

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi dựa trên những tài liệu, số liệu do chính tôi tự tìm hiểu và nghiên cứu. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và khách quan nhất. Đồng thời, kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực nếu sai tôi hoàn toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật.

Tác giả

Võ Thị Đoan Trang

LỜI CẢM ƠN

Trong quá trình nghiên cứu và hoàn thành luận văn này, tôi đã nhận được sự quan tâm và giúp đỡ quý báu của các thầy cô, bạn bè và đồng nghiệp.

Đầu tiên, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành và sâu sắc đến PGS.TS. Đào Việt Hà đã tận tình hướng dẫn và tạo mọi điều kiện tốt nhất giúp tôi hoàn thành luận văn.

Tôi xin trân trọng cảm ơn Ban lãnh đạo Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Ban lãnh đạo Viện Nghiên cứu và Ứng dụng công nghệ Nha Trang, Ban lãnh đạo Viện Hải dương học Nha Trang đã tạo mọi điều kiện thuận lợi giúp tôi hoàn thành các học phần của luận văn và các thủ tục cần thiết.

Tôi xin chân thành cảm ơn sự giúp đỡ và tạo điều kiện về mọi mặt của quý anh chị Phòng thí nghiệm về An toàn thực phẩm và môi trường (Khu vực miền Trung)- Viện Hải dương học Nha Trang; của quý thầy cô, anh chị học viên cao học các lớp CHE21A đang công tác và học tập tại Viện Nghiên cứu và Ứng dụng công nghệ Nha Trang.

Tôi cũng xin cảm ơn Sở Giáo dục và Đào tạo Khánh Hòa, Ban lãnh đạo trường THPT Lý Tự Trọng, các anh chị em đồng nghiệp đã luôn tạo điều kiện trong công việc, động viên và trợ giúp tôi để tôi dành thời gian chuyên tâm học tập và hoàn thành luận văn.

Cuối cùng, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến gia đình, người thân và bạn bè đã quan tâm, động viên và giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập và hoàn thành luận văn.

Tác giả luận văn

Võ Thị Đoan Trang

MỤC LỤC

MỤC LỤC	1
DANH MỤC CÁC KÍ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT	4
DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ	6
DANH MỤC CÁC BẢNG	8
DANH MỤC CÁC PHỤ LỤC	9
MỞ ĐẦU	10
Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU	12
1.1.ĐỘC TỐ TETRODOTOXIN.....	12
1.1.1.Đặc tính, cấu trúc hóa học.....	12
1.1.2.Một số dẫn chất của Tetrodotoxin.....	13
1.1.3.Độc tính Tetrodotoxin	14
1.1.4.Cơ chế hoạt động.....	14
1.1.5.Tetrodotoxins trong ốc biển	15
1.2.MỘT SỐ PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH TETRODOTOXINS.....	16
1.2.1.Phương pháp thử nghiệm sinh học.....	16
1.2.1.1.Phương pháp sinh hóa chuột	16
1.2.1.2.Phương pháp thử nghiệm cảm ứng sinh học.....	18
1.2.1.3.Thử nghiệm trên mô tế bào	18
1.2.1.4.Phương pháp thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzyme	19
1.2.2.Phương pháp hóa học	20
1.2.2.1.Phương pháp sắc ký lớp mỏng	20
1.2.2.2.Phương pháp quang phổ hồng ngoại.....	20
1.2.2.3.Phương pháp sắc ký khí khối phổ	21
1.2.2.4.Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao.....	22
1.3.PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG KHỐI PHỔ	26

1.3.1.Sơ lược về sắc ký lỏng khối phổ	26
1.3.2.Thiết bị sắc ký lỏng khối phổ	27
1.3.2.1.Pha động	27
1.3.2.2.Hệ thống bơm	27
1.3.2.3.Cột tách và pha tĩnh.....	27
1.3.2.4.Hệ tiêm mẫu	28
1.3.2.5.Detector khối phổ	28
1.3.3.Một số chế độ trong sắc ký lỏng khối phổ	28
1.3.3.1.Chế độ quét	28
1.3.3.2.Chế độ khảo sát ion chọn lọc	28
1.3.3.3.Chế độ khảo sát ion cô lập và khảo sát đa ion cô lập	29
Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	30
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU	30
2.1.1. Đối tượng nghiên cứu.....	30
2.1.2. Nguyên liệu, thiết bị.....	30
2.1.2.1. Dung môi, hóa chất	30
2.1.2.2. Thiết bị, dụng cụ phân tích.....	30
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	31
2.2.1. Thu mẫu và bảo quản mẫu	31
2.2.2.Xây dựng quy trình phân tích.....	31
2.2.2.1. Khảo sát điều kiện khối phổ xác định TTX	31
2.2.2.2. Khảo sát điều kiện sắc ký lỏng hiệu năng cao	32
2.2.2.3. Khảo sát quy trình xử lý mẫu.....	32
2.2.3. Đánh giá quy trình phân tích TTXs	33
2.2.3.1. Khảo sát khoảng tuyến tính và xây dựng đường chuẩn	33
2.2.3.2. Xác định giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng.....	34

2.2.3.3. Độ chụm và độ đúng của phương pháp	34
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	36
3.1. KHẢO SÁT ĐIỀU KIỆN PHÂN TÍCH TTXs TRÊN THIẾT BỊ LC-MS/MS	36
3.1.1. Khảo sát các điều kiện của detector khối phổ	36
3.1.2. Khảo sát các điều kiện của hệ pha động	37
3.1.2.1. Khảo sát chương trình gradient pha động	38
3.1.2.2. Khảo sát tốc độ dòng.....	40
3.2. KHẢO SÁT QUY TRÌNH XỬ LÝ MẪU	43
3.2.1. Khảo sát nồng độ dung môi tách chiết	45
3.2.2. Khảo sát thể tích dung môi rửa giải	47
3.3. ĐÁNH GIÁ PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH.....	53
3.3.1. Khảo sát khoảng tuyến tính và lập đường chuẩn	53
3.3.2. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng	55
3.3.3. Đánh giá độ chụm và độ đúng của phương pháp.....	56
3.4. PHÂN TÍCH MỘT SỐ MẪU ÓC THỰC TẾ	58
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	62
TÀI LIỆU THAM KHẢO	63
PHỤ LỤC	69

DANH MỤC CÁC KÍ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT

AOAC	Association of official analytical chemists	Hiệp hội các nhà hóa phân tích chính thức.
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid	Axit ethylene diamine tetraacetic
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay	Xét nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzyme
ESI	Electro spray ionization	Kỹ thuật ion hóa bằng phun điện tử
FLD	Fluorescence detector	Đầu dò huỳnh quang
GC-MS	Gas chromatography-Mass spectrometry	Sắc ký khí ghép khối phổ
IR	Infrared spectroscopy	Phổ hồng ngoại
HPLC	High performance liquid chromatography	Sắc ký lỏng hiệu năng cao
LC-MS	Liquid chromatography- Mass spectrometry	Sắc ký lỏng ghép khối phổ
LC-MS/MS	Liquid chromatography tandem mass spectrometry	Sắc ký lỏng khối phổ kép
LOD	Limit of detection	Giới hạn phát hiện
LOQ	Limit of quantitation	Giới hạn định lượng
MBA	Mouse bioassay	Phương pháp sinh hóa chuột
MRM	Multiple reaction monitoring	Kỹ thuật khảo sát đa ion cô lập

PSP	Paralytic shellfish poisons	Độc tố gây tê liệt ở động vật có vỏ
MU	Mouse unit	Đơn vị chuột
SD	Standard deviation	Độ lệch chuẩn
SPE	Solid phase extraction	Chiết pha rắn
SPR	Surface plasmon resonance	Cảm biến cộng hưởng plasmon bề mặt
STX	Saxitoxin	Saxitoxin
SRM	Selected reaction monitoring	Kỹ thuật khảo sát ion cô lập
TTX	Tetrodotoxin	Tetrodotoxin
TTXs	Tetrodotoxin analogues	Tetrodotoxin và các dẫn chất
TCBA	Tissue culture bioassay	Phương pháp thử nghiệm trên mô tế bào
RSD	Relative standard deviation	Độ lệch chuẩn tương đối

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ

Hình 1. 1. Cấu trúc hóa học TTX.....	12
Hình 1. 2. Một số dẫn xuất của TTX	14
Hình 1. 3. Tetrodotoxin ngăn kênh vận chuyển natri	15
Hình 1. 4. Mẫu ốc <i>Nassarius papillosus</i> và <i>Nassarius glans</i> gây ngộ độc tại Vạn Ninh, Khánh Hòa ngày 11/9/2020.....	16
Hình 1. 5. Phổ hồng ngoại của TTX	21
Hình 1. 6. Sắc ký đồ HPLC-FLD của TTXs chuẩn và	23
Hình 1. 7. Phổ khối phân giải LC-MS/MS của 3 loài (A) <i>Oliva annulata</i> , (B) <i>Oliva lignaria</i> , (C) <i>Oliva hirasei</i> và (D) TTX	24
Hình 1.8. Sắc ký đồ LC-MS, mẫu chuẩn TTXs (A) và các mẫu thử <i>F.niphobles</i> (B), <i>T.nigrovirids</i> (C), <i>T.biocellatus</i> (D)	25
Hình 2. 1. Thiết bị LC-MS/MS tại phòng thí nghiệm về An toàn thực phẩm và môi trường (Khu vực miền Trung)	30
Hình 2. 2. Mẫu ốc (a) <i>Nassarius glans</i> , (b) <i>Nassarius papillosus</i>	31
Hình 3. 1. Sắc ký đồ LC-MS/MS của TTXs chuẩn với các thể phân mảnh - 25V, -27V, -29V.....	36
Hình 3. 2. Sắc ký đồ LC-MS/MS của TTXs chuẩn với các thể phân mảnh - 38V, - 40V, -42V.....	37
Hình 3. 3. Đồ thị chương trình gradient 1	39
Hình 3. 4. Sắc ký đồ LC-MS/MS của TTXs chuẩn theo chương trình gradient 1	39
Hình 3. 5. Đồ thị chương trình gradient 2.....	40
Hình 3. 6. Sắc ký đồ LC-MS/MS của TTXs chuẩn theo chương trình gradient 2.....	40
Hình 3. 7. Sắc ký đồ LC-MS/MS của TTXs chuẩn với tốc độ dòng 0,4 ml/phút	41

Hình 3. 8. Sắc ký đồ LC-MS/MS của TTXs chuẩn với tốc độ dòng 0,6 ml/phút	42
Hình 3. 9. Sơ đồ xử lý mẫu dự kiến	44
Hình 3. 10. Đồ thị ảnh hưởng của nồng độ acid acetic đến hiệu suất thu hồi TTXs.....	47
Hình 3. 11. Đồ thị ảnh hưởng của thể tích rửa giải đến hiệu suất thu hồi TTXs	50
Hình 3. 12. Sơ đồ quy trình xử lý mẫu.....	51
Hình 3. 13. Đồ thị sự phụ thuộc diện tích peak vào nồng độ TTX.....	54
Hình 3. 14. Đồ thị sự phụ thuộc diện tích peak vào nồng độ 4-epiTTX	54
Hình 3. 15. Đồ thị sự phụ thuộc diện tích peak vào nồng độ 4,9-anhydroTTX .	55

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 2. 1. Số lượng và khối lượng trung bình của 2 loài ốc bùn thu ở vùng biển Khánh Hòa.....	31
Bảng 2. 2. Nồng độ dãy các dung dịch chuẩn.....	34
Bảng 3. 1. Thông số điều kiện tối ưu phân tích TTXs bằng LC-MS/MS.....	43
Bảng 3. 2. Kết quả ảnh hưởng của nồng độ acid acetic đến hiệu suất thu hồi TTX	45
Bảng 3. 3. Kết quả ảnh hưởng của nồng độ acid acetic đến hiệu suất thu hồi 4-epiTTX	46
Bảng 3. 4. Kết quả ảnh hưởng của nồng độ acid acetic đến hiệu suất thu hồi 4,9-anhydroTTX.....	46
Bảng 3. 5. Kết quả ảnh hưởng thể tích rửa giải đến hiệu suất thu hồi TTX...	48
Bảng 3. 6. Kết quả ảnh hưởng thể tích rửa giải đến hiệu suất thu hồi 4-epiTTX	49
Bảng 3. 7. Kết quả ảnh hưởng thể tích rửa giải đến hiệu suất thu hồi 4,9-anhydroTTX.....	49
Bảng 3. 8. Sự phụ thuộc diện tích peak vào nồng độ TTXs	53
Bảng 3. 9. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính và đường chuẩn của TTXs...	55
Bảng 3. 10. Độ lặp lại của phương pháp.....	57
Bảng 3. 11. Hiệu suất thu hồi của phương pháp	57
Bảng 3. 12. Kết quả phân tích 15 mẫu ốc loài <i>N. glans</i>	59
Bảng 3. 13. Kết quả phân tích 20 mẫu ốc loài <i>N. papillosus</i>	60

DANH MỤC CÁC PHỤ LỤC

- Phụ lục 1. Sắc ký đồ LC-MS/MS phân tích các mẫu ốc *N. glans* 69
- Phụ lục 2. Sắc ký đồ LC-MS/MS phân tích các mẫu ốc *N. papillosus* 70

MỞ ĐẦU

Lý do chọn đề tài

Độc tố sinh học biển ngày càng được quan tâm trên toàn thế giới, một trong số đó là Tetrodotoxins (TTXs). Tetrodotoxin là một chất độc thần kinh mạnh gây ra nhiều trường hợp ngộ độc dẫn đến tử vong ở người nhiều nơi trên thế giới. Việc phát hiện nhiều loài thủy hải sản chứa độc tố TTXs chẳng hạn như cá nóc, bạch tuộc đốm xanh, sò biển, một số loài cua biển, ốc biển... đã thu hút sự quan tâm của giới khoa học và các nhà quản lý về an toàn thực phẩm biển. Do đó, ngoài các nghiên cứu về phân bố, thành phần, hàm lượng, độc tính... của độc tố này ở sinh vật, các nhà nghiên cứu còn tập trung phát triển các phương pháp phân tích xác định độc tố này, đặc biệt là các phương pháp thử nghiệm sinh học và phân tích hóa học.

Ở Việt Nam, từ 2007 đến nay, mỗi năm đều ghi nhận các vụ ngộ độc TTXs trong ốc biển xảy ra chủ yếu ở các vùng ven biển Thanh Hóa, Ninh Thuận, Khánh Hòa... Mặc dù được rất nhiều sự quan tâm nghiên cứu về độc tố TTXs với các phương pháp, kỹ thuật phân tích khác nhau, nhưng đến nay ở Việt Nam chưa có nhiều công bố về phân tích độc tố này ở ốc biển bằng kỹ thuật sắc ký lỏng khối phổ kép LC-MS/MS. Đây là kỹ thuật hiện đại với độ nhạy, độ đặc hiệu và độ chính xác rất cao giúp phát hiện chính xác độc tố TTX và các đồng phân của nó, đáp ứng được tiêu chuẩn về số liệu độc tố TTXs trong sinh vật biển so với thế giới. Vì vậy, việc thực hiện đề tài **“Xây dựng quy trình phân tích độc tố tetrodotoxins trong ốc biển ở Việt Nam bằng LC-MS/MS”** là cần thiết, có ý nghĩa khoa học và thực tiễn.

Mục đích nghiên cứu

Đưa ra được quy trình xác định độc tố tetrodotoxins ở ốc biển có độ tin cậy và chính xác cao, phù hợp với điều kiện trang thiết bị tại Việt Nam.

Nội dung nghiên cứu

- Khảo sát nồng độ acid acetic dùng tách chiết độc tố TTXs từ 1-2 loài ốc biển tự nhiên;

- Khảo sát một số điều kiện tách chiết và tinh sạch độc tố TTXs từ ốc biển;
- Khảo sát một số điều kiện phân tích độc tố TTXs từ mẫu chiết bằng phương pháp sắc ký lỏng khối phổ kép (LC-MS/MS).
- Xây dựng quy trình thực nghiệm phân tích độc tố trong ốc biển TTXs bằng phương pháp LC-MS/MS.
- Đánh giá kết quả của quy trình thực nghiệm trên cơ sở so sánh, đối chiếu với số liệu kiểm chứng.

Cơ sở khoa học và tính thực tiễn của đề tài

Dựa trên những tiến bộ khoa học- kỹ thuật và công nghệ, trong luận án này tôi đề xuất nghiên cứu xây dựng quy trình thực nghiệm phân tích TTXs bằng LC-MS/MS, phù hợp với điều kiện trang thiết bị tại phòng thí nghiệm An toàn thực phẩm và môi trường (Khu vực miền Trung), Viện Hải dương học đảm bảo độ chính xác và tin cậy phương pháp phân tích. Đối tượng nghiên cứu là một số loài ốc biển thường gây ngộ độc tại vùng biển Nha Trang, Khánh Hòa. Kết quả của đề tài là dẫn liệu khoa học tin cậy phục vụ công tác quản lý an toàn thực phẩm biển và là tiền đề cần thiết để có số liệu phân tích chính xác phục vụ cho những công trình công bố quốc tế về độc tố TTXs trong sinh vật biển tại Việt Nam.

Những đóng góp của luận văn

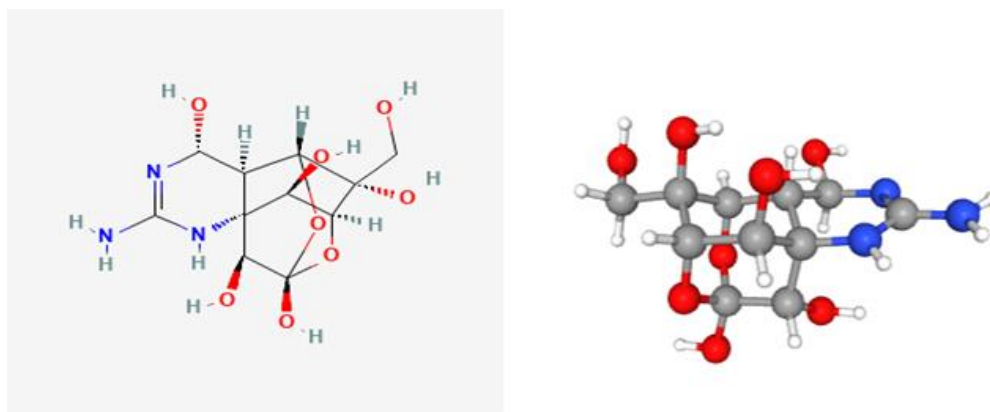
- Đề xuất được phương pháp tách chiết, tinh sạch độc tố TTXs trong mẫu ốc để phân tích bằng LC-MS/MS.
- Xây dựng được quy trình phân tích độc tố TTXs trong mẫu ốc biển bằng (LC-MS/MS) có độ chính xác cao.

Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. ĐỘC TỐ TETRODOTOXIN

1.1.1. Đặc tính, cấu trúc hóa học

Tetrodotoxin là một trong những chất độc phi protein mạnh nhất cũng như chất độc tự nhiên biển được biết đến nhiều nhất. Năm 1909, Tiến sĩ Yoshizumi Tahara đưa ra xác nhận rằng cá nóc chứa một loại chất độc và đặt tên là Tetrodotoxin theo tên của họ cá nóc mà nó được phân lập lần đầu tiên - Tetraodontidae [1]. Cấu trúc của chất độc này đã được xác định bởi Tsuda và cộng sự [2], Goto và cộng sự [3]. TTX là dẫn xuất aminoperhydroquinaoline, hợp chất dị vòng có công thức phân tử $C_{11}H_{17}O_8N_3$ và có cấu trúc hóa học được mô tả như hình 1.1.



Hình 1. 1. Cấu trúc hóa học TTX[3]

TTX là (4R,4aR,5R,6S,7S,8S,8aR,10S,12S)-2-azaniumylden-4,5,8,12-tetrahydroxy-6-(hydroxymethyl)-2,3,4,4a,5,6,7,8-octahydro-1H-8a,10-mathano-5,7-(epoxymethanoxy)quinazolin-10-olat.

Hoạt tính của TTX được quyết định bởi các nhóm chức quan trọng bao gồm:

(1) Nhóm guanidine có điện tích dương của 3 nguyên tử nitơ (Hình 1.1);

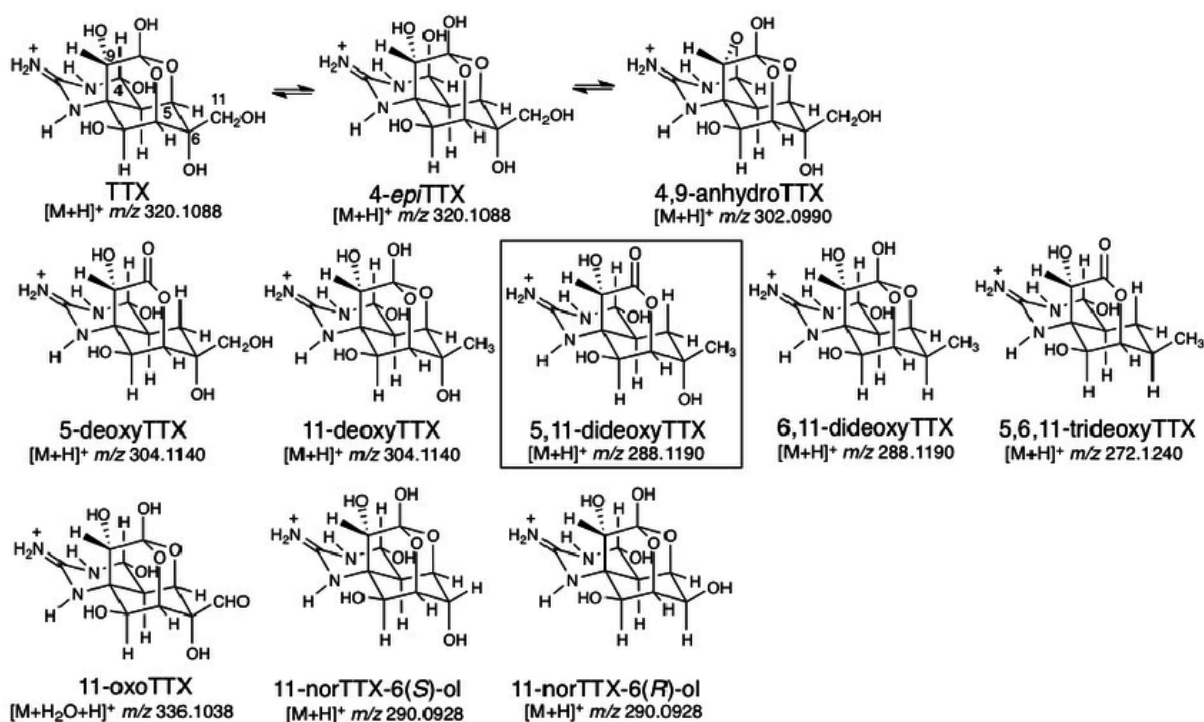
(2) Vòng pyrimidine (Hình 1.1), ba nhóm hydroxyl (có chức năng ổn định phức hợp liên kết giữa TTX và các kênh natri bề mặt pha lỏng)

Về đặc tính, TTX là một loại bột không màu. TTX trở nên sẫm màu ở khoảng 220°C nhưng không nóng chảy [4], có cấu trúc lưỡng cực [5] tan trong nước, bền nhiệt. Sự có mặt nhóm guanidine perhydroquinazoline (guanidin có tính bazơ mạnh) trong phân tử làm cho TTX dễ tan trong dung dịch axit. Ngoài ra do TTX cấu trúc ester nên dễ bị thủy phân trong dung dịch có tính axit mạnh hoặc kiềm mạnh. Môi trường để đảm bảo cấu trúc TTX ổn định trong dung dịch là trong axit hữu cơ yếu [6].

