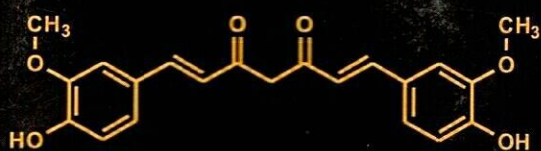


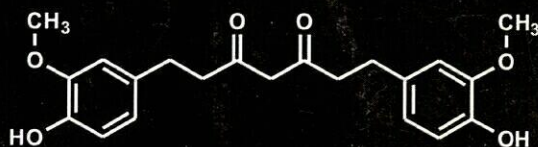
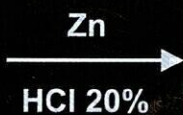
tap chí

DƯỢC HỌC

SỐ 466 * NĂM THỨ 55 * THÁNG RA 1 KỶ * ISSN 0866 - 7861



Curcumin



Tetrahydrocurcumin



Curcuma longa L.
Họ gừng - Zingiberaceae



BỘ Y TẾ XUẤT BẢN

Địa chỉ Tòa soạn: 138A Giảng Võ - Hà Nội

Tel: 043.8461430 - 043.7368367

E-mail: tapchiduoc@yahoo.com

NGHIÊN CỨU - KỸ THUẬT

- NGUYỄN VĂN QUÂN VÀ CS: Đánh giá kỹ năng thực hành của nhân viên nhà thuốc đạt nguyên tắc, tiêu chuẩn GPP trên địa bàn tỉnh Thanh Hóa giai đoạn 2012 - 2014 2
- NGUYỄN THỊ KIM CHI, PHẠM THỊ HƯƠNG LÝ, HOÀNG THỊ KIM HUYỀN, KHU THỊ KHÁNH DUNG, ĐÀO MINH TUẤN, TRẦN THỊ CHI MAI: Ứng dụng mô phỏng Monte Carlo trong lựa chọn liều dùng amikacin cho trẻ em dưới 1 tuổi tại Bệnh viện Nhi trung ương 7
- CAO CÔNG KHÁNH, NGUYỄN TƯỜNG VY: Nghiên cứu các điều kiện phân tích dư lượng 14 chất nhóm quinolon trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi bằng kỹ thuật LC-MS/MS 12
- LŨ THIÊN PHÚC, TRẦN VĂN MƯỜI, NGUYỄN TẤN ĐẠT, ĐỖ CHÂU MINH VĨNH THỌ, ĐẶNG VĂN TỊNH, NGUYỄN ĐỨC TUẤN: Thiết lập chất đối chiếu captopril disulfid và xây dựng qui trình HPLC định lượng tạp chất captopril disulfid trong nguyên liệu và chế phẩm captopril 18
- VŨ BÌNH DƯƠNG, PHẠM VĂN HIẾN: Xây dựng phương pháp định lượng tồn dư acid 2,4-dichlorophenoxy acetic trong chỉ thực bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao 24
- NGUYỄN QUỐC HUY: Xây dựng phương pháp định lượng oxostephanin bằng HPTLC và định lượng một số mẫu củ, lá loài *Stephania dielsiana* Y. C. Wu trồng tại Ba Vi (Hà Nội) 29
- NGUYỄN THỊ PHƯỢNG, NGUYỄN THỊ VÂN, NGUYỄN VĂN HẢI, NGUYỄN VĂN HÂN, NGUYỄN ĐÌNH LUYỆN: Nghiên cứu bán tổng hợp tetrahydrocurcuminoid từ nguồn curcuminoid chiết xuất trong nước và thử hoạt tính chống oxy hóa của chúng 33
- PHẠM THỊ NGUYỆT HẰNG, ĐỖ THỊ PHƯƠNG, NGUYỄN VĂN TÀI: Độc tính cấp và bán trường diễn (30 ngày) của clopidogrel bisulfat tổng hợp tại Việt Nam 37
- TRẦN HỮU GIÁP, VÂN THỊ MỸ HUỆ, CAO THỊ HUỆ, NGUYỄN THỊ MINH HẰNG, NGUYỄN VĂN HÙNG, CHÂU VĂN MINH, LÊ NGUYỄN THÀNH: Nghiên cứu tổng hợp thuốc ức chế bơm proton omeprazol 42
- PHẠM HẢI THANH TÙNG, PHÙNG THANH HƯƠNG, TRẦN VĂN ƠN: Nghiên cứu đa dạng di truyền của loài *Gymnema latifolium* Wall. ex Wight dựa trên trình tự vùng phiên mã nội của ADN ribosom nhân 45
- VÕ THỊ MỸ HƯƠNG, TRƯƠNG PHƯƠNG: Tổng hợp và thử hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm của một số dẫn chất 5-arylidene-2-(2'-fluorophenylimino) thiazolidin-4-on 49
- TRẦN VIỆT HÙNG, DƯƠNG MINH TÂN, PHÙNG MINH DŨNG, NGUYỄN TIẾN VŨNG: Định lượng nguyên liệu tetrodotoxin phân lập từ các loài họ cá nóc (Tetraodontidae) bằng sắc ký lỏng ghép nối khối phổ (LC-MS/MS) 57
- PHẠM QUỐC TUẤN, NGUYỄN MINH KHÔI, MINKYUN NA, NGUYỄN THÙY DƯƠNG, HÀ HƯƠNG LAN, PHƯƠNG THIÊN THƯƠNG: Nghiên cứu tác dụng chống viêm và giảm đau của cao phần dưới mặt đất cây lạc tân phụ 62

