

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 10644:2014

Xuất bản lần 1

**THỦY SẢN – XÁC ĐỊNH ĐỘC TÓ GÂY LIỆT CƠ (PSP)
TRONG ĐỘNG VẬT CÓ VỎ - PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ
LỎNG HIỆU NĂNG CAO (HPLC) CÓ LÀM SẠCH BẰNG
CHIẾT PHA RẮN VÀ SỬ DỤNG DETECTOR HUỖNH QUANG**

*Aquatic products – Determination of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins in
shellfish – HPLC method with solid phase extraction clean-up and
fluorescence detection*

HÀ NỘI - 2014

Lời nói đầu

TCVN 10644:2014 xây dựng dựa theo AOAC 2005.06 *Paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish. Prechromatographic oxidation and liquid chromatography with fluorescence detection*;

TCVN 10644:2014 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F13 *Phương pháp phân tích và lấy mẫu* biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Thủy sản - Xác định độc tố gây liệt cơ (PSP) trong động vật có vỏ - Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) có làm sạch bằng chiết pha rắn và sử dụng detector huỳnh quang

Aquatic products – Determination of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins in shellfish – HPLC method with solid phase extraction clean-up and fluorescence detection

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định các độc tố gây liệt cơ (PSP) như saxitoxin (STX), neosaxitoxin (NEO), các gonyautoxin 2 và 3 (GTX 2,3), gonyautoxin 1 và 4 (GTX 1,4), decarbamoyl saxitoxin (dcSTX), B-1, C-1 và C-2, C-3 và C-4 trong động vật thủy sản có vỏ (trai, ngao, hào và sò).

Giới hạn định lượng của phương pháp:

saxitoxin:	22 µg/kg;	GTX 2,3 (đồng thời):	125 µg/kg (nồng độ thấp nhất được thử nghiệm);
B-1:	27 µg/kg;	dcSTX:	8 µg/kg;
NEO:	40 µg/kg;	GTX 1,4 (đồng thời):	50 µg/kg;
C1,2 (đồng thời):	93 µg/kg;	C3,4 (đồng thời):	725 µg/kg.

Xem Phụ lục A về các kết quả thử nghiệm liên phòng chấp nhận phương pháp.

2 Nguyên tắc

Phần mẫu thử được chiết bằng cách gia nhiệt với dung dịch axit axetic. Các dịch chiết được làm sạch bằng cột chiết pha rắn (SPE) C18. Sau quá trình oxy hóa periodat và peroxit, mẫu được phân tích bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) sử dụng detector huỳnh quang. Hầu hết các độc tố (STX, C1,2, B-1, dcSTX và GTX2,3) có thể được định lượng sau khi làm sạch bằng cột SPE-C18 một lần. Các dịch chiết chứa các độc tố NEO, GTX1,4, C3,4 và B-2 phải được tinh sạch tiếp bằng cột SPE-COOH. Nồng độ các độc tố PSP tính được bằng cách so sánh diện tích pic hoặc chiều cao pic của mẫu thử và của các chất chuẩn tương ứng.

3 Thuốc thử và vật liệu thử

Chỉ sử dụng thuốc thử thuộc loại tinh khiết phân tích.

TCVN 10644:2014

3.1 Nước đã khử ion hai lần.

3.2 Axit axetic băng.

3.3 Axit axetic, dung dịch 1 % khối lượng.

3.4 Axit axetic, dung dịch 0,1 M.

3.5 Metanol.

3.6 Amoni format, dung dịch 0,3 M và 0,1 M.

3.7 Amoni axetat, dung dịch 0,01 M.

3.8 Natri clorua, dung dịch 0,3 M và 0,05 M.

3.9 Natri hydroxit, dung dịch 1 M và 0,2 M.

3.10 Hydro peroxit (H_2O_2), dung dịch 10 % (khối lượng/thể tích) (được bảo quản trong tủ lạnh).

3.11 Dinatri hydro phosphat (Na_2HPO_4), dung dịch 0,3 M.

3.12 Axit periodic, dung dịch 0,03 M (được bảo quản trong tủ lạnh).

3.13 Axetonitril.

3.14 Chất oxy hóa periodat

Chuẩn bị trong ngày sử dụng bằng cách trộn 5 ml dung dịch axit periodic 0,03 M (3.12), 5 ml dung dịch amoni format 0,3 M (3.6) và 5 ml dung dịch dinatri hydro phosphat 0,3 M (3.11), điều chỉnh pH đến 8,2 bằng dung dịch natri hydroxit 0,2 M (3.9), dùng máy đo pH (4.4).

3.15 Chất bổ chính nền, dùng cho quá trình oxy hóa bằng periodat

Chuẩn bị bằng cách chiết từ mẫu hầu không chứa các độc tố PSP theo 5.2 và 5.3. Chỉnh pH của dịch chiết đến 6,5 bằng dung dịch natri hydroxit 1 M (3.9) và để yên 2 ngày đến 3 ngày để kết tủa các chất đồng thời chiết được. Gạn lớp phía trên hoặc lọc qua bộ lọc cỡ lỗ 0,45 μm (4.16) và bảo quản trong tủ lạnh khi không sử dụng. Dịch chiết từ hầu không chứa các độc tố PSP có thể được bảo quản đông lạnh trong 2 tháng ở nhiệt độ $-20\text{ }^\circ C$, nhưng chất bổ chính nền phải được chuẩn bị mới sau 2 tuần.

Phân tích chất bổ chính nền đối với các độc tố PSP bằng cách oxy hóa bằng periodat và peroxit để đảm bảo không có độc tố trước khi sử dụng.

3.16 Các dung dịch chuẩn STX, NEO, GTX1,4, GTX2,3, C1,2, B-1 và dcSTX

Chuẩn bị các dung dịch chuẩn riêng rẽ nói trên trong dung dịch axit axetic 0,1 M (3.4) với các nồng độ trong dải từ 100 µg/ml đến 2 000 µg/ml¹⁾. Pha loãng với nước để có được các dung dịch chuẩn làm việc với nồng độ trong dải từ 8 µg/ml đến 100 µg/ml. Các dung dịch này bền ít nhất một tháng.

CHÚ THÍCH Để thuận tiện, các chất chuẩn có thể được kết hợp thành ba hỗn hợp bằng cách pha loãng các dung dịch gốc trong nước. Các dung dịch này được chỉnh đến pH 4 bằng dung dịch axit axetic 0,1 M (3.4). Đối với các dung dịch pha loãng tiếp theo sử dụng dung dịch axit axetic 0,1 mM, để đảm bảo các dung dịch duy trì ở pH 4. Các hỗn hợp như sau:

- Hỗn hợp I: GTX1,4 và NEO, đối với quá trình oxy hóa bằng periodat.
- Hỗn hợp II: GTX2,3, STX, B-1 và dcSTX, đối với quá trình oxy hóa bằng peroxit.
- Hỗn hợp III: C1,2 và C3,4, đối với quá trình oxy hóa bằng periodat và peroxit.

Hình B.2 cho thấy sắc ký đồ điển hình của các hỗn hợp trên.

Chuẩn bị các dung dịch pha loãng với axit axetic 0,1 mM như trên. Bảo quản các dung dịch chuẩn pha loãng trong lọ bằng chất dẻo để trong vật chứa bằng thủy tinh đã khử hoạt tính bằng cách ngâm lọ qua đêm trong natri hydroxit, rửa sạch bằng nước, sau đó tráng bằng metanol (3.5) và làm khô.

Các sản phẩm oxy hóa không bị ảnh hưởng bởi các loại lọ; do đó, phản ứng oxy hóa có thể được thực hiện trong lọ thủy tinh lấy mẫu tự động mà không cần khử hoạt tính.

3.17 Pha động

Pha động A: dung dịch amoni format 0,1 M (3.6);

Pha động B: dung dịch amoni format 0,1 M trong axetonitril 5 %.

Cả hai pha động đều được chỉnh đến pH 6 bằng cách thêm 6 ml dung dịch axit axetic 0,1 M (3.4).

4 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ thông thường của phòng thử nghiệm và cụ thể như sau:

4.1 Hệ thống sắc ký lỏng (LC)

Hệ thống sắc ký lỏng (LC) có gradient hai kênh, được trang bị một cổng bơm có thể bơm được 100 µl dung dịch. Sử dụng cột pha đảo C18 (4.18) có kích thước 15 mm x 4,6 mm đường kính trong, cỡ hạt 5 µm (ví dụ: cột Supelcosil LC-18) để tách các sản phẩm oxy hóa độc tố. Nếu sử dụng cột có kích thước khác thì điều chỉnh điều kiện gradient và tốc độ dòng để tách được các sản phẩm oxy hóa độc tố PSP

¹⁾ Có bán sẵn từ Hội đồng nghiên cứu quốc gia Canada (Halifax, Canada). Đây là ví dụ về sản phẩm thích hợp có bán sẵn trên thị trường. Thông tin này đưa ra tạo thuận lợi cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng chúng. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho kết quả tương đương.

TCVN 10644:2014

trong khoảng 15 min chạy sắc ký. Gradient pha động được khuyến cáo sử dụng để rửa giải các sản phẩm oxy hóa độc tố PSP bao gồm 2 pha động (xem 3.17) theo các điều kiện sau đây: 0 % đến 5 % pha động B trong 5 min đầu tiên, 5 % đến 70 % pha động B trong 4 min tiếp theo và trở về 0 % pha động B trong 2 min sau đó và ở mức 0 % pha động B thêm 3 min trước khi bơm tiếp.

Tốc độ dòng là 2 ml/min. Để kiểm tra rửa giải LC, dùng detector huỳnh quang đơn sắc, đặt ở bước sóng kích thích 340 nm và bước sóng phát xạ ở 395 nm. Detector phải đủ nhạy để có chiều cao pic ít nhất 3 cm với nhiễu đường nền pic-pic là 3 mm (tỉ lệ tín hiệu : nhiễu là 10 : 1) để bơm 400 pg chất chuẩn STX thực hiện qua quá trình oxy hóa bằng peroxit dưới các điều kiện sắc ký nêu trên.

Hình B.1 đưa ra sắc ký đồ dự kiến đối với các độc tố sau quá trình oxy hóa bằng peroxit và periodat. Hệ thống sắc ký phải có độ phân giải đường nền cao để tách được các sản phẩm oxy hóa chính GTX1,4 (cùng một pic), C1,2 (cùng một pic), NEO, GTX2,3 (cùng một pic), B-1 và STX, trong 15 min chạy sắc ký, ví dụ xem Hình B.2. Nên sử dụng bộ xử lý dữ liệu sắc ký để phân tích sắc ký đồ.