Phân tử TTX có 6 nhóm OH ở vị trí C₄, C₆, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁ ở mỗi vị trí gắn thêm nhóm guaidin có tính kiềm mạnh Cấu trúc TTX thay đổi liên quan đến một hay nhiều nhóm OH, chúng có ái lực với màng tế bào não, ở đó có chứa nhiều kênh vận chuyển ion Na⁺. Nghiên cứu cho thấy kênh vận chuyển ion Na⁺ bị đóng khi dùng TTX với nồng độ 1,8 nM [7].

1.1.2. Một số dẫn chất của Tetrodotoxin

Trong tự nhiên, TTX cùng tồn tại với các dẫn xuất của nó. Cho đến nay đã có 30 cấu trúc của TTX đã được báo cáo và độc tính thay đổi tùy theo cấu trúc [8]. Các dẫn xuất deoxy của TTX thì ít độc hơn TTX nhưng các dẫn xuất hydroxyl độc hơn TTX. Nhiều nghiên cứu đã phát hiện các dẫn chất của TTX như 4-epiTTX; 4,9-anhydroTTX; 5,6,11-trideoxyTTX [8] trong trứng loài cá nóc *Fugu poecilonotus* và *Fugu pardalis* [9]; 6-epiTTX trong cá nóc *Spheroids Spengler* [10] và các loài khác như loài sa giông *Cynops ensicauda* [11], ốc *Nassarius glans*, bạch tuộc đốm xanh *Hapalochlaena* [12]... Một số cấu trúc của các dẫn xuất TTXs được mô tả trong hình 1.2.



Hình 1. 2. Một số dẫn xuất của TTX [8]

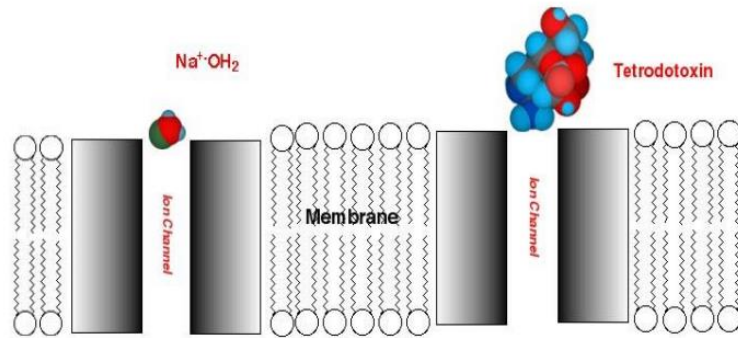
1.1.3. Độc tính Tetrodotoxin

Độc tính của TTX thường được biết đến độc hơn một nghìn lần so (1200 lần) với Cyanua và hiện chưa có thuốc giải độc đặc hiệu [9]. Trong các thử nghiệm sinh học trên chuột, liều gây chết trung bình LD_{50} được phát hiện là 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ khi ăn phải chất độc và từ 1 đến 2 mg TTX là đủ để gây chết cho một người trưởng thành [13], [14].

Theo nghiên cứu của Kao [15], liều gây chết tối thiểu của TTX trên một số loài động vật qua đường tiêm dưới da như [10]: ếch: 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$; gà mái: 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$; chuột nhắt: 8 $\mu\text{g}/\text{kg}$; bò cạp 2,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$; thỏ: 8 $\mu\text{g}/\text{kg}$; mèo: 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

1.1.4. Cơ chế hoạt động

Cơ chế gây độc của TTX trong cơ thể là ức chế kênh trao đổi ion natri vận động qua màng tế bào thần kinh với LD_{50} 9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (tiêm phúc mạc). TTX hoạt động bằng cách chặn các kênh natri, làm mất sự lan truyền tín hiệu thần kinh đến màng tế bào quan trọng của tế bào cơ tim, cơ xương, hệ thần kinh trung ương và ngoại biên [16] dẫn đến các triệu chứng điển hình và thậm chí nặng nhất là tử vong [17], [13].



Hình 1. 3. Tetrodotoxin ngăn kênh vận chuyển natri [13]

Cấp độ của triệu chứng ngộ độc TTXs được Tani và cộng sự đưa ra năm 2009 [18]. Cấp độ 1 bao gồm các dấu hiệu tê liệt bao gồm tê môi và đầu lưỡi và các vấn đề tiêu hóa như nôn mửa. Cấp độ 2 là tê liệt lan đến tứ chi, đau đầu. Cấp độ 3 làm tăng các triệu chứng thần kinh cơ (như chứng khó nuốt, chứng mất ngôn ngữ, hôn mê, mất phối hợp, mất điều hòa, cảm giác bông bênh, liệt dây thần kinh sọ, cơ co giật) và đi kèm các triệu chứng tim mạch (hạ huyết áp hoặc tăng huyết áp, rối loạn nhịp tim, nhịp tim nhanh và bất thường, tím tái, xanh xao, khó thở). Trong những trường hợp nghiêm trọng dẫn đến cấp độ 4, nạn nhân tê liệt hoàn toàn, suy tim và dẫn đến tử vong.

1.1.5. Tetrodotoxins trong ốc biển

Các vùng biển trên thế giới có rất nhiều thủy sản chứa độc tố TTXs sinh sống, đặc biệt ở các vùng biển nhiệt đới. Trong đó, độc tố TTXs trong một số loài ốc biển đã được ghi nhận bởi nhiều nhóm nghiên cứu như Noguchi và cộng sự [19], Hwang và cộng sự [20], Taniyama và cộng sự [18], Đặng Quốc Minh và cộng sự [21]. Độc tố TTX được tìm thấy trong nhiều loài ốc như ốc mặt trắng (*Turban*), ốc đụn (*The top of shells*), ốc hương Nhật Bản (*Babylonia japonica*), ốc bùn (*Niotha, Zeuxis*)... Từ năm 1985 đến 2004, tại Trung Quốc đã có ít nhất 28 vụ ngộ độc. Ngoài ra, một số trường hợp được ghi nhận do ngộ độc TTXs khi ăn ốc biển tại Đài Loan, Nhật Bản, Brunei [22], [23], [19], [20]. Độc tính TTXs tính theo đơn vị chuột (MU) trong loài *Nassarius glans* theo ghi nhận của Tani từ 725 đến 9860 MU/cá thể [15]. Tại Việt Nam, từ năm 2006 đến 2020, tình hình ngộ độc ốc biển do TTXs xảy ra rải rác ở các địa phương ven biển như Quảng Ngãi, Bình Thuận,

Khánh Hòa... gây ra một số trường hợp tử vong. Theo khảo sát, đa số các loài ốc này thuộc họ *Nasariidae* cụ thể là ốc bùn rặng cưa có tên khoa học *Nassarius papillosus* và ốc bùn bóng, có tên khoa học *Nassarius glans* [16], [21]. Theo nghiên cứu Đặng Quốc Minh và cộng sự, các loài *N. Pullus*, *N. conoidalis conoidalis* và *N. glans* được xác định chứa hàm lượng cao độc tố TTXs, trung bình từ 368-2625 MU/cá thể, độc tính vượt ngưỡng cho phép [16].



Hình 1. 4. Mẫu ốc *Nassarius papillosus* và *Nassarius glans*

gây ngộ độc tại Vạn Ninh, Khánh Hòa ngày 11/9/2020

1.2. MỘT SỐ PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH TETRODOTOXINS.

Quy trình xác định độc tố TTXs trong sinh vật biển nói chung cũng như trong ốc biển nói riêng đã được nghiên cứu rộng rãi bởi các nhà khoa học. Có một số phương pháp khác nhau đã được phát triển nhưng nhìn chung tập trung vào 2 nhóm phương pháp chính.

1.2.1. Phương pháp thử nghiệm sinh học

1.2.1.1. Phương pháp sinh hóa chuột

Xét nghiệm sinh hóa chuột MBA (Mouse bioassay) là phương pháp chính để phát hiện độc tố trong động vật có vỏ được áp dụng nhiều nước trên thế giới. Trong các xét nghiệm sinh học trên chuột, chất chiết từ mẫu được đưa vào cơ thể động vật thí nghiệm và sau đó thời gian chết được theo dõi.

Để biết nồng độ TTX trong mẫu nghiên cứu, thử nghiệm sinh học trên chuột được thực hiện bằng cách tiêm phúc mạc. Sau khi tiêm chất chiết TTX, chuột thử nghiệm bắt đầu xuất hiện các dấu hiệu và triệu chứng đặc trưng như cào xước vai, miệng bằng chân sau, yếu dần đến liệt ở chân sau, cử động không phối hợp, thở nông, co giật, nhảy, tiếp theo là suy hô hấp và cuối cùng bị chết. Độc tính của chất chiết chứa TTX được biểu thị bằng đơn vị chuột MU. Quy định đơn vị chuột (MU) là lượng độc tố TTX tối thiểu gây chết chuột có trọng lượng 18 - 20 g trong vòng 30 phút.

Hashimoto và Noguchi [9] đã xác định chính xác hàm lượng độc tố TTX ở của cá bống tượng sử dụng đường cong này quan hệ giữa liều lượng và thời gian chết của chuột. Một loạt các dung dịch thử nghiệm được chuẩn bị bằng cách pha loãng dịch chiết độc tố chưa biết với acid acetic 0,1%. Một lượng nhỏ các dung dịch này được tiêm vào màng bụng một nhóm chuột. Đường cong thời gian chết được vẽ dựa vào giá trị trung bình của thời gian chuột chết ở mỗi nồng độ pha loãng.

Để xác định độc tố trong động vật chân bụng biển (*Nassarius glans*) trong vụ ngộ độc ốc biển gây tử vong trên đảo TungSa ở Đài Loan vào tháng 4 năm 2004, Hwang và cộng sự [24] đã thu thập 20 mẫu ốc gây ngộ độc để làm mẫu phân tích. Các mô mềm tách ra được làm nhuyễn với acid axetic 1% trong methanol trong vòng 5 phút và ly tâm. Dịch chiết được làm khô ở 45°C sử dụng hệ thống cô quay chân không và được kiểm tra độc tính TTX trên dòng chuột nhắt trắng ICR khỏe mạnh, khối lượng từ 18-20 gam. Kết quả xác định được độc tính trung bình của từng mẫu ốc *N. glans* khác nhau trong nghiên cứu này là 5.1886 ± 1.959 MU.

MBA cho đến nay vẫn được sử dụng trong một số trường hợp. Tuy nhiên, do có một số hạn chế như lý do đạo đức, việc sử dụng MBA đối với một số nhóm độc tố biển chỉ là phương pháp tham khảo. Ngoài ra, MBA không thể cung cấp thông tin về thành phần độc tố cũng như phân biệt được TTXs với các chất độc thần kinh khác như chất độc gây tê liệt ở động vật có vỏ (PSP) ở một số loài động vật biển chứa đồng thời cả 2 loại này. Thêm vào đó, các nhược điểm khác của kỹ thuật này còn tồn tại, như thời gian thử nghiệm kéo dài, thiếu tính đặc hiệu và dẫn đến các kết quả dương tính giả

cao. Vì những lý do này, nhu cầu phát triển các phương pháp thay thế MBA đã được nghiên cứu rộng rãi.

1.2.1.2. Phương pháp thử nghiệm cảm ứng sinh học

Một trong những phương pháp giúp phát hiện độc tố nhanh chóng là cảm biến cộng hưởng plasmon bề mặt SPR (Surface Plasmon Resonance). SPR cho phép xác định các thông số động học của tương tác phân tử, nhưng nó cũng được sử dụng để định lượng chất phân tích trong các nền mẫu phức tạp.

Năm 2013, Campbell và cộng sự [27] đã phát triển phương pháp xét nghiệm SPR phát hiện TTX đơn giản và nhanh chóng ở động vật chân bụng ở Châu Âu. Mô mềm động vật chân bụng hoặc cá nóc được chiết bằng dung dịch đệm natri axetat, pH =5,0. Dịch chiết được pha loãng 1:20 trong dung dịch đệm pH =7,4. Dung dịch kháng thể được trộn với lượng bằng nhau của dung dịch hiệu chuẩn hoặc mẫu và được tiêm trên bề mặt chip với tốc độ dòng 12 μ l/phút trong 2 phút. Việc đọc các đơn vị đáp ứng của thiết bị được thực hiện 10 giây trước và 30 giây sau mỗi lần bơm để xác định sự khác biệt về đơn vị của đáp ứng thiết bị tương đối với từng chất hiệu chuẩn hoặc mẫu. Bề mặt chip được tái sinh bằng hỗn hợp với tỉ lệ 1:1 acid clohydric (10 nM) và dung dịch natri dodecyl sulfate 1% có pH 1,75. Một chu kỳ phân tích điển hình được hoàn thành trong khoảng 6 phút và mỗi chất chuẩn được phân tích lặp lại [9]. Quy trình chiết xuất đơn đã được áp dụng để thúc đẩy tính nhanh chóng của thử nghiệm. Việc chuẩn bị mẫu đơn giản này cho phép chiết xuất 40 mẫu mỗi giờ với tốc độ phát hiện nhanh 6 phút mỗi lần phân tích. Tuy nhiên SPR có độ nhạy kém hơn thử nghiệm sinh học truyền thống vì phương pháp này chịu ảnh hưởng lớn bởi các điều kiện bên ngoài. Tất cả các yếu tố làm thay đổi chỉ số khúc xạ trên bề mặt cảm biến làm cản trở quá trình phân tích như nền mẫu không đồng nhất, phức tạp và các liên kết không đặc hiệu [28].

1.2.1.3. Thử nghiệm trên mô tế bào

Phương pháp thử nghiệm trên mô tế bào TCBA (Tissue Culture Bioassay) này có thể thay thế cho MBA. TCBA phát hiện cả TTX và STX do

các độc tố này có cơ chế hoạt động tương tự. Kogure và cộng sự [29] nhận thấy rằng tế bào u nguyên bào thần kinh của chuột Neuro-2a có thể được ứng dụng trong việc xác định TTX. Ouabain hoặc veratridine được thêm vào các tế bào nuôi cấy, làm giảm khả năng tồn tại của chúng bằng cách tăng dòng ion natri vào tế bào và TTX, hoạt động như một chất chặn kênh natri, sẽ vô hiệu hóa phản ứng giúp tế bào tiếp tục phát triển. Tế bào được nuôi bổ sung 13,3 % huyết thanh bò trong môi trường ẩm có chứa 5% CO₂- 95% không khí ở 37°C. Tế bào được nuôi cấy bằng dung dịch 0,5% trypsin – 0,2% EDTA. Ít nhất 200 tế bào trong mỗi giếng được chọn ngẫu nhiên và theo dõi. Hàm lượng TTX được ước tính từ mối quan hệ giữa nồng độ TTX và tỷ lệ phần trăm tế bào sống.

Trên cơ sở của phương pháp, Hamasaki và cộng sự [30] đã cải tiến bằng cách sử dụng muối tetrazolium, 3-(4,5-dimetyl-2-thiazolyl) -2,5 diphenyl-2H tetrazolium bromide và đo tự động đĩa microplate để giảm thời gian. Các muối tetrazolium bị phân cắt bởi enzyme dehydrogenase trong ti thể, tạo ra tinh thể formazan màu xanh lam đậm. Do đó, xét nghiệm dễ thực hiện hơn và kết quả có thể lặp lại, đơn giản, rẻ tiền và có thể thay thế cho phương pháp thử nghiệm sinh hóa chuột. Tuy nhiên, phương pháp này vẫn có khả năng bị ảnh hưởng bởi tay nghề của kỹ thuật viên vì cần phải có các bước rửa để loại bỏ thuốc nhuộm hoặc tế bào chết tự do. Ngoài ra, nó cũng chưa phân biệt các chất độc và các hóa chất khác có khả năng ức chế dòng natri.

1.2.1.4. Phương pháp thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzyme

Phương pháp xét nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzyme (ELISA) sử dụng hiệu quả trong việc phát hiện và định lượng peptides, protein, antibodies, hormone,... trong các mẫu sinh học.

Trong nghiên cứu ngộ độc TTX khi ăn cá nóc ở Bangladesh, Islam và cộng sự [31] sử dụng một kháng thể kháng nguyên lại TTX để xác định nồng độ TTX trong nước tiểu và máu từ 38 bệnh nhân [32]. Kết quả TTX ở dưới mức phát hiện (< 1,6 ng/ml) trong 11 mẫu máu nhưng phát hiện độc tố trong nước tiểu. Ngy và cộng sự [33], Reverté và cộng sự [34] cũng đã phát triển phương pháp này để phát hiện độc tố tetrodotxin trong hào và trai. Phương pháp này có lợi thế sàng lọc TTX trong các mẫu động vật hai mảnh vỏ có thể

đơn giản hóa, thời gian phân tích nhanh nhưng ELISA tốn nhiều công sức và tốn kém để chuẩn bị kháng thể, phương pháp thiếu tính ổn định, sự ức chế không đủ kháng nguyên miễn dịch có thể dẫn đến kết quả sai, một số trường hợp cho kết quả dương tính giả hoặc âm tính giả và đặc biệt là chi phí phân tích rất cao nên ứng dụng chưa được phổ biến.

1.2.2. Phương pháp hóa học

Bên cạnh các phương pháp sinh học cùng với sự phát triển của hóa phân tích hiện đại nhằm phát hiện lượng vết độc tố và các dẫn xuất của nó chính xác hơn, các nhà khoa học nghiên cứu phân tích độc tố TTXs bằng các phương pháp hóa học như sắc ký bản mỏng, quang phổ, sắc ký khí kết hợp với khối phổ GC-MS, kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC, kỹ thuật sắc ký lỏng khối phổ LC-MS hoặc LC-MS/MS đã được phát triển. Quy trình này thường gồm các bước cơ bản như chiết tách, tinh sạch, phân tích và xử lý số liệu.

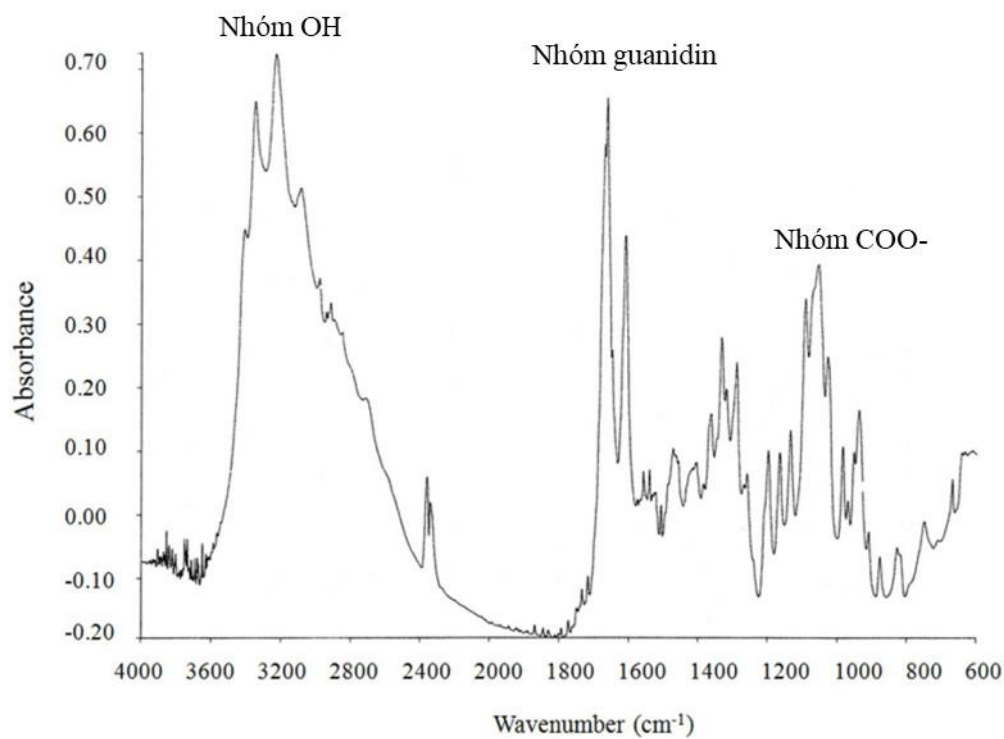
1.2.2.1. Phương pháp sắc ký lớp mỏng

Theo một số nhóm nghiên cứu [35] [36], phương pháp sắc ký lớp mỏng TLC (Thin layer chromatography) được sử dụng để xác định hợp chất TTX bằng cách sử dụng bản mỏng silica gel. Tấm này được theo dõi với 2 loại dung môi: dung môi 1 (pyridin – ethyl acetat – acid acetic – nước) với tỷ lệ 15:5:3:4 và dung môi 2 (butanol – acid acetic – nước) với tỷ lệ 2:1:1. Lượng dung môi tăng lên nhờ tác động của mao dẫn và thu được sự phân tách sắc ký. Độc tố sẽ hiển thị huỳnh quang tại bước sóng 365 nm. Thuốc thử màu được sử dụng là dung dịch KOH 10% hoặc thuốc thử Weber.

1.2.2.2. Phương pháp quang phổ hồng ngoại

Một phương pháp hiệu quả để xác định các nhóm chức các chất là sử dụng quang phổ hồng ngoại IR (Infrared Spectroscopy). Mặc dù phổ IR được cho là phức tạp nhưng nó vẫn góp phần định danh TTX. Năm 1984, Onoue đã sử dụng phổ IR sử dụng để định tính độc tố TTX trong cá nóc [37]. Manabu Asakawa và cộng sự [37] cũng đã đưa ra nghiên cứu phổ muối TTX-HCl được phân lập từ loài *Capthalothrix sp.* ở vịnh Hiroshima. Các dải hấp thụ ở 3353, 3235, 1666, 1612 và 1076 cm^{-1} được quan sát thấy trong quang phổ của

ting thể này cho thấy sự hấp thụ đặc trưng các nhóm chức OH, guanidin và COO⁻ của TTX (Xem hình 1.6).



Hình 1. 5. Phổ hồng ngoại của TTX [37]

1.2.2.3. Phương pháp sắc ký khí khối phổ

Sắc ký khí GC (Gas chromatography) và khối phổ MS (Mass spectrum) tạo thành một sự kết hợp hiệu quả để phân tích hóa học. Phương pháp GC-MS là phương pháp gián tiếp để phát hiện TTX và các dẫn chất của nó [38], [39].