RESEARCH - TECHNIQUES

- NGUYỄN VĂN QUÂN ET AL.: Professional skills with regard to the GPP of drugstore pharmaceutical staff in Thanh Hoa Province during 2012 – 2014 2
- NGUYỄN THỊ KIM CHI, PHẠM THỊ HƯƠNG LÝ, HOÀNG THỊ KIM HUYỀN, KHU THỊ KHÁNH DUNG, ĐÀO MINH TUẤN, TRẦN THỊ CHI MAI: Establishment of appropriate dosage of amikacin for pediatric patients aged under 1 of the National Pediatric Hospital (Hanoi, SRV) by Monte Carlo Simulation 7
- CAO CÔNG KHÁNH, NGUYỄN TƯỜNG VY: Analysis of 14 residual quinolone compounds in human foods and animal husbandry foodstuffs by LC-MS/MS 12
- LŨ THIÊN PHÚC, TRẦN VĂN MƯỜI, NGUYỄN TẤN ĐẠT, ĐỖ CHÂU MINH VĨNH THỌ, ĐẶNG VĂN TỊNH, NGUYỄN ĐỨC TUẤN: Establishment of captopril disulfide reference standard and development of an HPLC method for quantitative determination of captopril disulfide related compounds in raw captopril materials and pharmaceuticals 18
- VŨ BÌNH DƯƠNG, PHẠM VĂN HIẾN: Quantification of 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid residue in *Fructus Aurantii immaturus* by HPLC 24
- NGUYỄN QUỐC HUY: An HPTLC method for quantitative determination of oxostephanin in the roots and leaves of *Stephania dielsiana* Y. C. Wu collected in Ba Vi (Hanoi, SRV) 29
- NGUYỄN THỊ PHƯỢNG, NGUYỄN THỊ VÂN, NGUYỄN VĂN HẢI, NGUYỄN VĂN HÂN, NGUYỄN ĐÌNH LUYỆN: Semisynthesis and antioxidant activities of tetrahydrocurcuminoids from Vietnam's home-made curcuminoids 33
- PHẠM THỊ NGUYỆT HẰNG, ĐỖ THỊ PHƯƠNG, NGUYỄN VĂN TÀI: Acute and subchronic toxicity of the clopidogrel bisulfate recently synthesized in Vietnam 37
- TRẦN HỮU GIÁP, VÂN THỊ MỸ HUỆ, CAO THỊ HUỆ, NGUYỄN THỊ MINH HẰNG, NGUYỄN VĂN HÙNG, CHÂU VĂN MINH, LÊ NGUYỄN THÀNH: Study on synthesis of the proton pump inhibitor drug omeprazol 42
- PHẠM HẢI THANH TÙNG, PHÙNG THANH HƯƠNG, TRẦN VĂN ƠN: Genetic study on the biodiversity of *Gymnema latifolium* Wall. ex Wight by analysis of rDNA internal transcribed spacer sequences 45
- VÕ THỊ MỸ HƯƠNG, TRƯƠNG PHƯƠNG: Synthesis and antibacterial, anti-fungal bioactivity of some derivatives of 5-arylidene-2-(2'-fluorophenylimino) thiazolidin-4-on 49
- TRẦN VIỆT HÙNG, DƯƠNG MINH TÂN, PHÙNG MINH DŨNG, NGUYỄN TIẾN VŨNG: Quantitative determination of tetrodotoxin in its raw materials from puffer fishes (Tetraodontidae) by liquid chromatography - mass spectrometry (LC-MS/MS) 57
- PHẠM QUỐC TUẤN, NGUYỄN MINH KHÔI, MINKYUN NA, NGUYỄN THÙY DƯƠNG, HÀ HƯƠNG LAN, PHƯƠNG THIÊN THƯƠNG: Anti-inflammatory and analgesic property of the extracts from the underground parts of *Astilbe rivularis* 62