4.2 Bếp điện.

4.3 Máy trộn Vortex.

4.4 Máy đo pH.

4.5 Máy ly tâm, tạo được gia tốc hướng tâm 3600g.

4.6 Ống ly tâm, bằng chất dẻo (polypropylen), dung tích 1,5 ml và 50 ml.

4.7 Ống nghiệm thủy tinh, được chia vạch, dung tích 5 ml và 15 ml.

4.8 Ống nghiệm hình nón, được chia vạch, dung tích 15 ml.

4.9 Lọ lấy mẫu tự động.

4.10 Nồi cách thủy.

4.11 Nồi cách thủy đun sôi.

4.12 Tủ lạnh.

4.13 Bình cầu đáy tròn, dung tích 50 ml.

4.14 Cân, có thể cân chính xác đến 0,1 mg.

4.15 Pipet Pasteur.

4.16 Bộ lọc, cỡ lỗ 0,45 μ m.

4.17 Cột SPE, đảm bảo các cột SPE được sử dụng có khả năng thu hồi tối thiểu 80 % chất chuẩn và rửa giải chính xác các mẫu theo 5.3 và 5.4.

4.18 Cột C18, cột LC-18 (500 mg/3 ml)²⁾.

4.19 Cột trao đổi ion SPE-COOH.

Có thể sử dụng Bakerbond Carboxylic Acidsilane (COOH) liên kết với silica gel (thể tích 500 mg/3 ml)³⁾. Phenomenex⁴⁾ hoặc cột Isolute SPE-COOH.

5 Cách tiến hành

5.1 Chuẩn bị mô động vật có vỏ

Rửa sạch phía ngoài động vật có vỏ bằng nước sạch, mở vỏ, lấy các mô và chuyển vào thiết bị đồng hóa. Trộn cho đến khi thu được mẫu đồng nhất.

5.2 Chiết

Cân 5,00 g \pm 0,10 g mẫu đồng nhất (5.1), chính xác đến 0,1 mg, trộn với 3,0 ml dung dịch axit axetic 1 % (3.3) đựng trong ống ly tâm dung tích 50 ml (4.6), trên máy trộn Vortex (4.3), nới lỏng nắp (để tránh sự tích tụ áp lực trong quá trình làm nóng) và đặt trong nồi cách thủy đun sôi (4.11) (100 °C) sao cho lượng chứa trong ống thấp hơn mức nước. Gia nhiệt 5 min. Không đặt quá nhiều ống trong nồi cùng một lúc vì có thể làm nồi cách thủy ngừng sôi hoặc nhiệt độ bị giảm xuống quá 30 s. Lấy ống ra khỏi nồi cách thủy, trộn trên máy trộn Vortex (4.3) và làm nguội 5 min bằng cách đặt trong tủ lạnh (4.12) hoặc trong cốc có mở có chứa nước lạnh. Ly tâm 10 min ở tốc độ 4500 r/min (gia tốc 3600g) và gạn dung dịch phía trên vào ống nghiệm hình nón chia vạch dung tích 15 ml (4.8). Thêm 3 ml dung dịch axit axetic 1 % (3.3) vào ống ly tâm chứa phần cặn còn lại, trộn kỹ trên máy trộn Vortex (4.3) và ly tâm lại 10 min ở 4500 r/min (3600g). Thu lấy dịch phía trên cho vào ống nghiệm hình nón chia vạch chứa phần dịch chiết đầu tiên và pha loãng bằng nước đến 10,0 ml.

5.3 Làm sạch bằng cột SPE-C18

Dùng 6 ml metanol (3.5) để ổn định cột SPE-C18 (500 mg chất hấp thụ), tiếp theo là bằng 6 ml nước. Thêm 1 ml dịch chiết thô (tương đương 0,5 g động vật có vỏ) vào cột. Giữ tốc độ chảy ở khoảng 2 ml/min đến 3 ml/min đối với tất cả dịch rửa giải. Thu dịch rửa giải vào ống nghiệm hình nón

²⁾ Supelco, Bellefonte, PA, USA là ví dụ về sản phẩm thích hợp có bán sẵn trên thị trường.

³⁾ J.T. Baker, Phillipsburg, New Jersey, USA là ví dụ về sản phẩm thích hợp có bán sẵn trên thị trường.

⁴⁾ Torrance, CA, USA là ví dụ về sản phẩm thích hợp có bán sẵn trên thị trường.

Các thông tin nêu trên đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng các sản phẩm này. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho kết quả tương đương.

chia vạch dung tích 5 ml (4.7). Không để cột chảy đến khô. Rửa cột bằng 2 ml nước và gộp nước rửa với dịch rửa giải.

Chỉnh dịch chiết đến pH 6,5 bằng dung dịch NaOH 1 M (3.9), sử dụng giấy chỉ thị pH [được hiệu chuẩn lại bằng máy đo pH (4.4)], sau đó pha loãng bằng nước chính xác đến 4 ml. Sử dụng phần dịch chiết này cho quá trình oxy hóa bằng periodat và peroxit theo 5.5. Đồng thời, phân tách một lượng dịch chiết không oxy hóa để chắc chắn rằng các pic độc tố PSP trong sắc ký đồ đúng là của các độc tố PSP mà không phải là do các dịch chiết có huỳnh quang tự nhiên bị chiết cùng, bằng cách trộn một thể tích dịch chiết và chất bổ chính nền (3.15) với nước để thay cho chất oxy hóa periodat trước khi bơm lên hệ thống LC. Sắc ký đồ thu được cho phép nhận biết các pic phát sinh do các dịch chiết có huỳnh quang tự nhiên. Các độc tố PSP không tạo ra các pic trong các điều kiện này.

Đối với các dịch chiết mẫu có độc tố PSP cao hơn so với hỗn hợp chất chuẩn đậm đặc nhất, thì pha loãng dịch chiết mẫu bằng nước sau khi làm sạch bằng cột SPE, sao cho nồng độ độc tố nằm trong dải chất chuẩn và phân tích lại, bắt đầu từ 5.5. Ghi lại hệ số pha loãng, *D*.

5.4 Làm sạch bằng SPE-COOH

Việc làm sạch bằng trao đổi ion SPE-COOH chỉ được sử dụng đối với các dịch chiết được phát hiện có chứa các độc tố PSP *N*-1-hydroxyl hóa sau khi làm sạch bằng cột C18 (4.18). Ổn định cột bằng cách cho 10 ml dung dịch amoni axetat 0,01 M (3.7) đi qua cột SPE-COOH (4.19). Giữ tốc độ dòng ở khoảng 2 ml/min đến 3 ml/min đối với tất cả dịch rửa giải. Không để cột chảy đến khô.

Loại bỏ dịch rửa giải. Cho 2 ml phần dịch chiết mẫu (tương ứng với 0,250 g mô động vật có vỏ) thu được từ quá trình làm sạch cột SPE-C18 (xem 5.3) đi qua cột và thu lấy dịch rửa giải vào ống nghiệm hình nón chia vạch dung tích 15 ml (4.7) được đánh số 1. Sau đó cho 4,0 ml nước đi qua cột và thu vào cùng ống nghiệm. Chỉnh thể tích cuối cùng đến 6 ml. Phần này có chứa các độc tố C. Sau đó, cho 4,0 ml dung dịch NaCl 0,05 M (3.8) đi qua cột, thu dịch rửa giải vào ống nghiệm hình nón chia vạch dung tích 5 ml (4.7) được đánh số 2. Đảm bảo rằng thể tích cuối cùng là 4,0 ml. Phần này có chứa các độc tố GTX 1,4, GTX 2,3, B-1, B-2 và dcGTX 2,3. Tiếp theo, cho 5 ml dung dịch NaCl 0,3 M (3.8) đi qua cột và thu vào ống nghiệm hình nón chia vạch dung tích 5 ml (4.7) được đánh số 3. Đảm bảo thể tích cuối cùng là 5,0 ml. Phần này có chứa các độc tố STX, NEO và dcSTX. Tiến hành oxy hóa theo 5.5 và phân tích HPLC.

Nếu gặp phải vấn đề về độ nhạy của detector thì cô đặc từng phần dung dịch thu được từ cột trao đổi ion trong bình cầu đáy tròn dung tích 50 ml (4.13) thay cho việc dùng ống nghiệm hình nón chia vạch và cho bay hơi đến khoảng 1 ml trên thiết bị cô quay trong nồi cách thủy (4.10) đặt ở 45 °C. Dùng pipet Pasteur (4.15) chuyển dung dịch vào ống nghiệm hình nón chia vạch dung tích 5 ml. Rửa sạch bình cầu đáy tròn ba lần với khoảng 0,2 ml đến 0,3 ml nước mỗi lần, chuyển nước rửa vào ống nghiệm chia vạch sao cho thể tích dịch chiết cuối cùng là 2,0 ml.

CHÚ THÍCH Có thể sử dụng bình định mức chia vạch 2 ml. Phân tích các phần được đánh số từ 1 đến 3 bằng LC sau khi oxy hóa bằng periodat và peroxit như dưới đây.

5.5 Phản ứng oxy hóa

5.5.1 Oxy hóa bằng periodat

Phân phối tất cả các thuốc thử và dung dịch sử dụng trong các phản ứng oxy hóa bằng pipet tự động (Eppendorf hoặc tương đương)⁵⁾ với đầu tip bằng chất dẻo dùng một lần. Thêm 100 µl dung dịch chuẩn hoặc dịch chiết mẫu thử sau khi làm sạch bằng cột trao đổi ion hoặc cột SPE-C18 vào 100 µl dung dịch bổ chính nền (3.15) đựng trong ống ly tâm dung tích 1,5 ml (4.6) hoặc lọ lấy mẫu tự động (4.9), nếu thực hiện phân tích sắc ký tự động. Sau đó thêm 500 µl chất oxy hóa periodat và trộn kỹ trên máy trộn Vortex (4.3). Để dung dịch phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 1 min, sau đó thêm 5 µl axit axetic đặc (3.2) và trộn. Để yên hỗn hợp ít nhất 10 min ở nhiệt độ phòng trước khi bơm từ 50 µl đến 100 µl vào hệ thống LC. Dung dịch này bền được khoảng 1 ngày với độc tố không hydroxyl hóa. Tuy nhiên, với NEO, B-2 và GTX1,4 xảy ra phân hủy chậm các sản phẩm oxy hóa (khoảng 30 % sau 8 h). Sau đó, phép định lượng vẫn có thể thực hiện được nếu các chất chuẩn và dung dịch thử được bảo quản và được phân tích trong cùng điều kiện.

