

XÁC ĐỊNH ĐỒNG THỜI MỘT SỐ ĐỘC TỐ GÂY LIỆT CƠ TRONG CUA BIỂN BẰNG SẮC KÝ LỎNG KHÓI PHỔ HAI LẦN

Đến tòa soạn 20-3-2017

Nguyễn Thị Hà Bình, Trần Cao Sơn, Lê Thị Hồng Hảo

Viện Kiểm nghiệm An toàn Vệ sinh Thực phẩm quốc gia

Nguyễn Đình Quân

Trường Đại học Dược Hà Nội

Nguyễn Thị Nhung

Trường Đại học KHTN, Đại học Quốc gia Hà Nội

SUMMARY

SILMUTANEOUS DETERMINATION OF SOME PARALYTIC SHELFISH POISONING (PSP) TOXINS BY LIQUID CHROMATOGRAPHY TANDEM MASS SPECTROMETRY

A method for the simultaneous determination of paralytic shellfish poisoning toxins in crab by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) was developed and validated. The proposed method has good specificity, high sensitivity, acceptable repeatability and recovery. The method limit of detection and limit of quantitative for each toxin is 100 µg/kg and 300 µg/kg, respectively. The method has been applied for the PSP toxins determination in 30 crab samples.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ngộ độc gây liệt cơ (PSP - Paralytic shellfish poisoning) là triệu chứng ngộ độc xảy ra khi con người ăn phải các sinh vật biển có chứa các độc tố. Triệu chứng lâm sàng trong trường hợp nhẹ là cảm giác ngứa ran hoặc tê quanh môi, sau đó lan dần lên mặt và cổ; trong trường hợp nặng hơn có thể gây mất vận động, khó thở do liệt cơ hô hấp và dẫn đến tử vong. Một số hợp chất quan trọng của nhóm độc tố PSP gồm saxitoxin, neosaxitoxin, và các

gonyautoxin (1-4). Hiện nay, châu Âu và Mỹ quy định hàm lượng tối đa của các độc tố PSP trong thủy sản là 800 µg/kg [2][5].

Trong những năm gần đây, ở Việt Nam đã xảy ra nhiều trường hợp ngộ độc do ăn phải các thực phẩm có nguồn gốc từ động vật biển. Vụ ngộ độc ở Nha Trang năm 2006 tại Nha Trang, 165 du khách phải nhập viện do ăn phải tôm và cua được xác định có độc tố gây liệt cơ (saxitoxin). Năm 2015, trường hợp ngộ độc được ghi nhận ở Lý Sơn, Quảng

Ngãi; ba người đã phải nhập viện khi ăn phải cua mặt quỷ, có các triệu chứng của ngộ độc PSP.

Mặc dù ở Việt Nam đã ban hành TCVN sử dụng phương pháp HPLC-FLD trên cơ sở AOAC để xác định các độc tố PSP tuy nhiên phương pháp này vẫn gặp những khó khăn trong quá trình xác định các pic của các chất thuộc nhóm độc tố PSP do hạn chế về tính đặc hiệu, nhất là trên những nền mẫu phức tạp như cua biển [1][6]. Vì vậy, chúng tôi đã nghiên cứu phương pháp có thể xác định đồng thời một số độc tố gây liệt cơ trong cua biển bằng phương pháp sắc ký lỏng khối phổ hai lần.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Trong nhóm độc tố gây liệt cơ PSP, 6 chất hay gặp và có độc tính cao hơn hẳn thuộc nhóm carbamoyl đó là: Saxitoxin (STX), Neosaxitoxin (NEO), Gonyautoxin 1-4 (GTX 1-4), Gonyautoxin 2-3 (GTX 2-3). Mẫu cua biển được lựa chọn do có tiềm ẩn nguy cơ cao nhiễm độc tố PSP, mẫu được lấy tại các chợ ở Hà Nội trong thời gian từ tháng 9-10/2015.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp xử lý mẫu

Mẫu sau khi được thu tại chợ được mã hóa và sơ chế trước khi phân tích: cua được bỏ vỏ, lấy phần thịt và nội tạng, để ráo nước (khối lượng tối thiểu thu được

ở mỗi mẫu là 200 g). Sau đó đem xay nhuyễn thịt cua và cân khoảng 5 g mẫu vào ống ly tâm 15 mL. Toàn bộ mẫu được trữ trong tủ đông -20°C. Mẫu trước khi phân tích sẽ được rã đông về nhiệt độ thường.