Định lượng nguyên liệu tetrodotoxin phân lập từ các loài họ cá nóc (Tetraodontidae) bằng sắc ký lỏng ghép nối khối phổ (LC-MS/MS)

Trần Việt Hùng^{1*}, Dương Minh Tân¹, Phùng Minh Dũng², Nguyễn Tiến Vững³

¹ Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

² Công ty CP Dược TW Mediplantex

³ Viện Pháp y Quốc gia

*E-mail: tran.viethung168@gmail.com

Summary

A chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS) procedure was developed for determination of tetrodotoxin materials from puffer fishes (Tetraodontidae). The analyte was chromatographed on a C8 column (250 x 4.6 mm, i.d., 5 μ m), with acetate buffer and methanol mixer at rate of 30 ÷ 70 as the mobile phase, flow rate of 500 μ l/min. The mass spectrometer was operated in the selected reaction monitoring (SRM) mode using the positive electrospray ionization (ESI) technique. The method was validated over the concentration range of 0.50 μ g.ml⁻¹ - 10 μ g.ml⁻¹ for tetrodotoxin. The linearity was quite satisfactory ($r = 0.9993$). Limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) were 10 ng.ml⁻¹ and 25 ng.ml⁻¹, respectively. The recovery was > 98%. The sample preparation and analysis process were simple and time-saving. For the studied samples, the content of tetrodotoxin in the materials was 98.3%, and as such, the materials were appropriate for use to establish tetrodotoxin reference standard.

Keywords: Tetrodotoxin, puffer fish, LC-MS/MS, liquid chromatography mass spectrometry.

Đặt vấn đề

Tetrodotoxin (TTX) là một trong những chất độc thần kinh mạnh nhất được biết đến. Hợp chất này thể hiện chẹn kênh vận chuyển *natri* trong tế bào thần kinh, dẫn tới tê liệt thần kinh và tử vong [9]. TTX có trong một số loại sinh vật biển như: cua mặt quỷ, cóc Costa Rica, mực đốm xanh, sa giông California, và đặc biệt là trong cá nóc, là nguyên nhân hàng đầu gây ra những vụ ngộ độc cá nóc. Tuy nhiên, TTX đang được các nước trên thế giới, đặc biệt là Nhật Bản, Hàn Quốc và Trung Quốc, quan tâm nghiên cứu ứng dụng trong y dược để chữa một số bệnh hiểm nghèo như bệnh tim mạch, giảm đau trong ung thư, cai nghiện ma túy ...vv. Ở Việt Nam, một số tổ chức, cá nhân cũng nghiên cứu [2, 3, 14] và ứng dụng TTX trong một số bài thuốc hỗ trợ giảm đau, cai nghiện; tuy nhiên, hiện nay các tác giả vẫn đang tiếp tục nghiên cứu để có thông tin đầy đủ về độc tính cũng như về hiệu quả điều trị trên lâm sàng. Để đáp ứng nhu cầu kiểm