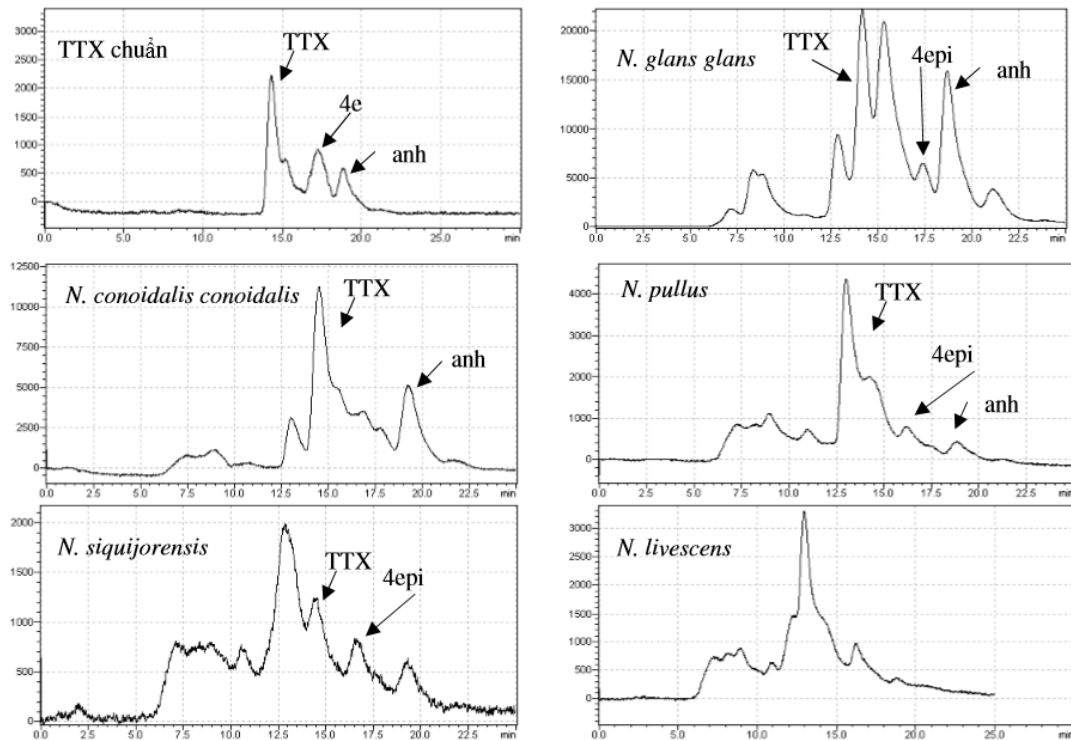
Từ năm 1984, Noguchi và cộng sự [19] đã tách chiết độc tố TTX trong nhuyễn thể động vật chân bụng (ếch) ở Nhật Bản bằng các dung dịch acid acetic và methanol, phân tích bằng phương pháp GC-MS cho thấy rằng nó chứa khung quinazoline đặc trưng cho TTX. Việc sàng lọc độc tố tetrodotoxin ở cá nóc, phân tích độ nhạy của TTX trong huyết tương người sử dụng phương pháp GC-MS đã được báo cáo [40], [41]. Trong các báo cáo sử dụng mô cá nóc nặng 0,5 g được xử lý bằng 5 ml acid acetic 0,1%, sau đó thủy phân bằng kiềm. Kết hợp kỹ thuật chiết chất lỏng-lỏng và tạo dẫn xuất N-methyl -N-TMS-trifluoroacetamide. Phương pháp đã chỉ sử dụng một lượng mẫu nhỏ và dung môi, quy trình chiết lỏng lỏng được đơn giản hóa cũng như phân tích sắc ký ngắn (8,2 phút).

1.2.2.4. Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao

Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC (High performance liquid chromatography) dựa trên sự phân tách giữa pha động và pha tĩnh nên có thể ứng dụng để phân tích TTXs. Nhiều nghiên cứu đã sử dụng phương pháp thay đổi các detector cho thấy kết quả độ nhạy, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng khác nhau.

Năm 1998, Chen và cộng sự sử dụng HPLC với đầu dò huỳnh quang để định lượng TTX trong cá nóc *N. Lineatai* cho kết quả khoảng tuyến tính rất tốt từ 10-2000 ng và giới hạn phát hiện là 10 ng. Một quy trình được Margaget và cộng sự [44] đưa ra và phát triển bằng cách sử dụng phương pháp chiết pha rắn để làm sạch mẫu huyết thanh và nước tiểu của bệnh nhân bị nhiễm độc TTX sau đó phân tích các mẫu bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao với đầu dò huỳnh quang. Nồng độ TTX tối thiểu có thể định lượng được lần lượt là 5 và 20 ng/ml đối với huyết thanh và nước tiểu. Đường chuẩn là tuyến tính trong khoảng 20–300 ng/ml đối với nước tiểu và 5–20 ng/ml đối với huyết thanh. Nhằm mục đích định lượng TTX trong mẫu huyết tương và nước tiểu người, Yu và cộng sự [43] cũng thu được giới hạn phát hiện là 10 ng/ml khi sử dụng sắc ký lỏng hiệu năng cao gép đầu dò diode.

Ở Việt Nam, phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao được nhóm các nhà khoa học ứng dụng phương pháp phân tích độc tố TTX trong ốc hương được nuôi bằng thức ăn chế biến từ cá nóc trong sản phẩm nước mắm chế biến từ các nóc độc chám cam [47] hoặc trong một số loài ốc bùn tự nhiên gây ngộ độc [21] (Xem hình 1.7).



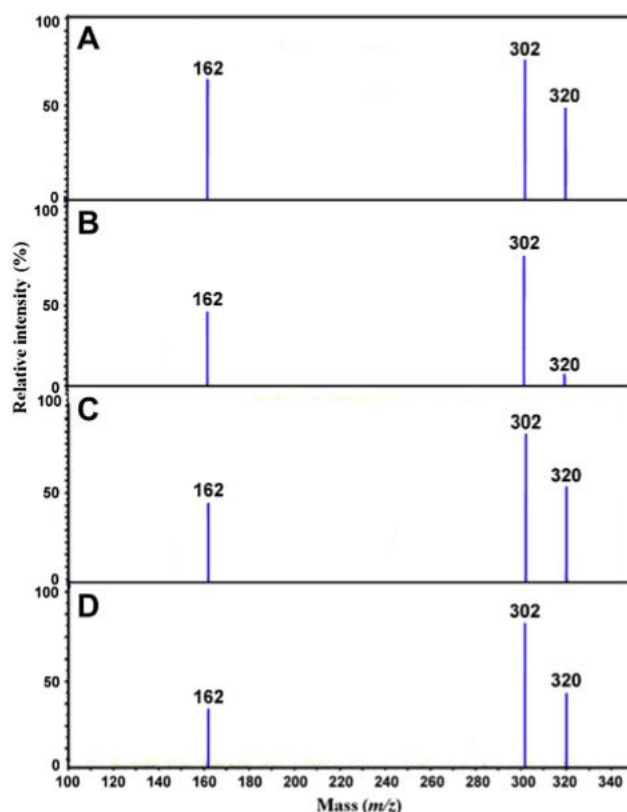
Hình 1. 6. Sắc ký đồ HPLC-FLD của TTXs chuẩn và một số mẫu ốc thu ở vùng biển Khánh Hòa, tháng 6/2015 [21]

Khi nghiên cứu các phương pháp phân tích hóa học hiện đại đối với TTXs, các nhà nghiên cứu nhận thấy cường độ huỳnh quang của 6-epiTTX và 11-norTTX-6(R)-ol cao gấp 20 lần và 10 lần so với TTX, trong khi 5-deoxyTTX và 11-deoxyTTX có cường độ huỳnh quang chỉ bằng 1/20 và 1/100 của TTX [47]. Như vậy, khi sử dụng hệ thống thiết bị HPLC-FLD có thể làm ảnh hưởng đáng kể đến giới hạn phát hiện TTXs và độ nhạy của phương pháp. Phương pháp sắc ký lỏng ghép đầu dò khối phổ có thể khắc phục hạn chế này bởi nó làm tăng khả năng phát hiện TTXs một cách chính xác và hiệu quả hơn. Phương pháp sắc ký lỏng khối phổ LC-MS (Liquid chromatography Mass spectrum) là phương pháp có tính ứng dụng cao và đang dần trở nên phổ biến trong phân tích các độc tố trên nền mẫu sinh học.

Nhóm nghiên cứu Tsai và cộng sự [48] sử dụng phương pháp LC-MS để định lượng TTXs trong máu và nước tiểu của các nạn nhân bị ngộ độc khi sử dụng cá nóc. Thành phần pha động được sử dụng là hỗn hợp 1% acetonitril, 10 mM trimethylamin, 10 mM amonifomat, tốc độ dòng tối ưu

được khảo sát là 0,4 ml/phút và cột Zorax 300SB-C3. Phương pháp LC-MS được xác nhận có hiệu quả hơn phương pháp GC-MS hay HPLC. Độ phục hồi độc tố trong nền mẫu 88,6% và giới hạn phát hiện là 15,6 nM.

Năm 2007, nhóm nghiên cứu của Jen cùng các cộng sự đã phân tích độc tố sinh vật biển từ năm loài động vật chân bụng *Naitca vitellus*, *Natica tumidus*, *Oliva hirasei*, *Oliva lignaria* và *Oliva annulata* được thu thập từ vùng biển Nha Trang, Khánh Hòa. Kết quả đã đưa ra quy trình phân tích độc tố STX và TTX bằng phương pháp phân tích HPLC, kết hợp với phương pháp LC-MS/MS [49]. Kết quả phân tích bằng LC-MS/MS các nhà nghiên cứu đã tìm thấy mảnh phổ $m/z = 320$ có thể gán cho $[TTX + H]^+$ và các mảnh ion thứ cấp tương ứng $m/z = 302$ và 162 đặc trưng cho TTX.



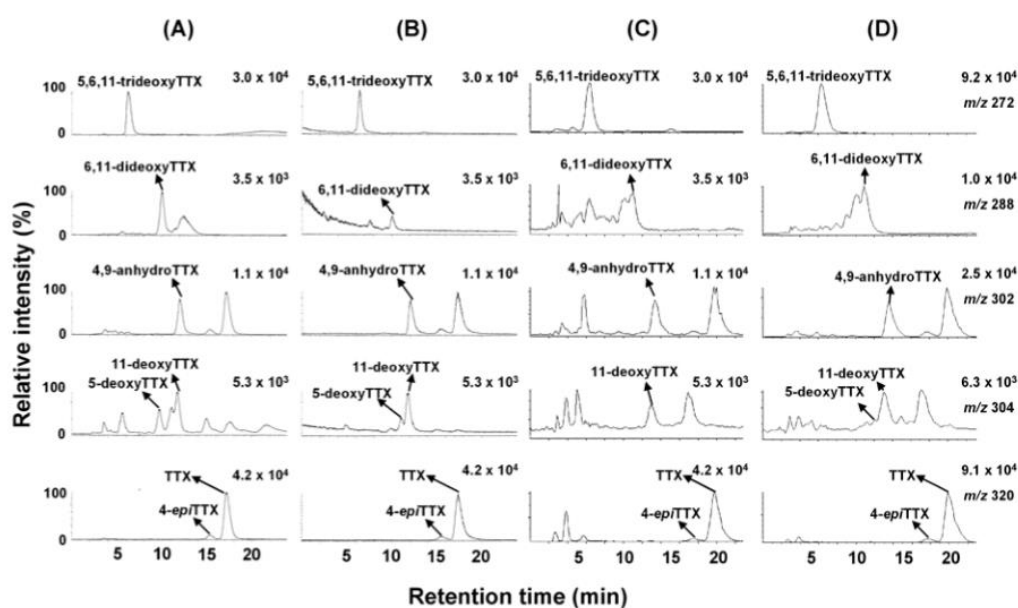
Hình 1. 7. Phổ khối phân giải LC-MS/MS của 3 loài

(A) *Oliva annulata*, (B) *Oliva lignaria*, (C) *Oliva hirasei* và (D) TTX [49]

Năm 2008, Jen và cộng sự [50] sử dụng kết hợp hai phương pháp phân tích HPLC và LC-MS/MS với cột Cosmosil HILIC 150 x 4,6 mm. Độc tố TTX hàm lượng lớn được xác định bằng phương pháp truyền thống HPLC-

FLD. Tuy nhiên, chất độc trong mẫu máu chỉ ở dạng vết và phương pháp LC–MS/MS mới xác nhận sự hiện diện của TTX. Nghiên cứu này cho thấy rằng LC–MS/MS kết hợp với chiết pha rắn có khả năng phát hiện thấp hơn và đáng tin cậy hơn khi xác định TTX trong các mẫu máu so với LC–MS đã báo cáo trước. Kết quả cho thấy độ tuyến tính trong huyết thanh được quan sát thấy trong khoảng nồng độ từ 1-100 ng/ml, độ phục hồi TTXs trong mẫu đến 90% và giới hạn phát hiện là 0,1 ng/ml. Khi so sánh với kết quả phân tích bằng HPLC có đường chuẩn tuyến tính 1-500 $\mu\text{g/ml}$ và giới hạn phát hiện 1 $\mu\text{g/ml}$ khẳng định phương pháp LC-MS/MS là phương pháp định lượng TTXs có giới hạn phát hiện thấp hơn và đáng tin cậy.

Jang và cộng sự [51] sử dụng hệ thống LC-MS để phân tích định tính và định lượng TTXs từ loài cá nóc *F. Niphobles*, *T. nigroviridis* và *T. Biocellatus* (Xem hình 1.9).



Hình 1. 8. Sắc ký đồ LC-MS, mẫu chuẩn TTXs (A) và các mẫu thử *F.niphobles* (B), *T.nigroviridis* (C), *T.biocellatus* (D) [51]

Kết hợp với phân tích LC-MS/MS thu được các mảnh ion m/z 320–162 ứng với TTX và 4-epiTTX, m/z 302–162 ứng với 4,9-anhydroTTX, m/z 304–162 ứng với 5-deoxyTTX và 11-deoxyTTX, m/z 288–224 ứng với 6,11-

dideoxyTTX, và m/z 272–162 ứng với 5,6,11-trideoxyTTX. Phương pháp đạt giới hạn phát hiện TTXs là 0,5 nmol/g.

Trong nghiên cứu của Kudo và cộng sự [12] một chất mới tương tự TTX là 6-deoxyTTX được phân lập từ buồng trứng của cá nóc bằng hệ thống LC-MS với cột TSK gel Amide-80 (2,0 x 150 mm; 5 μ m). Thành phần pha động được tối ưu là acetonitrile - đệm ammoni format 16mM (tỷ lệ 7:3), tốc độ dòng 0,2 ml/phút. Nghiên cứu thực hiện khảo sát lượng TTXs trong cá nóc *T. pardalis* và ốc *N. glans*, bạch tuộc đốm xanh *Hapalochlaena sp.* và bạch tuộc *H. maculosa*. Hợp chất 6-deoxyTTX cũng được xác định ở các động vật biển khác, ốc *N. glans* và bạch tuộc đốm xanh bằng cách sử dụng LC-MS.

Nhiều nghiên cứu đã chứng minh LC-MS và LC/MS-MS đã nâng cao độ chọn lọc và độ nhạy khi phân tích độc tố TTXs trên toàn thế giới. Sự cải tiến thiết bị phân tích làm tăng hiệu quả trong định danh và xác định đặc tính các đồng phân độc tố TTXs. Tuy nhiên, sắc ký lỏng ghép đầu dò khối phổ đơn vẫn bị hạn chế khi cần kết quả định lượng hàm lượng vết một số dẫn xuất của TTX. Các nghiên cứu trên cho thấy phương pháp LC-MS/MS đáng tin cậy, LC-MS có thể áp dụng để phân tích hàm lượng vết, độ chọn lọc cao rất hữu ích để xác định TTX và các dẫn chất của TTX trong các chất nền phức tạp.

1.3. PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG KHỐI PHỔ

1.3.1. Sơ lược về sắc ký lỏng khối phổ

Sắc ký lỏng khối phổ (LC-MS) là phương pháp phân tích hóa học hiện đại với sự kết hợp giữa thiết bị sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) và detector khối phổ (MS). Hỗn hợp các chất cần phân tích trong pha động sau khi được tách qua cột sắc ký sẽ được phát hiện và định lượng bằng detector khối phổ.

Trong phân tích, người ta thường sử dụng phương pháp LC-MS cho:

- Các hợp chất có độ phân cực trung bình và cao, khó bay hơi
- Phân tích thuốc trong dịch sinh học.
- Phân tích các hợp chất tự nhiên.

- Trường hợp không sử dụng được các detector khác: Không phát hiện được bằng detector khác hoặc trong phân tích khẳng định

- Nét nổi bật của phân tích khối phổ là tính chọn lọc và độ nhạy, độ đặc hiệu cao. Giới hạn phát hiện có thể đến 10-14 gam. Do vậy thường dùng kỹ thuật này để phân tích hàm lượng siêu vết trong mẫu thành phần phức tạp.

1.3.2. Thiết bị sắc ký lỏng khối phổ

1.3.2.1. Pha động

Một trong các yếu tố ảnh hưởng đáng kể đến sự phân tách của quá trình sắc ký là thành phần pha động. Thông thường, pha động là hai dung môi (hữu cơ hoặc dung dịch nước) hoà tan vào nhau với tỷ lệ thích hợp để có khả năng phân tách với độ phân giải cao.

Có hai chế độ pha động để sắc ký:

- ❖ **Đẳng dòng:** Thành phần pha động cố định một tỷ lệ trong suốt quá trình sắc ký.
- ❖ **Gradient:** Pha động là hỗn hợp của nhiều hệ dung môi, thường sử dụng là 2 kênh được đựng trong các bình khác nhau. Trong suốt thời gian thực hiện chương trình gradient tỷ lệ các kênh sẽ thay đổi để đảm bảo quá trình sắc ký hiệu quả nhất.

1.3.2.2. Hệ thống bơm

Bơm HPLC có chức năng tạo áp suất để đẩy pha động từ bình dung môi qua cột sắc ký.

1.3.2.3. Cột tách và pha tĩnh

Cột HPLC thường được chế tạo bằng thép không gỉ, thủy tinh hoặc chất dẻo có chiều dài 10-30 cm, đường kính trong 4-10 mm. Kích thước của hạt nhồi trong cột thường là 5-10 μm . Các chất nhồi thường được sử dụng là Silica gel, nhôm oxyd, polyme xốp hoặc các loại pha đảo C2, C8, C18... Cột tách sắc ký lỏng yêu cầu phải trơ, có thành phẳng, đồng nhất trên bề mặt và có thể chịu được áp suất cao.

1.3.2.4. Hệ tiêm mẫu

Mẫu lỏng hoặc dung dịch được một van tiêm tự động tiêm thẳng vào pha động cao áp ngay ở đầu cột. Thiết bị chứa mẫu thường có dung tích 0,50 - 20 μL

1.3.2.5. Detector khối phổ

Phương pháp phổ khối lượng là một kỹ thuật đo trực tiếp tỷ số khối lượng và điện tích của ion (có đơn vị bằng Dalton) được tạo thành khi ion hóa phân tử hoặc nguyên tử của mẫu. Các ion được tạo thành trong buồng ion hóa, được gia tốc và tách riêng nhờ bộ phận phân tích khối trước khi đến bộ phận phát hiện (detector). Khối phổ sẽ cho tín hiệu tương ứng với các ion được biểu thị bằng cường độ peak khác nhau. Khối phổ này cho thông tin định tính góp phần nhận dạng và xác định hàm lượng các chất.

1.3.3. Một số chế độ trong sắc ký lỏng khối phổ

1.3.3.1. Chế độ quét

Với một hỗn hợp nhiều chất, sau khi được tách ra qua cột sắc ký lỏng và đưa vào detector khối phổ, khối phổ sẽ ghi nhận tổng cường độ các ion sinh ra từ mỗi chất. Ta có một sắc đồ toàn ion và phổ khối được lấy toàn bộ các ion (Full scan). Full scan cho đầy đủ thông tin về chất phân tích hơn, tuy nhiên phương pháp này có độ nhạy không cao, nhiễu đường nền có thể lớn. Do đó chế độ quét này có hiệu quả đối với các phân tích khi chất phân tích có nồng độ đủ lớn và thường được lựa chọn để khảo sát ion mẹ.

1.3.3.2. Chế độ khảo sát ion chọn lọc

Trong kỹ thuật phân tích chọn lọc ion (SIM), đầu dò MS chỉ ghi nhận tín hiệu một số mảnh ion đặc trưng cho chất cần xác định. Chế độ SIM có thể được dùng để định lượng chất phân tích. Để đạt độ nhạy và độ chính xác cao có thể chọn được nhiều ion một lần. Do đó, khi đã biết ion mẹ chế độ SIM thường được sử dụng để khảo sát năng lượng phân mảnh tối ưu cho quá trình phân tích.

1.3.3.3. Chế độ khảo sát ion cô lập và khảo sát đa ion cô lập

Kỹ thuật ghi phổ có độ nhạy cao thường được sử dụng là khảo sát ion cô lập (SRM) và khảo sát đa ion cô lập (MRM). SRM là cô lập ion cần chọn để phân mảnh. Trong các mảnh ion sinh ra cô lập 1 mảnh ion con cần quan tâm và đưa vào đầu dò để phát hiện. Tuy nhiên trong thực tế phân tích vi lượng, các ion con cần khảo sát thường từ 2 trở lên, do vậy kỹ thuật ghi phổ MRM hiệu dụng hơn SRM. Đầu tiên, cô lập ion cần chọn (ion mẹ ở tứ cực thứ nhất, phân mảnh ion cô lập đó tại tứ cực thứ 2 thu được các ion con, cô lập 2 hoặc nhiều ion con cần quan tâm ở tứ cực thứ 3 và đưa vào đầu dò để phát hiện.

Đối với kỹ thuật MS/MS, một ion chọn lọc ở chế độ MS lần thứ nhất và sau đó được khảo sát tiếp bằng cách sử dụng năng lượng phân mảnh tạo ra một hoặc vài ion con đặc trưng ở chế độ MS lần thứ hai. Kỹ thuật MS/MS được làm giảm đáng kể nhiễu của đường nền góp phần để tăng độ chọn lọc và tăng độ nhạy của phương pháp.

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

2.1.1. Đối tượng nghiên cứu

TTXs trong 2 loài ốc biển có tiền sử gây ngộ độc thực phẩm tại Việt Nam được thu ở vùng biển ven bờ Khánh Hòa và lân cận, Việt Nam, được định danh làm tiêu bản và lấy phần mô mềm làm mẫu nghiên cứu. Mẫu được bảo quản dưới -10°C , tại phòng thí nghiệm An toàn thực phẩm và môi trường (Khu vực miền Trung), Viện Hải dương học Nha Trang, Khánh Hòa.

