilin G axit có 93,4% hoạt tính (4.2.1) vào cốc có mỏ (4.1.17), hòa tan bằng nước cất (4.2.9). Sau đó, chuyển toàn bộ dung dịch vào bình định mức màu nâu (4.1.19) rồi định mức bằng nước cất (4.2.9) để có 100 ml.

4.3.15. Chuẩn bị dung dịch gốc penicilin V 0,5 g/l (SM3)

Cân chính xác 0,0557 g chuẩn penicilin V có 89,8% hoạt tính (4.2.2), hòa tan bằng nước cất (4.2.9). Sau đó, chuyển toàn bộ dung dịch vào bình định mức màu nâu (4.1.19) rồi định mức bằng nước cất (4.2.9) để có 100 ml.

4.3.16. Chuẩn bị dung dịch gốc ampicilin 0,5 g/l (SM4)

Cân chính xác 0,0542 g chuẩn ampicilin natri có 92,2% hoạt tính (4.2.4), hòa tan bằng nước cất (4.2.9). Sau đó, chuyển toàn bộ dung dịch vào bình định mức màu nâu (4.1.19) rồi định mức bằng nước cất (4.2.9) để có 100 ml.

4.3.17. Chuẩn bị dung dịch gốc oxacilin 0,5 g/l (SM5)

Cân chính xác 0,0585 g chuẩn oxacilin natri có 85,5% hoạt tính (4.2.5), hòa tan bằng nước cất (4.2.9). Sau đó, chuyển

toàn bộ dung dịch vào bình định mức màu nâu (4.1.19) rồi định mức bằng nước cất (4.2.9) để có 100 ml.

4.3.18. Chuẩn bị dung dịch gốc nafcilin 0,5 g/l (SM6)

Cân chính xác 0,0604 g chuẩn nafcilin có 82,8% hoạt tính (4.2.6), hòa tan bằng nước cất (4.2.9). Sau đó, chuyển toàn bộ dung dịch vào bình định mức màu nâu (4.1.19) rồi định mức bằng nước cất (4.2.9) để có 100 ml.

4.3.19. Chuẩn bị dung dịch gốc cloxacilin 0,5 g/l (SM7)

Cân chính xác 0,0569 g chuẩn cloxacilin natri có 87,8% hoạt tính (4.2.7), hòa tan bằng nước cất (4.2.9). Sau đó, chuyển toàn bộ dung dịch vào bình định mức màu nâu (4.1.19) rồi định mức bằng nước cất (4.2.9) để có 100 ml.

4.3.20. Chuẩn bị dung dịch gốc dicloxacilin 0,5 g/l (SM8)

Cân chính xác 0,0525 g chuẩn dicloxacilin natri có 95,3% hoạt tính (4.2.8), hòa tan bằng nước cất (4.2.9). sau đó, chuyển toàn bộ dung dịch vào bình định mức màu nâu rồi định mức bằng nước cất (4.2.9) để có 100 ml.

4.3.21. Dung dịch chuẩn hỗn hợp các chất thuộc nhóm penicilin để thêm vào mẫu xác định độ thu hồi

Hút chính xác 50 μ l các dung dịch chuẩn SM1, SM2, SM3, SM4 và 300 μ l

các dung dịch chuẩn SM5, SM6, SM7, SM8 vào các bình định mức màu nâu 10 ml (4.1.18) rồi định mức tới vạch bằng nước cất (4.2.9).

4.3.22. Các dung dịch chuẩn hỗn hợp làm việc của 8 loại thuốc thuộc nhóm penicilin

Dùng các dung dịch gốc 0,5 g/l của các loại thuốc thuộc nhóm penicilin (từ SM1 đến SM8) và các bình định mức thủy tinh màu nâu 50 ml (4.1.19).

4.3.22.1. Dung dịch chuẩn hỗn hợp làm việc 1 (ST1): hút chính xác 125 μ l mỗi dung dịch từ SM1 đến SM4 và 375 μ l mỗi dung dịch từ SM5 đến SM8 vào các bình rồi thêm nước cất (4.2.9) để có 50 ml.

4.3.22.2. Dung dịch chuẩn hỗn hợp làm việc 2 (ST2): hút chính xác 250 μ l mỗi dung dịch từ SM1 đến SM4 và 750 μ l mỗi dung dịch từ SM5 đến SM8 vào các bình rồi thêm nước cất (4.2.9) để có 50 ml.

4.3.22.3. Dung dịch chuẩn hỗn hợp làm việc 3 (ST3): hút chính xác 500 μ l mỗi dung dịch từ SM1 đến SM4 và 1,5 ml mỗi dung dịch từ SM5 đến SM8 vào các bình rồi thêm nước cất (4.2.9) để có 50 ml.

4.3.22.4. Dung dịch chuẩn hỗn hợp làm việc 4 (ST4): hút chính xác 1 ml mỗi dung dịch từ SM1 đến SM4 và 3 ml mỗi dung dịch từ SM5 đến SM8 vào các bình rồi thêm nước cất (4.2.9) để có 50 ml.

Chú thích: Các dung dịch từ ST1 đến

ST4 được chuẩn bị hàng tháng và phải bảo quản trong buồng lạnh (nhiệt độ từ +2°C đến +4°C) và tối.

5. Phương pháp tiến hành

5.1. Chuẩn bị mẫu thử

5.1.1. Nghiền 200 g mẫu sản phẩm thủy sản bằng máy nghiền đồng thể (4.1.8). Cân chính xác 5.0 g mẫu đã được nghiền cho vào ống ly tâm 50 ml (4.1.22)

5.1.2. Dùng thiết bị phân phối dung môi (4.1.16) cho 30 ml dung dịch đệm photphat pH = 9 (4.3.5) vào ống ly tâm 50 ml chứa 5 g mẫu thử đã được nghiền rồi lắc trên máy lắc ống nghiệm (4.1.2) trong 1 phút.

5.1.3. Thêm 20 ml isooctan (4.2.12) vào ống nghiệm, tiếp tục lắc trong 1 phút. Sau đó, đồng nhất toàn bộ trên máy khuấy quay (4.1.4) trong 10 phút.

5.1.4. Ly tâm dung dịch trong 10 phút ở 2200 RCF (g), tốc độ 3500 vòng/phút ở nhiệt độ 10°C rồi hút bỏ phần dịch isooctan phía trên. Sau đó, chuyển toàn bộ pha nước sang ống nghiệm sạch 50 ml (4.1.20) và chỉnh pH về khoảng 8 - 9 bằng NaOH 5 mol/l (4.3.3).

5.2. Chuẩn bị mẫu trắng

Mẫu trắng là mẫu sản phẩm thủy sản đã được xác định không có penicilin. Tiến hành chuẩn bị và làm sạch mẫu trắng như đối với mẫu thử theo quy định tại Điều 5.1 và Điều 5.5.

5.3. Chuẩn bị mẫu xác định độ thu hồi 50 µg/kg và 300 µg/kg

Thêm chính xác 100 µl dung dịch chuẩn hỗn hợp các chất thuộc nhóm penicilin (4.3.21) vào 5 g mẫu trắng (5.2). Tiến hành chuẩn bị và làm sạch 2 mẫu xác định độ thu hồi (50 µg/kg và 300 µg/kg) như đối với mẫu thử theo quy định tại Điều 5.1 và Điều 5.5.

5.4. Chuẩn bị dung dịch chuẩn hỗn hợp các penicillin STD dùng để dựng đường chuẩn

5.4.1. Dung dịch chuẩn được chuẩn bị hàng ngày mỗi khi tiến hành phân tích bằng cách pha loãng các dung dịch ST1, ST2, ST3, ST4 trong ống nghiệm với 5 ml dung dịch pha loãng (4.3.9). Tiến hành như sau:

STD0: 100 µl dung dịch hòa loãng chất chuẩn (4.3.9).

STD1: 100 µl ST1 và thêm 900 µl dung dịch hòa tan chất chuẩn (4.3.9).

STD2: 100 µl ST2 và thêm 900 µl dung dịch hòa tan chất chuẩn (4.3.9).

STD3: 100 µl ST3 và thêm 900 µl dung dịch hòa tan chất chuẩn (4.3.9).

STD4: 100 µl ST4 và thêm 900 µl dung dịch hòa tan chất chuẩn (4.3.9).

5.4.2. Tiếp tục thực hiện bước tạo dẫn xuất như theo quy định tại Điều 5.6.

5.5. Làm sạch mẫu

5.5.1. Hoạt hóa cột

Gắn cột chiết pha rắn loại Bond Elut C18 lên giá đỡ, sau đó gắn bình chứa 50 ml lên cột. Thêm lần lượt 10 ml metanol (4.2.11), 10 ml nước cất (4.2.9), 5 ml dung dịch NaCl 2% (4.3.6) và 5 ml dung dịch đệm chiết pH = 9 (4.3.5). Cho ngay dịch chiết thu được (5.1.4) lên bình chiết trên cột đã được hoạt hóa.

Chú thích: không để cột bị khô trong quá trình hoạt hóa cột. Thêm dung dịch cần làm sạch ngay khi hết dịch đệm chiết hoặc khi còn một chút dung dịch đệm chiết.

5.5.2. Hút hỗn hợp với lưu lượng 3 ml/phút rồi thêm 2 ml dung dịch NaCl 2% (4.3.6) 2 ml nước cất (4.2.9). Tiến hành hút kiệt trong vòng 5 phút, ngừng hút chân không.

5.5.3. Đặt ống ly tâm 5 ml (4.1.22) dưới cột rồi rót 1 ml dung dịch rửa giải (4.3.7) lên cột. Để ngấm pha rắn khoảng 1 phút trước khi hút chân không dịch rửa giải với lưu tốc 3 ml/phút.

5.5.4. Sau khi rửa giải xong, thể tích dịch rửa giải khoảng 900 µl, chỉnh đến 1 ml bằng dung dịch rửa giải (4.3.7) trong bình tam giác nút mài.

5.6. Tạo dẫn xuất

5.6.1. Điều chỉnh pH dịch rửa giải trong khoảng 8 - 9 bằng dung dịch NaOH 2 mol/l (4.3.4). Thêm cẩn thận vào dung

dịch rửa giải thu được (5.5.4) 50 µl dung dịch anhydrit benzoic 0,2 mol/l (4.3.10), lắc trong 10 giây trên máy lắc ống nghiệm (4.1.2).