5.5.2 Oxy hóa bằng peroxit

Cho 25 µl dung dịch hydro peroxit 10 % (3.10) vào 250 µl dung dịch natri hydroxit 1 M (3.9) đựng trong ống ly tâm bằng chất dẻo dung tích 1,5 ml (4.6) (hoặc lọ lấy mẫu tự động (4.9), nếu thực hiện phân tích sắc ký tự động) và trộn. Sau đó thêm 100 µl dung dịch chuẩn hoặc dịch chiết mẫu sau khi làm sạch bằng cột trao đổi ion hoặc cột SPE-C18. Trộn và để phản ứng 2 min ở nhiệt độ phòng. Thêm 20 µl axit axetic đặc (3.2) và trộn. Bơm 25 µl đến 50 µl dung dịch này vào hệ thống LC. Dung dịch này bền ít nhất 8 h.

CHÚ THÍCH Nếu bơm nhiều hơn 50 µl thì có thể pic sẽ bị loãng rộng.

6 Tính kết quả

6.1 Yêu cầu chung

Mỗi độc tố có trong mô động vật có vỏ được định lượng bằng cách so sánh trực tiếp với các chất chuẩn phân tích ở nồng độ tương tự như dự kiến có trong phần mẫu thử (xem 6.2). Để thuận tiện, có thể sử dụng ba hỗn hợp chất chuẩn phân tích để định lượng các độc tố.

STX, GTX 2,3, B-1 và C1,2 tạo ra các sản phẩm oxy hóa đơn lẻ với cả hai phản ứng oxy hóa, trong khi dcSTX tạo ra hai sản phẩm oxy hóa với cả hai phản ứng. Tuy nhiên, NEO, B-2, GTX1,4, và C 3,4 mỗi loại tạo ra ba pic sau quá trình oxy hóa bằng periodat nhưng chỉ các pic rửa giải thứ hai được sử dụng để định lượng (Hình B.2). Vì một vài độc tố PSP (NEO và B-2; GT X1,4, và C3,4) cho các sản phẩm

⁵⁾ Đây là ví dụ về sản phẩm thích hợp có bán sẵn trên thị trường. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng các sản phẩm này. Các sản phẩm tương tự có thể được sử dụng nếu cho kết quả tương đương.

TCVN 10644:2014

oxy hóa giống nhau, nên việc định lượng cũng chỉ có thể được thực hiện sau khi tách bằng sắc ký trao đổi ion COOH nêu trên. Nếu dcSTX có mặt với nồng độ cao thì sẽ gây nhiễu đến việc định lượng NEO sau khi oxy hóa bằng periodat. NEO có thể được định lượng bằng cách sử dụng tỷ lệ toán học của các pic sau khi oxy hóa bằng periodat và peroxit như 6.2.

6.2 Tính nồng độ các độc tố PSP

Nồng độ độc tố, C , biểu thị bằng microgam trên kilogam ($\mu\text{g}/\text{kg}$), tính theo công thức sau:

$$C = \frac{A_x \times C_s \times V_x \times D \times 1000}{A_s \times M}$$

Trong đó:

A_x là diện tích pic của độc tố có trong dịch chiết được phân tích;

A_s là diện tích pic của chất chuẩn có nồng độ gần giống nhất với nồng độ chất phân tích;

C_s là nồng độ của chất chuẩn, tính bằng microgam trên mililit ($\mu\text{g}/\text{ml}$);

V_x là thể tích cuối cùng của dịch chiết được phân tích, tính bằng mililit (ml);

D là hệ số pha loãng dịch chiết mẫu (xem 5.3);

M là khối lượng phần mẫu thử, đã dùng trong quá trình làm sạch, tính bằng gam (g), ví dụ 0,5 g để làm sạch bằng cột SPE C18 và 0,25 g để làm sạch bằng cột trao đổi ion SPE-COOH;

1000 là hệ số chuyển đổi kết quả từ $\mu\text{g}/\text{g}$ sang $\mu\text{g}/\text{kg}$.

6.3 Tính NEO khi có mặt dcSTX

6.3.1 Yêu cầu chung

Diện tích pic của NEO có trong phần mẫu thử có chứa cả NEO và dcSTX có thể tính theo hai phương pháp. Hình B.3 đưa ra sắc ký đồ sau khi oxy hóa bằng periodat và peroxit của chất chuẩn dcSTX và một phần mẫu thử chưa biết có chứa hỗn hợp NEO và dcSTX.

6.3.2 Phương pháp 1

Nếu nồng độ dcSTX trong phần mẫu thử chứa hỗn hợp NEO và dcSTX là lớn để tạo ra pic đầu tiên tích phân tốt (pic D, Hình B.3) với oxy hóa bằng periodat, khi đó tính diện tích pic tương ứng với NEO (pic $X_{(\text{NEO})}$) từ tỉ số của hai diện tích pic dcSTX tạo ra do oxy hóa chất chuẩn bằng periodat.

Đối với chất chuẩn dcSTX được phân tích với oxy hóa bằng periodat, thì tỉ số của hai diện tích pic được tính bằng:

$$\frac{A}{B} = \frac{X_{(dcSTX)}}{D} \Rightarrow X_{(dcSTX)} = \frac{DA}{B}$$

Trong đó:

$X_{(dcSTX)}$ là diện tích pic của dcSTX trong pic C.

Diện tích pic NEO có thể được tính như sau:

$$X_{(NEO)} = C - X_{(dcSTX)} = C - \frac{DA}{B}$$

6.3.3 Phương pháp 2

Nếu nồng độ của dcSTX trong phần mẫu thử chứa NEO và dcSTX không đủ để tạo ra pic đầu tiên có thể tách tốt (pic D, Hình B.3) với oxy hóa bằng periodat, thì tính diện tích pic tương ứng với NEO (pic $X_{(NEO)}$) từ tỉ số pic dcSTX được tạo ra với oxy hóa bằng periodat (pic A, Hình B.3) và diện tích pic dcSTX được tạo ra do quá trình oxy hóa bằng peroxit (pic E, Hình B.3) trong chất chuẩn.

Đối với chất chuẩn dcSTX được phân tích với oxy hóa bằng periodat và peroxit, thì tỉ số của hai diện tích pic được tính bằng:

$$\frac{E}{A} = \frac{F}{X_{(dcSTX)}} \Rightarrow X_{(dcSTX)} = \frac{FA}{E}$$

Trong đó:

$X_{(dcSTX)}$ là diện tích pic của dcSTX trong pic C.

Diện tích pic NEO có thể được tính như sau:

$$X_{(NEO)} = C - X_{(dcSTX)} = C - \frac{FA}{E}$$

6.4 Áp dụng phương pháp đối với phép phân tích thông dụng

Để áp dụng hiệu quả phương pháp này vào phép phân tích thông dụng khi cần phân tích một số lượng lớn mẫu thì nên sử dụng quy trình sau (xem Hình C.1):

a) Phân tích dịch chiết mẫu thử sau khi làm sạch bằng cột SPE-C18 và quá trình oxy hóa bằng periodat. Nếu không có pic nào tương ứng với pic của chất chuẩn PSP, thì mẫu thử là âm tính và không cần phải phân tích tiếp.

b) Nếu có mặt bất kỳ độc tố STX, dcSTX, GTX2,3, B-1 hoặc C1,2 không hydroxyl hóa, nhưng không có mặt các độc tố NEO, GTX1,4 và C3,4 đã *N*-hydroxyl hóa, thì các độc tố không hydroxyl hóa có thể

TCVN 10644:2014

được định lượng bằng cách so sánh trực tiếp với các chất chuẩn đã biết qua quá trình oxy hóa bằng periodat. Tuy nhiên, phản ứng oxy hóa peroxit nhạy hơn đối với B-1, C1,2 và dcSTX và được ưu tiên hơn nếu yêu cầu độ phát hiện tối ưu. Tuy nhiên, phản ứng oxy hóa bằng peroxit có thể được sử dụng để xác nhận kết quả của tất cả các độc tố thu được từ quá trình oxy hóa bằng periodat.

c) Nếu có mặt cả hai độc tố *N*-hydroxyl hóa và không hydroxyl hóa, thì các độc tố không hydroxyl hóa được định lượng sau khi oxy hóa một phần dịch chiết mẫu thử khác bằng cách sử dụng hydro peroxit và các pic được so sánh với pic của các chất chuẩn bị oxy hóa tương tự. Nguyên nhân là do quá trình oxy hóa bằng periodat một số độc tố hydroxyl hóa tạo ra các pic của sản phẩm chất rủa giải đồng chất không hydroxyl hóa và một số độc tố (đặc biệt là B-1, C1,2 và dcSTX) mà quá trình oxy hóa bằng peroxit cho độ phát hiện tốt hơn.

d) Để định lượng mọi độc tố *N*-hydroxyl hóa, làm sạch một phần dịch chiết mẫu thử khác bằng các cột SPE-COOH và phần thích hợp được oxy hóa sau quá trình oxy hóa bằng periodat. Bước này tách được C3,4 ra khỏi GTX1,4 và B-2 ra khỏi NEO, cho phép định lượng tất cả các độc tố bằng cách so sánh trực tiếp với các chất chuẩn và được thực hiện cùng với quá trình oxy hóa bằng periodat.

7 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải nêu rõ:

- a) mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- b) phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- c) phương pháp thử đã sử dụng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- d) kết quả thử nghiệm thu được;
- e) mọi điều kiện thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này hoặc được xem là tùy chọn, cùng với mọi tình huống bất thường có thể ảnh hưởng đến kết quả.

Phụ lục A

(tham khảo)

Các kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm

Phương pháp này chấp nhận trị số HorRat < 2,0 để xử lý số liệu thống kê với đối với tổng các độc tố PSP.

Các kết quả thử nghiệm liên phòng được nêu trong các bảng từ Bảng A.1 đến Bảng A.18.