2.1.2. Nguyên liệu, thiết bị

2.1.2.1. Dung môi, hóa chất

- Chuẩn TTX (Wako, Nhật Bản), chuẩn 4-epiTTX (Nhật Bản), chuẩn 4,9-anhydroTTX (Nhật Bản).
- Acetonitrile (Merck, Đức), Methanol (Wako, Nhật Bản), Acid formic (Wako, Nhật Bản), Ammonium hydroxide (Wako, Nhật Bản), nước cất siêu sạch Mili-Q Water (Merck, Đức) dùng cho LC-MS/MS.
- Acid acetic (Wako, Nhật Bản).

2.1.2.2. Thiết bị, dụng cụ phân tích

- Cân phân tích, máy ly tâm, buret, pipet thủy tinh.
- Cột chiết pha rắn SPE (Envi-carb 250 mg/3ml)
- Cột Waters Xbrige (HILIC column) Amide 4.6 mm I.D.×150mm
- Nghiên cứu này sử dụng thiết bị LC-MS/MS 8040 Shimadu, Nhật Bản.

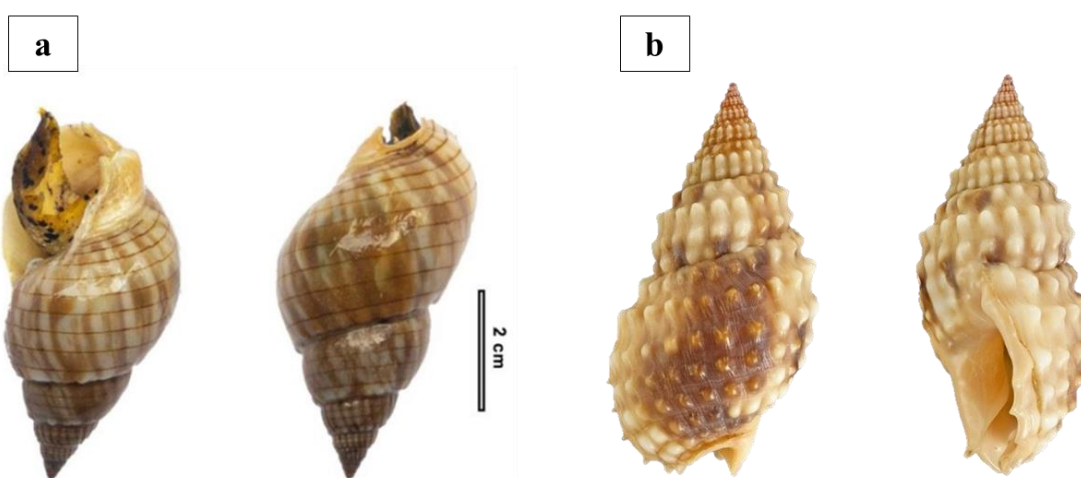


Hình 2. 1. Thiết bị LC-MS/MS tại phòng thí nghiệm về An toàn thực phẩm và môi trường (Khu vực miền Trung).

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Thu mẫu và bảo quản mẫu

2 loài ốc bùn, bao gồm: *Nassarius glans* (Hình 2.2a), *Nassarius papillosus* (Hình 2.2b) được thu ngoài tự nhiên tại vùng biển Khánh Hòa vào tháng 6/2023 (Bảng 2.1). Mẫu sau khi thu được rửa sạch và bảo quản bằng đá lạnh, sau đó vận chuyển ngay về phòng thí nghiệm về An toàn thực phẩm và môi trường (Khu vực miền Trung). Mẫu được bảo quản dưới -10°C đến khi thực hiện phân tích độc tố.



Hình 2. 2. Mẫu ốc (a) *Nassarius glans*, (b) *Nassarius papillosus*

Bảng 2. 1. Số lượng và khối lượng trung bình của
2 loài ốc bùn thu ở vùng biển Khánh Hòa.

Loài	Số lượng cá thể	Khối lượng cả vỏ (g)	Khối lượng thịt ốc (g)
<i>Nassarius glans</i>	25	7,05±1,53	2,98±0,66
<i>Nassarius papillosus</i>	20	6,77±2,12	2,73±0,76

2.2.2. Xây dựng quy trình phân tích

2.2.2.1. Khảo sát điều kiện khối phổ xác định TTX

Do TTXs có độ phân cực và qua tham khảo một số tài liệu [51], [53], [54] chúng tôi tiến hành xác định TTXs bằng kỹ thuật ion hóa phun điện tử

ESI với chế độ bắn phá ion dương và chế độ ghi phổ MRM. Khảo sát thể phân mảnh tối ưu để lượng ion con tạo thành nhiều, ổn định nhất trong điều kiện hóa chất và trang thiết bị thực tế tại phòng thí nghiệm.

2.2.2.2. Khảo sát điều kiện sắc ký lỏng hiệu năng cao

Tiến hành trên mẫu chuẩn TTXs (gồm TTX: 2,551 $\mu\text{g/ml}$; 4-epiTTX: 2,148 $\mu\text{g/ml}$; 4,9-anhydroTTX: 1,755 $\mu\text{g/ml}$)

Chúng tôi tiến hành khảo sát điều kiện sắc ký lỏng hiệu năng cao với các nội dung:

- Khảo sát chương trình gradient hệ pha động: trong phân tích sắc ký tỷ lệ pha động ảnh hưởng rất nhiều đến khả năng phân tách của TTXs ra khỏi hỗn hợp và pha tĩnh. Chương trình được chọn phải đảm bảo peak cần phân tích trong sắc ký đồ phân tách rõ ràng, không bị chập và thời gian lưu hợp lý.

- Khảo sát tốc độ dòng: điều chỉnh tốc độ dòng để thời gian lưu phù hợp, đảm bảo áp suất cột.

Từ kết quả khảo sát lựa chọn điều kiện sắc ký thích hợp để có thể tiến hành định lượng TTXs trong mẫu óc trên hệ thống LC-MS/MS.

2.2.2.3. Khảo sát quy trình xử lý mẫu

Việc xây dựng quy trình tách chiết độc tố TTXs từ mẫu óc là cần thiết để đảm bảo độ chính xác của kết quả phân tích LC/MS-MS.

Khảo sát nồng độ dung môi tách chiết: Do trong phân tử TTXs có nhóm guanidin perhydroquinaolin có tính kiềm mạnh nên TTXs tan trong dung dịch axit. Tuy nhiên TTXs cũng có cấu trúc ester nội phân tử nên dễ bị thủy phân bởi các axit mạnh, do đó cách duy nhất để giữ TTXs bền vững trong dung dịch là hòa tan trong axit hữu cơ yếu. Acid acetic được lựa chọn sử dụng trong nhiều nghiên cứu [6], [44], [53], [54] [53] để chiết độc tố TTXs từ sinh vật biển khi phân tích bằng kỹ thuật sắc ký lỏng với đầu dò MS/MS. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành khảo sát nồng độ acid acetic phù hợp. Đánh giá qua hiệu suất thu hồi sau tách chiết bằng phương pháp thêm chuẩn vào mẫu trắng và tính hiệu suất thu hồi theo công thức sau:

$$R = \frac{C_{tt}}{C_{lt}} \cdot 100 \quad (1)$$

Trong đó:

R: hiệu suất thu hồi (%).

C_{tt} : Nồng độ thực tế của TTXs thu được ($\mu\text{g/ml}$).

C_{lt} : Nồng độ lý thuyết của TTXs ($\mu\text{g/ml}$).

- Khảo sát thể tích rửa giải: kỹ thuật phổ biến nhất để làm sạch các mẫu chứa TTXs là chiết pha rắn [54], [55]. Trong đó rửa giải là bước cuối cùng để thu hồi chất phân tích. TTXs tan trong nước và độ phân cực cao nên dung môi rửa giải thường được lựa chọn là methanol, acid acetic, acid formic, acetonitrile... Theo nhiều nghiên cứu, dung môi rửa giải có độ hồi phục cao acetonitrile/nước/acid acetic (20:80:1) [54]. Tuy nhiên, thể tích dung môi rửa giải ảnh hưởng đến nồng độ dư TTXs được chiết tách từ mẫu thử. Vì vậy, chúng tôi tiến hành khảo sát thể tích rửa giải thích hợp. Đánh giá qua hiệu suất thu hồi sau rửa giải bằng phương pháp thêm chuẩn vào mẫu trắng và tính hiệu suất thu hồi theo công thức (1).

2.2.2.4. Xây dựng quy trình định lượng TTXs trong mẫu ốc bằng phương pháp sắc ký lỏng khối phổ song song

Từ những kết quả khảo sát điều kiện sắc ký, điều kiện phân mảnh khối phổ, quy trình xử lý mẫu mà cho hiệu suất cao nhất, tổng hợp và xây dựng quy trình thực nghiệm định lượng TTXs trong mẫu thử đại diện.

2.2.3. Đánh giá quy trình phân tích TTXs

Theo hướng dẫn thẩm định phương pháp phân tích AOAC, thẩm định lại quy trình phân tích đã xây dựng, đảm bảo phương pháp nghiên cứu là phù hợp với các nội dung cơ bản như sau:

2.2.3.1. Khảo sát khoảng tuyến tính và xây dựng đường chuẩn

Tiến hành pha dãy các dung dịch chuẩn TTXs với dung môi là acid acetic 0,03M. Các dung dịch chuẩn được bảo quản trong tủ lạnh nhiệt độ $\leq 4^{\circ}\text{C}$. Nồng độ dãy dung dịch chuẩn được ghi trong bảng 2.2.

Bảng 2. 2. Nồng độ dãy các dung dịch chuẩn

Dung dịch	C1	C2	C3	C4	C5
Nồng độ TTX ($\mu\text{g/ml}$)	2,500	1,250	0,500	0,250	0,125
Nồng độ 4-epiTTX ($\mu\text{g/ml}$)	2,500	1,250	0,500	0,250	0,125
Nồng độ 4,9-anhydroTTX ($\mu\text{g/ml}$)	2,500	1,250	0,500	0,250	0,125

Phân tích mẫu xác định phương trình hồi qui ($y=ax+b$) và hệ số tương quan r. Dựa vào đường chuẩn và diện tích peak đo được trong quá trình phân tích xác định hàm lượng TTXs.

2.2.3.2. Xác định giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng

Giới hạn phát hiện LOD (Limit of detection) được định nghĩa là nồng độ nhỏ nhất của chất phân tích mà có tín hiệu sắc ký lớn gấp 3 lần tín hiệu đường nền ($S/N=3$). Đây là một thông số đặc trưng cho độ nhạy của phương pháp. Chất nào nhạy hơn sẽ có giới hạn phát hiện nhỏ hơn.

Giới hạn định lượng LOQ (Limit of quantification) là nồng độ nhỏ nhất đo được của phương pháp với độ đúng và độ chính xác thích hợp. Theo lý thuyết thống kê trong hóa phân tích thì LOQ là nồng độ chất phân tích mà cho tín hiệu gấp 10 lần tín hiệu đường nền ($S/N=10$) tức là:

$$LOQ = \frac{10}{3} LOD$$

2.2.3.3. Độ chụm và độ đúng của phương pháp

- Độ lặp lại: là mức độ gần nhau của các giá trị riêng lẻ của các phép đo lặp lại và được biểu diễn bằng độ lệch chuẩn (SD) hay độ lệch chuẩn tương đối RSD (%). Chúng tôi tiến hành khảo sát trên nền mẫu thực, phân tích lặp lại 6 lần. Tính giá trị trung bình, độ lệch chuẩn, độ lệch chuẩn tương đối của các lần thử nghiệm.

Giá trị trung bình:
$$x_{tb} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

$$\text{Độ lệch chuẩn: } SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - x_{tb})^2}{(n-1)}}$$

$$\text{Độ lệch chuẩn tương đối: } RSD(\%) = \frac{SD}{x_{tb}} \cdot 100$$

Trong đó:

x_{tb} : giá trị trung bình

x_i : nồng độ chất phân tích.

n : số lần thí nghiệm

SD (Standard Deviation): độ lệch chuẩn.

RSD (relative standard deviation): độ lệch chuẩn tương đối

- Độ đúng của phương pháp: là khái niệm chỉ mức độ gần nhau giữa các giá trị trung bình của kết quả thử nghiệm và giá trị thực hoặc giá trị được chấp nhận là đúng.

- Hiệu suất thu hồi (đánh giá độ đúng): là tỷ lệ phần trăm giữa giá trị thu được so với giá trị lý thuyết. Thực hiện thêm chuẩn ở 3 mức nồng độ; tại mỗi nồng độ chuẩn thêm vào thực hiện lặp 3 lần. Tính hiệu suất thu hồi tại mỗi nồng độ thêm chuẩn.

Hiệu suất thu hồi của phương pháp:

$$H(\%) = \frac{C_{m+c} - C_m}{C_c} \cdot 100\%$$

Trong đó:

C_{m+c} : nồng độ chất phân tích trên mẫu đã thêm chuẩn ($\mu\text{g/ml}$)

C_m : nồng độ chất phân tích trong mẫu thử ($\mu\text{g/ml}$)

C_c : nồng độ chuẩn thêm vào ($\mu\text{g/ml}$).

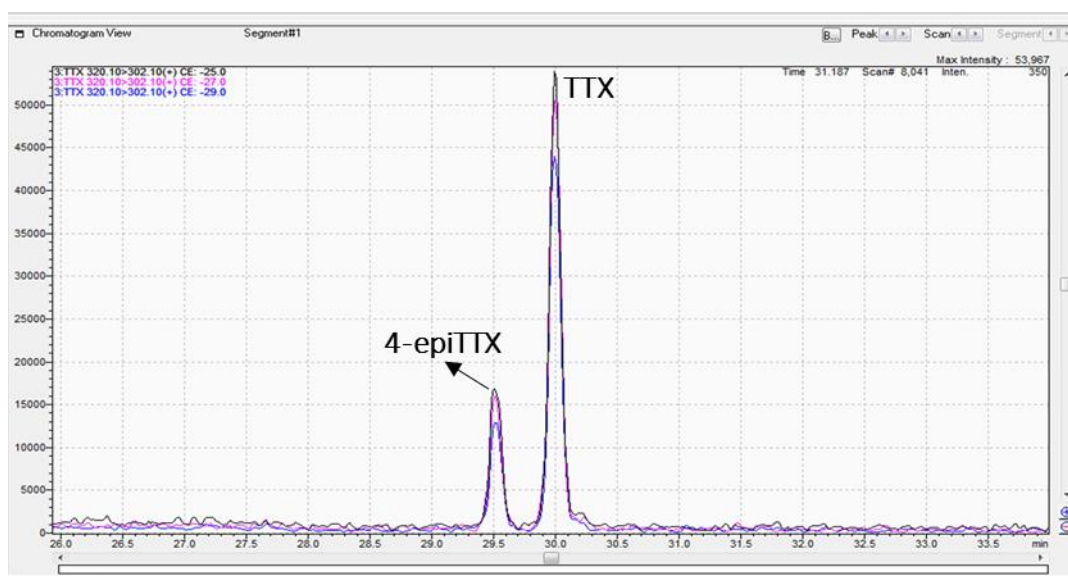
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. KHẢO SÁT ĐIỀU KIỆN PHÂN TÍCH TTXs TRÊN THIẾT BỊ LC-MS/MS

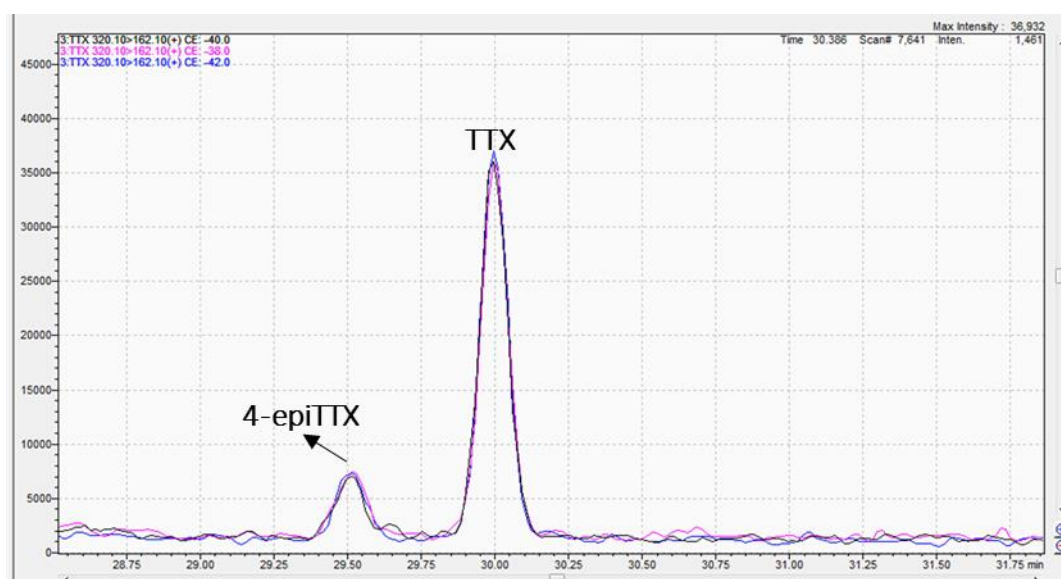
3.1.1. Khảo sát các điều kiện của detector khối phổ

Các chất thuộc nhóm TTXs phân cực và có khối lượng phân tử trung bình. Chúng tôi tiến hành khảo sát xác định TTXs bằng kỹ thuật ion hóa phun điện tử và chế độ bắn phá ion dương. Phổ ESI-MS thường cho các peak có cường độ lớn tương ứng với những ion sơ cấp giữ nguyên cấu trúc nguyên bản của đối tượng phân tích, tạo điều kiện thuận lợi cho việc bắn phá tiếp để tạo ra các ion thứ cấp đặc trưng khi phân tích MS/MS ở chế độ MRM nhằm nâng cao độ đặc hiệu của phương pháp. Chế độ ion dương với nguồn ion hoá phun điện tử (ESI+) được áp dụng để định tính và định lượng TTXs, trong đó các mảnh ion mẹ $[M+H]^+ = 320$ và các mảnh ion thứ cấp $m/z = 302$ và 162 đặc trưng của TTX và 4-epiTTX.

Chúng tôi đã tiến hành khảo sát thế bắn phá là $-25V$, $-27V$, $-29V$, $-38V$, $-40V$ và $-42V$. Sắc ký đồ của mẫu chuẩn TTXs (gồm TTX: $0,255 \mu\text{g/ml}$ và 4-epiTTX: $0,215 \mu\text{g/ml}$) được ghi lại trong hình 3.1 và 3.2.



Hình 3. 1. Sắc ký đồ LC-MS/MS của TTXs chuẩn với các thế phân mảnh $-25V$, $-27V$, $-29V$.



Hình 3. 2. Sắc ký đồ LC-MS/MS của TTXs chuẩn
với các thế phân mảnh -38V, -40V, -42V.

Nhận xét: Kết quả cho thấy khi bắn phá với thế -38V, -40V hay -42V cường độ tín hiệu của các peak mảnh ion con thấp, bề rộng đáy lớn. Khi thay đổi thế -25V, -27V hay -29V kết quả các peak có cường độ tín hiệu cao hơn, cân đối, rõ nét và không kéo đuôi. Trong đó với thế phân mảnh -25V cho peak có tính hiệu cao nhất, không bị kéo đuôi, phù hợp để phân tích. Vì vậy, chúng tôi lựa chọn mức thế bắn phá phù hợp là -25V để tạo mảnh ion con từ ion mẹ $[TTX-H]^+$ có số khối bằng 320 Da.

3.1.2. Khảo sát các điều kiện của hệ pha động

Pha động trong LC-MS/MS không chỉ đóng vai trò phân tích các chất mà còn tác động đến quá trình ion hóa do đó ảnh hưởng đến tín hiệu phân tích. Tùy thuộc vào khả năng tương tác của các chất với pha tĩnh, tốc độ dòng của pha động mà chất phân tích sẽ được rửa giải ra khỏi cột với các thời gian khác nhau.

Các chất thuộc nhóm TTXs phân cực, đồng thời để đảm bảo an toàn thiết bị thì hệ pha động thường được nghiên cứu là các dung môi phân cực và phân cực trung bình gồm có acetonitrile, acid formic, ammonium hydroxide... Tham khảo tài liệu, chúng tôi lựa chọn dung môi pha động hai kênh A và B như sau:

Kênh A: nước/acid formic/ NH_4OH (500: 0,075: 0,3).

Kênh B: acetonitrile/ nước/ acid formic (350: 150: 0,05).

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành khảo sát chương trình gradient pha động và tốc độ dòng sử dụng dung dịch chuẩn TTXs (gồm TTX: 2,551 $\mu\text{g/ml}$; 4-epiTTX: 2,148 $\mu\text{g/ml}$; 4,9-anhydroTTX: 1,755 $\mu\text{g/ml}$) như sau:

3.1.2.1. Khảo sát chương trình gradient pha động

Thực hiện phân tách, xác định đồng thời TTX, các dẫn xuất và đồng phân của TTX, sử dụng chế độ rửa giải đẳng dòng là không phù hợp. Chúng tôi tiến hành khảo sát một số chương trình rửa giải gradient. Cố định các điều kiện sắc ký:

- Cột Waters Xbrige (HILIC column) Amide 4.6 mm I.D. $\times 150\text{mm}$.

- Pha động kênh A và kênh B.

Kênh A: nước/acid formic/ NH_4OH (500: 0,075: 0,3).

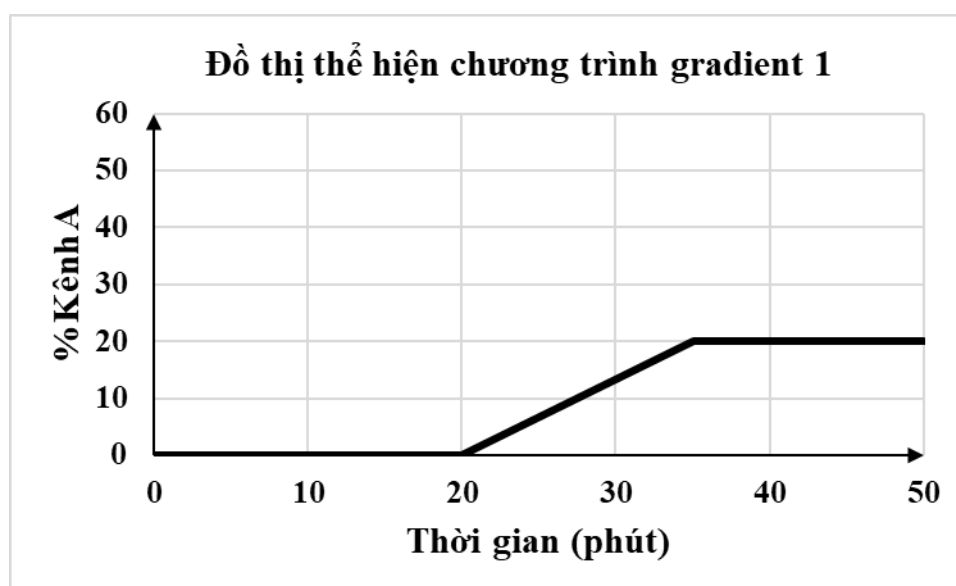
Kênh B: acetonitrile/ nước/ acid formic (350: 150: 0,05).