Các điều kiện về dung môi chiết, làm sạch được khảo sát để lựa chọn quy trình chiết độc tố PSP tối ưu.

2.2.2. Phương pháp sắc ký lỏng khối phổ hai lần

Các độc tố được tách qua cột sắc ký lỏng dạng HILIC, phát hiện và định lượng bằng LC-MS/MS với nguồn ion hóa ESI(+), chế độ quét đa phản ứng MRM. Mỗi độc tố lựa chọn ít nhất 1 ion mẹ để bắn phá và thu được 2 ion con, 1 ion dùng để định lượng và 1 ion dùng để định tính.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

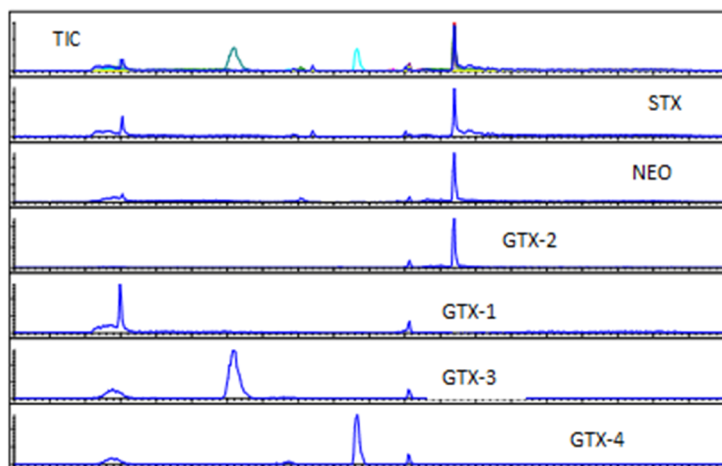
3.1. Tối ưu các điều kiện chạy máy LC-MS/MS

Các ion mẹ và ion con của các độc tố PSP đã được xác định bằng cách phun dòng chất chuẩn 100 ng/mL vào khối phổ. Các điều kiện của nguồn ESI(+) và các điều kiện phân mảnh được tối ưu tự động.

Qua tham khảo một số nghiên cứu trước đây [3][7][8], cột HILIC là loại pha tĩnh được ưu tiên sử dụng do đặc tính lưu giữ được các hợp chất rất phân cực. Trong nghiên cứu này, cột TSK-gel Amide 80 (Tosoh) đã được khảo sát và lựa chọn.

Bảng 1. Các thông số tối ưu cho ESI⁺-MS/MS

Tên chất	Ký hiệu	Ion mẹ (m/z)	Ion con (m/z)	Năng lượng va chạm (eV)
Saxitoxin	STX	300	298	23
			204	31
Neosaxitoxin	NEO	316	298	23
			220	31
Gonyautoxin 1	GTX1	332	314	25
			164	35
Gonyautoxin 2	GTX2	316	298	23
			220	31
Gonyautoxin 3	GTX3	396	316	13
			298	23
Gonyautoxin 4	GTX4	412	332	17
			314	27



Hình 1. Sắc đồ của các độc tố PSP tại mức nồng độ của STX, NEO, GTX-1, GTX2 100µg/L, của GTX-3 38 µg/L, GTX-4 32,6 µg/L

3.2. Khảo sát quy trình xử lý mẫu

Nền mẫu của biển là nền mẫu rất phức tạp do chứa nhiều protein, hàm lượng muối và các ion kim loại nặng lớn nên việc lựa chọn dung môi chiết và quy trình xử lý mẫu là rất quan trọng để chiết được hiệu quả các PSP và loại trừ được các tạp chất và ảnh hưởng của nền mẫu. Độc tố gây liệt cơ là các chất rất phân cực tan rất tốt trong nước bèn trong môi trường pH 2-4 nên các dung môi phân cực như nước có chứa acid chlohydric 0,1N, acid acetic 1%, acid formic 0,1%... thường được sử dụng trong các nghiên cứu xác định PSP [1][4][8].