**Bảng A.1 – Các kết quả liên phòng thử nghiệm về xác định STX
trong động vật có vỏ sau khi làm sạch bằng cột SPE C18**

Số mẫu	Nền mẫu	Số lượng phòng thử nghiệm	Giá trị trung bình, µg/kg	Độ thu hồi, %	s_R^d	RSD_R^e , %	Giới hạn tái lập, R^f	Trị số HorRat
Mẫu thực nghiệm	Trai	11 ^a (1 ^b)	471,00		41,16	8,74	115,25	0,49
1	Sò	15(0)	1048,07		229,23	21,87	641,84	1,38
2	Ngao	15(0)	338,27		90,88	26,87	254,46	1,43
3	Hàu	15	KPH ^c					
4	Trai	15	KPH					
5	Ngao	15(0)	522,20		69,39	13,29	194,29	0,75
5D	Ngao	15(0)	517,87		73,89	14,27	206,89	0,81
6	Ngao	15	KPH					
7	Trai	14(0)	23,36		8,48	36,30	23,74	1,29
8	Trai	15(0)	309,60		78,07	25,22	218,60	1,32
8D	Trai	15(0)	315,53		70,28	22,27	196,78	1,17
9	Trai	15(0)	132,47		33,38	25,20	93,46	1,16
10	Hàu	15(0)	136,13		46,14	33,89	129,19	1,57
10D	Hàu	15(0)	144,47		41,64	28,82	116,59	1,35
11	Hàu	15(0)	257,67		59,49	23,09	166,57	1,18
12	Trai	15(0)	783,87		215,24	27,46	602,67	1,65
Thêm chuẩn 1	Trai	15(0)	223,07	74,4	52,46	23,52	146,89	1,17
Thêm chuẩn 2	Trai	15(0)	447,00	74,5	112,49	25,17	314,97	1,39
Thêm chuẩn 3	Trai	15(0)	51,27	93,2	16,96	33,08	47,49	1,32
Thêm chuẩn 4	Trai	15(0)	169,00	76,8	43,00	25,44	120,40	1,22
Thêm chuẩn 5	Trai	11(0)	13,18		8,65	65,63	24,22	2,14

^a là số lượng phòng thử nghiệm được giữ lại sau khi trừ các ngoại lệ thống kê Dixon.

^b là số lượng phòng thử nghiệm ngoại lệ.

^c KPH là không phát hiện được.

^d s_R là độ lệch chuẩn tái lập.

^e RSD_R là độ lệch chuẩn tương đối tái lập.

^f $R = 2,8 \times s_R$.

**Bảng A.2 – Các kết quả liên phòng thử nghiệm về xác định STX
trong động vật có vỏ sau khi làm sạch bằng cột SPE-COOH**

Số mẫu	Nền mẫu	Số lượng phòng thử nghiệm	Giá trị trung bình, $\mu\text{g}/\text{kg}$	Độ thu hồi, %	s_R^d	RSD_R^e , %	Giới hạn tái lập, R^f	Trị số HorRat
Mẫu thực nghiệm	Trai	15 ^a (0 ^b)	451,80		121,68	26,93	340,70	1,49
1	Sò	15(0)	955,93		187,77	19,64	525,76	1,22
2	Ngao	14(0)	294,57		82,80	28,11	231,84	1,46
3	Hàu	14	KPH ^c					
4	Trai	14	KPH					
5	Ngao	15(0)	509,53		85,78	16,84	240,18	0,95
5D	Ngao	15(0)	474,40		82,56	17,40	231,17	0,97
6	Ngao	14	KPH					
7	Trai	12(0)	21,33		6,80	31,88	19,04	1,12
8	Trai	15(0)	270,13		68,83	25,48	192,72	1,31
8D	Trai	13(0)	269,08		49,81	18,51	139,47	0,95
9	Trai	14(0)	119,64		38,16	31,90	106,85	1,45
10	Hàu	14(0)	140,00		45,24	32,31	126,67	1,50
10D	Hàu	15(0)	123,67		26,92	21,77	75,38	0,99
11	Hàu	15(0)	232,87		37,89	16,27	106,09	0,82
12	Trai	14(0)	644,00		78,89	12,25	220,89	0,72
Thêm chuẩn 1	Trai	13(0)	191,08	63,7	39,19	20,51	109,73	1,00
Thêm chuẩn 2	Trai	15(0)	409,27	68,2	122,65	29,97	343,42	1,64
Thêm chuẩn 3	Trai	11(0)	43,55	79,2	11,36	26,08	31,81	1,02
Thêm chuẩn 4	Trai	15(0)	147,93	67,2	31,42	21,24	87,98	1,00
Thêm chuẩn 5	Trai	9(0)	10,44		4,48	42,91	12,54	1,35

^a là số lượng phòng thử nghiệm được giữ lại sau khi trừ các ngoại lệ thống kê Dixon.

^b là số lượng phòng thử nghiệm ngoại lệ.

^c KPH là không phát hiện được.

^d s_R là độ lệch chuẩn tái lập.

^e RSD_R là độ lệch chuẩn tương đối tái lập.

^f $R = 2,8 \times s_R$.

Bảng A.3 – Các kết quả liên phòng thử nghiệm về xác định NEO
trong động vật có vỏ sau khi làm sạch bằng cột SPE C18

Số mẫu	Nền mẫu	Số lượng phòng thử nghiệm	Giá trị trung bình, $\mu\text{g}/\text{kg}$	Độ thu hồi, %	s_R^f	RSD_R^g , %	Giới hạn tái lập, R^h	Trị số HorRat
Mẫu thực nghiệm	Trai	$10^a(2^b)$	565,50		113,31	20,04	317,27	1,15
3	Hàu	15	KPH ^c					
4	Trai	15	KPH					
5	Ngao	7(1)	33,14		12,75	38,47	35,70	1,44
5D	Ngao	9(1)	40,00		17,41	43,53	48,75	1,68
6	Ngao	15	KPH					
8	Trai	14(0)	283,66		91,76	32,33	256,93	1,67
8D	Trai	14(0)	278,29		70,58	25,36	197,62	1,31
9	Trai	13(0)	140,08		45,88	32,75	128,46	1,52
12	Trai	15(0)	871,07		227,63	26,13	637,36	1,60
Thêm chuẩn 1	Trai	14(0)	222,64	55,7	88,03	39,54	246,48	1,97
Thêm chuẩn 2	Trai	15(0)	445,40	56,9	116,94	25,68	327,43	1,43
Thêm chuẩn 3	Trai	14(0)	158,29 ^d		39,36	24,87	110,21	1,18
Thêm chuẩn 4	Trai	12(0)	213,33 ^e		85,77	40,21	240,16	1,99
Thêm chuẩn 5	Trai	12(0)	344,08 ^e		163,71	47,58	458,39	2,53

^a là số lượng phòng thử nghiệm được giữ lại sau khi trừ các ngoại lệ thống kê Dixon.

^b là số lượng phòng thử nghiệm ngoại lệ.

^c KPH là không phát hiện được.

^d Tổng của NEO và dcSTX, tính theo NEO.

^e NEO không có mặt trong các mẫu này. Các pic tạo bởi dcSTX nhưng được tính theo NEO.

^f s_R là độ lệch chuẩn tái lập.

^g RSD_R là độ lệch chuẩn tương đối tái lập.

^h $R = 2,8 \times s_R$.

Bảng A.4 – Các kết quả liên phòng thử nghiệm về xác định NEO trong động vật có vỏ sau khi làm sạch bằng cột SPE-COOH

Số mẫu	Nền mẫu	Số lượng phòng thử nghiệm	Giá trị trung bình, $\mu\text{g/kg}$	Độ thu hồi, %	s_R^d	RSD_R^e , %	Giới hạn tái lập, R^f	Trị số HorRat
Mẫu thực nghiệm	Trai	15 ^{a(0^b)}	642,80		147,95	23,02	414,26	1,35
3	Hàu	14	KPH ^c					
4	Trai	14	KPH					
5	Ngao	10(0)	38,80		13,02	33,56	36,46	1,29
5D	Ngao	10(0)	42,20		18,27	43,29	51,16	1,68
6	Ngao	14	KPH					
8	Trai	13(1)	254,62		89,85	35,29	251,58	1,80
8D	Trai	15(0)	266,20		92,93	34,91	260,20	1,79
9	Trai	14(0)	97,64		46,37	47,49	129,84	2,09
12	Trai	14(1)	842,93		199,36	23,65	558,21	1,44
Thêm chuẩn 1	Trai	14(0)	212,29	53,1	68,05	32,06	190,54	1,59
Thêm chuẩn 2	Trai	15(0)	492,43	61,6	159,58	32,41	446,82	1,82

^a là số lượng phòng thử nghiệm được giữ lại sau khi trừ các ngoại lệ thống kê Dixon.
^b là số lượng phòng thử nghiệm ngoại lệ.
^c KPH là không phát hiện được.
^d s_R là độ lệch chuẩn tái lập.
^e RSD_R là độ lệch chuẩn tương đối tái lập.
^f $R = 2,8 \times s_R$.

Bảng A.5 – Các kết quả liên phòng thử nghiệm về xác định NEO khi có mặt dcSTX trong mẫu động vật có vỏ thêm chuẩn sau khi làm sạch bằng cột SPE-COOH – Thêm chuẩn 3

Số phòng thử nghiệm	NEO, µg/kg	Độ thu hồi, %
2	107	53,5
6 ^a	137	68,5
12 ^a	154	77,2
15	86	43,0
18	75	37,5
19 ^a	92	46,0
22	112	56,0
23	153	76,5
Giá trị trung bình	114,48	57,28
Độ lệch chuẩn tái lập, S_R		30,49
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập, RSD_R	26,63	
Giới hạn tái lập: $R = 2,8 \times S_R$		85,37
Trị số HorRat	1,20	
^a Việc tính toán được thực hiện trong phòng thí nghiệm cộng tác sử dụng các kết quả do các cộng tác viên cung cấp.		

Bảng A.6 – Các kết quả liên phòng thử nghiệm về xác định dcSTX
trong động vật có vỏ sau khi làm sạch bằng cột SPE C18

Số mẫu	Nền mẫu	Số lượng phòng thử nghiệm	Giá trị trung bình, $\mu\text{g}/\text{kg}$	Độ thu hồi, %	s_R ^a	RSD_R ^f , %	Giới hạn tái lập, R ^g	Trị số HorRat
Mẫu thực nghiệm	Trai	9 ^a (0 ^b)	18,78		21,61	115,07	60,51	3,95
1	Sò	13(0)	12,31		4,33	35,17	12,12	1,13
3	Hàu	15	KPH ^c					
4	Trai	15	KPH					
5	Ngao	14(0)	8,14		2,71	33,29	7,59	1,01
5D	Ngao	12(1)	7,42		1,83	24,66	5,12	0,74
6	Ngao	15	KPH					
7	Trai	11(1)	10,55		2,02	19,15	5,66	0,60
11	Hàu	11(0)	3,45		1,63	47,25	4,56	1,26
12 ^d	Trai							
Thêm chuẩn 3	Trai	15(0)	83,73	83,7	41,17	49,17	115,28	2,12
Thêm chuẩn 4	Trai	15(0)	293,87	73,5	63,35	21,56	177,38	1,12
Thêm chuẩn 5	Trai	14(1)	385,64	64,27	40,60	10,53	113,68	0,57

^a là số lượng phòng thử nghiệm được giữ lại sau khi trừ các ngoại lệ thống kê Dixon.
^b là số lượng phòng thử nghiệm ngoại lệ.
^c KPH là không phát hiện được.
^d Không tính được, chỉ có 7 phòng thử nghiệm báo cáo dữ liệu; số còn lại báo cáo là không phát hiện được.
^e s_R là độ lệch chuẩn tái lập.
^f RSD_R là độ lệch chuẩn tương đối tái lập.
^g $R = 2,8 \times s_R$.