5.6.2. Để phản ứng trong 3 phút trong bể điều nhiệt (4.1.10) ở nhiệt độ 50°C rồi thêm 500 µl dung dịch cho phản ứng tạo dẫn xuất (4.3.12). Khuấy mạnh bình chứa dung dịch cho phản ứng tạo dẫn xuất hoặc đặt trong bể siêu âm (4.1.9) trong 2 phút. Đậy nút và lắc hỗn hợp thu được trên máy lắc ống nghiệm (4.1.2) trong 10 giây.

5.6.3. Để phản ứng xảy ra trong 10 phút trong bể điều nhiệt (4.1.10) ở nhiệt độ 65°C. Sau đó, làm lạnh dưới vòi nước

đến nhiệt độ bình thường, tránh ánh sáng rồi ly tâm trong 10 phút ở 2000 RCF (g).

5.7. Tiến hành phân tích trên HPLC

5.7.1. Điều kiện phân tích

a) Pha động: đệm photphat 0,1 mol/l
pH = 6,0: 65%

Axetonitril: 35%

b) Lưu tốc: 1,0 ml/phút

c) Bước sóng phát hiện: 325 nm

d) Thể tích tiêm mẫu: 200 µl

đ) Nhiệt độ cột: 20°C

e) Thời gian lưu: theo Bảng 1

Bảng 1. Thời gian lưu của các chất thuộc nhóm penicillin

Số thứ tự	Tên chất	Thời gian (phút)	Số thứ tự	Tên chất	Thời gian (phút)
1	Amoxicilin	5,5 ± 0,2	5	Penicilin G	7,6 ± 0,2
2	Penicilin -V	9,0 ± 0,3	6	Ampicilin	11,5 ± 0,4
3	Oxacilin	14,2 ± 0,5	7	Cloxacilin	17,9 ± 0,7
4	Dicloxacin	27,5 ± 1,0	8	Nafcilin	16,9 ± 0,6

5.7.2. Tiêm các dung dịch đã tạo dẫn xuất theo thứ tự:

a) Dung dịch chuẩn đã tạo dẫn xuất với 5 mức nồng độ khác nhau. Dựng đường chuẩn diện tích pic các chuẩn penicillin và nồng độ theo phương trình tuyến tính bậc nhất: $Y = ax + b$.

b) Dung dịch mẫu trắng đã tạo dẫn xuất.

c) Dung dịch 2 mẫu xác định độ thu hồi 50 µg/kg và 300 µg/kg đã tạo dẫn xuất.

d) Dung dịch mẫu thử đã tạo dẫn xuất.

Chú thích:

- Tiêm 200 µl nước cất (0) trước mỗi lần phân tích mẫu mới

- Thay đổi tiền cột sau khoảng 30 - 40 mẫu

- Sau khi phân tích xong, dùng hỗn hợp axetonitril (4.2.10) và nước cất (4.2.9) theo tỷ lệ 50/50 để làm vệ sinh bơm tiêm mẫu. Rửa cột với hỗn hợp trên với tỷ lệ 90/10 trong 60 phút. Nếu ngừng chạy trong thời gian dài, nên rửa cột với hỗn hợp trên, sau đó với metanol (4.2.11) trong khoảng 30 phút, tiếp đến với axetonitril tinh khiết (4.2.10) trong 30 phút. Sau đó, lặp lại với metanol (4.2.11) trong 30 phút và cuối cùng bằng nước cất tinh khiết (4.2.9) trong 60 phút.

- Quy trình này có thể được lặp lại nếu cần thiết.

6. Tính kết quả

Cách tính với tất cả các chất thuộc nhóm penicilin đều giống nhau.

6.1. Hàm lượng các chất thuộc nhóm penicilin có trong mẫu thử được tính theo công thức:

$$C (\mu\text{g}/\text{kg}) = \frac{Y - a}{b} \times \frac{100}{m \times R_m}$$

Trong đó:

- C là hàm lượng các chất thuộc nhóm penicilin có trong mẫu, tính theo µg/kg;

- Y là diện tích pic của các chất thuộc nhóm penicilin có trong mẫu thử;

- a là tung độ góc của đường chuẩn;

- b là hệ số góc của đường chuẩn;

- m là khối lượng mẫu thử đem phân tích (5g);

- R_m là hiệu suất thu hồi trung bình tính từ 2 mẫu xác định độ thu hồi.

6.2. Tính hiệu suất thu hồi

6.2.1. Hiệu suất thu hồi được tính từ kết quả của 2 mẫu xác định độ thu hồi theo công thức sau:

$$R = \frac{Y_{\text{sup}}}{Y_{\text{std}}} \times 100$$

Trong đó:

- R là hiệu suất thu hồi;

- Y_{sup} là diện tích pic của mẫu xác định độ thu hồi;

- Y_{std} là diện tích pic của chất chuẩn với nồng độ 50 µg/kg và 300 µg/kg.

6.2.2. Tính hiệu suất thu hồi trung bình của 2 mẫu xác định độ thu hồi theo công thức sau:

$$R = \frac{R_1 + R_2}{2}$$

6.3. Yêu cầu về độ tin cậy của phép phân tích

Kết quả mẫu phân tích chỉ được chấp nhận khi hiệu suất thu hồi (%) và độ lệch giữa hai lần tiêm (CV) của một loạt mẫu phân tích phải thỏa mãn các số liệu trong Bảng 2.

Bảng 2. Yêu cầu về độ tin cậy của phép phân tích

Số thứ tự	Tên chất	Hiệu suất thu hồi (%)	CV (%)
Mẫu có bổ sung 50 µg/kg			
1	Amoxicilin	75 ± 18	8
2	Penicilin -G	74 ± 17	8
3	Penicilin -V	75 ± 30	13
4	Ampicilin	74 ± 13	6
Mẫu có bổ sung 300 µg/kg			
5	Oxacilin	65 ± 18	9
6	Nafcilin	64 ± 22	12
7	Cloxacilin	60 ± 16	9
8	Dicloxacin	48 ± 17	11

TIÊU CHUẨN NGÀNH 28 TCN 198: 2004

**HISTAMIN TRONG SẢN PHẨM
THỦY SẢN - PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH
LƯỢNG BẰNG SẮC KÝ LỎNG
HIỆU NĂNG CAO**

*Histamin in fishery products - Method
for quantitative analysis by High Perfor-
mance Liquid Chromatography*

(ban hành kèm theo Quyết định số
03/2004/QĐ-BTS ngày 01/3/2004
của Bộ trưởng Bộ Thủy sản).

1. Đối tượng và phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định hàm lượng histamin trong sản phẩm thủy sản bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (sau đây gọi tắt là HPLC). Giới hạn phát hiện của phương pháp là 5 mg/kg.

2. Phương pháp tham chiếu

Tiêu chuẩn này được xây dựng dựa theo Tiêu chuẩn NMKL số 99 - 1981 (Nordic committee on food analysis No. 99 - 1981).

3. Nguyên tắc

Histamin có trong mẫu thủy sản được tách chiết bằng metanol. Dịch chiết được làm sạch trên cột trao đổi anion; sau đó, được tạo dẫn xuất huỳnh quang với o-Phthal aldehyt (OPT). Hàm lượng dẫn xuất histamin được định lượng trên hệ thống HPLC với đầu dò huỳnh quang theo phương pháp ngoại chuẩn.

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

4.1. Thiết bị, dụng cụ

4.1.1. Hệ thống HPLC với đầu dò huỳnh quang.

4.1.2. Cột sắc ký lỏng C18, kích thước cột L x ID: 50 x 4,6 mm, kích thước hạt: 5 μ m.

4.1.3. Máy nghiền đồng thể tốc độ 6000 - 30000 vòng/phút (HEIDOLPH DIAX 900).

4.1.4. Bể điều nhiệt hoạt động ở nhiệt độ 20 - 100°C (GRANT Y14).

4.1.5. Máy lắc tốc độ 50 - 500 vòng/phút (IKA ® KS 260 basic).

4.1.6. Máy đo pH, dải pH từ 2 đến 12 (Knick 766).

4.1.7. Cân phân tích, độ chính xác 0,0001 g.

4.1.8. Cột thủy tinh (khóa teflon, kích thước: 300 x 10,5 mm ID x 13 mm OD).

4.1.9. Bình tam giác, bình định mức và pipet thủy tinh các loại.

4.1.10. Giấy lọc 0.45 μ m (Whatman No.1).

4.2. Hóa chất

Hóa chất phải là loại tinh khiết được sử dụng để phân tích, gồm:

4.2.1. Nước cất dùng cho HPLC.

4.2.2. Metanol dùng cho HPLC.

4.2.3. Axetonitril dùng cho HPLC.

4.2.4. Axit clohydric (HCl) đậm đặc 37 %.

4.2.5. Natri hydroxit (NaOH) rắn.

4.2.6. Kali dihydro phosphat (KH_2PO_4) rắn.

4.2.7. o-Phthal aldehyt (OPT) 99%, được bảo quản lạnh.

4.2.8. Trietylamin (TEA).

4.2.9. Histamin dihydroclorua ($\text{C}_5\text{H}_{11}\text{Cl}_2\text{N}_3$), M = 184,07 g/mol.

4.2.10. Axit phosphoric (H_3PO_4) đậm đặc 85 %.

4.2.11. Nhựa trao đổi anion, Dowex loại 1 x 8, kích thước hạt 50 -100 mesh.

4.3. Dung dịch chuẩn và dung dịch thử

4.3.1. Các dung dịch chuẩn histamin

4.3.1.1. Dung dịch chuẩn histamin gốc 1000 mg/l: hòa tan 0,1656 g histamin dihydroclorua (4.2.9) trong axit HCl 0,1 M rồi định mức đến 100 ml. Dung dịch này bền trong 1 tuần lễ nếu được bảo quản lạnh.

4.3.1.2. Dung dịch chuẩn histamin 10 mg/l: pha loãng 1 ml dung dịch chuẩn gốc histamin 1000 mg/l (4.3.1.1) với dung dịch axit HCl 0,1 M (4.3.2.3) rồi định mức đến 100 ml. Dung dịch này bền trong 1 tuần lễ nếu được bảo quản lạnh.

4.3.1.3. Các dung dịch chuẩn histamin làm việc: pha loãng lần lượt 1; 2 và 3 ml dung dịch chuẩn histamin 10 mg/l (4.3.1.2) trong dung dịch axit HCl 0,1 M (4.3.2.3) rồi định mức đến 100 ml để được các dung dịch chuẩn 0,1; 0,2 và 0,3 mg/l.