- Nhiệt độ cột 60°C.

- Tốc độ dòng 0,6 ml/phút.

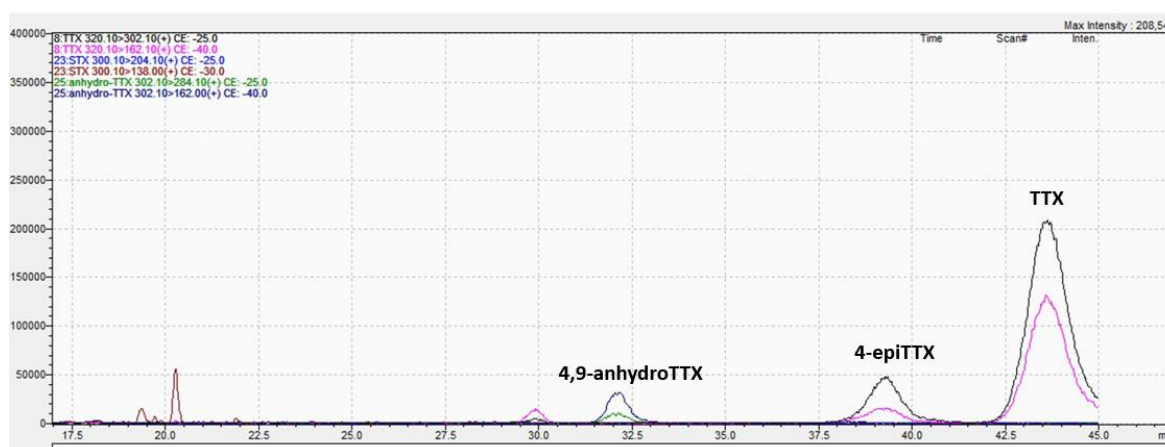
- Thể tích tiêm mẫu: 5 μl .

Chương trình gradient 1: Thời gian thực hiện chương trình gradient 1 là 50 phút và bắt đầu chạy 100%B trong 20 phút. Sau đó gradient tuyến tính đến tỷ lệ kênh A: B = 20:80 trong 15 phút và giữ ổn định trong 15 phút. Quay lại 100% B khi kết thúc. Chương trình gradient 1 được trình bày tại hình 3.3.



Hình 3. 3. Đồ thị chương trình gradient 1

Kết quả sắc ký đồ thể hiện hình 3.4:



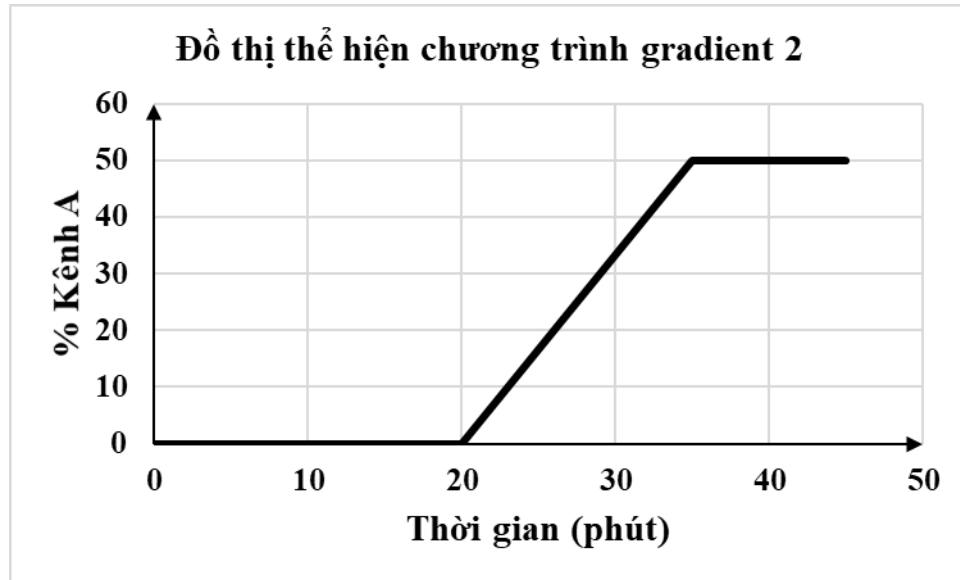
Hình 3. 4.Sắc ký đồ LC-MS/MS của TTXs chuẩn

theo chương trình gradient 1

Nhận xét: Sắc ký đồ thu được cho thấy các chất phân tích tách khỏi nhau tốt, tuy nhiên TTX ra muộn (trong vòng 45 phút), peak tù, chân peak doãng làm giảm độ nhạy của phương pháp phân tích. Chúng tôi tiến hành tăng % kênh A ở gradient đoạn 2 theo chương trình gradient 2.

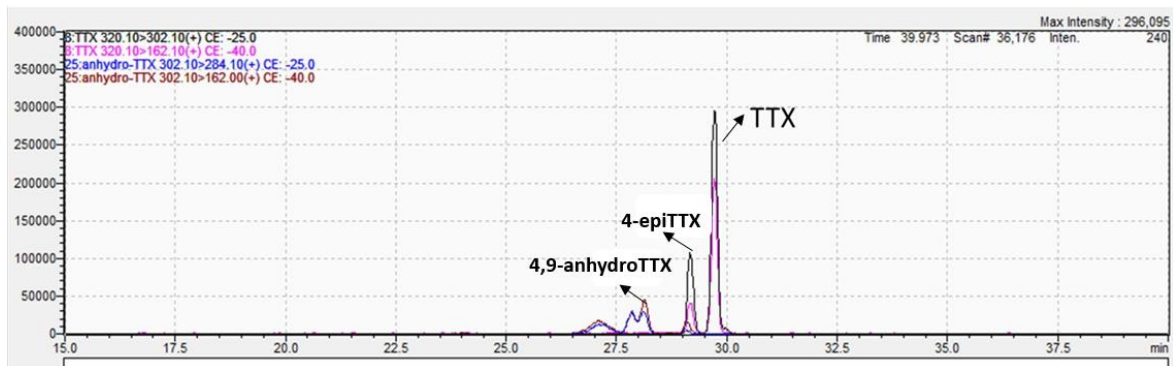
❖ Chương trình gradient 2: Thời gian thực hiện chương trình gradient 2 là 45 phút và bắt đầu chạy 100%B trong 20 phút. Sau đó gradient tuyến tính đến tỷ lệ kênh A: B = 50:50 trong 15 phút và giữ ổn định trong 10

phút. Quay lại 100% B khi kết thúc. Chương trình gradient 2 được trình bày tại hình 3.5



Hình 3. 5. Đồ thị chương trình gradient 2

Kết quả sắc ký đồ thu được thể hiện hình 3.6.



Hình 3. 6. Sắc ký đồ LC-MS/MS của TTXs chuẩn
theo chương trình gradient 2

Nhận xét: Các peak có tín hiệu cao, cân đối, tách nhau rõ ràng, thời gian phân tích nhanh hơn (khoảng 30 phút) và phù hợp với mục đích phân tích. Vì vậy chúng tôi lựa chọn chương trình gradient 2 cho việc rửa giải các chất phân tích ra khỏi cột và giữ cố định cho các bước khảo sát tiếp theo.

3.1.2.2. Khảo sát tốc độ dòng

Thời gian lưu và hình dạng của peak sắc ký phụ thuộc nhiều vào tốc độ dòng của pha động. Nếu tốc độ dòng pha động lớn, khả năng phân bố các chất

trong pha động lớn. Nếu là hỗn hợp của nhiều chất sẽ ra nhanh có thể gây chồng lấp các peak. Nhưng nếu tốc độ dòng quá chậm thì chất phân tích bị giữ lại trong cột lâu, thời gian phân tích kéo dài, ảnh hưởng đến hình dạng peak như peak bị tù, bị kéo đuôi, phân tích kém chính xác.

Theo hệ pha động và chương trình gradient trên với tốc độ dòng 0,6 ml/phút cho sắc ký đồ ổn định. Tuy nhiên chúng tôi thử nghiệm tiến hành khảo sát chương trình gradient trên ở tốc độ dòng khác nhau để tối ưu hóa tối đa các yếu tố. Chúng tôi lựa chọn khảo sát tốc độ dòng pha động ở hai giá trị 0,4 ml/phút và 0,6 ml/phút với các thông số của HPLC như sau:

- Cột Waters Xbrige (HILIC column) Amide 4.6 mm I.D.×150mm

- Pha động:

Kênh A: nước/acid formic/NH₄OH (500: 0,075: 0,3).

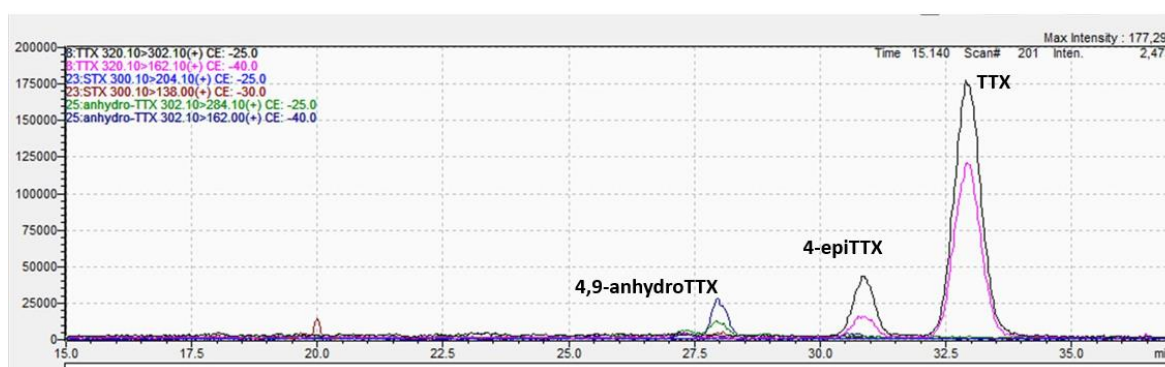
Kênh B: acetonitrile/ nước/ acid formic (350: 150: 0,05).

Chương trình gradient 2

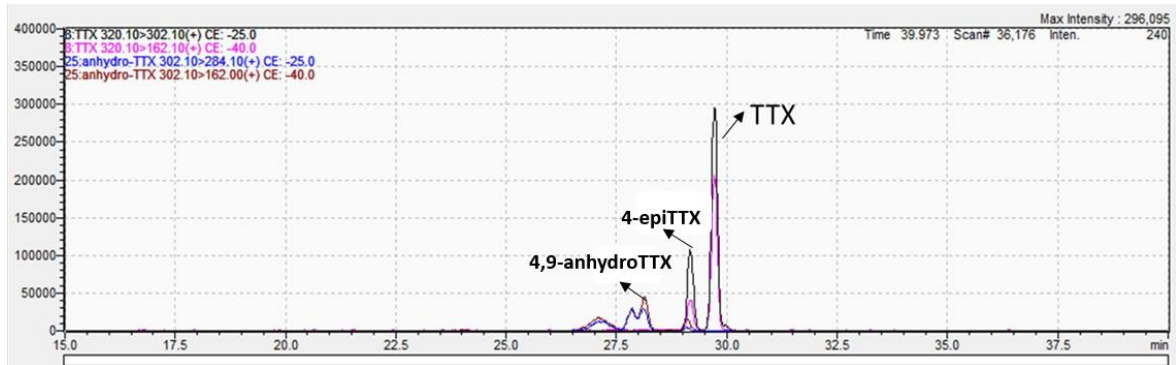
- Nhiệt độ cột 60°C.

- Thể tích tiêm mẫu: 5 µl.

Kết quả sắc ký đồ thu được ghi trong hình 3.7 và 3.8.



Hình 3. 7. Sắc ký đồ LC-MS/MS của TTXs chuẩn
với tốc độ dòng 0,4 ml/phút



Hình 3. 8. Sắc ký đồ LC-MS/MS của TTXs chuẩn
với tốc độ dòng 0,6 ml/phút

Nhận xét: Kết quả khảo sát cho thấy vận tốc pha động 0,4 ml/phút các peak xuất hiện chậm hơn, bề rộng đáy lớn, thời gian lưu khoảng 33 phút. Ở tốc độ dòng 0,6 ml/phút các peak của các đồng phân TTX vừa đủ tách ra khỏi nhau, bề rộng đáy giảm, peak sắc nhọn và thời gian lưu không quá dài khoảng 29,5 phút là tương đối phù hợp cho quá trình sắc ký. Càng tăng tốc độ pha động thì sự tương tác giữa chất phân tích với pha tĩnh càng ít, nên thời gian lưu ngắn. Nhưng khi tốc độ pha động quá cao thì thời gian lưu ngắn, chất phân tích dễ bị ảnh hưởng bởi tạp chất ở nền mẫu khi phân tích mẫu thực và áp suất cột cao rất dễ làm hỏng cột. Do đó, để các peak tách nhau rõ ràng, tiết kiệm thời gian phân tích, chúng tôi vẫn lựa chọn chọn tốc độ dòng pha động thích hợp là 0,6 ml/phút và giữ cố định cho các khảo sát tiếp theo.

Từ các kết quả khảo sát về điều kiện chạy máy LC-MS/MS chúng tôi đưa ra các thông số điều kiện tối ưu cho phân tích TTXs trình bày bảng 3.1.

Bảng 3. 1. Thông số điều kiện tối ưu phân tích TTXs bằng LC-MS/MS

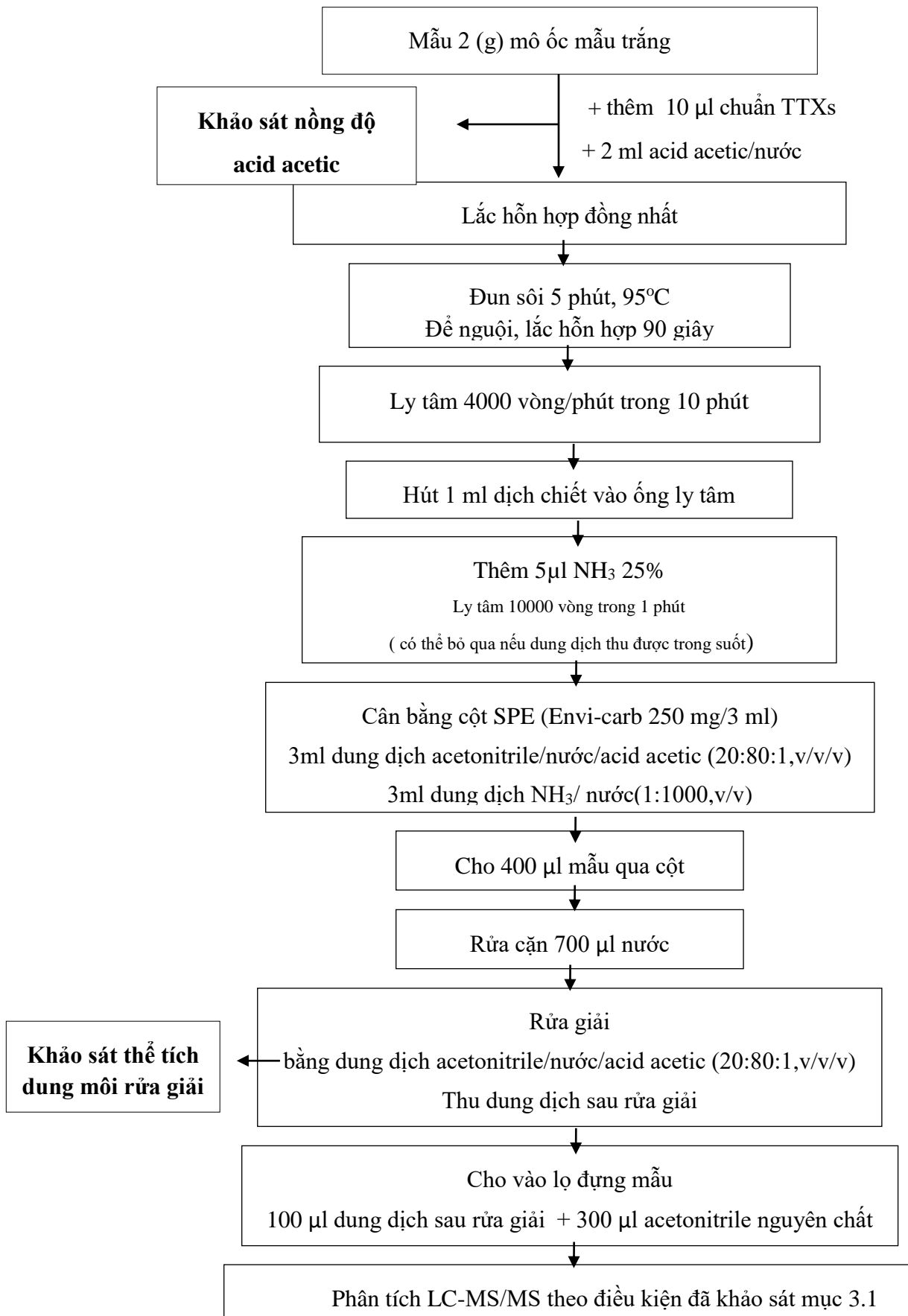
Cột	Cột Waters Xbrige (HILIC column) Amide I.D. 4.6 mm ×150mm.
Thành phần pha động	Kênh A: nước/acid formic/NH ₄ OH (500: 0,075: 0,3). Kênh B: acetonitrile/ nước/ acid formic (350: 150: 0,05).
Chương trình gradient	Thời gian thực hiện chương trình gradient 2 là 45 phút và bắt đầu chạy 100%B trong 20 phút. Sau đó gradient tuyến tính đến tỷ lệ kênh A: B = 50:50 trong 15 phút và giữ ổn định trong 10 phút. Quay lại 100% B khi kết thúc.
Tốc độ dòng	0,6 ml/phút
Detector MS/MS với thế phân mảnh	-25V

Các kết quả trên được áp dụng khi chạy các khảo sát về điều kiện tách chiết, xử lý mẫu và thẩm định quy trình.

3.2. KHẢO SÁT QUY TRÌNH XỬ LÝ MẪU

Có một số quy trình đã và đang được sử dụng để tách chiết TTXs [54]. Phổ biến là phương pháp chiết pha rắn sử dụng dung môi methanol, acid acetic, acetonitrile, ammonium hydroxide... Trong quá trình xử lý mẫu, yếu tố ảnh hưởng nhiều nhất đến kết quả của mẫu phân tích là dung môi tách chiết và thể tích rửa giải. Vì vậy chúng tôi tiến hành khảo sát hai yếu tố này.

Dự kiến qui trình khảo sát như hình 3.9:



Hình 3. 9. Sơ đồ xử lý mẫu dự kiến

3.2.1. Khảo sát nồng độ dung môi tách chiết

Do bản chất TTXs ở dạng ester nên để đảm bảo hiệu suất chiết tách cao cần lựa chọn dung môi tách chiết có độ phân cực phù hợp. Dung môi lựa chọn cũng phải hạn chế được việc chiết theo cùng các tạp chất khác trong ốc, có thể đơn giản hóa quá trình làm sạch mẫu và hạn chế sai số. Acid acetic được sử dụng trong nhiều nghiên cứu khác để chiết độc tố TTXs từ ốc trước khi phân tích bằng kỹ thuật sắc ký lỏng với đầu dò MS/MS. Chúng tôi tiến hành khảo sát nồng độ acid acetic để có hiệu suất thu hồi tốt nhất.

Các khảo sát về nồng độ dung môi tách chiết ban đầu được chúng tôi sử dụng cột chiết pha rắn Envi-carb 250 mg/3 ml và thể tích dung môi rửa giải là 1 ml. Sử dụng nền mẫu trắng không phát hiện TTXs. Sau khi cân mẫu, thêm 10 μ l chuẩn hỗn hợp TTXs nồng độ 1mg/ml tiến hành theo qui trình chiết dự kiến như sơ đồ hình 3.9 với dung môi tách chiết là acid acetic/nước khảo sát với các nồng độ 0,5%, 1% và 1,5%. Tại mỗi nồng độ, làm lặp 3 lần.