Bảng A.7 – Các kết quả liên phòng thử nghiệm về xác định dcSTX
trong động vật có vỏ sau khi làm sạch bằng cột SPE-COOH

Số mẫu	Nền mẫu	Số lượng phòng thử nghiệm	Giá trị trung bình, $\mu\text{g}/\text{kg}$	Độ thu hồi, %	s_R^a	RSD_R^f , %	Giới hạn tái lập, R^g	Trị số HorRat
Mẫu thực nghiệm	Trai	$10^a(0^b)$	12,60		12,38	98,25	34,66	3,18
1	Sò	12(1)	9,88		3,89	39,37	10,89	1,23
3	Hàu	14	KPH ^c					
4	Trai	14	KPH ^c					
5	Ngao	11(0)	8,36		4,86	58,13	13,61	1,77
5D	Ngao	10(0)	6,80		3,33	48,97	9,32	1,44
6	Ngao	14	KPH ^c					
7	Trai	13(0)	11,62		3,04	26,16	8,51	0,84
11 ^d	Hàu							
12	Trai	10(0)	7,80		3,22	41,28	9,02	1,24
Thêm chuẩn 3	Trai	13(0)	69,08	69,1	17,09	24,74	47,85	1,03
Thêm chuẩn 4	Trai	15(0)	276,00	69,0	52,83	19,14	147,92	0,99
Thêm chuẩn 5	Trai	15(0)	396,27	66,04	93,72	23,65	262,42	1,29

^a là số lượng phòng thử nghiệm được giữ lại sau khi trừ các ngoại lệ thống kê Dixon.
^b là số lượng phòng thử nghiệm ngoại lệ.
^c KPH là không phát hiện được.
^d Không tính được, chỉ có 6 phòng thử nghiệm báo cáo dữ liệu; số còn lại báo cáo là không phát hiện được.
^e s_R là độ lệch chuẩn tái lập.
^f RSD_R là độ lệch chuẩn tương đối tái lập.
^g $R = 2,8 \times s_R$.

**Bảng A.8 – Các kết quả liên phòng thử nghiệm về xác định GTX1,4
trong động vật có vỏ sau khi làm sạch bằng cột SPE C18**

Số mẫu	Nền mẫu	Số lượng phòng thử nghiệm	Giá trị trung bình, $\mu\text{g}/\text{kg}$	Độ thu hồi, %	s_R^e	RSD_R^f , %	Giới hạn tái lập, R^g	Trị số HorRat
Mẫu thực nghiệm	Trai	11 ^a (0 ^b)	1437,55		649,76	45,20	1819,33	2,98
1	Sò	10(0)	199,30		170,10	85,35	476,28	4,19
2	Ngao	11(1)	285,27		60,08	21,06	168,22	1,09
3	Hàu	16	KPH ^c					
4	Trai	16	KPH ^c					
5	Ngao	11(0)	61,36		28,46	46,38	79,69	1,91
5D	Ngao	11(0)	62,09		17,73	28,56	49,64	1,17
6	Ngao	16	KPH ^c					
7	Trai	15(0)	1489,13 ^d		417,08	28,01	1167,82	1,86
8	Trai	12(0)	572,67		156,87	27,39	439,24	1,57
8D	Trai	13(0)	672,23		164,05	24,40	459,34	1,44
9	Trai	13(0)	254,46		69,57	27,34	194,80	1,39
11	Hàu	12(0)	81,00		54,86	67,73	153,61	2,90
12	Trai	10(0)	1815,70 ^d		427,69	23,56	1197,53	1,61
Thêm chuẩn 1	Trai	10(0)	240,10	60,0	115,87	48,26	324,44	2,43
Thêm chuẩn 2	Trai	11(0)	1440,45 ^d		274,83	19,08	769,52	1,26
Thêm chuẩn 5	Trai	12(1)	2236,25 ^d		571,98	25,58	1601,54	1,80

^a là số lượng phòng thử nghiệm được giữ lại sau khi trừ các ngoại lệ thống kê Dixon.

^b là số lượng phòng thử nghiệm ngoại lệ.

^c KPH là không phát hiện được.

^d Tổng của GTX1,4 và C3,4, được tính theo GTX1,4.

^e s_R là độ lệch chuẩn tái lập.

^f RSD_R là độ lệch chuẩn tương đối tái lập.

^g $R = 2,8 \times s_R$.

Bảng A.9 – Các kết quả liên phòng thử nghiệm về xác định GTX1,4
trong động vật có vỏ sau khi làm sạch bằng cột SPE-COOH

Số mẫu	Nền mẫu	Số lượng phòng thử nghiệm	Giá trị trung bình, $\mu\text{g}/\text{kg}$	Độ thu hồi, %	s_R^f	RSD_R^g , %	Giới hạn tái lập, R^h	Trị số HorRat
Mẫu thực nghiệm	Trai	16 ^a (0 ^b)	1279,38		316,92	24,77	887,38	1,61
1 ^c	Sò							
2	Ngao	13(1)	364,23		141,21	38,77	395,39	2,08
3	Hàu	15	KPH ^d					
4	Trai	15	KPH ^d					
5	Ngao	13(0)	73,54		17,18	23,36	48,10	0,99
5D	Ngao	13(0)	71,46		22,60	31,63	63,28	1,33
6	Ngao	16	KPH ^d					
7	Trai	14(1)	240,07		64,50	26,87	180,60	1,35
8	Trai	15(1)	645,00		147,94	22,94	414,23	1,34
8D	Trai	15(1)	674,73		120,99	17,93	338,77	1,06
9	Trai	14(0)	235,57		44,94	19,08	125,83	0,96
11	Hàu	8(1)	48,88		13,03	26,66	36,48	1,06
12	Trai	16(0)	2079,31		394,95	18,99	1105,86	1,33
Thêm chuẩn 1	Trai	14(0)	267,50	66,9	86,80	32,45	243,04	1,66
Thêm chuẩn 2	Trai	15(0)	628,07	78,5	167,26	26,63	468,33	1,55
Thêm chuẩn 5	Trai	14(0)	265,21 ^e		68,76	25,93	192,53	1,33

^a là số lượng phòng thử nghiệm được giữ lại sau khi trừ các ngoại lệ thống kê Dixon.

^b là số lượng phòng thử nghiệm ngoại lệ.

^c không tính được. Một nửa số phòng thử nghiệm báo cáo là không phát hiện được

^d KPH là không phát hiện được.

^e GTX1,4 không có mặt trong mẫu này. Các pic tạo bởi dcGTX2,3 (đã xác nhận bằng quá trình oxy hóa peroxit) nhưng được tính theo GTX1,4.

^f s_R là độ lệch chuẩn tái lập.

^g RSD_R là độ lệch chuẩn tương đối tái lập.

^h $R = 2,8 \times s_R$.

Bảng A.10 – Các kết quả liên phòng thử nghiệm về xác định GTX2,3
trong động vật có vỏ sau khi làm sạch bằng cột SPE C18

Số mẫu	Nền mẫu	Số lượng phòng thử nghiệm	Giá trị trung bình, $\mu\text{g/kg}$	Độ thu hồi, %	s_R^d	$RSD_R^e, \%$	Giới hạn tái lập, R^f	Trị số HorRat
Mẫu thực nghiệm	Trai	12 ^{a(1^b)}	3291,17		523,82	15,92	1466,70	1,19
1	Sò	16(0)	2526,00		652,30	25,82	1826,44	1,86
2	Ngao	15(1)	2537,73		479,37	18,89	1342,24	1,36
3	Hàu	16	KPH ^c					
4	Trai	16	KPH ^c					
5	Ngao	16(0)	119,75		21,78	18,19	60,98	0,83
5D	Ngao	16(0)	113,75		24,44	21,49	68,43	0,97
6	Ngao	16	KPH ^c					
7	Trai	14(0)	348,64		92,95	26,66	260,26	1,42
8	Trai	16(0)	813,13		252,98	31,11	708,34	1,89
8D	Trai	16(0)	757,31		180,55	23,84	505,54	1,43
9	Trai	16(0)	316,44		65,95	20,84	184,66	1,10
10	Hàu	16(0)	367,25		88,99	24,23	249,17	1,30
10D	Hàu	15(1)	336,20		78,60	23,38	220,08	1,24
11	Hàu	15(1)	673,00		182,03	27,05	509,68	1,59
12	Trai	15(1)	1855,93		505,27	27,22	1414,76	1,87
Thêm chuẩn 1	Trai	14(1)	227,36	75,8	42,71	18,79	119,59	0,94
Thêm chuẩn 2	Trai	16(0)	529,31	88,2	167,47	31,64	468,92	1,80
Thêm chuẩn 5	Trai	16(0)	954,31	79,5	293,49	30,75	821,77	1,91

^a là số lượng phòng thử nghiệm được giữ lại sau khi trừ các ngoại lệ thống kê Dixon.
^b là số lượng phòng thử nghiệm ngoại lệ.
^c KPH là không phát hiện được.
^d s_R là độ lệch chuẩn tái lập.
^e RSD_R là độ lệch chuẩn tương đối tái lập.
^f $R = 2,8 \times s_R$.