Chuẩn bị mới các dung dịch chuẩn mỗi khi phân tích.

4.3.2. Các dung dịch thử

4.3.2.1. Dung dịch axit HCl 2,5 M: pha loãng 125 ml axit HCl (4.2.4) trong nước cất (4.2.1) để có 500 ml.

4.3.2.2. Dung dịch axit HCl 1 M: pha loãng 40 ml dung dịch axit HCl 2,5 M (4.3.2.1) trong nước cất để có 100 ml.

4.3.2.3. Dung dịch axit HCl 0,1 M: pha loãng 10 ml dung dịch axit HCl 1 M (4.3.2.2) trong nước cất để có 100 ml.

4.3.2.4. Dung dịch NaOH 1 M: hòa tan 40 g NaOH (4.2.5) trong 1000 ml nước cất.

4.3.2.5. Dung dịch OPT: hòa tan 0,100 mg OPT (4.2.7) trong 100 ml metanol (4.2.2). Dung dịch bền trong 1 tuần lễ nếu được bảo quản lạnh trong chai sẫm màu.

4.3.2.6. Dung dịch H_3PO_4 1,19 M: pha loãng 121,8 ml H_3PO_4 đậm đặc 85% (4.2.10) với nước cất (4.2.1) để có 1000 ml.

4.3.3. Chuẩn bị nhựa trao đổi anion: nhựa trao đổi anion được đổ vào trong dung dịch NaOH 1 M (4.3.2.4) với tỷ lệ tương ứng 15 ml NaOH/1 g nhựa. Tiến hành khuấy đều dung dịch, để yên ít nhất trong 30 phút rồi gạn bỏ phần dung dịch. Lặp lại thao tác trên. Cuối cùng rửa nhựa với nước cất. Sau đó, đổ nhựa lên giấy lọc rồi rửa nhiều lần với

nước cất (4.2.1) cho đến khi hết NaOH. Nhựa bảo quản được 1 tuần trong nước cất.

4.3.4. Chuẩn bị pha động: hòa tan 1.089 g KH_2PO_4 (4.2.6) trong gần 600 ml nước (4.2.1). Thêm 100 ml axetonitril (4.2.3) và 0,10 ml TEA (4.2.8), chỉnh pH đến $7,30 \pm 0,05$ trên máy đo pH (4.1.6). Sau đó, chuyển dung dịch vào bình định mức 1000 ml (4.1.9) rồi định mức tới vạch bằng nước cất (4.2.1).

Chú thích: trong quá trình chuẩn bị pha động, dung dịch phải được lọc qua giấy lọc 0,45 μ m (4.1.10) và đuổi khí bằng bể siêu âm trước khi sử dụng.

5. Phương pháp tiến hành

5.1. Chuẩn bị mẫu thử

5.1.1. Nghiền ít nhất 200 g mẫu bằng máy nghiền đồng thể (4.1.3). Cân chính xác 10 g mẫu đã được nghiền đồng thể (ký hiệu W) cho vào bình tam giác 150 ml (4.1.9).

5.1.2. Thêm 50 ml metanol (4.2.2) lắc đều trong 2 phút. Đặt bình chứa dung dịch mẫu trên bể điều nhiệt (4.1.4) ở nhiệt độ 60°C trong 15 phút. Sau đó, chuyển toàn bộ sang bình định mức 100 ml; tráng bình tam giác bằng metanol (4.2.2).

5.1.3. Để nguội dung dịch tới nhiệt độ trong phòng rồi định mức đến vạch bằng metanol (4.2.2) để có 100 ml (ký hiệu V_1).

Lắc đều dung dịch rồi lọc qua giấy lọc (4.1.10). Dịch chiết này bền được vài tuần lễ nếu được bảo quản lạnh.

5.2. Chuẩn bị mẫu trắng

Mẫu trắng là mẫu thủy sản đã được xác định không chứa histamin. Tiến hành chuẩn bị mẫu trắng như chuẩn bị với mẫu thử theo quy định tại Điều 5.1.

5.3. Chuẩn bị mẫu để xác định độ thu hồi 100 ppm

Thêm chính xác 1 ml dung dịch chuẩn histamin 1000 mg/l (4.3.1.1) vào 10 g mẫu trắng đã được nghiền đồng thể. Tiến hành chuẩn bị mẫu để xác định độ thu hồi như chuẩn bị với mẫu thử theo quy định tại Điều 5.1.

5.4. Làm sạch mẫu

5.4.1. Chuẩn bị cột làm sạch

Nhồi nhựa trao đổi anion đã được chuẩn bị (4.3.3) vào cột thủy tinh (4.1.8) đến chiều cao khoảng 8 cm và giữ không để khô cột. Trước khi sử dụng phải rửa cột thủy tinh với 10 ml nước cất (4.2.1).

5.4.2. Làm sạch mẫu

Lần lượt cho 1 ml dịch chiết thu được tại các Điều 5.1, 5.2 và 5.3 (kí hiệu V_2) qua cột, rồi rửa cột bằng 4 - 5 ml nước cất (4.2.1). Thu dịch chảy ra vào bình 50 ml đã chứa 5 ml dung dịch axit HCl 1 M (4.3.2.2). Khi lớp dung dịch cách mặt trên lớp nhựa khoảng 2 mm phải cho tiếp

nước cất (4.2.1) vào cột cho đến khi thu được khoảng 35 ml dịch giải hấp. Khóa cột rồi định mức phần dịch giải hấp thu được bằng nước cất (4.2.1) để có 50 ml (ký hiệu V_3).

5.5. Tạo dẫn xuất huỳnh quang

5.5.1. Dung dịch xác định đường chuẩn

Hút chính xác 5 ml các dung dịch chuẩn histamin làm việc (4.3.1.3) vào các bình định mức 50 ml, thêm 3 ml dung dịch NaOH 1 M (4.3.2.4) vào mỗi bình rồi lắc đều. Sau khoảng 5 phút, thêm 1 ml dung dịch OPT (4.3.2.5) vào mỗi bình. Sau đúng 4 phút, tiếp tục thêm 3 ml dung dịch H_3PO_4 1,19 M (4.3.2.6) vào mỗi bình, định mức đến vạch bằng dung dịch HCl 0,1 M (4.3.2.3) rồi lắc đều các bình.

Chú thích: phải lắc đều dung dịch sau mỗi lần thêm hóa chất ít nhất 1 lần trong quá trình tạo phản ứng với dung dịch OPT (4.3.2.5).

5.5.2. Mẫu trắng

Hút chính xác 5 ml dịch chiết mẫu trắng đã được làm sạch (5.4.2) vào bình tam giác 50 ml. Sau đó, tiến hành tạo dẫn xuất như đối với dung dịch xác định đường chuẩn theo quy định tại Điều 5.5.1.

5.5.3. Mẫu xác định độ thu hồi

Hút chính xác 5 ml dịch chiết mẫu xác định độ thu hồi đã được làm sạch (5.4.2) vào bình tam giác 50 ml. Sau đó, tiến

hành tạo dẫn xuất như đối với dung dịch xác định đường chuẩn theo quy định tại Điều 5.5.1.

5.5.4. Mẫu thử

Hút chính xác 5 ml dịch chiết mẫu thử đã được làm sạch (5.4.2) vào bình tam giác 50 ml. Sau đó, tiến hành tạo dẫn xuất như đối với dung dịch xác định đường chuẩn theo quy định tại Điều 5.5.1.

5.6. Tiến hành phân tích trên HPLC

5.6.1. Điều kiện phân tích:

a) Cột sắc ký: cột Licrocart C18, kích thước 50 x 4,6 mm, 5 μ m (4.1.2).

b) Nhiệt độ cột: 40°C.

c) Pha động: hỗn hợp gồm: KH_2PO_4 , axetonitril và TEA (4.3.4).

d) Tốc độ dòng: 1 ml/phút.

đ) Bước sóng kích thích: $\lambda = 350$ nm.

e) Bước sóng phát xạ: $\lambda = 444$ nm.

g) Thể tích tiêm: 20 μ l.

5.6.2. Ổn định cột sắc ký trong 30 phút tại chế độ làm việc.

5.6.3. Tiêm các dung dịch chuẩn đã được tạo dẫn xuất huỳnh quang (5.5.1). Dựng mối quan hệ tuyến tính của diện tích pic sắc ký theo nồng độ.

5.6.4. Tiêm dịch chiết mẫu trắng (5.5.2); dịch chiết mẫu xác định độ thu hồi (5.5.3) và dịch chiết mẫu thử (5.5.4)

đã được tạo dẫn xuất huỳnh quang vào hệ thống HPLC. Mỗi dịch thực hiện 2 lần. Tính diện tích trung bình và xác định nồng độ histamin trong dịch chiết từ đường chuẩn. Tính hàm lượng histamin trong mẫu theo Điều 6.

5.7. Yêu cầu về độ tin cậy của phép phân tích

5.7.1. Độ lặp lại của 2 lần tiêm

Độ lệch chuẩn (CV_s) tính theo diện tích pic sắc ký của 2 lần tiêm cùng một dung dịch chuẩn phải nhỏ hơn 0,5%.

5.7.2. Độ thu hồi (R)

Độ thu hồi của mẫu được xác định theo mỗi lần phân tích mẫu. Độ thu hồi tính được phải nằm trong khoảng từ 90 đến 110%.

5.7.3. Đường chuẩn phải có độ tuyến tính tốt, hệ số tương quan quy hồi tuyến tính (R^2) phải lớn hơn hoặc bằng 0,99.

6. Tính kết quả

Hàm lượng histamin có trong mẫu thử được tính theo công thức sau:

$$M \text{ (mg/kg)} = \frac{C \times V_1 \times V_3}{W \times V_2}$$

Trong đó:

- M là hàm lượng histamin có trong mẫu, tính theo mg/kg.

- C là nồng độ histamin có trong dịch chiết mẫu (5.6.4), tính theo μ g/ml.

- V_1 là thể tích dịch mẫu thử (100 ml) đã được định mức (5.1).

- V_2 là thể tích dịch chiết (1 ml) chuẩn bị được làm sạch (5.4.2).

- V_3 là thể tích dịch đã được làm sạch (5.4.2) chứa trong bình định mức (50 ml).

- W là khối lượng (10 g) của mẫu thử đã được nghiền đồng thể (5.1).