Loại dung môi chiết, thể tích dung môi chiết, ảnh hưởng của nhiệt độ lên hiệu suất chiết và ý nghĩa của quá trình pha

loãng mẫu đến việc giảm ảnh hưởng nền đã được khảo sát và tối ưu.

Ba quy trình xử lý mẫu khác nhau đã được thử nghiệm trên cơ sở tham khảo một số nghiên cứu trước đây [1][4][8]. Quy trình 1 (QT1) dựa trên việc chiết bằng acetonitrile:nước (90:10) chứa 0,1% acid formic, sau đó làm sạch dịch chiết bằng hỗn hợp C18 và GCB. Quy trình 2 (QT2) sử dụng HCl 0,1N để chiết mẫu, sau đó cũng làm sạch dịch chiết bằng hỗn hợp C18 và GCB. Quy trình 3 (QT3) thực hiện chiết mẫu bằng dung dịch acid acetic 1% sau khi thủy phân ở 100°C trong 5 phút. Ly tâm lạnh để lắng cặn, pha loãng phần dịch phía trên với hỗn hợp acid formic 0,1%:acetonitrile (60:40) theo tỷ lệ 1:10.

Bảng 2. Bảng so sánh hàm lượng các PSP thu được từ của 3 quy trình chiết

Độc tố	QT1 (µg/mL)	QT2 (µg/mL)	QT3 (µg/mL)
STX	30	ND	80
NEO	32	ND	85
GTX-1	25	ND	73
GTX-2	23	ND	81
GTX-3	31	ND	77
GTX-4	25	ND	70

ND: Không phát hiện

Kết quả sau khi phân tích trên LC-MS/MS cho thấy, xử lý mẫu theo quy trình 3 đạt hiệu suất thu hồi là cao nhất (khoảng 70 - 85%) đối với tất cả các chất, trong khi với hai quy trình còn lại hiệu suất chiết là không đáng kể.

Quy trình chiết mẫu được tối ưu như sau: Mẫu đồng nhất được cân chính xác khoảng 5 g vào ống ly tâm 15 mL. Thêm 2 mL acid acetic 1% vào mẫu và lắc xoáy 10 giây sau đó đem lắc ngang 30 phút ở tốc độ 140 vòng/phút. Mẫu sau đó được gia nhiệt ở 100°C trong 5 phút, rồi để nguội về nhiệt độ phòng và đem ly tâm 6000 vòng/phút trong 5 phút ở nhiệt độ -20°C. Gạn dịch chiết vào bình định mức 5 mL. Phần cặn còn lại được chiết lặp lần 2 với 2 mL acid acetic 1% như trên. Gộp dịch chiết và định mức đến 5 mL bằng acid acetic 1%. Lấy 2 mL dịch chiết đem làm sạch bằng d-SPE có chứa 50 mg C18, 5 mg GCB. Lắc xoáy và ly tâm ở tốc độ 13000 vòng/phút trong 2 phút. Lấy 1 mL dịch nổi pha loãng với 9 mL hỗn hợp dung môi acetonitril / acid

formic 1% (4/6, v/v). Lọc dịch chiết qua màng lọc 0,45 µm và phân tích bằng LC-MS/MS.

3.3 Thẩm định phương pháp phân tích

3.3.1. Tính đặc hiệu /chọn lọc

Trong nghiên cứu này mỗi chất đều được đặc trưng bởi một ion mẹ và hai ion con, do đó số điểm IP của mỗi chất đều là 4 đạt yêu cầu của EC về nhận dạng pic. Ngoài ra, trên mẫu thêm chuẩn có xuất hiện các pic với thời gian lưu tương tự trên chuẩn; trên mẫu trắng không thấy có tín hiệu pic của các độc tố PSP.