Bảng A.11 – Các kết quả liên phòng thử nghiệm về xác định GTX_{2,3}
trong động vật có vỏ sau khi làm sạch bằng cột SPE-COOH

Số mẫu	Nền mẫu	Số lượng phòng thử nghiệm	Giá trị trung bình, µg/kg	Độ thu hồi, %	s_R^d	RSD_R^e , %	Giới hạn tái lập, R^f	Trị số HorRat
Mẫu thực nghiệm	Trai	15 ^a (1 ^b)	3314,33		594,49	17,94	1664,57	1,34
1	Sò	16(0)	2347,94		522,01	22,23	1461,63	1,58
2	Ngao	16(0)	2697,50		506,20	18,77	1417,36	1,36
3	Hàu	15	KPH ^c					
4	Trai	14	KPH ^c					
5	Ngao	15(1)	132,00		25,33	19,19	70,92	0,88
5D	Ngao	16(0)	115,94		28,43	24,52	79,60	1,11
6	Ngao	15	KPH ^c					
7	Trai	15(0)	342,80		80,23	23,40	224,64	1,25
8	Trai	16(0)	804,63		164,42	20,43	460,38	1,24
8D	Trai	16(0)	745,94		164,78	22,09	461,38	1,32
9	Trai	16(0)	320,88		58,22	18,14	163,02	0,96
10	Hàu	15(1)	369,47		71,38	19,32	199,86	1,04
10D	Hàu	15(0)	341,60		86,11	25,21	241,11	1,34
11	Hàu	16(0)	701,31		203,93	29,08	571,00	1,72
12	Trai	16(0)	1873,94		345,02	18,41	966,06	1,27
Thêm chuẩn 1	Trai	15(0)	261,27	87,1	42,72	16,35	119,62	0,84
Thêm chuẩn 2	Trai	16(0)	563,56	93,9	116,81	20,73	327,07	1,19
Thêm chuẩn 5	Trai	16(0)	1024,88	85,4	174,72	17,05	489,22	1,07

^a là số lượng phòng thử nghiệm được giữ lại sau khi trừ các ngoại lệ thống kê Dixon.
^b là số lượng phòng thử nghiệm ngoại lệ.
^c KPH là không phát hiện được.
^d s_R là độ lệch chuẩn tái lập.
^e RSD_R là độ lệch chuẩn tương đối tái lập.
^f $R = 2,8 \times s_R$.

Bảng A.12 – Các kết quả liên phòng thử nghiệm về xác định B-1
trong động vật có vỏ sau khi làm sạch bằng cột SPE C18

Số mẫu	Nền mẫu	Số lượng phòng thử nghiệm	Giá trị trung bình, $\mu\text{g}/\text{kg}$	Độ thu hồi, %	s_R^d	RSD_R^e , %	Giới hạn tái lập, R^f	Trị số HorRat
Mẫu thực nghiệm	Trai	11 ^a (0 ^b)	435,36		47,84	10,99	133,95	0,61
1	Sò	13(0)	91,08		25,12	27,58	70,34	1,20
2	Ngao	11(1)	31,00		7,36	23,74	20,61	0,88
3	Hàu	16	KPH ^c					
4	Trai	16	KPH ^c					
5	Ngao	13(1)	42,77		8,36	19,55	23,41	0,76
5D	Ngao	13(1)	40,54		7,22	17,81	20,22	0,69
6	Ngao	16	KPH ^c					
7	Trai	15(0)	145,07		27,11	18,69	75,91	0,87
8	Trai	15(0)	328,00		47,09	14,36	131,85	0,76
8D	Trai	15(0)	334,13		51,52	15,42	144,26	0,82
9	Trai	15(0)	119,80		25,34	21,15	70,95	0,96
10	Hàu	12(0)	37,67		9,26	24,58	25,93	0,94
10D	Hàu	14(0)	39,57		12,97	32,78	36,32	1,26
11	Hàu	14(0)	73,14		16,47	22,52	46,12	0,95
12	Trai	15(0)	946,87		263,88	27,87	738,86	1,73
Thêm chuẩn 2	Trai	14(0)	53,36		16,01	30,00	44,83	1,21
Thêm chuẩn 3	Trai	15(0)	311,13	77,8	69,98	22,49	195,94	1,18
Thêm chuẩn 4	Trai	15(0)	1212,53	75,8	239,77	19,77	671,36	1,27
Thêm chuẩn 5	Trai	14(1)	691,00	86,4	223,40	32,33	625,52	1,91

^a là số lượng phòng thử nghiệm được giữ lại sau khi trừ các ngoại lệ thống kê Dixon.
^b là số lượng phòng thử nghiệm ngoại lệ.
^c KPH là không phát hiện được.
^d s_R là độ lệch chuẩn tái lập.
^e RSD_R là độ lệch chuẩn tương đối tái lập.
^f $R = 2,8 \times s_R$.

Bảng A.13 – Các kết quả liên phòng thử nghiệm về xác định B-1
trong động vật có vỏ sau khi làm sạch bằng cột SPE-COOH

Số mẫu	Nền mẫu	Số lượng phòng thử nghiệm	Giá trị trung bình, $\mu\text{g}/\text{kg}$	Độ thu hồi, %	s_R^d	RSD_R^e , %	Giới hạn tái lập, R^f	Trị số HorRat
Mẫu thực nghiệm	Trai	14 ^a (0 ^b)	349,71		58,75	16,80	164,50	0,90
1	Sò	12(1)	71,75		13,02	18,15	36,46	0,76
2	Ngao	9(0)	27,11		4,43	16,34	12,40	0,59
3	Hàu	14	KPH ^c					
4	Trai	14	KPH ^c					
5	Ngao	12(0)	42,00		11,07	26,36	31,00	1,02
5D	Ngao	12(0)	40,75		9,73	23,88	27,24	0,92
6	Ngao	14	KPH ^c					
7	Trai	13(0)	120,85		17,71	14,65	49,59	0,67
8	Trai	14(0)	285,79		43,73	15,30	122,44	0,79
8D	Trai	14(0)	274,14		52,47	19,14	146,92	0,98
9	Trai	14(0)	123,71		29,11	23,53	81,51	1,07
10	Hàu	10(0)	30,60		5,99	19,58	16,77	0,72
10D	Hàu	12(0)	37,58		10,93	29,08	30,60	1,11
11	Hàu	12(0)	63,00		11,09	17,60	31,05	0,73
12	Trai	14(0)	784,86		73,41	9,35	205,55	0,56
Thêm chuẩn 2	Trai	13(0)	46,00		8,78	19,09	24,58	0,75
Thêm chuẩn 3	Trai	13(0)	292,54	73,1	43,03	14,71	120,48	0,76
Thêm chuẩn 4	Trai	14(0)	1064,71	66,5	147,33	13,84	412,52	0,87
Thêm chuẩn 5	Trai	15(0)	619,67	77,5	85,39	13,78	239,09	0,80

^a là số lượng phòng thử nghiệm được giữ lại sau khi trừ các ngoại lệ thống kê Dixon.

^b là số lượng phòng thử nghiệm ngoại lệ.

^c KPH là không phát hiện được.

^d s_R là độ lệch chuẩn tái lập.

^e RSD_R là độ lệch chuẩn tương đối tái lập.

^f $R = 2,8 \times s_R$.

Bảng A.14 – Các kết quả liên phòng thử nghiệm về xác định C1,2
trong động vật có vỏ sau khi làm sạch bằng cột SPE C18

Số mẫu	Nền mẫu	Số lượng phòng thử nghiệm	Giá trị trung bình, $\mu\text{g}/\text{kg}$	Độ thu hồi, %	s_R^d	RSD_R^e , %	Giới hạn tái lập, R^f	Trị số HorRat
Mẫu thực nghiệm	Trai	12 ^a (0 ^b)	299,00		50,81	16,99	142,27	0,89
2	Ngao	13(1)	253,62		56,83	22,41	159,12	1,14
3	Hàu	16	KPH ^c					
4	Trai	15	KPH ^c					
5	Ngao	16(0)	256,50		74,66	29,11	209,05	1,48
5D	Ngao	15(1)	239,13		50,81	21,25	142,27	1,07
6	Ngao	16	KPH ^c					
7	Trai	15(0)	912,40		301,90	33,09	845,32	2,04
8	Trai	12(0)	118,08		63,81	54,04	178,67	2,45
8D	Trai	10(1)	96,30		24,10	25,03	67,48	1,10
9	Trai	9(0)	76,56		80,34	104,9	224,95	4,46
10	Hàu	11(0)	161,91		43,73	27,01	122,44	1,28
10D	Hàu	15(0)	189,73		58,51	30,84	163,83	1,50
11	Hàu	16(0)	357,69		58,20	16,27	162,96	0,87
12	Trai	16(0)	256,50		67,38	26,27	188,66	1,34
Thêm chuẩn 2	Trai	13(1)	734,85	73,5	108,97	14,83	305,12	0,88
Thêm chuẩn 5	Trai	14(1)	1566,50	78,3	227,74	14,54	637,67	0,97

^a là số lượng phòng thử nghiệm được giữ lại sau khi trừ các ngoại lệ thống kê Dixon.

^b là số lượng phòng thử nghiệm ngoại lệ.

^c KPH là không phát hiện được.

^d s_R là độ lệch chuẩn tái lập.

^e RSD_R là độ lệch chuẩn tương đối tái lập.

^f $R = 2,8 \times s_R$.

Bảng A.15 – Các kết quả liên phòng thử nghiệm về xác định C1,2
trong động vật có vỏ sau khi làm sạch bằng cột SPE-COOH

Số mẫu	Nền mẫu	Số lượng phòng thử nghiệm	Giá trị trung bình, µg/kg	Độ thu hồi, %	s_R^e	RSD_R^f , %	Giới hạn tái lập, R^g	Trị số HorRat
Mẫu thực nghiệm	Trai	14 ^a (0 ^b)	300,93		77,77	25,84	217,76	1,35
2	Ngao	14(1)	261,07		66,24	25,37	185,47	1,30
3	Hàu	14	KPH ^c					
4	Trai	14	KPH ^c					
5	Ngao	14(1)	237,07		64,30	27,12	180,04	1,37
5D	Ngao	15(0)	238,07		80,34	33,75	224,95	1,70
6	Ngao	15	KPH ^c					
7	Trai	15(0)	983,40		255,06	25,94	714,17	1,62
8	Trai	9(0)	108,56		40,27	37,09	112,76	1,66
8D	Trai	10(0)	93,40		35,75	38,28	100,10	1,67
9 ^d	Trai							
10	Hàu	14(0)	204,36		57,38	28,08	160,66	1,38
10D	Hàu	14(0)	200,71		48,51	24,17	135,83	1,19
11	Hàu	15(0)	349,07		81,27	23,28	227,56	1,24
12	Trai	12(1)	257,75		39,23	15,22	109,84	0,78
Thêm chuẩn 2	Trai	14(0)	859,64	86,0	204,53	23,79	572,68	1,45
Thêm chuẩn 5	Trai	15(0)	1687,13	84,4	342,42	20,30	958,78	1,37

^a là số lượng phòng thử nghiệm được giữ lại sau khi trừ các ngoại lệ thống kê Dixon.

^b là số lượng phòng thử nghiệm ngoại lệ.

^c KPH là không phát hiện được.

^d không tính được, chỉ 3 phòng thử nghiệm báo cáo dữ liệu, các phòng còn lại báo cáo không phát hiện được.

^e s_R là độ lệch chuẩn tái lập.

^f RSD_R là độ lệch chuẩn tương đối tái lập.

^g $R = 2,8 \times s_R$.