Chú thích: Nếu kết quả tính trên mẫu lớn hơn 15 mg/100 g thủy sản thì phải pha loãng dịch chiết mẫu và thực hiện lại quy trình từ Điều 5.4.

thủy sản bằng kỹ thuật Polymerase Chain Reaction (sau đây gọi tắt là PCR).

2. Tài liệu tham khảo

- Rapid Identification of Salmonella serovars in feces by specific detection of virulence gens, *invA* and *spvC*, by an Enrichment broth culture multiplex PCR combination assay. (CHENG HSUN CHIU AND JONATHAN T.OU. - Journal of Clinical microbiology, p.2619 - 2622. Oct. 1996).

- Specific detection of Salmonella spp. by multiplex polymerase chain reaction. (JS. WAY, KL. JOSEPHSON, SD. PILLAI, M. ABBASZADAGAN, CP. GERBA AND IL. PEPPER. - Appl. Environ. Microbiol., 59 (5): 1473 - 1479, 1993).

- Detection of Salmonella spp. and Listeria monocytogenes in Suspended Organic Waste by Nucleic Acid Extraction and PCR. (CAROLA BURTSCHER, PAPA A. FALL, PETER A. WILDERER, AND STEFAN WUERTZ. - Appl. Environ. Microbiol. 65 (5): 2235 - 2237, 1999).

- Nordic commitees on food analysis (NMKL) No 71, 5th ed., 1999, Salmonella - Detection in foods.

3. Giải thích thuật ngữ

Trong Tiêu chuẩn này, các thuật ngữ dưới đây được hiểu như sau:

3.1. Salmonella

TIÊU CHUẨN NGÀNH 28 TCN 199: 2004

SALMONELLA TRONG SẢN PHẨM THỦY SẢN - PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH TÍNH BẰNG KỸ THUẬT POLYMERASE CHAIN REACTION

Salmonella in fishery products - Method for qualitative analysis by Polymerase Chain Reaction

(ban hành kèm theo Quyết định số 03/2004/QĐ-BTS ngày 01/3/2004 của Bộ trưởng Bộ Thủy sản).

1. Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp định tính Salmonella trong sản phẩm

Giống Salmonella là vi sinh vật thuộc họ vi khuẩn đường ruột enterobacteriaceae có hơn 2400 kiểu huyết thanh. Salmonella là trực trùng Gram âm, kích thước khoảng 0,6 - 2,0 μm , hiếu khí, có thể di động, không tạo bào tử, sinh hơi lên men dextrosa, sinh khí dihydrogen sulfua.

Tất cả các kiểu huyết thanh Salmonella đều mang cụm gen inv (invasion) giúp cho quá trình xâm nhiễm vào trong thành ruột của người và động vật, mở đầu của tiến trình gây bệnh. Cụm gen này nằm trong hệ thống gen SPI - 1 (Salmonella pathogenicity island) có mặt trong tất cả các Salmonella, từ nhóm tiến hóa thấp nhất là S. bongori đến nhóm tiến hóa cao nhất là S. enterica I. InvA là một bản gen luôn có mặt trong hệ thống gen inv.

3.2. Kỹ thuật PCR là kỹ thuật dùng để khuếch đại số lượng bản sao của một trình tự ADN đích qua các chu kỳ gồm 3 bước: biến tính ADN, bắt cặp bổ sung với môi và tổng hợp mạch mới nhờ enzym ADN polymerase.

3.3. ADN đích (target ADN)

Trong kỹ thuật PCR, ADN đích được hiểu là một đoạn ADN đặc trưng cho đối tượng cần phát hiện. Trong Tiêu chuẩn này, ADN đích là một đoạn trong gen invA.

3.4. Biến tính là sự chuyển từ sợi ADN dạng mạch kép sang dạng mạch đơn dưới

tác dụng của tác nhân biến tính. Trong Tiêu chuẩn này, tác nhân biến tính là nhiệt.

3.5. Bắt cặp bổ sung là sự kết hợp giữa hai mạch ADN hay một ADN mạch đơn với ARN có các trình tự bổ sung để tạo nên một mạch kép.

3.6. ADN polymerase là enzym tổng hợp nên mạch ADN mới từ một mạch khuôn. Phương pháp này sử dụng Taq ADN polymerase là một ADN polymerase hoạt động ở nhiệt độ cao.

3.7. Môi là một trình tự ADN hay ARN ngắn bắt cặp với một mạch khuôn ADN có mang một đầu 3' - OH tự do giúp ADN polymerase bắt đầu tổng hợp mạch mới.

4. Nguyên tắc

Phương pháp định tính này dựa vào việc xác định đoạn ADN đích có được khuếch đại hay không. Quá trình xác định được thực hiện bằng cách điện di sản phẩm khuếch đại trên gel agarose nhuộm màu ADN bằng etyl bromua và quan sát bằng đèn UV có bước sóng là 302 nm. Nếu trong mẫu có gen đích, trên bảng gel điện di sẽ xuất hiện sản phẩm khuếch đại có kích thước phù hợp với độ dài của đoạn ADN đích đã định. Nếu trong mẫu không có gen đích, trên gel điện di không xuất hiện sản phẩm khuếch đại hay sản phẩm khuếch đại có kích thước không phù hợp với đoạn ADN đích.

5. Thiết bị, dụng cụ, hóa chất và môi trường

5.1. Thiết bị, dụng cụ

5.1.1. Tủ ấm 37°C.

5.1.2. Máy luân nhiệt.

5.1.3. Máy ly tâm dùng cho ống eppendorf 1,5 ml.

5.1.4. Máy lắc ống nghiệm.

5.1.5. Thiết bị điện di ngang và bộ nguồn điện di có điện thế hoạt động từ 80 đến 150 volt.

5.1.6. Hộp đèn soi UV có kính lọc 302 nm.

5.1.7. Bộ chụp ảnh trên đèn UV.

5.1.8. Ống Eppendorf 0,2, 0,5 ml; 1,5 ml chuyên dùng cho PCR.

5.2. Hóa chất, môi trường

5.2.1. Môi

Gồm hai môi invA1 và invA2 được thiết lập cách nhau 520 bp trong gen invA có vai trò trong quá trình xâm nhiễm Salmonella vào thành ruột động vật và người. Trình tự của hai môi như sau:

invA1:

5' - TTGTTACGGCTATTTTGACCA - 3'

invA2:

5' - CTGACTGCTACCTTGGCTGATG - 3'

Nồng độ môi sử dụng trong phân tích

được pha loãng thành 6 pM trong đệm TE. Đệm TE có thành phần như sau: 10 mM Tris-HCl (pH = 8), 1 mM EDTA.

5.2.2. Môi trường nuôi cấy vi sinh vật và các loại hóa chất khác

Khuyến khích sử dụng môi trường nuôi cấy dạng bột khô và các vật liệu dùng cho phản ứng khuếch đại PCR được tổng hợp thành kit đang được lưu hành trên thị trường có thành phần phù hợp như dưới đây.

Quá trình pha chế, bảo quản, sử dụng phải tuân thủ theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Trong trường hợp sử dụng các vật liệu hóa chất riêng lẻ, độ tinh khiết của các thành phần và nước pha chế phải đảm bảo chất lượng dùng cho vi sinh và sinh học phân tử.

5.2.2.1. Dung dịch đệm pepton

Pepton ($C_5H_{10}O_5$): 10,0g

Natri clorua (NaCl): 5,0g

Dinatri hydro phôt phat (Na_2HPO_4): 3,6 g

Kali dihydro phôt phat (KH_2PO_4): 1,5g

Nước cất: 1000 ml

Hòa tan các thành phần trong nước cất, đun tan, phân phối vào trong các bình chứa phù hợp. Hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C trong 15 phút. pH sau khi khử trùng là $7,0 \pm 0,2$ ở 25°C.

5.2.2.2. Hỗn hợp dùng trong khuếch đại PCR 1,1x

Taq polymerase: 0,025 U/ μ l (1,25 U/50 μ l)

Tris - HCl (pH = 8,8 ở nhiệt độ 25°C): 75 mM

Sunphat amon (NH₄)₂ SO₄: 20 mM

Tween 20: 0,01% (v/v)

dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP): 200 μ M (mỗi loại)

Magiê clorua (MgCl₂): 1,5 mM

Tất cả các thành phần trên được pha chế trong nước cất 2 lần và bảo quản ở nhiệt độ 4°C trong 1 tháng. Có thể bảo quản ở nhiệt độ - 20°C trong 1 năm. Không nên rã đông và tái đông dung dịch đã pha chế nhiều lần.

5.2.2.3. Thang ADN

Nên sử dụng thang đo phù hợp có thể ước lượng được đoạn khuếch đại 520 bp. Có thể sử dụng sản phẩm khuếch đại có kích thước 520 bp đã biết trước làm thang đo trong phương pháp này.

5.2.2.4. Agarose

Sử dụng trong kỹ thuật này là loại dùng để điện di ADN có kích thước nhỏ hơn 1000 bp.

5.2.2.5. Đệm điện di TAE 1x

Tris: 4,84 g

Na₂EDTA 0,5M, pH = 8,0: 2 ml

Axit axetic băng: 1,14 ml

Nước cất cho đủ: 1000 ml

Nên pha chế thành dung dịch 10x (đậm đặc 10 lần), khi sử dụng mới pha loãng với nước thành dung dịch 1x.

5.2.2.6. Đệm tải mẫu 6x

Glyxerol: 30 %

Xanh bromphenon: 0,25 %

Tris: 200 mM

Na₂EDTA: 20 mM

Các thành phần trên được pha trong nước cất, bảo quản ở nhiệt độ 4°C.

5.2.2.7. Thuốc nhuộm AND: dung dịch ethyl bromua nồng độ 10 mg/ml.

6. Phương pháp tiến hành

6.1. Lấy mẫu

Cân chính xác 25 g mẫu (hoặc một khối lượng chính xác tùy theo yêu cầu) rồi cho vào bình tam giác hoặc bao PE vô trùng.

6.2. Tăng sinh

Nhằm làm tăng số lượng Salmonella trong mẫu, các tế bào bị suy yếu hay tổn thương cũng được phục hồi và phát triển. Giai đoạn này được tiến hành trong môi trường không chọn lọc và trên nguyên tắc cứ một phần khối lượng mẫu sẽ bỏ

sung 9 phần khối lượng môi trường tăng sinh. Nếu lấy 25 g mẫu, phải bổ sung 225 g môi trường tăng sinh dung dịch pepton đậm.