tra, đánh giá chất lượng và độ an toàn các sản phẩm chứa độc tố từ cá nóc, cần phải có chất đối chiếu hóa học TTX. Chúng tôi đã thực hiện nghiên cứu chiết xuất, phân lập và tinh chế TTX đạt độ tinh khiết cao ($\geq 95\%$) từ cá nóc để làm chất chuẩn đối chiếu hóa học phục vụ các nghiên cứu ứng dụng TTX trong y học. Do TTX là một chất có hoạt lực sinh học cao và giá trị rất cao, thường chỉ đóng lọ chuẩn 1 mg/lọ, do đó cần phải có phương pháp định tính và định lượng có độ nhạy, độ chính xác và độ đặc hiệu cao để đánh giá nguyên liệu TTX phân lập từ cá nóc cũng như để xác định hàm lượng chuẩn sau khi thiết lập. Phương pháp LC-MS/MS hiện nay đang được ứng dụng nhiều với những ưu điểm vượt trội như độ đặc hiệu cao, độ nhạy tốt, ... Vì vậy, chúng tôi đặt vấn đề nghiên cứu "Định lượng nguyên liệu tetrodotoxin phân lập từ các loài họ cá nóc (Tetraodontidae) bằng phương pháp sắc ký lỏng ghép nối khối phổ LC-MS/MS".

● Nghiên cứu - Kỹ thuật

Nguyên liệu, thiết bị và phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu

Mẫu nghiên cứu TTX được chiết xuất, phân lập và tinh chế từ cá nóc, số lô: TTX-NC01.13, do nhóm nghiên cứu Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương thực hiện.

Hoá chất, thuốc thử

Chất chuẩn tetrodotoxin (Sigma Aldrich, 1 mg tetrodotoxin và 5 mg đệm citrat pH 4,8/lọ, hàm lượng: 99,0 %, Lot. N°: 038K1804. Khi thêm 1 ml nước sẽ có dung dịch tetrodotoxin trong đệm pH 4,8 nồng độ 1 mg/ml); Dung môi tinh khiết dùng cho LC-MS/MS: methanol tinh khiết sắc ký (Merck), nước cất siêu tinh khiết; Hoá chất khác: acid acetic băng, amoni acetat.

Thiết bị, điều kiện sắc ký

Cân phân tích Mettler MS105 có độ nhạy 0,01 mg, micro pipette Eppendorf 100 μ L – 1000 μ L; Máy sắc ký lỏng khối phổ tandem MS (Thermo Scientific TSQ Quantum Ultra); Cột sắc ký: Alltech Apollo C₈ (250 x 4,6 mm; 5 μ m); Pha động: đệm acetat – methanol (30:70) (pha dung dịch đệm acetat: dung dịch amoni acetat 15 mM, acid acetic 15 mM); Tốc độ dòng: 500 μ L/phút; Thể tích tiêm: 10 μ L; Điều kiện khối phổ: Nguồn ESI với chế độ ion dương, khí Sheath Gas (SG): 20, khí hỗ trợ Auxiliary Gas (AG): 10, thế ion hóa: 3200 V, nhiệt hóa hơi: 200°C, nhiệt độ mao quản: 360°C, chế độ quét SRM: m/z = 320 → 162 với mức năng lượng va chạm Collision Energy = 32 V.

Chuẩn bị mẫu

Dung dịch chuẩn tetrodotoxin: Pha dung dịch chuẩn gốc 200 μ g.ml⁻¹ (C0): Thêm 1,0 ml nước vào lọ chuẩn, lắc kỹ để hoà tan hoàn toàn 1 mg chuẩn tetrodotoxin; Dùng micropipette với đầu cole 0,5 ml hút toàn bộ dung dịch chuẩn này vào bình định mức 5,0 ml, tráng lọ chuẩn và chuyển vào bình định mức nhiều lần bằng nước, và thêm nước vừa đủ 5,0 ml thu được dung dịch chuẩn gốc C0. Bảo quản dung dịch chuẩn gốc ở nhiệt độ \leq 4°C. Từ dung dịch chuẩn gốc C0, pha dãy các dung dịch chuẩn 10,0 μ g.ml⁻¹; 5,0 μ g.ml⁻¹; 2,5 μ g.ml⁻¹; 1,0 μ g.ml⁻¹; 0,5 μ g.ml⁻¹ và 0,1 μ g.ml⁻¹ trong pha động, trong quá trình thực nghiệm, các dung dịch chuẩn này được bảo quản trong tủ lạnh nhiệt độ \leq 4°C. Cách pha dãy dung dịch chuẩn được ghi trong bảng 1.