Kết quả hiệu suất thu hồi trung bình của 3 lần làm lặp trình bày ở bảng 3.2, bảng 3.3, bảng 3.4 và đồ thị hình 3.10 như sau:

Bảng 3. 2. Kết quả ảnh hưởng của nồng độ acid acetic đến hiệu suất thu hồi TTX

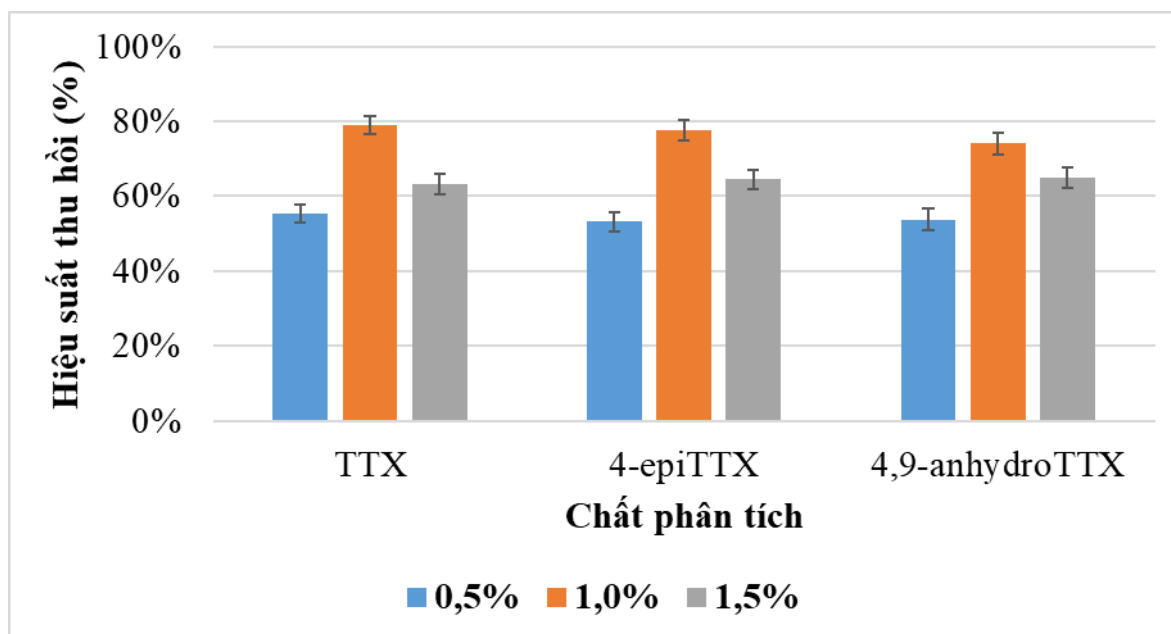
Nồng độ acid acetic/nước	Lần thử nghiệm	TTX				
		C_{lt} (μ g/ml)	S_{peak}	C_{tt} (μ g/ml)	HS thu hồi	HS thu hồi trung bình
0,5%	Lần 1	0,500	381825	0,286	57,18%	55,36 \pm 2,23%
	Lần 2	0,500	355715	0,264	52,87%	
	Lần 3	0,500	374798	0,280	56,02%	
1,0%	Lần 1	0,500	501408	0,385	76,92%	78,98 \pm 2,32%
	Lần 2	0,500	511101	0,393	78,52%	
	Lần 3	0,500	529093	0,407	81,49%	
1,5%	Lần 1	0,500	427320	0,323	64,69%	63,31 \pm 2,73%
	Lần 2	0,500	399938	0,301	60,17%	
	Lần 3	0,500	429682	0,325	65,08%	

Bảng 3. 3. Kết quả ảnh hưởng của nồng độ acid acetic đến hiệu suất thu hồi 4-epiTTX

Nồng độ acid acetic/nước	Lần thử nghiệm	4-epiTTX				HS thu hồi trung bình
		C _{lt} (µg/ml)	S _{peak}	C _{tt} (µg/ml)	HS thu hồi(%)	
0,5%	Lần 1	0,500	155649	0,280	55,94%	53,12±2,70%
	Lần 2	0,500	140251	0,253	50,56%	
	Lần 3	0,500	146805	0,264	52,85%	
1,0%	Lần 1	0,500	216095	0,385	77,06%	77,54±2,72%
	Lần 2	0,500	210457	0,375	75,09%	
	Lần 3	0,500	225826	0,402	80,46%	
1,5%	Lần 1	0,500	171419	0,307	61,45%	64,50±2,64%
	Lần 2	0,500	184069	0,329	65,87%	
	Lần 3	0,500	184928	0,331	66,17%	

Bảng 3. 4. Kết quả ảnh hưởng của nồng độ acid acetic đến hiệu suất thu hồi 4,9-anhydroTTX

Nồng độ acid acetic/nước	Lần thử nghiệm	4,9-anhydroTTX				HS thu hồi trung bình
		C _{lt} (µg/ml)	S _{peak}	C _{tt} (µg/ml)	HS thu hồi(%)	
0,5%	Lần 1	0,500	85044	0,275	54,97%	53,79±2,86%
	Lần 2	0,500	78029	0,253	50,53%	
	Lần 3	0,500	86481	0,279	55,88%	
1,0%	Lần 1	0,500	117399	0,377	75,45%	74,12±2,96%
	Lần 2	0,500	118552	0,381	76,18%	
	Lần 3	0,500	109942	0,354	70,73%	
1,5%	Lần 1	0,500	105124	0,338	67,68%	64,90±2,73%
	Lần 2	0,500	100542	0,324	64,78%	
	Lần 3	0,500	96513	0,311	62,23%	



Hình 3. 10. Đồ thị ảnh hưởng của nồng độ acid acetic đến hiệu suất thu hồi TTXs

Nhận xét: Khi tăng nồng độ acid acetic, hiệu suất thu hồi TTXs đều tăng. Tuy nhiên khi nồng độ tăng quá cao (1,5%), hiệu suất thu hồi lại giảm đáng kể dưới 65%. Khi chiết tách với nồng độ acid cao thì quá trình chiết hòa tan nhiều tạp chất hơn đồng thời nồng độ acid cao có thể ảnh hưởng cấu trúc của TTXs, ảnh hưởng đến quá trình chiết xuất TTXs. Ngược lại nếu sử dụng nồng độ acid thấp không chiết tách được hết TTXs trong mẫu. Tại nồng độ acid acetic 1%, hiệu suất thu hồi TTXs khá đồng đều và cao hơn so với hai mức nồng độ còn lại. Chúng tôi ở nồng độ này tạo ra môi trường thích hợp nhất cho quá trình chiết tách TTXs. Như vậy để không lãng phí dung môi và đảm bảo hiệu quả tách chiết, chúng tôi lựa chọn nồng độ acid acetic là 1% cho các khảo sát tiếp theo. Tuy nhiên, hiệu suất thu hồi của quá trình tách chiết trên vẫn còn thấp dưới 80%, do đó cần phải khảo sát thể tích dung môi rửa giải để đạt được hiệu suất thu hồi cao hơn.

3.2.2. Khảo sát thể tích dung môi rửa giải

Do dịch chiết TTXs từ những nền mẫu sinh học thường chứa nhiều tạp chất (lipid, các acid béo, amin, ...) nên mẫu cần được làm sạch qua cột chiết pha rắn (Envi-carb 250 mg/3 ml). Trong luận văn này, chúng tôi sử dụng

dung môi rửa giải là acetonitrile/nước/acid acetic (20:80:1, v/v/v). Thể tích dung môi rửa giải ảnh hưởng đến nồng độ dư lượng TTXs được chiết tách từ mẫu thử. Đánh giá thể tích rửa giải phù hợp qua hiệu suất thu hồi.

Sử dụng nền mẫu trắng không phát hiện TTXs. Sau khi cân mẫu, thêm 10 μ l chuẩn hỗn hợp các TTXs nồng độ 1mg/ml tiến hành theo qui trình chiết dự kiến như sơ đồ hình 3.9 với dung môi rửa giải là acetonitrile/nước/acid acetic (20:80:1, v/v/v). Khảo sát các thể tích dung môi rửa giải 1ml, 2ml, 3ml. Tại mỗi thể tích, làm lặp 3 lần. Tính toán tương tự như công thức (1), thu được hiệu suất thu hồi trung bình của 3 lần làm lặp như sau:

Bảng 3. 5. Kết quả ảnh hưởng thể tích rửa giải đến hiệu suất thu hồi TTX

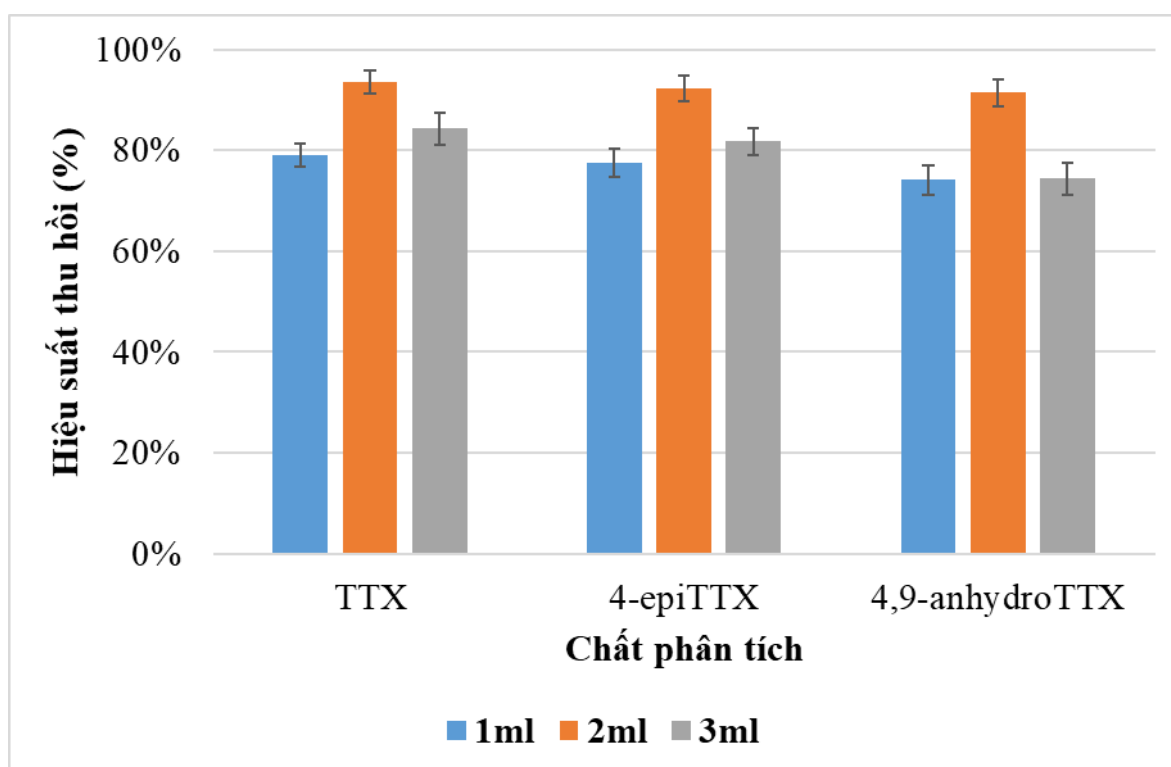
Thể tích dung môi rửa giải (ml)	Lần thử nghiệm	TTX				
		C_{lt} (μ g/ml)	S_{peak}	C_{tt} (μ g/ml)	HS thu hồi(%)	HS thu hồi trung bình
1 ml	Lần 1	0,500	501408	0,385	76,92%	78,98 \pm 2,32%
	Lần 2	0,500	511101	0,393	78,52%	
	Lần 3	0,500	529093	0,407	81,49%	
2 ml	Lần 1	0,250	320397	0,235	94,08%	93,53 \pm 2,37%
	Lần 2	0,250	310856	0,227	90,93%	
	Lần 3	0,250	324910	0,239	95,57%	
3 ml	Lần 1	0,167	210446	0,144	86,67%	84,33 \pm 3,15%
	Lần 2	0,167	198491	0,135	80,75%	
	Lần 3	0,167	208204	0,143	85,56%	

Bảng 3. 6. Kết quả ảnh hưởng thể tích rửa giải
đến hiệu suất thu hồi 4-epiTTX

Thể tích dung môi rửa giải (ml)	Lần thử nghiệm	4-epiTTX				
		C _{lt} (µg/ml)	S _{peak}	C _{tt} (µg/ml)	HS thu hồi(%)	HS thu hồi trung bình
1 ml	Lần 1	0,500	216095	0,385	77,06%	77,54±2,72%
	Lần 2	0,500	210457	0,375	75,09%	
	Lần 3	0,500	225826	0,402	80,46%	
2 ml	Lần 1	0,250	123981	0,224	89,75%	92,26±2,56%
	Lần 2	0,250	131307	0,237	94,87%	
	Lần 3	0,250	127444	0,230	92,17%	
3 ml	Lần 1	0,167	76476	0,141	84,83%	81,71±2,79%
	Lần 2	0,167	72650	0,135	80,82%	
	Lần 3	0,167	71362	0,132	79,47%	

Bảng 3. 7. Kết quả ảnh hưởng thể tích rửa giải
đến hiệu suất thu hồi 4,9-anhydroTTX

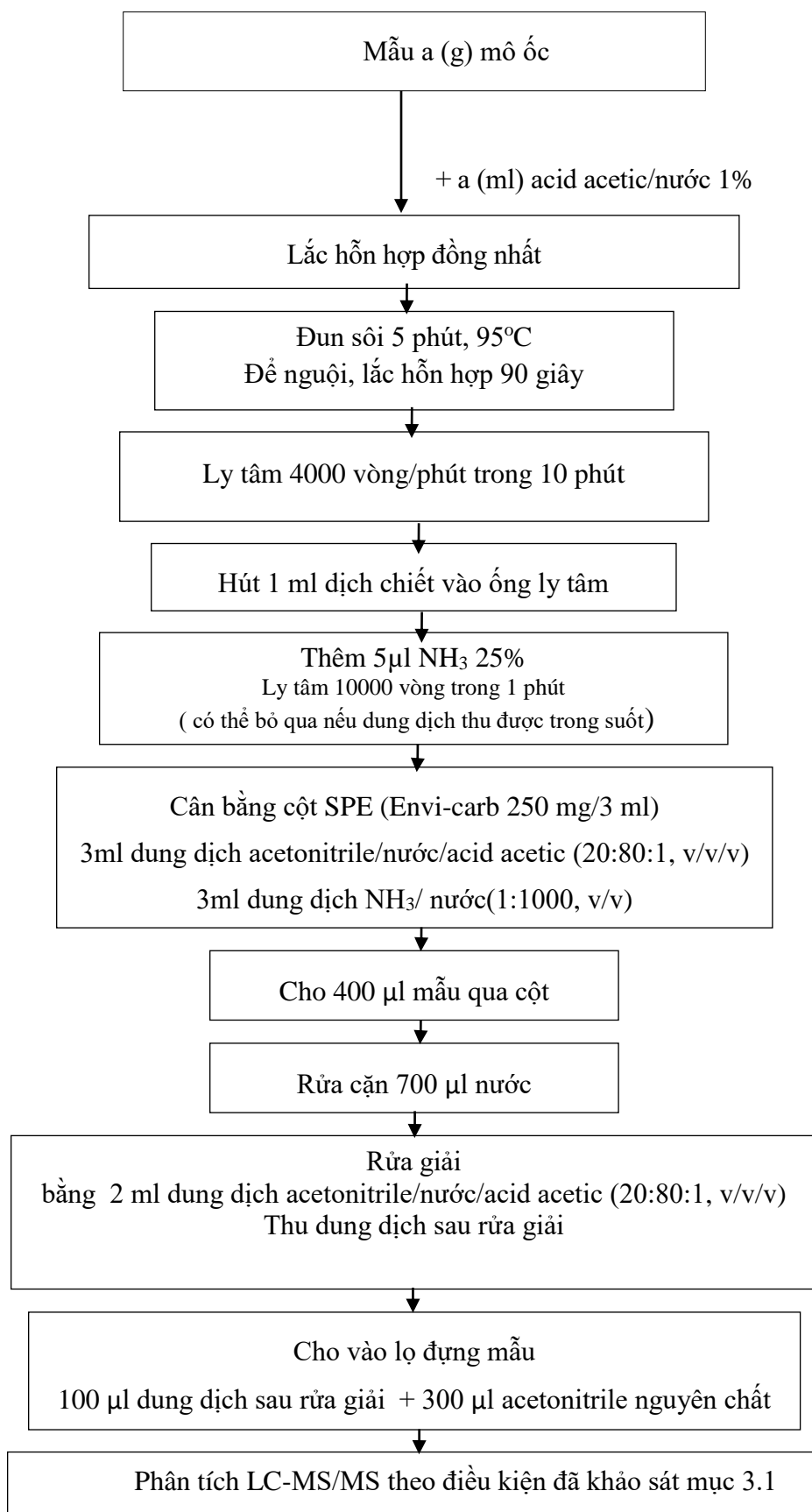
Thể tích dung môi rửa giải (ml)	Lần thử nghiệm	4,9-anhydroTTX				
		C _{lt} (µg/ml)	S _{peak}	C _{tt} (µg/ml)	HS thu hồi(%)	HS thu hồi trung bình
1 ml	Lần 1	0,500	117399	0,377	75,45%	74,12±2,96%
	Lần 2	0,500	118552	0,381	76,18%	
	Lần 3	0,500	109942	0,354	70,73%	
2 ml	Lần 1	0,250	68179	0,221	88,59%	91,41±2,67%
	Lần 2	0,250	70675	0,229	91,75%	
	Lần 3	0,250	72365	0,235	93,89%	
3 ml	Lần 1	0,167	35552	0,118	70,93%	74,35±3,12%
	Lần 2	0,167	37732	0,125	75,07%	
	Lần 3	0,167	38770	0,128	77,04%	



Hình 3. 11. Đồ thị ảnh hưởng của thể tích rửa giải đến hiệu suất thu hồi TTXs

Nhận xét: Khi tăng thể tích dung môi rửa giải từ 1 ml lên 2 ml làm tăng hiệu suất thu hồi đáng kể (> 91%) nhưng lại không tăng thêm khi sử dụng thể tích rửa giải lớn hơn. Trong cùng điều kiện tách chiết, khi rửa giải với 2ml acetonitrile/nước/acid acetic (20:80:1, v/v/v) là lượng dung môi đủ để chiết rút hoàn toàn lượng TTXs trong mẫu được cho qua cột, đồng thời với lượng thể tích trên đảm bảo nồng độ của chất phân tích. Với thể tích rửa giải 1 ml cho hiệu suất thu hồi thấp hơn do chưa đủ để hòa tan và rửa giải hoàn toàn lượng TTXs hấp thụ trên cột SPE. Với thể tích rửa giải 3 ml, lượng thể tích này làm giảm nồng độ TTXs trong dịch chiết làm giảm tín hiệu của mẫu và tiêu tốn dung môi. Do đó, để vừa được hiệu suất thu hồi cao vừa tiết kiệm dung môi, chúng tôi chọn thể tích rửa giải là 2 ml cho các nghiên cứu tiếp theo.

Từ kết quả khảo sát, đánh giá thực nghiệm, lựa chọn điều kiện làm sạch dịch chiết cho phép loại tốt các thành phần tạp bị chiết theo độ dốc, đồng thời bảo toàn được lượng độc tố có trong dịch chiết ban đầu. Chúng tôi đưa ra quy trình xử lý mẫu trong ốc biển như hình 3.12.



Hình 3. 12. Sơ đồ quy trình xử lý mẫu

Thuyết minh quy trình:

- Cân chính xác khoảng khoảng a (gam) mô óc đã được đồng nhất bằng cân phân tích vào ống ly tâm có dung tích 50 ml. Thêm a (ml) dung môi chiết acid acetic/nước nồng độ 1% (v/v), lắc hỗn hợp đồng nhất. Các ống chứa mẫu được đặt trong bể nước sôi 95°C, trong 5 phút; sau đó để nguội về nhiệt độ phòng. Ly tâm ở tốc độ 4000 vòng/phút trong 10 phút; thu dịch ly tâm phía trên để phân tích. Hút 1 ml dịch chiết sang ống ly tâm mới và thêm 5µl dung dịch NH₃ 25%.

- Làm sạch SPE: Cột SPE được hoạt hóa bằng 3ml dung dịch acetonitrile/nước/acid acetic (20:80:1, v/v/v) và 3 ml dung dịch NH₃/ nước (1:1000, v/v) trước khi cho mẫu qua cột. Nạp 400µl dịch chiết cho qua cột với tốc độ chảy 1 giọt/giây. Rửa tạp bằng 700µl nước khử ion. TTXs sau đó được rửa giải bằng 2 ml dung dịch acetonitrile/nước/acid acetic (20:80:1), thu dung dịch rửa giải vào lọ đựng mẫu 5 ml, dán nhãn. Dung dịch sau rửa giải được pha loãng bằng cách lấy 100 µl mẫu và thêm 300 µl acetonitrile. Các lọ đựng mẫu bảo quản ở 4°C.

- Tiến hành tiêm mẫu tự động 5µl và phân tích LC-MS/MS theo các thông số được trình bày trong bảng 3.1.

Bảng 3.1. Thông số điều kiện tối ưu phân tích TTXs bằng LC-MS/MS

Cột	Cột Waters Xbrige (HILIC column) Amide I.D. 4.6 mm ×150mm.
Thành phần pha động	Kênh A: nước/acid formic/NH ₄ OH (500: 0,075: 0,3). Kênh B: acetonitrile/ nước/ acid formic (350: 150: 0,05).
Chương trình gradient	Thời gian thực hiện chương trình gradient 1 là 45 phút và bắt đầu chạy 100%B trong 20 phút. Sau đó gradient tuyến tính đến tỷ lệ kênh A: B = 50:50 trong 15 phút và giữ ổn định trong 10 phút. Quay lại 100% B khi kết thúc.
Tốc độ dòng	0,6 ml/phút
Detector MS/MS với thế phân mảnh	-25V

3.3. ĐÁNH GIÁ PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH

3.3.1. Khảo sát khoảng tuyến tính và lập đường chuẩn

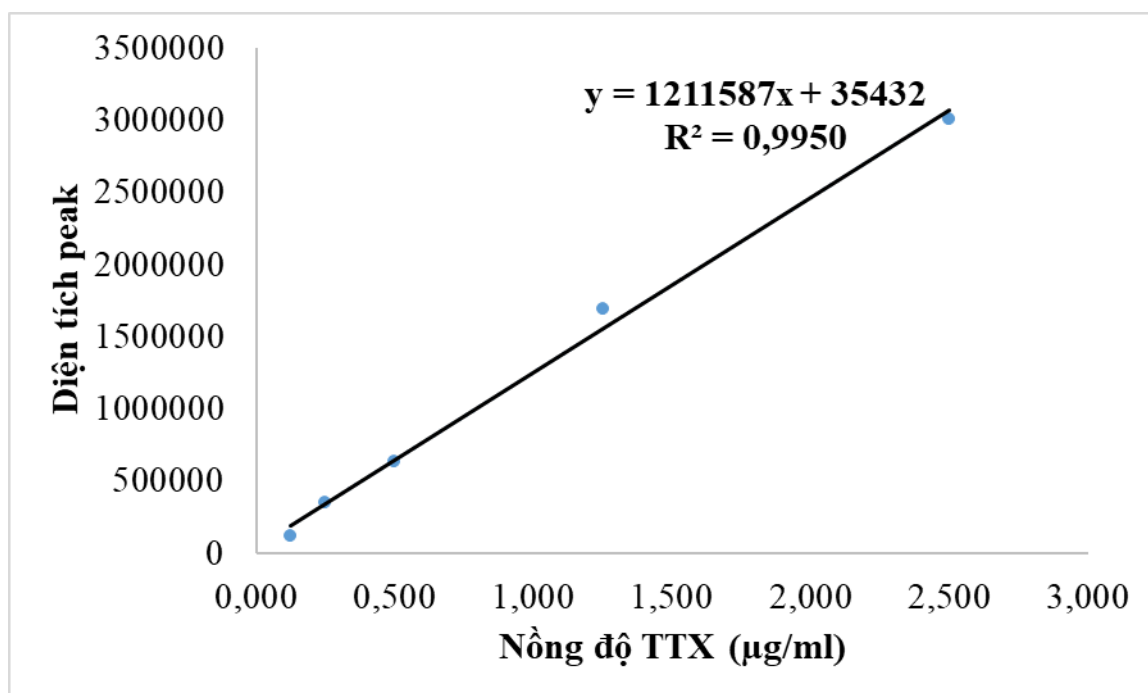
Chúng tôi tiến hành pha dãy dung dịch chuẩn có nồng độ xác định, tiến hành phân tích LC-MS/MS ở điều kiện đã được khảo sát.