Ủ mẫu có môi trường tăng sinh ở nhiệt độ $37,0^{\circ}\text{C} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ trong khoảng 18 giờ \pm 2 giờ.

6.3. Xử lý mẫu giải phóng ADN

Giai đoạn này nhằm thu nhận sinh khối sau khi tăng sinh, rửa sạch môi trường sau khi nuôi cấy, phá vỡ tế bào để giải phóng ADN. Cách xử lý như sau:

6.3.1. Lắc đều canh khuẩn tăng sinh. Hút 0,5 ml vào trong ống eppendorf có thể tích 1,5 ml, ly tâm với tốc độ 10 000 vòng/phút trong 5 phút rồi loại bỏ phần môi trường lỏng bên trên. Rửa sinh khối bên dưới với nước cất vô trùng rồi tiếp tục ly tâm với chế độ như trên để loại bỏ phần nước.

6.3.2. Huyền phù sinh khối trong ống với 0,5 ml nước cất vô trùng. Đun sôi cách thủy trong 10 phút. Ly tâm huyền dịch sau khi đun với tốc độ 10 000 vòng/phút trong 5 phút để lắng các mảnh vỡ tế bào xuống đáy. Phần dịch trong bên trên được coi là khuôn ADN để tiến hành phản ứng khuếch đại.

6.4. Khuếch đại

Giai đoạn này nhằm làm tăng số lượng bản sao đoạn ADN đích trên máy luân nhiệt (thermocycler) bằng hai môi đặc

trung. Quá trình khuếch đại được tiến hành trong khoảng 30 chu kỳ.

6.4.1. Chuẩn bị ống khuếch đại

Hút 45 μl hỗn hợp khuếch đại PCR 1,1 x cho vào trong ống nghiệm PCR có thể tích 0,2 hoặc 0,5 ml, thêm vào 1 μl mỗi môi invA1 và invA2 có nồng độ 6 pM và 3 μl mẫu khuôn ADN. Tổng thể tích trong một ống khuếch đại là 50 μl .

Đối chứng dương: thay dịch khuôn ADN mẫu bằng dịch ADN của *Salmonella* chuẩn đã biết.

Đối chứng âm: thay dịch khuôn ADN mẫu bằng nước cất vô trùng.

6.4.2. Chương trình khuếch đại

Các ống khuếch đại được đặt vào trong máy luân nhiệt. Chương trình khuếch đại như sau:

Duy trì nhiệt độ 95°C trong 5 phút để làm biến tính hoàn toàn các sợi ADN trong mẫu. Tiếp theo là 35 chu kỳ, mỗi chu kỳ có 3 bước như sau: $95^{\circ}\text{C}/60$ giây; $54^{\circ}\text{C}/45$ giây và $72^{\circ}\text{C}/60$ giây. Sau khi kết thúc 35 chu kỳ, mẫu được giữ ở nhiệt độ 72°C trong 10 phút, sau đó giữ ổn định ở nhiệt độ 20°C cho đến khi điện di.

6.5. Điện di sản phẩm khuếch đại

6.5.1. Chuẩn bị gel điện di agarose 1%

Gel agarose 1 % pha trong đệm TAE 1x được đun chảy hoàn toàn và đổ vào khay điện di đã có sẵn các lược để tạo giếng.

Gel điện di phải có độ dày khoảng 3 - 4 mm. Gel sau khi chuẩn bị được ngâm chìm hoàn toàn trong đệm TAE.

6.5.2. Chuẩn bị dịch điện di

Mẫu sau khi khuếch đại được nhuộm với 10 μ l đệm tải mẫu 6x rồi trộn thật đều.

6.5.3. Điện di

Một giếng trong gel điện di được sử dụng cho thang ADN chuẩn hay mẫu đối chứng dương. Nạp 10 μ l dịch điện di đã chuẩn bị vào trong gel agarose. Tiến hành điện di trong 60 phút ở hiệu điện thế 100 vôn.

6.6. Nhuộm ADN, quan sát sản phẩm khuếch đại

6.6.1. Chuẩn bị dung dịch nhuộm mẫu

Pha dung dịch nhuộm ADN như sau: cho 0,2 ml etyl bromua 10 mg/ml vào 0,5 lít nước, pha vào trong khay chứa có miệng rộng hơn bản gel điện di.

6.6.2. Nhuộm gel

Ngâm bản gel đã điện di vào dung dịch nhuộm trong 10 phút. Rửa gel bằng nước trong khoảng 3 - 5 phút để loại bỏ phần etyl bromua dư.

6.6.3. Quan sát, chụp hình

Cho bản gel đã nhuộm lên hộp đèn soi UV, đóng kính bảo vệ, bật đèn rồi quan sát các vạch sáng đỏ của ADN xuất hiện

trên bản gel. Sau đó, chụp hình để lưu trữ kết quả.

7. Đọc và giải thích kết quả

Kết quả phân tích chỉ được xem xét kết luận khi mẫu đối chứng dương tính có sản phẩm khuếch đại ADN với kích thước 520 bp và mẫu đối chứng âm không có sản phẩm này.

Mẫu được kết luận là dương tính Salmonella khi có sản phẩm khuếch đại 520 bp trên bản gel. Mẫu được kết luận là âm tính khi không có sản phẩm khuếch đại, hay sản phẩm khuếch đại có kích thước khác hơn 520 bp.

8. Quy định về đảm bảo an toàn

Trong quá trình tiến hành thao tác phải thực hiện đúng các quy định sau đây:

8.1. Thuốc nhuộm etyl bromua là một chất độc có thể gây ung thư cho người và động vật. Do đó, khi sử dụng hóa chất này phải có găng tay và kính bảo hộ. Dung dịch sau khi sử dụng phải cho chảy qua than hoạt tính trước khi đổ bỏ.

8.2. Chỉ được bật đèn UV để quan sát ADN sau khi đã đóng kính bảo vệ.

8.3. Nghiêm cấm sử dụng các dụng cụ liên quan đến sản phẩm sau khuếch đại cho việc tăng sinh hay chuẩn bị mẫu.

8.4. Phòng thí nghiệm phải được bố trí riêng biệt khu chuẩn bị mẫu trước

khi khuếch đại và khu xử lý sản phẩm sau khi khuếch đại để tránh hiện tượng nhiễm chéo gây kết quả dương tính giả./.

TIÊU CHUẨN NGÀNH 28 TCN 200: 2004

VIBRIO CHOLERAЕ TRONG SẢN PHẨM THỦY SẢN - PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH TÍNH

Vibrio cholerae in fishery products - Method for qualitative analysis

(ban hành kèm theo Quyết định số 03/2004/QĐ-BTS ngày 01/3/2004 của Bộ trưởng Bộ Thủy sản).

1. Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp định tính vi khuẩn *Vibrio cholerae* trong sản phẩm thủy sản.

2. Phương pháp tham chiếu

Tiêu chuẩn này được xây dựng dựa theo chương 9, Sổ tay phân tích vi sinh, tái bản lần 8 năm 1998 của Cục Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Mỹ.

3. Nguyên tắc

Vibrio cholerae thuộc giống *Vibrio*, họ Vibrionaceae là vi khuẩn gram âm, kỵ khí tùy nghi, có khả năng di động, phản ứng oxidaza dương tính, phát triển

được ở nhiệt độ 42°C, lên men đường sacaroza, khử lysin; phát triển được ở môi trường không có muối nhưng không phát triển được ở môi trường có nồng độ muối lớn hơn hoặc bằng 6 %; nhạy với hợp chất ức chế phẩy khuẩn O/129 Vibriostat.

Phát hiện *Vibrio cholerae* bằng cách tăng sinh trong môi trường lỏng chọn lọc và cấy chuyển phân lập trên môi trường rắn chọn lọc. Những khuẩn lạc nghi ngờ được khẳng định bằng thử nghiệm sinh hóa và kháng huyết thanh.

4. Thiết bị, dụng cụ và môi trường, thuốc thử

4.1. Thiết bị, dụng cụ

- 4.1.1. Tủ ấm (37,0°C ± 1,0°C).
- 4.1.2. Bể điều nhiệt (42,0°C ± 0,2°C).
- 4.1.3. Cân có độ chính xác 0,0001 g.
- 4.1.4. Máy nghiền đồng thể.
- 4.1.5. Máy lác ống nghiệm.
- 4.1.6. Đĩa petri.
- 4.1.7. Ống nghiệm đường kính các cỡ: 13, 16 và 18 mm.
- 4.1.8. Một số thiết bị thông thường khác như: máy đo pH, tủ sấy, nồi hấp thanh trùng, tủ lạnh.

4.2. Môi trường, thuốc thử

- 4.2.1. Nước pepton kiềm: Ancalin Peptone Water (APW)

Pepton: 10,00 g

Natri clorua (NaCl): 10,00 g

Nước cất: 1,00 lít

pH = 8,5 ± 0,2 (ở nhiệt độ 25°C)

Hòa tan các thành phần, chỉnh pH theo yêu cầu rồi chia vào các bình chứa thích hợp. Hấp ở nhiệt độ 121°C trong 10 phút. Khi bảo quản phải vặn chặt nắp bình, để tránh bay hơi nước và pH bị thay đổi.

4.2.2. Môi trường phân lập: Thạch Thiosunfat-Citrat-Bile-muối-Sacaroza (TCBS thạch)

Pepton: 10,00 g

Cao nấm men: 5,00 g

Natri xitrat: 10,00 g

Natri thiosunphat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$): 10,00 g

Mật bò: 5,00 g

Sacaroza: 20,00 g

Natri clorua (NaCl): 10,00 g

Sắt (III) xitrat ($\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7$): 1,00 g

Natri cholate: 3,00 g

Xanh bromthymol: 0,04 g

Xanh thymol: 0,04 g

Thạch: 15,00 g

Nước cất vô trùng: 1,00 lít

pH = 8,6 ± 0,2 (ở nhiệt độ 25°C).

Đun sôi để hòa tan hoàn toàn các thành phần rồi làm nguội ngay tới nhiệt

độ khoảng 50°C. Rót 15 - 20 ml vào các đĩa petri vô trùng. Trước khi sử dụng phải làm khô đĩa môi trường bằng cách để qua đêm ở nhiệt độ trong phòng hoặc đặt đĩa trong tủ ấm ở nhiệt độ khoảng 37°C - 45°C.