Bảng 1: Cách pha dãy các dung dịch chuẩn

Dung dịch chuẩn	C1	C2	C3	C4	C5	C6
Dung dịch chuẩn trung gian	C0	C0	C1	C1	C1	C1
Số ml chuẩn trung gian	0,5	0,25	1,25	0,5	0,25	0,05
V bình định mức (ml)	10,0	10,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Nồng độ thu được (μ g.ml ⁻¹)	10	5	2,5	1,0	0,5	0,1

Dung dịch thử (A): Cân chính xác khoảng 2,50 mg nguyên liệu TTX cho vào bình định mức 10,0 ml, thêm khoảng 7 ml pha động, lắc kỹ trong 10 phút, thêm pha động vừa đủ đến vạch, lắc đều. Hút 1,0 ml dung dịch này vào bình định mức 10,0 ml, pha loãng vừa đủ với pha động, lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,45 μ m, thu được dung dịch thử A. Nồng độ dung dịch A là 25 μ g.ml⁻¹.

Dung dịch thử (B): Hút 1 ml dung dịch A vào bình định mức 10,0 ml, pha loãng vừa đủ với pha động, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 μ m thu được dung dịch thử (B). Nồng độ dung dịch B là 2,5 μ g.ml⁻¹.

Dung dịch thử (C): Hút 0,25 ml dung dịch A và 0,375 ml dung dịch chuẩn C1 vào bình định mức 5,0 ml, thêm pha động vừa đủ đến vạch, lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

Dung dịch thử (D): Hút 0,25 ml dung dịch A và 0,625 ml dung dịch chuẩn C1 vào bình định mức 5,0 ml, thêm pha động vừa đủ đến vạch, lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

Dung dịch (E): Hút 0,25 ml dung dịch A và 0,875 ml dung dịch chuẩn C1 vào bình định mức 5,0 ml, thêm pha động vừa đủ đến vạch, lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

Tiến hành: Tiêm lần lượt các dung dịch chuẩn theo dãy để xây dựng đường chuẩn; Xác định giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ); Tiêm các dung dịch loãng dần nồng độ, đến khi pic thu được có tỷ số nhiễu đường nền S/N \approx 3. Tại mức nồng độ này chính là giới hạn phát hiện (LOD) của phương pháp. Với giới hạn định lượng (LOQ), mức nồng độ cho tỷ số nhiễu đường nền S/N \approx 10. Tiêm lần lượt các dung dịch thử B để đánh giá độ đặc hiệu và định lượng, các dung dịch thử C, D và E để khảo sát đánh giá độ đúng của phương pháp phân tích.