Bảng A.16 – Các kết quả liên phòng thử nghiệm về xác định C3,4
trong động vật có vỏ sau khi làm sạch bằng cột SPE-COOH

Số mẫu	Nền mẫu	Số lượng phòng thử nghiệm	Giá trị trung bình, $\mu\text{g}/\text{kg}$	Độ thu hồi, %	s_R^d	RSD_R^e , %	Giới hạn tái lập, R^f	Trị số HorRat
3	Hàu	15	KPH ^c					
4	Trai	15	KPH ^c					
6	Ngao	15	KPH ^c					
7	Trai	13 ^a (0 ^b)	837,15		227,24	27,14	636,27	1,65
12	Trai	10(1)	237,50		106,35	44,78	297,78	2,25
Thêm chuẩn 2	Trai	9(0)	724,78	80,5	180,88	24,96	506,46	1,49
Thêm chuẩn 5	Trai	15(0)	1425,07	79,2	301,97	21,19	845,52	1,40

^a là số lượng phòng thử nghiệm được giữ lại sau khi trừ các ngoại lệ thống kê Dixon.
^b là số lượng phòng thử nghiệm ngoại lệ.
^c KPH là không phát hiện được.
^d s_R là độ lệch chuẩn tái lập.
^e RSD_R là độ lệch chuẩn tương đối tái lập.
^f $R = 2,8 \times s_R$.

Bảng A.17 – Các kết quả liên phòng thử nghiệm về xác định độc tố PSP trong động vật có vỏ sau khi làm sạch bằng cột SPE C18 – xử lý thống kê mẫu mù giống nhau

Độc tố PSP	Cặp Youden	Nền mẫu	Số lượng phòng thử nghiệm	Giá trị trung bình, $\mu\text{g/kg}$	s_r ^c	RSD_r ^d , %	s_R ^e	RSD_R ^f , %	Giới hạn lặp lại, r ^g	Giới hạn tái lập, R ^h	Trị số HorRat
STX	5 và 5D	Ngao	15 ^a (0 ^b)	520,03	31,38	6,03	71,46	13,74	87,85	200,10	0,78
	8 và 8D	Trai	15(0)	312,57	67,80	21,69	73,23	23,43	189,84	205,05	1,23
	10 và 10D	Hàu	15(0)	140,30	24,96	17,79	43,91	31,29	69,87	122,94	1,46
NEO	8 và 8D	Trai	13(0)	280,00	43,14	15,41	83,82	29,94	120,79	234,70	1,55
dcSTX	5 và 5D	Ngao	12(0)	7,46	0,68	9,08	2,02	27,04	1,90	5,65	0,81
GTX1,4	5 và 5D	Ngao	9(0)	64,61	12,85	19,89	24,13	37,35	35,98	67,57	1,55
	8 và 8D	Trai	11(0)	601,45	119,96	19,95	155,53	25,86	335,89	435,48	1,50
GTX2,3	5 và 5D	Ngao	16(0)	116,75	15,77	13,51	23,15	19,83	44,15	64,82	0,90
	8 và 8D	Trai	16(0)	785,22	135,94	17,31	220,26	28,05	380,64	616,72	1,69
	10 và 10D	Hàu	15(0)	347,13	66,64	19,20	81,10	23,36	186,59	227,09	1,25
B-1	5 và 5D	Ngao	13(0)	41,65	5,26	12,62	7,82	18,78	14,72	21,90	0,73
	8 và 8D	Trai	15(0)	331,07	27,86	8,42	49,17	14,87	78,01	137,68	0,79
	10 và 10D	Hàu	12(0)	38,58	8,35	21,63	11,69	30,30	23,37	32,73	1,16
C1,2	5 và 5D	Ngao	15(0)	241,47	37,53	15,54	53,39	22,11	105,09	149,49	1,12
	8 và 8D	Trai	8(0)	101,00	28,62	28,34	38,38	38,00	80,14	107,46	1,68
	10 và 10D	Hàu	11(0)	168,77	53,48	31,69	53,48	31,69	149,75	149,75	1,52

^a là số lượng phòng thử nghiệm được giữ lại sau khi trừ các ngoại lệ thống kê Cochran.

^b là số lượng phòng thử nghiệm ngoại lệ.

^c s_r là độ lệch chuẩn tái lập.

^d RSD_r là độ lệch chuẩn tương đối tái lập.

^e s_R là độ lệch chuẩn tái lập.

^f RSD_R là độ lệch chuẩn tương đối tái lập.

^g $r = 2,8 \times s_r$.

^h $R = 2,8 \times s_R$.

Bảng A.18 – Các kết quả liên phòng thử nghiệm về xác định độc tố PSP trong động vật có vỏ sau khi làm sạch bằng cột SPE-COOH – xử lý thống kê mẫu mù giống nhau

Độc tố PSP	Cặp Youden	Nền mẫu	Số lượng phòng thử nghiệm	Giá trị trung bình, $\mu\text{g/kg}$	s_r^c	RSD_r^d , %	s_R^e	RSD_R^f , %	Giới hạn lặp lại, r^g	Giới hạn tái lập, R^h	Trị số HorRat
STX	5 và 5D	Ngao	15(0)	491,97	43,99	8,94	85,73	17,43	123,16	240,04	0,98
	8 và 8D	Trai	13(0)	273,31	36,19	13,24	60,05	21,97	101,32	168,15	1,13
	10 và 10D	Hàu	14(0)	132,14	32,87	24,88	37,88	28,67	92,05	106,08	1,32
NEO	8 và 8D	Trai	13(0)	262,65	67,73	25,79	89,95	34,24	189,65	251,79	1,75
			10(0)	40,50	7,82	19,30	15,86	39,15	21,89	44,40	1,51
dcSTX	5 và 5D	Ngao	9(0)	6,89	0,88	12,80	3,15	45,76	2,47	8,83	1,35
GTX1,4	5 và 5D	Ngao	12(0)	73,92	11,10	15,02	19,36	26,19	31,09	54,20	1,11
	8 và 8D	Trai	15(0)	659,87	85,84	13,01	135,04	20,47	240,36	378,12	1,20
GTX2,3	5 và 5D	Ngao	15(0)	124,47	19,88	15,97	28,14	22,61	55,65	78,80	1,03
	8 và 8D	Trai	16(0)	775,28	91,07	11,75	166,54	21,48	380,64	616,72	1,69
	10 và 10D	Hàu	14(0)	357,21	84,30	23,60	84,30	23,60	236,03	236,03	1,26
B-1	5 và 5D	Ngao	11(0)	40,68	5,04	12,39	10,37	25,48	14,11	29,03	0,98
	8 và 8D	Trai	14(0)	279,96	40,58	14,49	48,02	17,15	113,62	134,44	0,89
	10 và 10D	Hàu	10(0)	35,25	8,49	24,10	9,56	27,11	23,78	26,76	1,02
C1,2	5 và 5D	Ngao	14(0)	230,43	46,06	19,99	62,14	26,97	128,97	174,01	1,35
	8 và 8D	Trai	8(0)	100,94	19,99	19,80	40,52	40,14	55,96	113,45	1,78
	10 và 10D	Hàu	14(0)	202,54	37,12	18,33	52,66	26,00	103,93	147,46	1,28

^a là số lượng phòng thử nghiệm được giữ lại sau khi trừ các ngoại lệ thống kê Cochran.

^b là số lượng phòng thử nghiệm ngoại lệ.

^c s_r là độ lệch chuẩn lặp lại.

^d RSD_r là độ lệch chuẩn tương đối lặp lại.

^e s_R là độ lệch chuẩn tái lập.

^f RSD_R là độ lệch chuẩn tương đối tái lập.

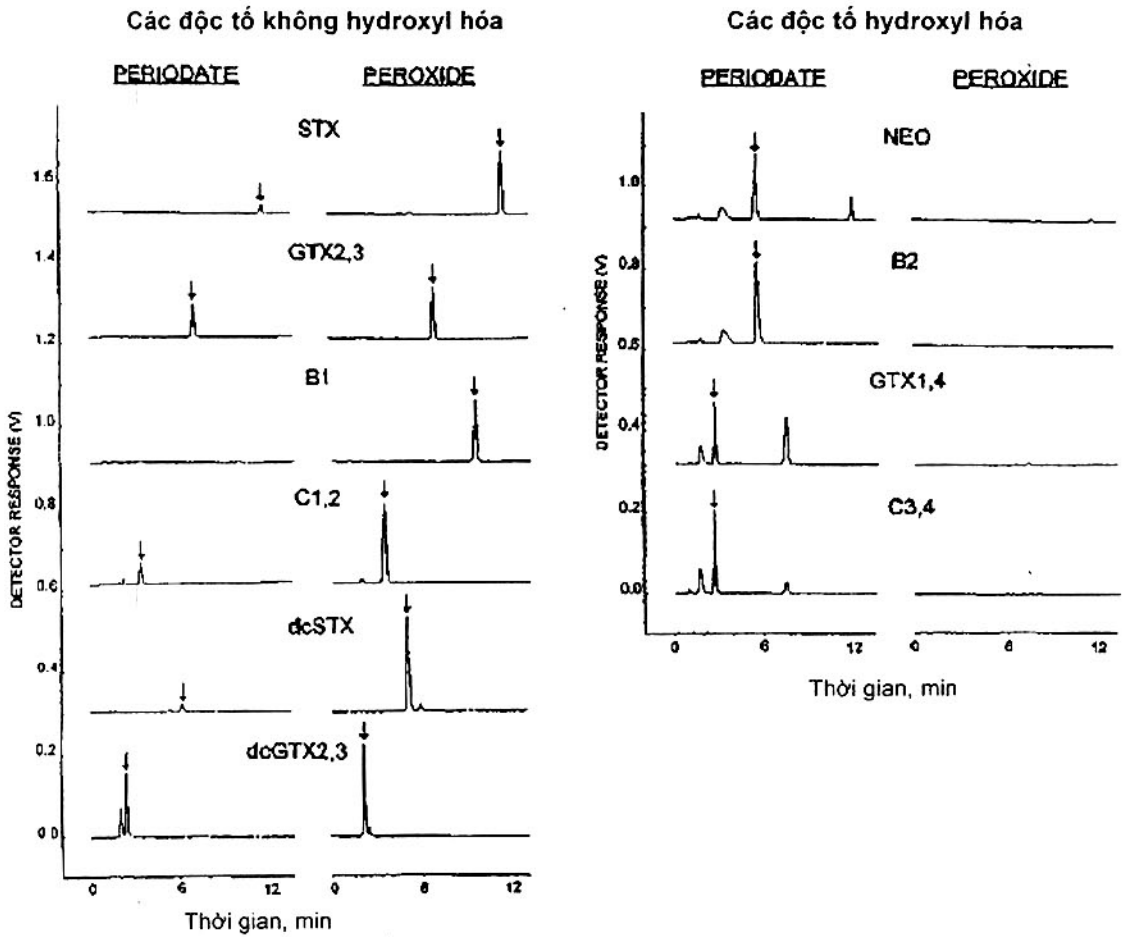
^g $r = 2,8 \times s_r$.