Chú thích: Không hấp khử trùng môi trường.

4.2.3. Môi trường, thuốc thử sinh hóa

4.2.3.1. Thạch sắt ba đường: Triple Sugar Iron agar -TSI

Pepton: 15,00 g

Proteose pepton: 5,00 g

Cao thịt bò: 3,00 g

Cao nấm men: 3,00 g

Natri clorua (NaCl): 5,00 g

Lactoza: 10,00 g

Sacaroza: 10,00 g

Glucoza: 1,00 g

Sắt (II) sunphat (FeSO_4): 0,20 g

Natri thiosunphat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$): 0,30 g

Đỏ phenol: 0,024 g

Thạch: 12,00 g

Nước cất: 1,00 lít; pH = 7,4 ± 0,2 (ở nhiệt độ 25°C).

Hòa tan các thành phần, chia vào mỗi ống nghiệm khoảng 5 ml. Hấp ở nhiệt độ 121°C trong 15 phút. Trước khi môi trường đông, đặt các ống nằm nghiêng

sao cho phần thạch đứng cao khoảng 2 - 3 cm và phần thạch nghiêng khoảng 4 - 5 cm.

4.2.3.2. Thạch sắt hai đường: Klingler Iron Agar - KIA

Polypepton pepton: 20,00 g

Natri clorua (NaCl): 5,00 g

Lactoza: 20,00 g

Dextroza: 1,00 g

Sắt ammoni xitrat: 0,50 g

Natri thiosulphat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$): 0,50 g

Phenon đỏ: 0,025 g

Thạch: 15,00 g

Nước cất: 1,00 lít; pH = $7,4 \pm 0,2$

(ở nhiệt độ 25°C)

Cách pha như quy định tại Điều 4.2.3.1.

4.2.3.3. Hugh - Leifson Glucoza

Pepton: 2,00 g

Cao nấm men: 0,50 g

Natri clorua (NaCl): 30,00 g

Dextroza: 10,00 g

Tím bromcresol: 0,015 g

Thạch: 3,00 g

Nước cất: 1,00 lít; pH = $7,4 \pm 0,2$

(ở nhiệt độ 25°C)

Đun nóng để hòa tan hoàn toàn các thành phần trên rồi chia vào mỗi ống

thạch khoảng 5 ml. Hấp ở nhiệt độ 121°C trong 15 phút.

4.2.3.4. O/F Glucoza

Trypton: 2,00 g

Natri clorua (NaCl): 5,00 g

Dikali hydro phosphat (K_2HPO_4): 0,30 g

Xanh bromthymol: 0,03 g

Thạch: 2,00 g

Glucoza: 10,00 g

Nước cất: 1,00 lít; pH = $6,8 \pm 0,2$

(ở nhiệt độ 25°C)

Đun sôi để hòa tan các thành phần rồi rót 5 ml môi trường vào mỗi ống thạch. Hấp ở nhiệt độ 121°C trong 15 phút.

4.2.3.5. Canh thang muối trypton có giải nồng độ NaCl là: 0; 1; 3; 6; 8 và 10 % NaCl (ký hiệu lần lượt là: T_1N_0 ; T_1N_1 ; T_1N_3 ; T_1N_6 ; T_1N_8 và T_1N_{10})

Hòa tan 10 g trypton trong 1 lít nước cất. Sau đó, thêm lần lượt: 10, 30, 60, 80 và 100 g NaCl để được các canh thang trypton có giải nồng độ NaCl như trên. Sau đó, khuấy đều, rồi chỉnh pH sao cho môi trường sau khi hấp có pH = $7,2 \pm 0,2$ (ở nhiệt độ 25°C). Tiến hành rót 5 ml môi trường vào mỗi ống thạch. Hấp ở nhiệt độ 121°C trong 15 phút.

Chú thích: Các ống môi trường phải được nút chặt trong quá trình bảo quản để tránh bốc hơi nước làm thay đổi nồng độ muối.

4.2.3.6. Môi trường thử decarboxylaza (Môi trường cơ bản)

Pepton: 5,00 g

Cao nấm men: 3,00 g

Glucosa: 1,00 g

Tím bromcresol: 0,02 g

Nước cất: 1,00 lít; pH = $6,5 \pm 0,2$ (ở nhiệt độ 25°C)

Tùy theo loại môi trường cần pha, thêm 5 g một trong các loại axitamin: L-lysin hoặc L-arginin hoặc L-ornithin vào môi trường cơ bản trên. Sau đó, rót 5 ml môi trường vào các ống nghiệm, nút lỏng nắp. Hấp ở nhiệt độ 121°C trong 10 phút. Các ống phải được nút chặt trong khi bảo quản và sau khi cấy.

4.2.3.7. Canh thang urê

Urê: 20,00 g

Dinatri hydro phosphat (Na_2HPO_4): 9,50 g

Dikali hydro phosphat (K_2HPO_4): 9,10 g

Cao nấm men: 0,10 g

Đỏ phenol: 0,01 g

Nước cất: 1,00 lít; pH = $6,8 \pm 0,1$ (ở nhiệt độ 25°C)

Hòa tan các thành phần. Không được hấp khử trùng, lọc vô trùng bằng màng lọc có đường kính lỗ là $0,45 \mu\text{l}$. Sau đó, rót khoảng 1,5 - 3,0 ml vào các ống

nghiệm hoặc đĩa petri đã được sấy vô trùng.

4.2.3.8. Canh thang bromcresol (Môi trường cơ bản)

Pepton: 10,00 g

Natri clorua (NaCl): 5,00 g

Cao thịt bò: 3,00 g

Tím bromcresol: 0,04 g

Nước cất: 1,00 lít; pH = $7,0 \pm 0,2$ (ở nhiệt độ 25°C)

Hòa tan các thành phần trên, chỉnh pH sao cho môi trường sau khi pha đạt yêu cầu như trên rồi rót 2,5 ml vào các ống nghiệm. Hấp ở nhiệt độ 121°C trong 10 phút.

Pha các loại dung dịch cacbonhydrat 50% (như: sacaroza, lactoza, D-cellobioza, arabinoza, D-manniton và D-mannoza) trong nước cất rồi lọc vô trùng. Thêm $0,278 \pm 0,002$ ml dung dịch này vào ống nghiệm chứa 2,5 ml môi trường cơ bản. Môi trường cuối cùng có nồng độ carbohydrat là 5%.

4.2.3.9. Thạch trypton muối 2%: TSA 2% NaCl

Trypton: 10,00 g

Natri clorua (NaCl): 20,00 g

Thạch: 20,00 g

Nước cất: 1,00 lít; pH = $7,2 \pm 0,2$ (ở nhiệt độ 25°C)

Đun sôi để hòa tan các thành phần

trên. Hấp ở nhiệt độ 121°C trong 15 phút. Sau đó, để nguội đến nhiệt độ khoảng 45 - 50°C rồi rót ra đĩa hoặc ống nghiệm.

4.2.3.10. Thuốc thử Oxidaza

Hòa tan 1,0 g N, N, N, N'-tetrametyl-p-phenylenediamine.2HCl vào 100 ml nước cất vô trùng. Đựng dung dịch trong lọ sẫm màu hoặc bọc lọ trong giấy bạc. Bảo quản dung dịch ở nhiệt độ 2 - 8°C, sử dụng trong vòng 7 ngày.

4.2.3.11. Dầu khoáng vô trùng

Rót khoảng 20 - 50 ml dầu khoáng vào bình có nắp xoáy. Hấp dầu ở nhiệt độ 121°C trong 30 phút.

4.2.3.12. Thuốc thử ONPG

Dung dịch đậm:

Natri dihydro phosphat ngậm 1 phân tử nước ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$): 6,90 g

Nước cất: 45,00 ml

Dung dịch hydroxit natri (NaOH) 30% (w/v): 3,00 ml

Hòa tan $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ trong nước cất. Thêm dung dịch NaOH 30% và chỉnh pH = 7,0 (ở nhiệt độ 25°C), thêm nước cất vừa đủ 50 ml. Bảo quản dung dịch ở nhiệt độ 2 - 8°C.

Dung dịch ONPG:

ONPG (o-nitrophenyl-D-galactoside): 80,00 mg

Nước cất ở 37°C: 15,00 ml

Dung dịch đậm: 5,00 ml

Hòa tan ONPG trong nước cất ở nhiệt độ 37°C. Thêm dung dịch đậm vào rồi lắc đều. Bảo quản ở nhiệt độ 2 - 8°C. Trước khi sử dụng phải làm ấm dung dịch đến nhiệt độ 37°C.

Chú thích: Có thể sử dụng đĩa ONPG được sản xuất sẵn thay cho dung dịch ONPG.

4.2.3.13. Các đĩa 10 µg và 150 µg O/129 Vibriostat

Cắt giấy lọc thành các mảnh tròn đường kính khoảng 5 - 6 mm rồi đặt vào các đĩa petri, hấp khử trùng.

Chuẩn bị đĩa 150 µg O/129 Vibriostat: hòa tan 2,4 - diamino - 6,7 - diisopropyl pteridin photphat (O/129) trong nước cất vô trùng theo tỷ lệ 15,0 mg/ml, nhỏ 10µl dung dịch này vào mỗi đĩa.

Chuẩn bị đĩa 10 µg O/129 Vibriostat: hòa tan 2,4 - diamino - 6,7 - diisopropyl - pteridine phosphat (O/129) trong nước cất vô trùng theo tỷ lệ 1,0mg/ml, nhỏ 10µl dung dịch này vào mỗi đĩa.

Sấy khô các đĩa, bảo quản trong tủ lạnh, tránh ánh sáng.

4.2.3.14. Dung dịch nước muối sinh lý

Hòa tan 8,5 g NaCl trong 1 lít nước cất. Hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C trong 15 phút rồi để nguội.

5. Phương pháp tiến hành

5.1. Chuẩn bị mẫu

5.1.1. Chuẩn bị mẫu thủy sản

Cân vô trùng 25 g mẫu thủy sản vào một túi PE đã vô trùng. Cắt các mẫu lớn thành các mảnh nhỏ rồi thêm 225 ml nước pepton kiềm APW (4.2.1) vào túi, nghiền bằng máy nghiền đồng thể trong 2 phút.