Kết quả được trình bày trong bảng 3.8 như sau:

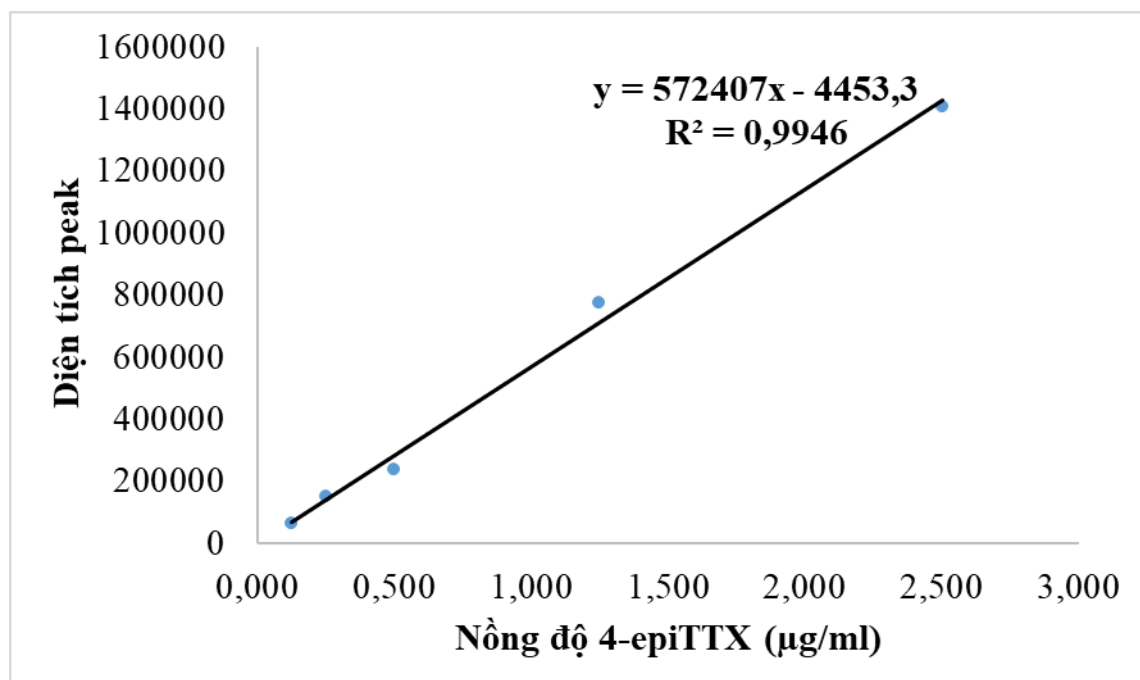
Bảng 3. 8. Sự phụ thuộc diện tích peak vào nồng độ TTXs

Nồng độ (µg/ml)	S _{peak} TTX	S _{peak} 4-epiTTX	S _{peak} 4,9-anhydroTTX
2,500	3001078	1404021	775034
1,250	1686918	773207	429701
0,500	627170	234017	128045
0,250	350580	150782	81576
0,125	115003	63087	38008

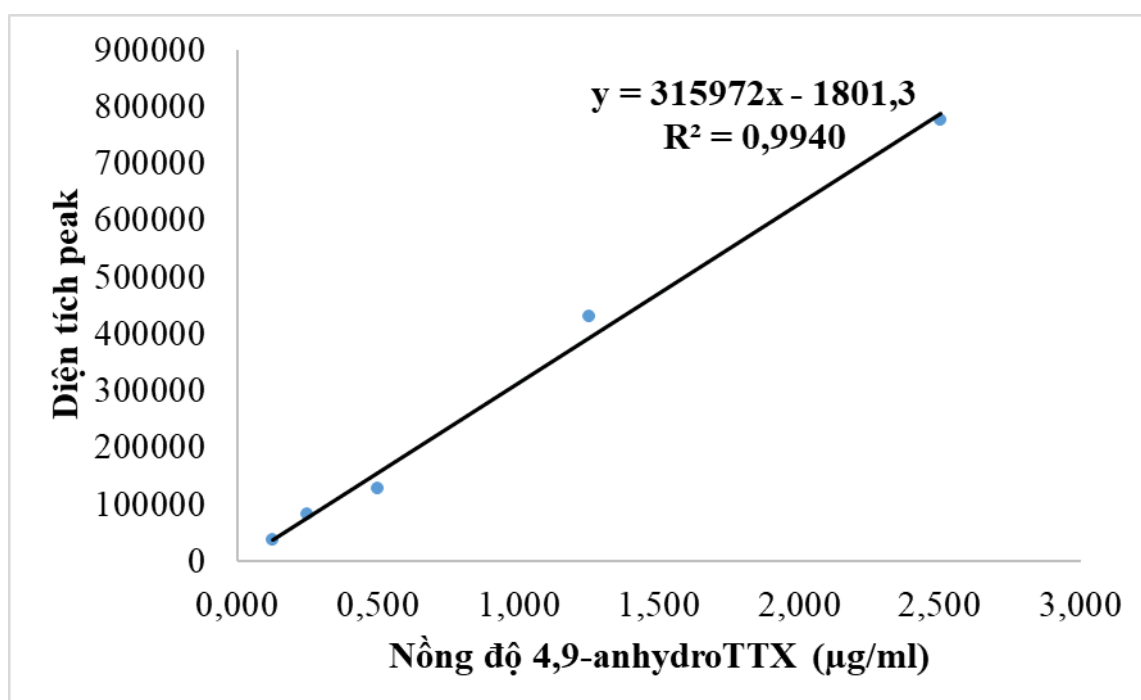
Các dữ liệu trên được xử lý phần mềm Excel chúng tôi thu được đồ thị hình 3.13; 3,14 và 3.15.



Hình 3. 13. Đồ thị sự phụ thuộc diện tích peak vào nồng độ TTX



Hình 3. 14. Đồ thị sự phụ thuộc diện tích peak vào nồng độ 4-epiTTX



Hình 3. 15. Đồ thị sự phụ thuộc diện tích peak vào nồng độ 4,9-anhydroTTX

Nhận xét: Như vậy trong khoảng nồng độ chúng tôi khảo sát, nồng độ TTXs và diện tích peak đều có mối quan hệ tuyến tính. Do đó 3 đồ thị trên cũng là đường chuẩn của TTX, 4-epiTTX và 4,9-anhydroTTX. Hệ số tương quan tuyến tính hoàn toàn đáp ứng yêu cầu của AOAC về hệ số hồi quy tuyến tính ($R^2 \geq 0,99$) [56]. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính và đường chuẩn của TTXs tóm tắt ở bảng 3.9.

Bảng 3. 9. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính và đường chuẩn của TTXs

Chất phân tích	Khoảng tuyến tính (µg/ml)	PT hồi quy	R^2
TTX	0,125-2,500	$y = 1211587x + 35432$	0,9950
4-epiTTX	0,125-2,500	$y = 572407x - 4453,3$	0,9946
4,9-anhydroTTX	0,125-2,500	$y = 315972x - 1801,3$	0,9940

3.3.2. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng

Giới hạn phát hiện (LOD) được định nghĩa là nồng độ nhỏ nhất của chất phân tích mà phương pháp phân tích có thể phát hiện được, có tín hiệu sắc ký lớn gấp 3 lần tín hiệu đường nền. Đây là một thông số đặc trưng cho độ nhạy của phương pháp. Chất nào nhạy hơn sẽ có giới hạn phát hiện nhỏ.

Cũng theo phương pháp này giới hạn định lượng (LOQ) là nồng độ nhỏ nhất chất phân tích mà có tín hiệu lớn gấp 10 lần tín hiệu nhiễu đường nền hay mẫu trắng ($S/N = 10$).

Phân tích mẫu chuẩn và tiến hành pha loãng cho đến khi thu được tỷ số tín hiệu/nhiễu (S/N) = 3. Kết quả thu được như sau: giới hạn phát hiện của TTX là 0,012 $\mu\text{g/ml}$ và 4-epiTTX là 0,032 $\mu\text{g/ml}$. Giới hạn định lượng của TTX là 0,041 $\mu\text{g/ml}$ còn 4-epiTTX là 0,107 $\mu\text{g/ml}$.

Nhận xét: Giới hạn phát hiện TTXs thấp hơn nhiều so với các nghiên cứu về TTXs trong ốc biển đã được công bố như 0,1 $\mu\text{g/ml}$ [24]; 1 $\mu\text{g/ml}$ [49]. Kết quả cho thấy phương pháp có độ nhạy cao đạt được mục tiêu của nghiên cứu.

3.3.3. Đánh giá độ chụm và độ đúng của phương pháp

Đây là hai yếu tố quan trọng đánh giá hiệu quả của phương pháp phân tích. Để tiến hành xác định hai yếu tố này, chúng tôi sử dụng mẫu ốc loài *N. glans* thu thập được. Lấy phần thịt ốc của 10 cá thể ốc loài *N. glans* trộn đều với nhau với tổng khối lượng thịt ốc cân được 28,75 gam.

- Đối với mẫu thực: Lấy 2 gam mẫu mô ốc đã đồng nhất tiến hành theo sơ đồ hình 3.12. Phân tích lặp lại 6 lần.

- Đối với mẫu thêm chuẩn: Lấy 2 gam mẫu thực, thêm 10 μl chuẩn TTXs ở các mức nồng độ khác nhau 1 mg/ml; 0,5 mg/ml và 0,1 mg/ml. Tiến hành quy trình xử lý và phân tích (lặp lại 3 lần cho mỗi nồng độ) như sơ đồ hình 3.12.

Các kết quả tính độ lệch chuẩn tương đối và hiệu suất thu hồi được trình bày trong bảng 3.10 và 3.11.

Bảng 3. 10. Độ lặp lại của phương pháp

Lần TN	S_{peak}		
	TTX	4-epiTTX	4,9-anhydroTTX
1	451400	148775	146774
2	470332	150079	149627
3	461790	143985	153002
4	487341	149019	146218
5	450780	155707	149073
6	469280	146900	157236
Trung bình \bar{x}_{tb}	465154	149078	146809
SD	13734	3891	4158
RSD (%)	2,95	2,61	2,83

Bảng 3. 11. Hiệu suất thu hồi của phương pháp

Mẫu	Chất phân tích	Nền ($\mu\text{g/ml}$)	Lượng thêm vào ($\mu\text{g/ml}$)	Lượng tìm thấy trung bình ($\mu\text{g/ml}$)	Hiệu suất thu hồi TB (%)
Mẫu thêm chuẩn mức 1	TTX	0,355	0,250	0,583	91,44 \pm 1,30%
	4-epiTTX	0,268	0,250	0,492	89,38 \pm 2,20%
	4,9-anhydroTTX	0,481	0,250	0,705	89,42 \pm 2,73%
Mẫu thêm chuẩn mức 2	TTX	0,355	0,125	0,467	89,49 \pm 2,40%
	4-epiTTX	0,268	0,125	0,378	87,61 \pm 2,48%
	4,9-anhydroTTX	0,481	0,125	0,591	87,43 \pm 3,11%
Mẫu thêm chuẩn mức 3	TTX	0,355	0,025	0,376	83,43 \pm 2,01%
	4-epiTTX	0,268	0,025	0,289	83,39 \pm 2,81%
	4,9-anhydroTTX	0,481	0,025	0,502	83,02 \pm 2,12%

Nhận xét: Độ lặp lại của phương pháp đáp ứng yêu cầu của AOAC (RSD <15%). Kết quả hiệu suất thu hồi ở 3 mức nồng độ với mỗi chất phân tích hơn 83%, nằm trong giới hạn cho phép của AOAC (80-110%). Điều này chứng minh phương pháp phân tích đáp ứng yêu cầu theo tiêu chuẩn của AOAC [56].

So sánh với quy trình phân tích độc tố TTXs trong trai và hào [57] sử dụng HILIC-MS/MS với cột Waters Acquity BEH Amide UPLC 1.7 μm , 2.1 \times 150 mm cho kết quả hiệu suất thu hồi từ 70% đến 77% đối với trai; 76% đến 84 % đối với hào và độ lặp lại RSD < 9%.

Như vậy quy trình đảm bảo khả năng phát hiện và định lượng các TTXs trong đối tượng ốc biển. Do đó có thể áp dụng quy trình để tiến hành phân tích các các thể ốc thực tế.

3.4. PHÂN TÍCH MỘT SỐ MẪU ỐC THỰC TẾ

Sau khi nghiên cứu các điều kiện xử lý mẫu và sắc ký, chúng tôi tiến hành phân tích một số mẫu thực gồm 15 mẫu *N. glans* và 20 mẫu ốc *N. papillosus*.

Từ diện tích peak cho kết quả hàm lượng độc tính trong các mẫu ốc được tổng hợp trong bảng 3.12 và 3.13.

Bảng 3. 12. Kết quả phân tích 15 mẫu ốc loài *N. glans*

Mẫu số	Kết quả hàm lượng			Hàm lượng tổng TTXs($\mu\text{g/g}$)	Độc tính tổng TTXs (MU/g)
	TTX ($\mu\text{g/g}$)	4-epiTTX ($\mu\text{g/g}$)	4,9-anhydroTTX ($\mu\text{g/g}$)		
<i>N. glans 1</i>	-	-	-	-	-
<i>N. glans 2</i>	-	-	-	-	-
<i>N. glans 3</i>	-	-	-	-	-
<i>N. glans 4</i>	-	-	-	-	-
<i>N. glans 5</i>	-	-	-	-	-
<i>N. glans 6</i>	-	-	-	-	-
<i>N. glans 7</i>	229,73	87,37	180,06	497,16	1112,29
<i>N. glans 8</i>	171,76	68,52	96,28	336,56	830,36
<i>N. glans 9</i>	-	-	-	-	-
<i>N. glans 10</i>	-	-	-	-	-
<i>N. glans 11</i>	-	-	-	-	-
<i>N. glans 12</i>	60,68	26,70	69,30	156,67	298,35
<i>N. glans 13</i>	-	-	-	-	-
<i>N. glans 14</i>	25,69	10,89	15,13	51,17	124,73
<i>N. glans 15</i>	-	-	-	-	-
TB	34,85	13,82	25,77	74,44	168,98

Bảng 3. 13. Kết quả phân tích 20 mẫu ốc loài *N. papillosus*

Mẫu số	Kết quả hàm lượng			Hàm lượng tổng TTXs(µg/g)	Độc tính tổng TTXs (MU/g)
	TTX (µg/g)	4-epiTTX (µg/g)	4,9-anhydroTTX (µg/g)		
<i>N. papillosus 1</i>	-	-	-	-	-
<i>N. papillosus 2</i>	-	-	-	-	-
<i>N. papillosus 3</i>	-	-	-	-	-
<i>N. papillosus 4</i>	-	-	-	-	-
<i>N. papillosus 5</i>	-	-	-	-	-
<i>N. papillosus 6</i>	-	-	-	-	-
<i>N. papillosus 7</i>	-	-	-	-	-
<i>N. papillosus 8</i>	-	-	-	-	-
<i>N. papillosus 9</i>	12,86	6,17	8,67	27,70	63,02
<i>N. papillosus 10</i>	-	-	-	-	-
<i>N. papillosus 11</i>	11,07	6,60	8,79	24,46	55,31
<i>N. papillosus 12</i>	39,42	16,96	24,26	80,64	191,66
<i>N. papillosus 13</i>	170,27	71,17	96,40	337,84	825,53
<i>N. papillosus 14</i>	-	--	-	-	-
<i>N. papillosus 15</i>	-	-	-	-	-
<i>N. papillosus 16</i>	-	-	-	-	-
<i>N. papillosus 17</i>	-	-	-	-	-
<i>N. papillosus 18</i>	-	-	-	-	-
<i>N. papillosus 19</i>	26,36	11,48	10,94	48,78	127,78
<i>N. papillosus 20</i>	-	-	-	-	-
TB	13,00	5,62	7,45	26,07	63,17

Ghi chú: (-) không phát hiện độc tố

Nhận xét: Kết quả phân tích 35 cá thể ốc đã phát hiện 4/15 cá thể ốc loài *N. glans* và 5/20 cá thể ốc loài *N. papillosus* có chứa độc tố TTXs với hàm lượng cao vượt ngưỡng an toàn nhiều lần (0,044 µg/g, theo Cục an toàn thực phẩm Châu Âu) [58]. Từ hàm lượng độc tố, chúng tôi chuyển qua độc tính MU/g theo Nakamura và Yasumoto (1985) [9] cho thấy độc tính ở từng cá thể phát hiện rất lớn độc tính vượt ngưỡng an toàn (10MU/g) từ 10 đến 100 lần. Hàm lượng và độc tính ở loài *N. glans* cao hơn loài *N. papillosus* và đặc

biệt mẫu *N. glans* 7 có tổng độc tính 1112,29 MU/g (>1000 MU/g) được đánh giá có mức độ độc cực mạnh [22], có thể gây tử vong ở người khi ăn khoảng 5g ốc tương ứng với 2-3 cá thể ốc. Do vậy cần khuyến cáo kịp thời cho người dân không đánh bắt và tiêu thụ 2 loài ốc này làm thực phẩm.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

Sau một thời gian thực hiện luận văn chúng tôi đã thực hiện được mục tiêu đề ra với kết quả như sau:

1. Đã xây dựng được quy trình phân tích TTXs trong ốc biển bằng phương pháp sắc ký lỏng khối phổ kép LC-MS/MS với giới hạn phát hiện cũng như giới hạn định lượng thấp đáp ứng tốt khả năng phát hiện và định lượng hàm lượng nhỏ TTXs trong ốc biển.
2. Nghiên cứu đã tối ưu hóa quy trình xử lý mẫu từ ốc biển và các điều kiện phân tích TTXs trong ốc biển bằng LC-MS/MS.
3. Quy trình phân tích có hiệu suất thu hồi cao trên 83% và độ lặp lại nằm trong giới hạn cho phép của AOAC.
4. Sử dụng quy trình phân tích này đã phát hiện được các mẫu ốc *N. glans* và *N. papillosus* chứa độc tố TTXs.

KIẾN NGHỊ

Tiếp tục nghiên cứu thử nghiệm quy trình để phân tích TTXs trong một số loài sinh vật biển khác bằng phương pháp sắc ký lỏng khối phổ kép LC-MS/MS.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Suehiro M, 1994, Historical review on chemical and medical studies of globefish toxin before World War II, *The Japanese Journal for the History of Pharmacy*, 29(3), pp. 428–434.
2. Tsuda K., Tachikawa R., Sakai K., Tamura C., Amakasu O., Kawamura M., Ikuma S., 1964, On the structure of tetrodotoxin, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 12(5), pp. 642–645.
3. Goto T., Kishi Y., Takahashi S., Kishi Y., Takahashi S., Hirata Y., 1965, Tetrodotoxin, *Tetrahedron*, 21(8), pp. 2059–2088.
4. Yu C., 2008, Detection and biosynthesis of puffer fish toxin from bacterial culture for novel medical application, Thesis.
5. Leung K.S.Y., Fong B.M.W., and Tsoi Y.K., 2011, Analytical challenges: determination of tetrodotoxin in human urine and plasma by LC-MS/MS, *Marine Drugs*, 9(11), pp. 2291–2303.
6. Asakawa M., Shida Y., Miyazawa K., Noguchi T., 2012, *Instrumental Analysis of Tetrodotoxin*, IntechOpen, Japan.
7. Lin S. J., Liao C.J., Chen S.K., Hwang D., 2002, Survey on toxicity and label of dried dressed fish fillet in 1998, *Journal of Food and Drug Analysis*, 10 (1), pp.11-18.
8. Noguchi Y., Suzuki T., Matsutani K., Sakakibara R., Nakahigashi R., Adachi M., Nishikawa T., Abe H., 2022, An almost nontoxic tetrodotoxin analog, 5,6,11-trideoxytetrodotoxin, as an odorant for the grass puffer, *Scientific Reports*, 12(1), pp.15087.
9. Nakamura M. and Yasumoto T., 1985, Tetrodotoxin derivatives in puffer fish, *Toxicon*, 23(2), pp. 271–276.
10. Hagen N.A., Fisher K.M., Lapointe B., Souich P., Chary S., Moulin D., Sellers E., 2007, An open-label, multi-dose efficacy and safety study of intramuscular tetrodotoxin in patients with severe cancer-related pain, *Journal Pain Symptom Manage*, 34(2), pp. 171–182.
11. Kudo Y. and Yotsu-Yamashita M., 2019, Isolation and Biological Activity of 8- Epitetrodotoxin and the Structure of a Possible Biosynthetic Shunt Product of Tetrodotoxin, Cep-226A, from the *Newt Cynops ensicauda popei*, *Journal of Natural Products*, 82(6), pp. 1656–1663.
12. Kudo Y., Finn J., Fukushima K., Sakugawa S., Cho Y., Konoki K., Yotsu M., 2014, Isolation of 6-deoxytetrodotoxin from the pufferfish, *Takifugu pardalis*, and a comparison of the effects of the C-6 and C-11 hydroxy groups of tetrodotoxin on its activity, *Journal of Natural Products*, 77(4), pp. 1000–1004.

13. Saoudi M., Abdelmouleh A., and El Feki A., 2010, Tetrodotoxin: a potent marine toxin, *Toxin Reviews*, 29(2), pp. 60–70.
14. Xu Q., Huang K., Gao L., Zhang H., Rong K., 2003, Toxicity of tetrodotoxin towards mice and rabbits, *Journal of Hygiene Research*, 32(4), pp. 371–374.
15. Kao C.Y., 1966, Tetrodotoxin, saxitoxin and their significance in the study of excitation phenomena, *Pharmacological Reviews*, 18(2), pp. 997–1049.
16. Narahashi T., Haas H.G., and Therrien E.F., 1967, Saxitoxin and Tetrodotoxin: Comparison of Nerve Blocking Mechanism, *Science*, 157(3795), pp. 1441–1442.
17. Chen R. and Chung S.H., 2014, Mechanism of tetrodotoxin block and resistance in sodium channels, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 446(1), pp. 370–374.
18. Taniyama S., Isami Y., Matsumoto T., Nagashima Y., Takatani T., Arakawa O., 2009, Toxicity and toxin profile of tetrodotoxin detected in the scavenging gastropod *Nassarius (Alectrion) glans* “Kinshibai.”, *Journal of Food Hygiene and Safety Science*, 50(1), pp. 22–28.
19. Noguchi T., Maruyama J., Narita H., Hashimoto K., 1984, Occurrence of tetrodotoxin in the gastropod mollusk *Tutufa lissostoma* (frog shell), *Toxicon*, 22(2), pp. 219–226.
20. Hwang P.A., Tsai Y.H., Deng J.F., Cheng C.A., Ho P.H., Hwang D.F., 2005, Identification of tetrodotoxin in a marine gastropod (*Nassarius glans*) responsible for human morbidity and mortality in Taiwan, *Journal of Food Protection*, 68(8), pp. 1696–1701.
21. Đặng Quang Minh, Phạm Xuân Kỳ, Đào Việt Hà, Lê Hồ Khánh Hỷ, Nguyễn Thu Hồng, Phan Bảo Vy, Đoàn Thị Thiết, 2015, Độc tố Tetrodotoxin và Saxitoxin trong một số loài ốc bùn (giống *Nassarius Duméril*, 1806) ở vùng biển Khánh Hòa., *Tuyển tập nghiên cứu biển*, 21(2), pp. 70-79.
22. Noguchi T., Onuki K., and Arakawa O., 2011, Tetrodotoxin Poisoning Due to Pufferfish and Gastropods, and Their Intoxication Mechanism, *Toxicon*, 2011, pp. 276-939.
23. Hwang P.A., Tsai Y.H., Lin S.J., Hwang D.F., 2007, The gastropods possessing TTX and/or PSP, *Food Reviews International*, 23(4), pp. 321–340.
24. Hwang P.A., Tsai Y.H., Deng J.F., Cheng C.A., Ho P.H., Hwang D.F., 2005, Identification of tetrodotoxin in a marine gastropod (*Nassarius glans*) responsible for human morbidity and mortality in Taiwan, *Journal of Food Protection*, 68(8), pp. 1696–1701.