Kết quả

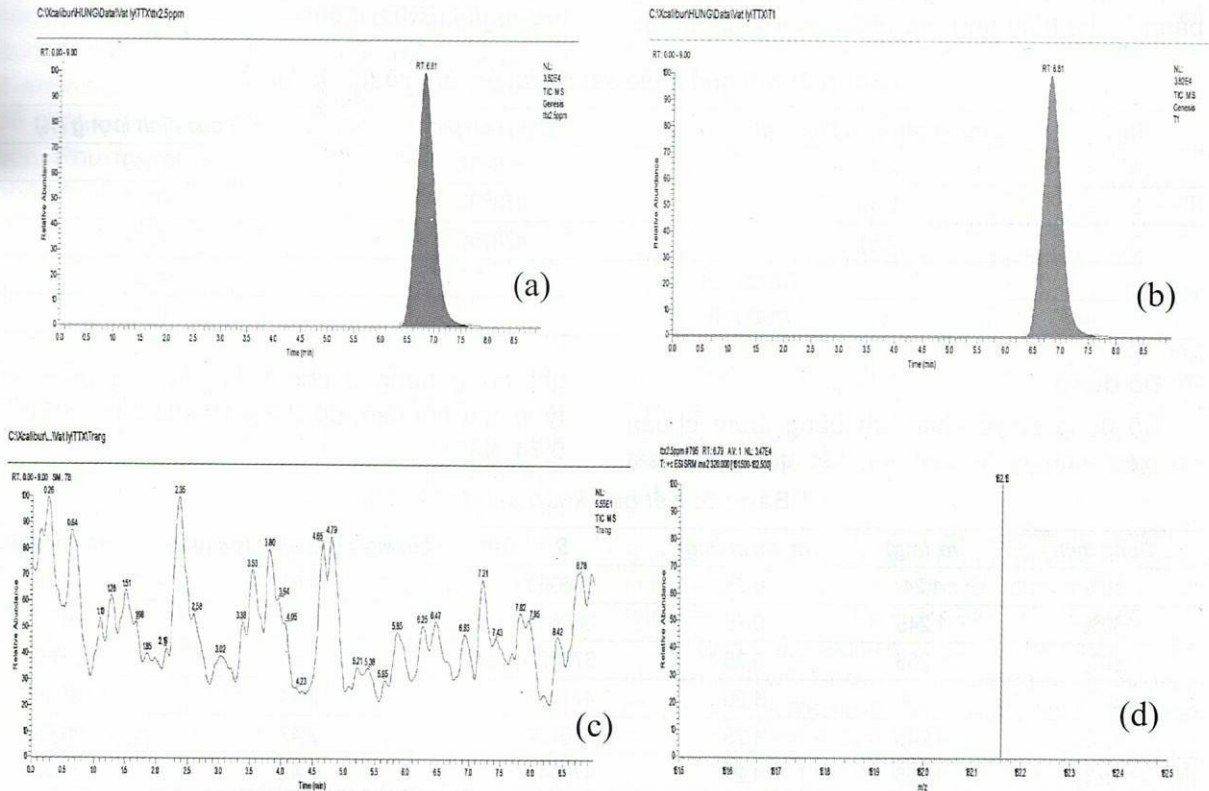
Độ đặc hiệu

Độ đặc hiệu được xác định bằng cách tiêm

● Nghiên cứu - Kỹ thuật

dung dịch trắng, dung dịch chuẩn 2,5 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, và

dung dịch thử. Sắc ký đồ được ghi trong hình 1.

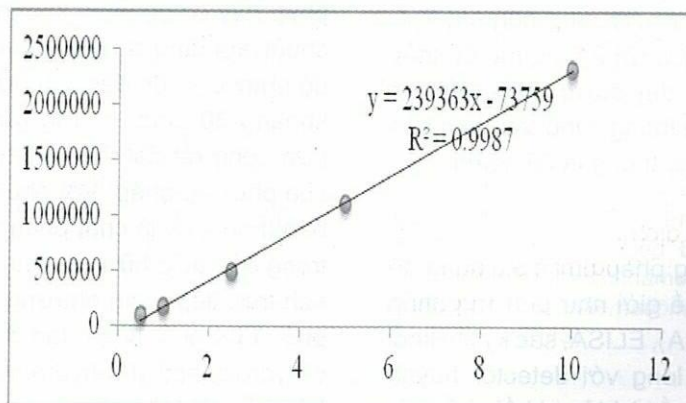


Hình 1: Sắc ký đồ dung dịch chuẩn TTX nồng độ 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (a), dung dịch thử B (b), dung dịch trắng (c) và mảnh phổ SRM $m/z = 320 - 162$ đặc trưng của TTX để định lượng (d)

Với chương trình sắc ký đã chọn, pic của TTX thu được cân đối, thời gian lưu ổn định ($t_r = 6,8$ phút), thời gian chạy mẫu 10 phút. Trên sắc ký đồ của mẫu thử có pic chính có thời gian lưu, phổ MS giống với thời gian lưu và phổ MS của pic chuẩn tương ứng trên sắc ký đồ của mẫu chuẩn. Phổ SRM $m/z = 320 \rightarrow 162$ là đặc trưng cho TTX.