5.1.2. Chuẩn bị mẫu hào

Lấy phần thịt của 10 - 12 con hào (kể cả nước) rồi cắt nhỏ, trộn đều. Sau đó, nghiền bằng máy nghiền đồng thể 50 g mẫu hào trong 450 ml nước pepton kiềm APW (4.2.1) trong 2 phút. Chia dung dịch mẫu này vào 2 bình vô trùng, mỗi bình chứa 250 ml rồi pha loãng thành hai dãy bằng cách trộn đều 10 ml dung dịch mẫu trong 90 ml nước pepton kiềm APW (4.2.1). Ủ mẫu ở hai chế độ nhiệt là $37,0^{\circ}\text{C} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ và $42,0^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ theo như quy định tại Điều 5.2.

5.2. Tăng sinh

5.2.1. Đối với mẫu thông thường

Ủ các bình chứa mẫu đã chuẩn bị tại Điều 5.1.1 (kể cả mẫu chứng dương và mẫu chứng âm) ở nhiệt độ $37,0^{\circ}\text{C} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ trong 6 - 8 giờ. Sau đó, phân lập như quy định tại Điều 5.3, phần còn lại ủ tiếp 16 - 24 giờ rồi phân lập lại.

5.2.2. Đối với mẫu hào

Ủ 1 dãy pha loãng 10^{-1} đến 10^{-2} ở nhiệt độ $37,0^{\circ}\text{C} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ trong 6 - 8 giờ và 16 - 24 giờ.

Ủ 1 dãy pha loãng 10^{-1} đến 10^{-2} ở nhiệt độ $42,0^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ trong 6 - 8 giờ.

5.3. Phân lập và đọc kết quả trên đĩa

Sau khi nuôi ủ ở các chế độ nhiệt và các khoảng thời gian trên (5.2), không lắc, dùng khay cấy lấy dịch mẫu trên bề mặt cấy ria vào môi trường TCBS thạch (4.2.2). Ủ các đĩa TCBS thạch ở nhiệt độ $37,0^{\circ}\text{C} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ trong 18 - 24 giờ.

Trên môi trường TCBS thạch, khuẩn lạc *V. cholerae* tròn, hơi dẹt, bóng, màu vàng (do vi khuẩn lên men sacarozơ), ở giữa đậm và có viền mờ xung quanh.

5.4. Thử nghiệm sinh hóa và kháng huyết thanh

5.4.1. Thử nghiệm sinh hóa sơ bộ

Chọn ít nhất 3 khuẩn lạc nghi ngờ trên TCBS thạch để cấy chuyển sang môi trường không chọn lọc TSA 2% NaCl (4.2.3.9). Ủ ở nhiệt độ $37,0^{\circ}\text{C} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ trong 18 - 24 giờ. Khuẩn lạc mọc trên môi trường này được sử dụng để thực hiện các thử nghiệm sinh hóa.

5.4.1.1. Thử nghiệm trên môi trường TSI, KIA

Cấy chuyển các khuẩn lạc từ môi trường TSA (5.4.1) vào các ống thạch nghiêng TSI (4.2.3.1) hoặc KIA (4.2.3.2).

Nới lỏng các nắp ống để tạo điều kiện hiếu khí. Nuôi ủ ở nhiệt độ $37,0^{\circ}\text{C} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ trong 18 - 24 giờ.

Trên môi trường TSI, *V.cholerae* làm phân thạch nghiêng và thạch đứng của môi trường chuyển màu vàng, không sinh hơi và không sinh H_2S . Trên môi trường KIA, phân thạch nghiêng có màu đỏ và thạch đứng màu vàng, không sinh hơi và không sinh H_2S .

5.4.1.2. Thử nghiệm với các canh thang trypton muối

Cấy khuẩn lạc từ môi trường TSA (5.4.1) vào các ống canh thang muối trypton có giải nồng độ NaCl là: 0; 1; 3; 6; 8 và 10 % (4.2.3.5). Nuôi ủ ở nhiệt độ $37,0 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ trong 18 - 24 giờ, rồi ủ lại các ống âm tính sau 18 - 24 giờ nữa. *V. cholerae* phát triển được trong ống canh thang có nồng độ NaCl là 0%, 3% và làm đục môi trường.

5.4.1.3. Thử nghiệm lên men - oxy hóa

Cấy khuẩn lạc từ môi trường TSA (5.4.1) vào 2 ống môi trường bán lỏng Hugh-Leifson glucoza (4.2.3.3) hoặc O/F glucoza (4.2.3.4). Phủ khoảng 1 - 2 ml dầu khoáng vô trùng (4.2.3.11) vào một trong 2 ống. Ủ các ống nghiệm ở nhiệt độ $37,0 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ trong 1 - 2 ngày. *V. cholerae* lên men glucoza làm môi trường Hugh - Leifson từ màu tím chuyển thành vàng và môi trường O/F từ màu xanh thành vàng.

5.4.1.4. Thử nghiệm oxidaza

Đặt giấy lọc lên một nắp đĩa petri, nhỏ khoảng 2 - 3 giọt thuốc thử oxidaza (4.2.3.10). Dùng que cấy bạch kim (platin) hoặc que cấy nhựa dùng một lần; hoặc que gỗ vô trùng lấy các khuẩn lạc từ môi trường TSA (5.4.1) ria lên vị trí đã nhỏ thuốc thử oxidaza. *V. cholerae* làm vết ria có màu tím thẫm hoặc xanh thẫm sau 10 giây.

Chú thích: Không dùng que cấy bằng crôm hoặc bằng sắt trong thử nghiệm này.

5.4.1.5. Nhuộm gram

V. cholerae là vi khuẩn gram âm, hình cong dạng dấu phẩy.

5.4.2. Thử nghiệm sinh hóa kháng định

5.4.2.1. Thử nghiệm phát triển ở nhiệt độ 42°C

Cấy vi khuẩn từ TSA (5.4.1) vào một ống canh thang trypton 1% NaCl (4.2.3.5). Ủ ở nhiệt độ $42,0^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ trong 18 - 24 giờ. *V. cholerae* phát triển được ở nhiệt độ 42°C làm môi trường bị đục.

5.4.2.2. Thử nghiệm cacbonhydrat

Cấy vi khuẩn từ TSA (5.4.1) vào các ống canh thang bromcresol có chứa một trong các loại cacbohydrat: sacaroza, lactoza, D-cellobioza, arabinoza, D-

manniton, D-mannoza (4.2.3.8). Ủ các ống canh thang ở nhiệt độ $37,0^{\circ}\text{C} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$. Phản ứng dương tính khi môi trường có màu vàng, âm tính khi môi trường giữ nguyên màu đỏ.

V. cholerae cho phản ứng sacaroza, manniton, mannoza dương tính và lactoza, cellobioza, arabinoza âm tính.

5.4.2.3. Thử nghiệm decacboxylaza/dehydrolaza

Cấy vi khuẩn từ môi trường TSA (5.4.1) vào các ống canh thang ornithin, lysin, arginin (4.2.3.6) và ống đối chứng không có axit amin. Mỗi ống được phủ 1 - 2 ml dầu khoáng vô trùng (4.2.3.11). Ủ các ống ở nhiệt độ $37,0^{\circ}\text{C} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ trong 18 - 24 giờ. Phản ứng dương tính khi môi trường giữ nguyên màu tím hoặc hơi đậm hơn. Phản ứng âm tính khi toàn bộ ống canh thang có màu vàng ổn định trong 4 ngày (tương tự màu của ống đối chứng).

V. cholerae cho phản ứng lysin và ornithin dương tính, phản ứng arginin âm tính.

5.4.2.4. Thử nghiệm urê

Cấy vi khuẩn từ TSA (5.4.1) vào canh thang urê (4.2.3.7), ủ ở nhiệt độ $37,0^{\circ}\text{C} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ trong 18 - 24 giờ. *V. cholerae* cho phản ứng âm tính nếu môi trường giữ nguyên màu tím hồng.

5.4.2.5. Thử nghiệm ONPG

Lấy vi khuẩn đã phát triển trên môi trường TSI (5.4.1.1) hoặc từ môi trường không chọn lọc khác có chứa 1,0% lactoza vào ống nghiệm có chứa 0,25 ml nước muối sinh lý, hòa tan. Thêm 1 giọt toluen vào ống rồi lắc đều, để yên trong 5 phút. Thêm 0,25 ml dung dịch ONPG (4.2.3.12). Ủ ống nghiệm ở nhiệt độ $37,0^{\circ}\text{C} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$. Kiểm tra ống định kỳ trong 24 giờ. *V. cholerae* cho phản ứng ONPG dương tính khi dung dịch có màu vàng.

Có thể dùng đĩa ONPG (4.2.3.12) thay cho thuốc thử ONPG. Hòa tan khuẩn lạc nghi ngờ vào ống nghiệm chứa 0,2 ml nước muối sinh lý. Đặt đĩa ONPG vào đáy ống rồi ủ ấm và đọc kết quả như trên.

5.4.2.6. Thử nghiệm tính nhạy cảm với hợp chất ức chế phẩy khuẩn O/129 Vibriostat

Dàn vi khuẩn lên đĩa thạch TSA 2% NaCl (4.2.3.9). Đặt các đĩa O/129 có chứa 10 μg hoặc 150 μg Vibriostat (4.2.3.13) vào các vị trí khác nhau. Sau đó, lật ngược đĩa rồi ủ ở nhiệt độ $37,0 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ trong 18 - 24 giờ. *V. cholerae* không phát triển được do bị ức chế bởi Vibriostat tạo một vòng vô khuẩn xung quanh các đĩa O/129.

5.4.3. Thử nghiệm kháng huyết thanh

Nhỏ 1 giọt kháng huyết thanh lên lam kính sạch và một giọt nước muối sinh lý

(4.2.3.14) lên một vị trí khác của lam. Dùng que cấy vô trùng khác nhau chuyển vi khuẩn từ TSA (5.4.1) lên hai giọt dung dịch trên rồi phân tán đều vi khuẩn. Kết luận dương tính khi có hiện tượng ngưng kết ở giọt có kháng huyết thanh và không có hiện tượng ngưng kết ở giọt nước muối. Sử dụng chủng chứng dương và chủng chứng âm trong quá trình thực hiện.

Tóm tắt thử nghiệm kháng huyết thanh *V. cholerae* theo Bảng 1 và Bảng 2.