^h $R = 2,8 \times s_R$.

Phụ lục B

(tham khảo)

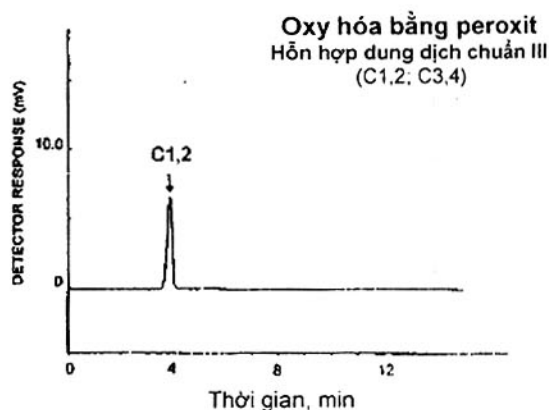
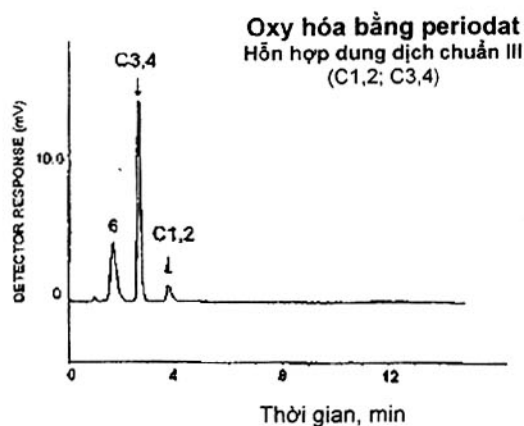
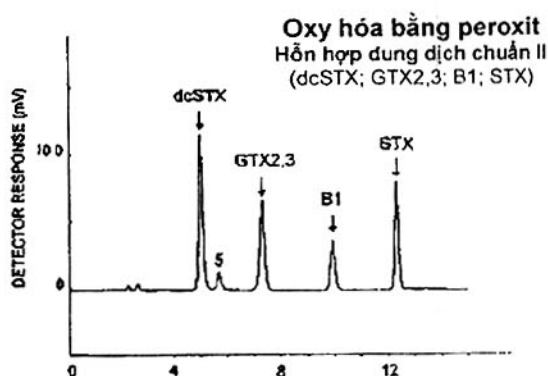
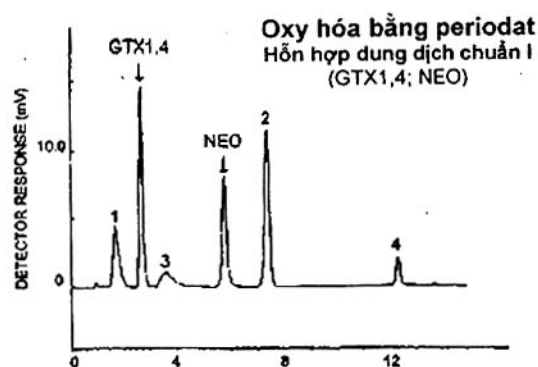
Ví dụ về sắc ký đồ



CHÚ DẪN: Các mũi tên chỉ trên các pic được sử dụng để định lượng.

Hình sắc ký đồ cho thấy các sản phẩm oxy hóa được hình thành sau khi oxy hóa bằng periodat và peroxit của các độc tố trong thử nghiệm này. Khối lượng bằng nhau của từng chất độc đã được sử dụng cho mỗi phản ứng oxy hóa.

Hình B.1 – Sắc ký đồ của các độc tố không hydroxyl hóa và các độc tố hydroxyl hóa



CHÚ DẪN

Các mũi tên chỉ trên các pic được sử dụng để định lượng.

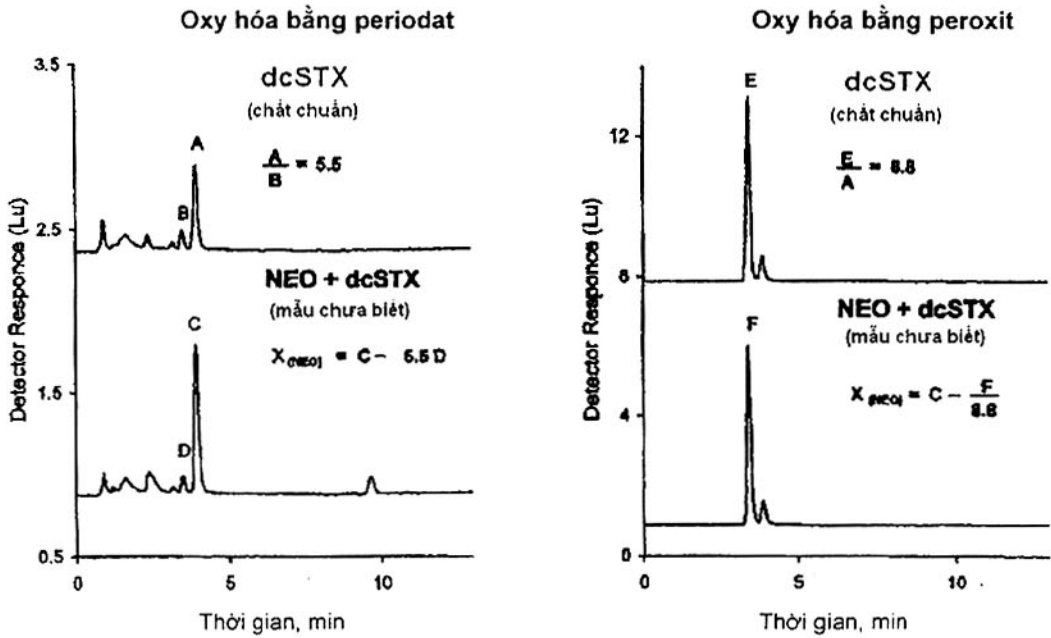
Pic 1 và 2 là sản phẩm oxy hóa thứ cấp của GTX1, 4;

Pic 3 và 4 là sản phẩm oxy hóa thứ cấp của NEO;

Pic 5 là một sản phẩm oxy hóa thứ cấp của dcSTX;

Pic 6 là một sản phẩm oxy hóa thứ cấp của C3, 4.

Hình B.2 – Sắc ký đồ điển hình thu được với 3 hỗn hợp của các chất chuẩn phân tích độc tố PSP (Các độc tố hydroxyl bị oxy hóa bằng periodat và các độc tố không hydroxyl hóa bằng peroxit)



CHÚ DẪN

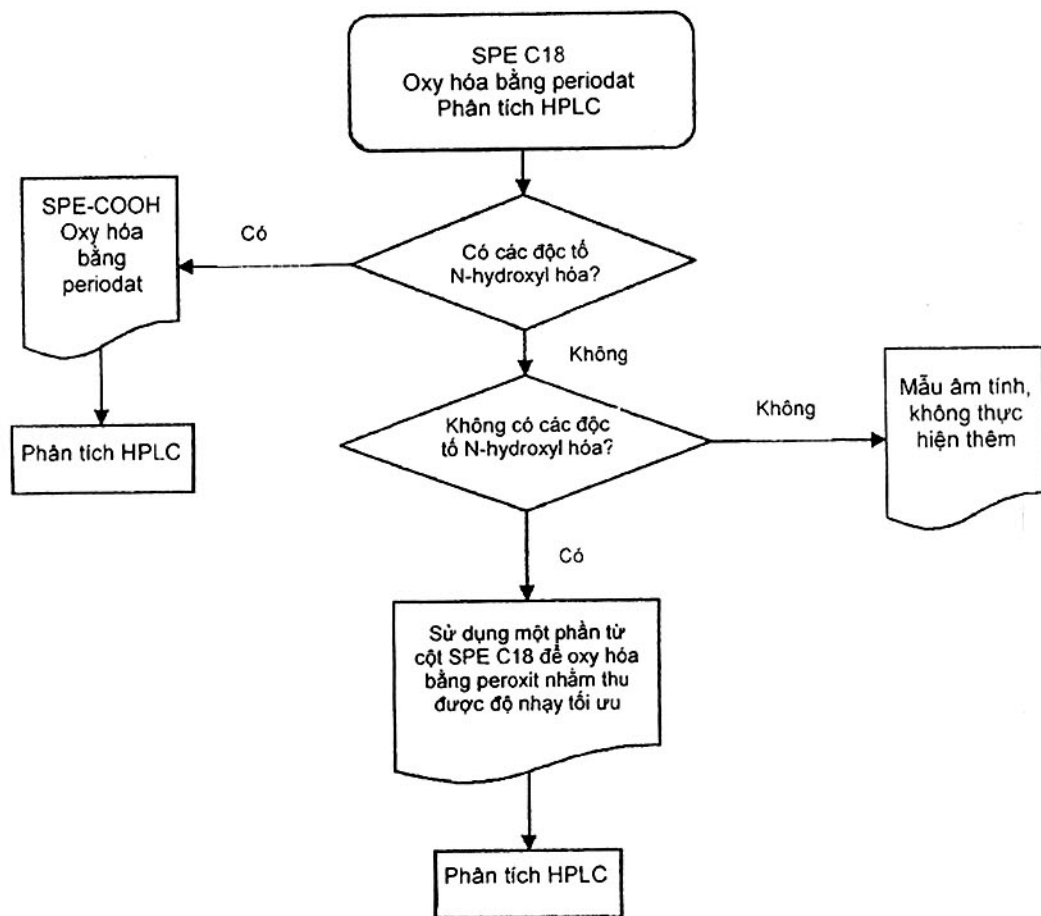
A, B, và E là diện tích pic của chất chuẩn dcSTX sau khi oxy hóa bằng periodat (pic A và pic B) và peroxit (pic E);

C, D, và F là diện tích pic của mẫu chưa biết bị nhiễm dcSTX và NEO sau khi oxy hóa bằng periodat (pic C, pic D) và peroxit (pic F).

Hình B.3 – Sắc ký đồ của chất chuẩn dcSTX sau khi oxy hóa bằng periodat và peroxit (giải thích các tính toán NEO có mặt dcSTX)

Phụ lục C
(tham khảo)

Sơ đồ quy trình phân tích thông dụng



Hình C.1 – Sơ đồ quy trình phân tích thông dụng

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] AOAC Official Method 959.08 *Paralytic Shellfish Poison, Biological Method*
-