Độ tuyến tính

Kết quả phân tích cho thấy trong khoảng nồng độ khảo sát 0,5 – 10,0 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, có độ tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ và diện tích pic, với phương trình hồi quy $y = 239363x - 73759$, hệ số tương quan $r = 0,9993$



Hình 2: Đồ thị biểu diễn mối tương quan nồng độ TTX và diện tích pic

● Nghiên cứu - Kỹ thuật

Độ lặp lại của phương pháp

Kết quả định lượng và độ lặp lại ghi trong bảng 2 cho thấy phương pháp có độ lặp lại tốt.

Hàm lượng mẫu nguyên liệu TTX sản phẩm đề tài định lượng được là 98,27 % với độ lệch chuẩn tương đối (RSD) 0,69%.

Bảng 2: Kết quả khảo sát độ tuyến tính và độ lặp lại

Stt	Lượng cân mẫu thử (mg)	Diện tích pic	Kết quả định lượng (%)
1	2,48	466937	97,49
2	2,49	473893	98,55
3	2,51	478755	98,77
Trung bình			98,27
RSD (%)			0,69

Độ đúng

Độ đúng được khảo sát bằng thêm chuẩn và xác định tỷ lệ thu hồi, kết quả khảo sát

ghi trong bảng 3 cho thấy phương pháp có tỷ lệ thu hồi cao, độ đúng tốt (98,33%, RSD = 0,74 %).

Bảng 3: Kết quả khảo sát độ thu hồi

Dung dịch	m_1 (mg)	m_c thêm (mg)	S_1	Lượng TTX tính được (mg)	% thu hồi
80%	1,24	0,75	376038	1,95	97,85
80%	1,245	0,75	382611	1,98	99,31
80%	1,255	0,75	378023	1,96	97,63
100%	1,24	1,25	471083	2,44	97,96
100%	1,245	1,25	476732	2,47	98,94
100%	1,255	1,25	478046	2,48	98,82
120%	1,24	1,75	560840	2,90	97,13
120%	1,245	1,75	569380	2,95	98,44
120%	1,255	1,75	574077	2,97	98,92
Trung bình					98,33
RSD (%)					0,74

Giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng

Giới hạn phát hiện được xác định bằng phương pháp pha loãng dần dung dịch chuẩn C6 đến khi dung dịch chuẩn không có đáp ứng. Sau khi khảo sát ở điều kiện sắc ký đã chọn, ở nồng độ 10 ng/ml có tỷ số nhiễu đường nền $s/n = 4$. Pha loãng hơn nồng độ dưới 2,5 ng/mL thì thấy không còn đáp ứng nên đây được coi là giới hạn phát hiện (LOD) của hệ thống. Như vậy giới hạn định lượng (LOQ) của hệ thống là 25 ng/ml.

Bàn luận

Có rất nhiều phương pháp được sử dụng để định lượng TTX trên thế giới như phương pháp sinh hoá trên chuột (MBA), ELISA, sắc ký khí khối phổ (GC/MS), sắc ký lỏng với detector huỳnh quang (HPLC-FLD) và sắc ký lỏng khối phổ (LC/MS). Các phương pháp này đều có những ưu

nhược điểm riêng. Phương pháp sinh hoá trên chuột^[1,10] đã được chấp nhận trên toàn thế giới. Tuy nhiên, phương pháp này có nhược điểm là không đặc hiệu, bởi độc tố tetrodotoxin có nhiều dẫn chất cũng mang độc tính. Hơn nữa, phương pháp này có độ nhạy không cao, sử dụng nhiều chuột làm tăng chi phí. Phương pháp ELISA^[8] có độ nhạy cao, độ đặc hiệu tốt, thời gian phân tích khoảng 30 phút, nhưng giá của các kháng thể đơn dòng rất đắt, làm giảm khả năng ứng dụng của phương pháp. Với phương pháp sắc ký khí, bản thân TTX là chất phân cực tốt, chỉ tan được trong các acid hữu cơ yếu, nên không thể phân tích trực tiếp bằng phương pháp sắc ký khí khối phổ. TTX phải được tạo dẫn xuất với 2-amino-6-hydroxymethyl-8-hydroxyquinazolin hoặc BSTFA (N,O-bis-trimethylsilyl-trifluoroacetamid)^[5], MSTFA (N-methyl-N-TMS-trifluoroacetamid)^[6].