Bảng 1. Phân biệt *V. cholerae* O1 và *V. cholerae* non - O1

Kháng nguyên	Kháng huyết thanh đa giá O1	Dung dịch muối sinh lý	Kết luận
Chủng có kết quả sinh hóa tương tự <i>V. cholerae</i>	+	-	<i>V. cholerae</i> O1
Chủng có kết quả sinh hóa tương tự <i>V. cholerae</i>	-	-	<i>V. cholerae</i> non - O1
Chủng có kết quả sinh hóa tương tự <i>V. cholerae</i>	+	+	Chủng không đặc hiệu với kháng nguyên O nhóm 1

Bảng 2. Phân biệt các kiểu huyết thanh chủng *V. cholerae* O1

Kháng nguyên	Kháng huyết thanh Inaba	Kháng huyết thanh Ogawa	Dung dịch muối sinh lý	Kết luận
<i>V. cholerae</i> O1	+	-	-	Chủng Inaba
<i>V. cholerae</i> O1	-	+	-	Chủng Ogawa
<i>V. cholerae</i> O1	+	+	-	Chủng Hikojima
<i>V. cholerae</i> O1	-	-	-	Chủng không đặc hiệu

6. Đọc kết quả

Phát hiện hoặc không phát hiện được *V. cholerae* trong 25 g mẫu./.

TIÊU CHUẨN NGÀNH 28 TCN 201: 2004

SẢN PHẨM THỦY SẢN ĐÔNG LẠNH - CỎI ĐIỆP

Frozen fishery products - Scallop meat

(ban hành kèm theo Quyết định số
03/2004/QĐ-BTS ngày 01/3/2004
của Bộ trưởng Bộ Thủy sản).

1. Đối tượng và phạm vi áp dụng

1.1. Tiêu chuẩn này quy định các yêu cầu về chất lượng và an toàn vệ sinh cho sản phẩm còi điệp đông lạnh đã qua xử lý nhiệt (chần) hoặc chưa qua xử lý nhiệt, phải qua nấu chín trước khi ăn.

1.2. Điệp nguyên liệu dùng để chế biến còi điệp gồm 2 loài:

- Điệp quạt/Điệp răng lược (*Chlamys nobilis*) và
- Điệp tròn/Điệp bơi viên trắng (*Amusium pleuronectes*).

2. Giải thích thuật ngữ

Còi điệp là phần cơ thịt của điệp đã được tách ra khỏi vỏ, màng áo và nội tạng; có thể còn dính trứng hoặc không dính trứng (trong dân gian gọi là có gan hoặc không gan).

3. Yêu cầu về nguyên liệu và bảo quản, vận chuyển nguyên liệu

3.1. Còi điệp phải được chế biến từ điệp

nguyên liệu còn tươi tốt, nguyên vẹn. Hai mảnh vỏ điệp còn khít chặt hoặc nếu hai mảnh vỏ đang mở, khi đụng vào vỏ phải tự khít lại.

3.2. Trong thời gian không quá 24 giờ kể từ khi đánh bắt, điệp phải được nhanh chóng vận chuyển về nơi chế biến bằng phương tiện vận chuyển có mái che.

3.3. Khi bảo quản, vận chuyển phải xếp lên chặt các cá thể điệp lại với nhau trong dụng cụ chứa đựng. Không cho điệp mở miệng để giữ độ ẩm. Giữ độ ẩm cho điệp bằng nước biển, tránh để nước ngọt tiếp xúc với điệp. Không để điệp phơi dưới nắng gió.

4. Yêu cầu kỹ thuật

4.1. Sản phẩm còi điệp đông lạnh gồm hai loại:

a) Loại có trứng: là còi điệp khi lấy còi, trứng được giữ lại và phải dính chắc vào còi.

b) Loại không trứng: là còi điệp đã loại bỏ trứng khi lấy còi.

4.2. Kích cỡ

Cỡ còi điệp được tính bằng số lượng còi điệp có trong 446,42g (lbs) gồm:

4.2.1. Còi điệp không trứng gồm các cỡ: 40 - 60, 60 - 80, 80 - 100, 100 - 120, 120 - 150, 150 - 200, 200 - 300, 300 - 500, 500 - 800 và vụn.

4.2.2. Còi điệp có trứng không có cỡ được cấp đông rời (IQF) và dạng khối 500 - 800, các cỡ còn lại tương tự như còi (block).
điệp không trứng.

4.3. Dạng sản phẩm

Sản phẩm còi điệp đông lạnh gồm dạng quy định trong Bảng 1.

4.4. Chỉ tiêu cảm quan của sản phẩm sau khi rã đông phải theo đúng yêu cầu quy định trong Bảng 1.

Bảng 1. Chỉ tiêu cảm quan

Tên chỉ tiêu	Yêu cầu
1. Màu sắc	Từ trắng ngà đến vàng ngà, không bị vàng sậm.
2. Trạng thái	Mềm mại tự nhiên, còn nguyên vẹn, không bị trương nước, không dập nát.
3. Mùi	Đặc trưng của sản phẩm, không có mùi ôi dầu, không có mùi lạ.
4. Vị	Ngọt đậm đà tự nhiên của sản phẩm, không mặn, không có vị lạ.
5. Tạp chất	Không cho phép có tạp chất nhìn thấy bằng mắt thường.
6. Khối lượng	Khối lượng tịnh của mỗi đơn vị sản phẩm trên mẫu kiểm sau khi rã đông nhanh để ráo nước, cho phép sai khác $\pm 5\%$; song giá trị trung bình của tổng số mẫu kiểm phải đạt giá trị ghi trên bao bì.

4.5. Chỉ tiêu hóa học của sản phẩm phải theo đúng mức quy định trong Bảng 2.

Bảng 2. Chỉ tiêu hóa học

Tên chỉ tiêu	Mức
1. Hàm lượng protein thô, tính bằng phần trăm theo khối lượng, không nhỏ hơn	15
2. Hàm lượng nước, tính bằng phần trăm theo khối lượng, không lớn hơn	81
3. Tỷ số giữa hàm lượng nước với hàm lượng protein thô (H/P), không lớn hơn	5
4. Hàm lượng phot phat, tính bằng số mg P_2O_5 trong 1kg sản phẩm, không lớn hơn.	5.000

4.6. Chỉ tiêu vi sinh của sản phẩm phải theo đúng mức và yêu cầu quy định trong Bảng 3.

Bảng 3. Chỉ tiêu vi sinh

Tên chỉ tiêu	Mức
1. Tổng số vi khuẩn hiếu khí, tính bằng số khuẩn lạc trong 1 g sản phẩm	$m = 100.000$ $M = 1.000.000$ $n = 5$ $c = 2$
2. Vi khuẩn chỉ điểm vệ sinh	
- Staphylococcus aureus, tính bằng số khuẩn lạc trong 1 g sản phẩm.	$m = 100$ $M = 1.000$ $n = 5$ $c = 2$
- Coliform, tính bằng số khuẩn lạc trong 1 g sản phẩm.	$m = 10$ $M = 100$ $n = 5$ $c = 2$
hoặc E.coli (trên môi trường đặc), tính bằng số khuẩn lạc trong 1 g sản phẩm.	$m = 100$ $M = 1.000$ $n = 5$ $c = 1$
3. Vi khuẩn gây bệnh, tính bằng số khuẩn lạc trong 25 g sản phẩm:	
- Sallmonela	Không cho phép $n = 5$ $c = 0$
- Shigella	Không cho phép $n = 5$ $c = 0$
- Vibrio cholera	Không cho phép $n = 5$ $c = 0$

- Trong đó:

- n là số mẫu.

- m là giới hạn dưới. Mẫu có số khuẩn lạc đếm được ở dưới giới hạn này được coi là đạt.

- M là giới hạn chấp nhận được. Mẫu có số khuẩn lạc đếm được vượt quá giới hạn này được coi là không đạt.

- c là số mẫu có số khuẩn lạc đếm được nằm giữa trị số m và M.

- Chất lượng của một lô được xem là:
 - Đạt khi tất cả các mẫu có số khuẩn lạc không lớn hơn 3 m.
 - Chấp nhận được khi tất cả các mẫu có số khuẩn lạc trong khoảng 3 m và 10 m (M) và khi c/n không lớn hơn 2/5.

- Chất lượng của một lô được xem là không đạt khi:

- Trong tất cả các mẫu, số khuẩn lạc đều lớn hơn M.
- Khi c/n lớn hơn 2/5.

5. Phương pháp thử

5.1. Lấy mẫu và chuẩn bị mẫu theo TCVN 5276 - 90.

5.2. Thử chỉ tiêu cảm quan theo phần 3 của TCVN 2068 -1993.

5.3. Thử chỉ tiêu hóa học

5.3.1. Xác định hàm lượng protein thô theo TCVN 3705 - 90.

5.3.2. Xác định hàm lượng nước theo TCVN 3700 - 90.

5.3.3. Xác định hàm lượng phôt phát theo 28TCN 185: 2002.

5.4. Thử chỉ tiêu vi sinh

5.4.1. Xác định tổng số vi khuẩn hiếu khí chịu nhiệt trung bình, Coliform,

E.coli, Staphylococcus aureus, Shigella, Sallmonela theo TCVN 5287-1994.

5.4.2. Xác định Vibrio cholera 28TCN 200: 2004.

6. Bao gói, ghi nhãn, bảo quản và vận chuyển

6.1. Bao gói

Bao gói theo TCVN 5512 -1991 (Bao bì vận chuyển - Thùng cactông đựng hàng thủy sản xuất khẩu); TCVN 5653 -1992 (Bao bì thương phẩm - Túi chất dẻo) và TCVN 4378: 2001 (Cơ sở chế biến thủy sản - Điều kiện đảm bảo chất lượng và vệ sinh an toàn thực phẩm).

6.2. Ghi nhãn

Ghi nhãn hàng hóa theo Thông tư số 03/2000/TT-BTS ngày 22/9/2000 của Bộ trưởng Bộ Thủy sản hướng dẫn thực hiện Quyết định số 178/1999/QĐ-TTg ngày 30/8/1999 của Thủ tướng Chính phủ (ban hành Quy chế ghi nhãn hàng hóa lưu thông trong nước và hàng hóa xuất khẩu, nhập khẩu) đối với hàng hóa thủy sản.

6.3. Bảo quản và vận chuyển theo TCVN 4378: 2001 (Cơ sở chế biến thủy sản - Điều kiện đảm bảo chất lượng và vệ sinh an toàn thực phẩm)/.

VĂN PHÒNG CHÍNH PHỦ XUẤT BẢN

Điện thoại: 8233947

In tại Xí nghiệp Bản đồ I - Bộ Quốc phòng