3.3.2 Giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ)

Xác định LOD, LOQ dựa trên phương pháp xác định tỷ lệ tín hiệu/nhiều (S/N). Các kết quả cho thấy tất cả các chất đều có thể định lượng được ở mức thấp hơn so với mức giới hạn tối đa chung của EC. Do đó, phương pháp đáp ứng được yêu cầu để ứng dụng phân tích độc tố PSP trong các nền mẫu của biển.

Bảng 3. Kết quả LOD, LOQ của các độc tố PSP

Thông số	STX	NEO	GTX1	GTX2	GTX3	GTX4
LOD (µg/kg)	100	100	100	100	100	100
LOQ (µg/kg)	300	300	300	300	300	300
Giới hạn tối đa (µg/kg)	800	800	800	800	800	800

3.3.3 Xác định khoảng tuyến tính

Kết quả khoảng tuyến tính thu được của các PSP đều nằm trong khoảng từ 30-500 ng/mL (tương đương trên mẫu từ 300-5000 µg/kg). Đường chuẩn của các chất cũng được xây dựng trong khoảng này với hệ số biến thiên $R^2 > 0,99$.

3.3.4 Độ lặp lại và độ thu hồi

Độ lặp lại và độ thu hồi của phương pháp được đánh giá bằng cách phân tích các mẫu trắng thêm chuẩn ở các mức

nồng độ khác nhau, phân tích lặp lại 6 lần cho mỗi nồng độ (Bảng 3).

Các kết quả thẩm định cho thấy các giá trị độ thu hồi và hệ số biến thiên dao động tùy từng độc tố PSP. Giá trị RSD% của các chất trong khoảng 2,3-8,3%; giá trị của độ thu hồi đều nằm trong khoảng từ 82-103%. Điều này khẳng định phương pháp có độ lặp lại và độ thu hồi tốt, đáp ứng yêu cầu của AOAC và Châu Âu (bảng 4).

Bảng 4. Độ lặp lại và thu hồi của các độc tố PSP trên nền mẫu của biển

Thêm chuẩn	Stt	STX	NEO	GTX-1	GTX-2	GTX-3	GTX-4
STX: 1000 µg/kg NEO: 1000 µg/kg GTX-1: 500 µg/kg GTX-2: 1000µg/kg GTX-3: 300 µg/kg GTX-4: 300 µg/kg	1	99	85	80	104	98	78
	2	97	97	85	105	85	84
	3	101	83	80	107	80	83
	4	97	93	81	107	94	81
	5	98	98	86	93	92	92
	6	93	88	84	103	86	84
	TB	97	90	82	103	89	83
	SD	2,7	6,3	2,7	5,2	6,6	4,7
	RSD%	2,7	6,9	3,2	5,1	7,5	5,6
STX: 2000 µg/kg NEO: 2000 µg/kg GTX-1: 1000 µg/kg GTX-2: 2000 µg/kg GTX-3: 500 µg/kg GTX-4: 500 µg/kg	1	98	89	88	83.5	86	81
	2	84	81	87	86.5	87	75
	3	99	84	86	87.5	84	94
	4	81	78	80	85	94	81
	5	89	87	91	85	91	82
	6	95	94	84	82	86	86
	TB	91	85	86	84	88	83
	SD	7,5	5,9	3,7	2,0	3,7	6,4
	RSD%	8,3	6,9	4,4	2,3	4,3	7,7
STX: 5000 µg/kg NEO: 5000 µg/kg GTX-1: 3000 µg/kg GTX-2: 5000 µg/kg GTX-3: 1000 µg/kg GTX-4: 1000 µg/kg	1	96	99.6	87	98.8	93	90
	2	98	97.4	82	99.4	91	82
	3	93	98.4	80	96	87	87
	4	98	97	91	100	84	81
	5	98	96.6	86	94.4	92	86
	6	100	91	76	90.8	84	80
	TB	97	96	83	96	88	84
	SD	2,4	3,0	5,4	3,6	4,0	3,9
	RSD%	2,5	3,1	6,4	3,7	4,6	4,7

3.4. Kết quả xác định độc tố liệt cơ trong một số đối tượng của biển

Trên cơ sở phương pháp đã xây dựng, chúng tôi tiến hành xác định hàm lượng các độc tố liệt cơ nghiên cứu trên các mẫu được lấy trên thị trường Hà Nội. Ba mươi mẫu phân tích được kiểm soát hiệu suất chiết bằng việc chọn ngẫu nhiên 3 mẫu để thêm chuẩn (mức thêm chuẩn của STX, NEO, GTX-1, GTX-2, GTX-3, GTX-4 là 1000 µg/kg).