25. Yang C.C., Han K.C., Lin T.J., Tsai W.J., Deng J.F., 1995, An outbreak of tetrodotoxin poisoning following gastropod mollusc consumption, *Human and Experimental Toxicology*, 14(5), pp. 446–450.
26. Ha D.V. and Sato S., 2010, Toxicity of some marine snails responsible for recent food poisonings in Vietnam, *Vietnam Journal of Marine Science and Technology*, 10(3), pp. 89–95.
27. Campbell K., Barnes P., Haughey S.A., Higgins C., Kawatsu K., Vasconcelos V., Elliott C., 2013, Development and single laboratory validation of an optical biosensor assay for tetrodotoxin detection as a tool to combat emerging risks in European seafood, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(24), pp. 7753–7763.
28. Griffin G.D., Stratis-Cullum D.N., and McKnight T.E., 2019, Biosensors, *Encyclopedia of Microbiology (Fourth Edition)*, Academic Press, Oxford, pp. 542–574.
29. Kogure K., Tamplin M.L., Simidu U., Colwell R.R., 1988, A tissue culture assay for tetrodotoxin, saxitoxin and related toxins, *Toxicon*, 26(2), pp. 191–197.
30. Hamasaki K., Kogure K., and Ohwada K., 1996, A biological method for the quantitative measurement of tetrodotoxin (TTX): tissue culture bioassay in combination with a water-soluble tetrazolium salt, *Toxicon*, 34(4), pp. 490–495.
31. Islam Q.T., Razzak M.A., Islam M.A., Bari M.L., Basher A., Chowdhury F.R., Sayeduman A.B.M., Ahasan H.M., Faiz M.A., Arakawa O., Yotsu M., Kuch U., Mebs D., 2011, Puffer fish poisoning in Bangladesh: clinical and toxicological results from large outbreaks in 2008, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 105(2), pp. 74–80.
32. Kawatsu K., Hamano Y., Yoda T., Terano Y., Shibata T., 1997, Rapid and highly sensitive enzyme immunoassay for quantitative determination of tetrodotoxin, *Japan Journal of Medical Science and Biology*, 50(3), pp. 133–150.
33. Ngy L., Tada K., Yu C.F., Takatani T., Arakawa O., 2008, Occurrence of paralytic shellfish toxins in Cambodian Mekong pufferfish *Tetraodon turgidus*: selective toxin accumulation in the skin, *Toxicon*, 51(2), pp. 280–288.
34. Reverté L., Rambla-Alegre M., Leonardo S., Belles C., Campbell K., Elliott C., Gerssen A., Klijnstra M., Diogene J., Campas M., 2018, Development and validation of a maleimide-based enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of tetrodotoxin in oysters and mussels, *Talanta*, 176, pp. 659–666.

35. Tanu M.B. and Noguchi T., 1999, Tetrodotoxin as a toxic principle in the horseshoe crab *Carcinoscorpius rotundicauda* collected from Bangladesh, *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, 40(6), pp. 426-430.
36. Yu C.F., Yu H.F., Chan P.L., Yan Q., Wong P.K., 2004, Two novel species of tetrodotoxin-producing bacteria isolated from toxic marine puffer fishes, *Toxicon*, 44(6), pp. 641-647.
37. Asakawa M., Toyoshima T., Ito K., Bessho K., Yamaguchi C., Tsunetsugu S., Shida Y., Kajihara H., Mawwatari S., Noguchi T., Miyazawa K., 2003, Paralytic toxicity in the ribbon worm *Cephalothrix* species (Nemertea) in Hiroshima Bay, Hiroshima Prefecture, Japan and the isolation of tetrodotoxin as a main component of its toxins, *Toxicon*, 41(7), pp. 747-753.
38. Stan'kov I.N., Kondrat'ev V.B., Derevyagina I.D., Morozova O.T., Selivanova V.I., Semchenko F.M., 2016, Gas-chromatographic determination of trace amounts of tetrodotoxin in water, drugs, and blood plasma, *Journal of Analytical Chemistry*, 71(3), pp. 289-296.
39. Yotsu M., Endo A., and Yasumoto T., 1989, An Improved Tetrodotoxin Analyzer, *Agricultural and Biological Chemistry*, 53(3), pp 893-895.
40. Maran B.A.V., Iwamoto E., Okuda J., Matsuda S., Taniyama S., Shida Y., Asakawa M., Ohtsuka S., Nakai T., Boxshall G., 2007, Isolation and characterization of bacteria from the copepod *Pseudocaligus fugu* ectoparasitic on the panther puffer *Takifugu pardalis* with the emphasis on TTX, *Toxicon*, 50(6), pp. 779-790.
41. Man C.N., Noor N.M., Harn G.L., Lajis R., Mohamad S., 2010, Screening of tetrodotoxin in puffers using gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1217(47), pp. 7455-7459.
42. Chen C.Y. and Chou H.N., 1998, Detection of Tetrodotoxin by High Performance Liquid Chromatography in Lined-Moon Shell and Puffer Fish, *Acta Zoologica Taiwanica*, 9(1), pp. 41-48.
43. Yu C.H., Yu C.F., Tam S., Yu H.F., 2010, Rapid screening of tetrodotoxin in urine and plasma of patients with puffer fish poisoning by HPLC with creatinine correction, *Food Additives and Contaminants*, 27(1), pp. 89-96.
44. O'Leary M.A., Schneider J.J., and Isbister G.K., 2004, Use of high performance liquid chromatography to measure tetrodotoxin in serum and urine of poisoned patients, *Toxicon*, 44(5), pp. 549-553.
45. Đào Việt Hà, Phạm Xuân Kỳ, Nguyễn Phương Anh, Phan Bảo Vy. Đặng Quốc Minh, 2013, Độc tính Tetrodotoxin ở ốc hương *Babylonia*

areolata (Link, 1807) nuôi bằng thức ăn chế biến từ cá nóc độc, *Kỷ yếu hội nghị Quốc tế “Biển Đông 2012,”* tr. 432-441.

46. Hà Đ.V. and Sato S., 2013, Độc tính Tetrodotoxin trong sản phẩm nước mắm chế biến từ cá nóc độc chám cam *Torquigener gloerfelti*, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Biển*, 13(3), tr. 263–267.

47. Shoji Y., Yotsu-Yamashita M., Miyazawa T., Yasumoto T., 2001, Electrospray ionization mass spectrometry of tetrodotoxin and its analogs: liquid chromatography/mass spectrometry, tandem mass spectrometry, and liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Analytical Biochemistry*, 290(1), pp. 10–17.

48. Tsai Y.H., Hwang D.F., Cheng C.A., Hwang C.C., Deng J.F., 2006, Determination of tetrodotoxin in human urine and blood using C18 cartridge column, ultrafiltration and LC-MS, *Journal of Chromatography B*, 832(1), pp. 75–80.

49. Jen H.C., Nguyen T.A.T., Wu Y.J., Hoang T., Arakawa O., Lin W.F., Hwang D.F., 2014, Tetrodotoxin and paralytic shellfish poisons in gastropod species from Vietnam analyzed by high-performance liquid chromatography and liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Journal of Food and Drug Analysis*, 22(2), pp. 178–188.

50. Jen H.C., Lin S.J., Tsai Y.H., Chen C.H., Lin Z.C., Hwang D.F., 2008, Tetrodotoxin poisoning evidenced by solid-phase extraction combining with liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, 871(1), pp. 95–100.

51. Jang J.H., Lee J.S., and Yotsu-Yamashita M., 2010, LC/MS analysis of tetrodotoxin and its deoxy analogs in the marine puffer fish *Fugu niphobles* from the southern coast of Korea, and in the brackishwater puffer fishes *Tetraodon nigroviridis* and *Tetraodon biocellatus* from Southeast Asia, *Marine Drugs*, 8(4), pp. 1049–1058.

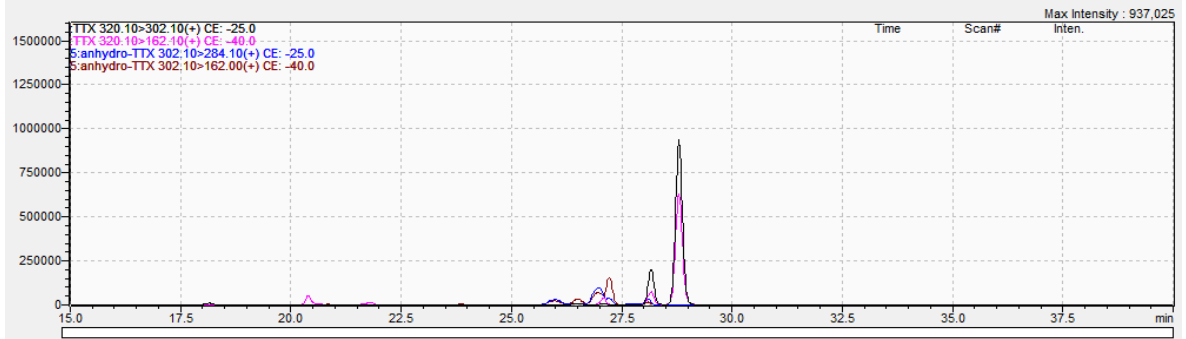
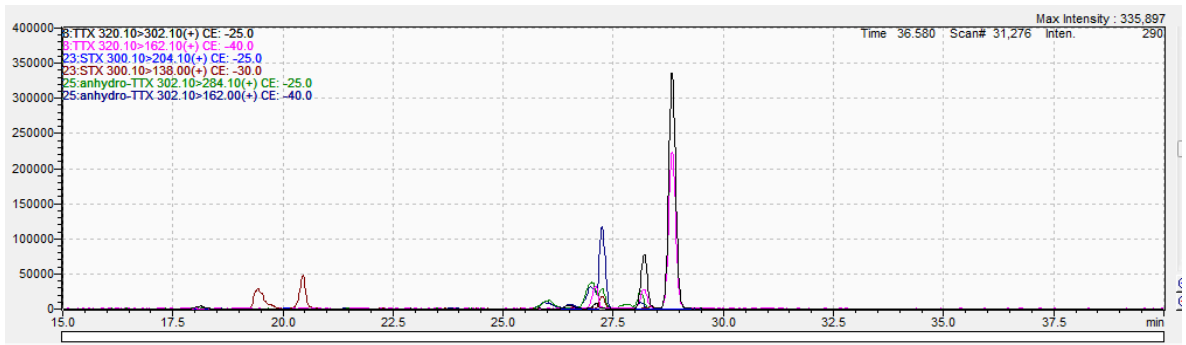
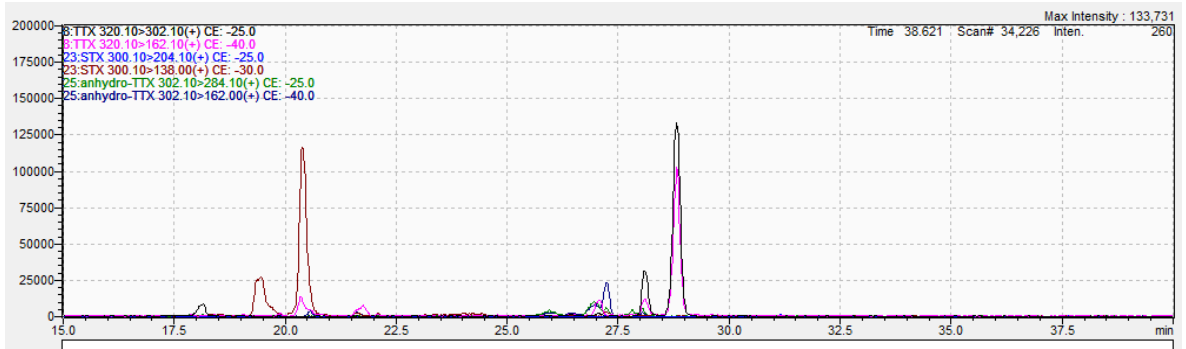
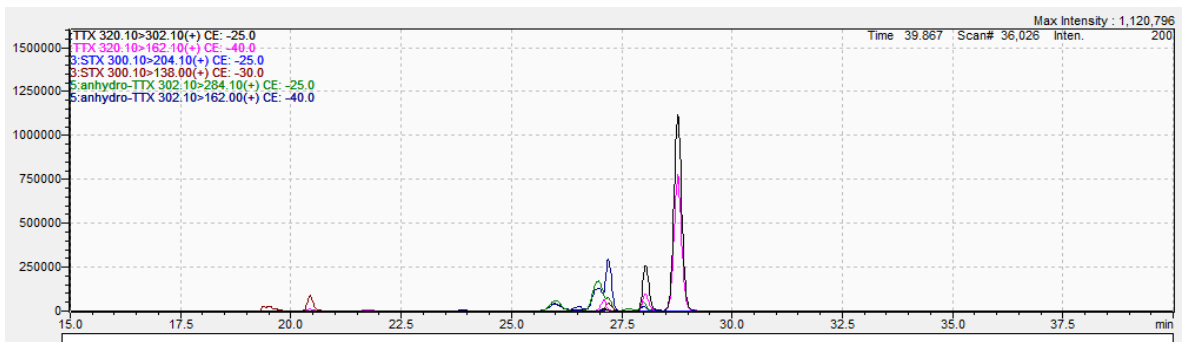
52. Tissue B., 2013, *Basics of Analytical Chemistry and Chemical Equilibria*, John Wiley & Sons, Canada.

53. Boundy M.J., Selwood A.I., Harwood D.T., McNabb P.S., Tuner A.D., 2015, Development of a sensitive and selective liquid chromatography–mass spectrometry method for high throughput analysis of paralytic shellfish toxins using graphitised carbon solid phase extraction, *Journal of Chromatography A*, 1387, pp. 1–12.

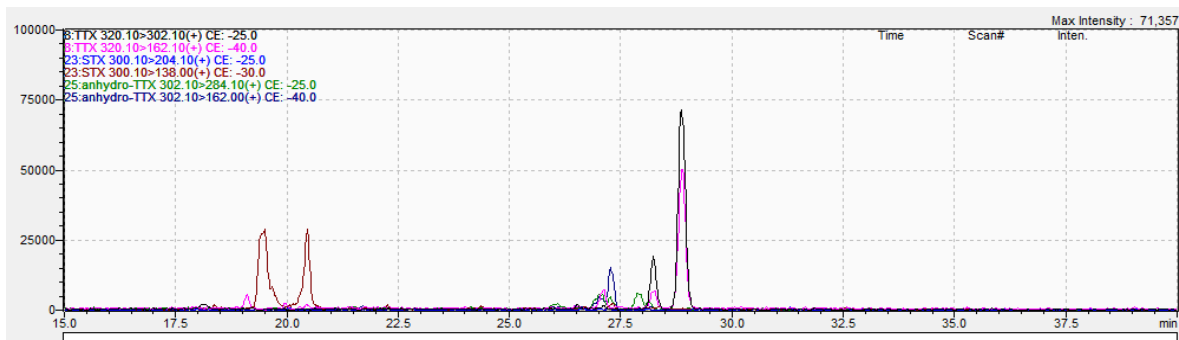
54. Hu C., Zhang Y., Zhou Y., Wang Z.H., Feng X., 2022, Tetrodotoxin and Its Analogues in Food: Recent Updates on Sample Preparation and Analytical Methods Since 2012, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(39), pp.12249-12269.

55. Xin L., Liang Y., Yang S., Jiang F., Yu F., Zhang M., Chang W., Yu C., Liu G., Lu Y., 2022, Simple and fast determination of tetrodotoxin in human plasma based on hydrophilic-interaction/ion-exchange mixed-mode solid phase extraction combined with liquid chromatography-tandem mass spectroscopy, *Journal of Chromatography A*, 1684, pp. 463-567.
56. AOAC, 2016, Guideline for Standard Method Performance Requirements, pp. 1 – 6
57. Turner A.D., Boundy M.J., and Rapkova M.D., 2017, Development and Single-Laboratory Validation of a Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Method for Quantitation of Tetrodotoxin in Mussels and Oysters, *Journal of AOAC International*, 100(5), pp. 1469–1482.
58. Boente-Juncal A., Otero P., Rodríguez I., Botana L.M., 2020, Oral Chronic Toxicity of the Safe Tetrodotoxin Dose Proposed by the European Food Safety Authority and Its Additive Effect with Saxitoxin, *Toxins (Basel)*, 12(5), pp. 312.

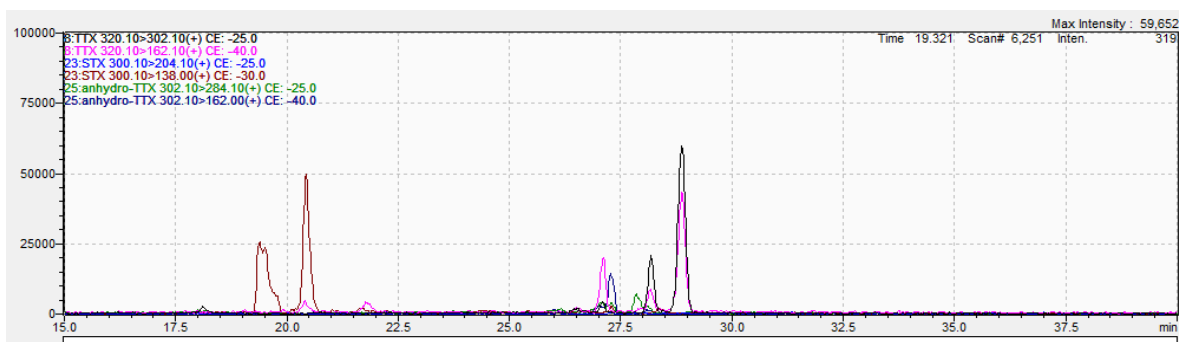
PHỤ LỤC

Phụ lục 1. Sắc ký đồ LC-MS/MS phân tích các mẫu ốc *N. glans*Sắc ký đồ mẫu *N.glans* 7Sắc ký đồ mẫu *N.glans* 8Sắc ký đồ mẫu *N.glans* 12Sắc ký đồ mẫu *N.glans* 14

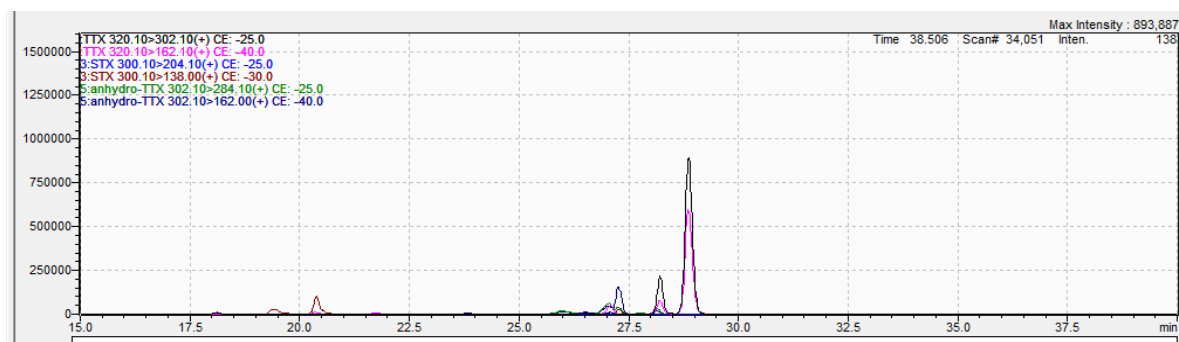
Phụ lục 2. Sắc ký đồ LC-MS/MS phân tích các mẫu ốc *N. papillosus*



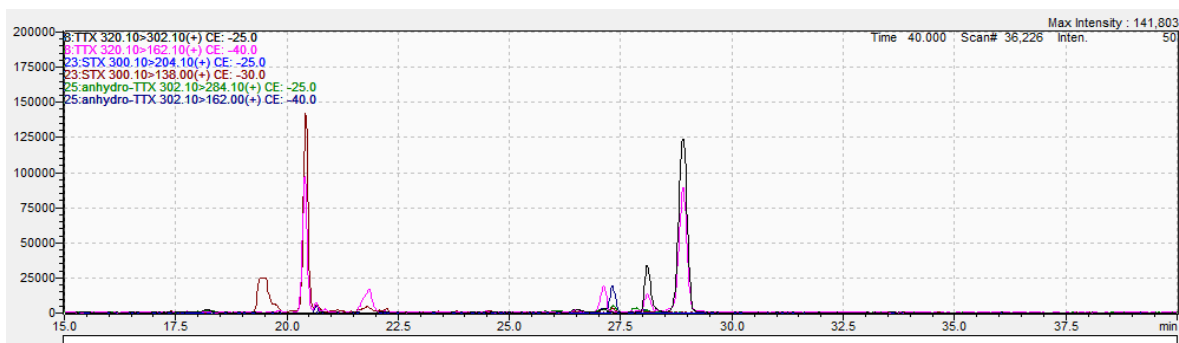
Sắc ký đồ mẫu *N. papillosus* 9



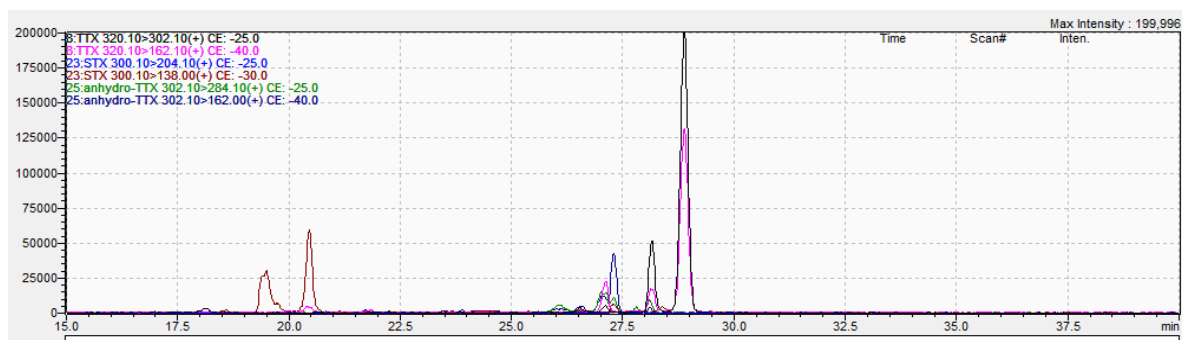
Sắc ký đồ mẫu *N. papillosus* 11



Sắc ký đồ mẫu *N. papillosus* 12



Sắc ký đồ mẫu *N. papillosus* 13



Sắc ký đồ mẫu *N. papillosus* 19