Hiệu suất thu hồi của các mẫu thêm

chuẩn đều đạt kết quả tốt (trong khoảng 80-98% cho cả 6 PSP). Kết quả kiểm tra cho thấy chưa có mẫu của biển nào ở Hà Nội phát hiện có chứa các độc tố PSP. Đây cũng là khó khăn của nhóm nghiên cứu khi tại thời điểm nghiên cứu không xảy ra các trường hợp ngộ độc gây liệt cơ do của biển hoặc các loài nhuyễn thể khác. Phương pháp được xây dựng sẽ được sử dụng để tiếp tục kiểm soát mức độ nhiễm độc tố gây liệt cơ trong thủy sản nói chung và của biển

nói riêng, đặc biệt khi xảy ra các trường hợp ngộ độc thực phẩm.

4. KẾT LUẬN

Một phương pháp xác định chọn lọc và nhạy đã được phát triển để xác định đồng thời 8 độc tố gây liệt cơ trong cua biển bằng LC-MS/MS sử dụng cột HILIC (TSK-gel Amide 80) với các điều kiện xử lý mẫu được tối ưu. Phương pháp đã được thẩm định đáp ứng được độ đặc hiệu theo tiêu chuẩn EC, khoảng tuyến tính tốt trong khoảng nồng độ từ 300-5000 µg/kg, giới hạn định lượng của tất cả các độc tố PSP (300µg/kg) đều thấp hơn mức giới hạn tối đa của chúng trên nền mẫu thực phẩm - theo quy định của châu Âu (800 µg/kg). Độ lặp lại của phương pháp tốt với hệ số biến thiên CV trong khoảng 2,3-8,3% cho tất cả các chất. Độ thu hồi đạt được từ 82-103% đáp ứng yêu cầu đề ra. Trong số 30 mẫu cua biển được lấy tại Hà Nội, chưa phát hiện mẫu nào có chứa độc tố PSP.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Cefas (2008), *Refinement and in-house validation of the AOAC HPLC method (2005.06): the determination of paralytic shellfish poisoning toxins in mussels by liquid chromatography and fluorescence detection*, Final report.
2. Etheridge S.M. (2010), "Paralytic shellfish poisoning: Seafood safety and human health perspectives", *Toxicon*, 56, 108-122
3. Hatfield R.G., Turner A.D. (2012), "Rapid liquid Chromatography for paralytic Shellfish toxin analysis using superficially porous chromatography with AOAC Official method SM 2005.06", *Journal of AOAC international*, 95(4), 1089-1096.
4. Mattarozzi M. et al. (2016), "Optimization of a rapid QuEChERS sample treatment method for HILIC-MS² analysis of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins in mussels", *Food Control* 60, 138-145.
5. Rubio D.P. et al. (2015), "Purification and characterization of saxitoxin from *Mytilus chilensis* of southern Chile", *Toxicon*, 108, 147-153
6. Tiêu chuẩn quốc gia TCVN 8339:2010, "Nhuyễn thể hai mảnh vỏ (xác định hàm lượng độc tố gây liệt cơ (PSP) – Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao
7. Turrel E. et al. (2008), "Optimization of Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography/ Mass Spectrometry and Development of Solid-phase-Extraction for the Determination of Paralytic Shellfish poisoning toxins", *Journal of AOAC International*, 01(06), 1372-1386.
8. Xhuo L. et al. (2013), "Determination of paralytic shellfish poisoning toxins by HILIC-MS/MS coupled with dispersive solid phase extraction", *Food chemistry* 137, 115-121.