● Nghiên cứu - Kỹ thuật

Vì vậy, phương pháp này khá phức tạp, mất nhiều thời gian trong xử lý mẫu. Phương pháp sắc ký lỏng sử dụng detector huỳnh quang^[12], sử dụng NaOH đặc, nóng để tạo dẫn xuất sau cột với 2-amino-6-hydroxymethyl-8-hydroxyquinazolin để phát huỳnh quang làm kéo dài thời gian phân tích. Phương pháp LC/MS cũng đã được nhiều nhà phân tích sử dụng để định lượng TTX, tuy nhiên, đa phần đều sử dụng những cột đặc biệt như: cột C₃^[11], cột HILIC^[7,13]. Ở Việt Nam, các nghiên cứu định lượng TTX thường chỉ sử dụng phương pháp sinh hoá trên chuột như Viện Hải dương học Nha Trang, Viện Vắc xin và sinh phẩm y tế Nha Trang^[1] hoặc HPLC-FLD như nhóm nghiên cứu Viện Nghiên cứu Hải sản^[4], tuy nhiên, lại tiến hành tại phòng thí nghiệm ở Nhật Bản. Đây là lần đầu tiên xây dựng phương pháp định lượng TTX bằng sắc ký lỏng khối phổ, sử dụng cột sắc ký C₈ phổ biến, đơn giản, thời gian chạy mẫu chỉ khoảng 10 phút, đảm bảo độ đúng, độ đặc hiệu và độ tuyến tính để có thể ứng dụng định lượng TTX trong nguyên liệu.

Kết luận

Đã xây dựng được phương pháp định lượng tetrodotoxin bằng sắc ký lỏng khối phổ LC/MS/MS với độ đặc hiệu cao, khoảng tuyến tính rộng từ 0,5 - 10 µg.ml⁻¹, và độ đúng tốt (98,33%). Giới hạn phát hiện (LOD) của phương pháp là 10 ng/mL, giới hạn định lượng (LOQ) là 25 ng/mL. Tetrodotoxin chiết xuất, phân lập và tinh chế từ cá nóc đạt hàm lượng 98,27%, phù hợp để làm nguyên liệu thiết lập chất chuẩn phục vụ công tác nghiên cứu, kiểm nghiệm.

Tài liệu tham khảo

1. Lê Văn Hiệp, Nguyễn Ái Thường, Lâm Thành Hưng, Ngô Phú, Nguyễn Công Bảy (2007), "Bước đầu thử nghiệm tinh chế độc tố cá nóc", *Tạp chí Y học dự phòng*, 7 (92), 26-29.
2. Viện Công nghệ sinh học (2008) "Nghiên cứu tạo chế phẩm để sử dụng điều trị nghiện ma túy", *Đề tài KHCN cấp Viện, Lê Quang Huân- Viện Công nghệ sinh học chủ trì, Viện KHCN (2008 - 2010)*.
3. Lê Quang Huân, Đái Duy Ban, Phan Xuân Đạc (2010), "Cơ chế phân tử của chế phẩm Bahudo chứa tetrodotoxin (TTX) dùng trong hỗ trợ giảm đau và cai

nghiện ma túy", *Tạp chí Nghiên cứu Y học*, 71 (6), 131-134.

4. Nguyễn Văn Lệ, Nguyễn Hữu Hoàng, Bùi Thị Thu Hiền và cs (2006), "Kết quả phân tích độc tố cá nóc biển Việt Nam", *Tuyển tập Nghiên cứu nghề cá biển*, 4, 256-264.

5. Alcaraz A., R. E. Whipple, H. R. Gregg, B. D. Andresen, P. M. Grant (1998) "Analysis of tetrodotoxin", *Forensic Science International*, 99 (1999), 35-45.

6. Che Nin Man, Norjuliana Mohd Noor, Gam Lay Harn, Razak Lajis, Samsur Mohamad (2010), "Screening of tetrodotoxin in puffers using gas chromatography-mass spectrometry", *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010), 7455-7459.

7. Hsiao-Chin Jen, Shin-Jung Lin, Yung-Hsiang Tsai, Chun-Hsiang Che, Zu-Chun Lin, Deng-Fwu Hwang (2008), "Tetrodotoxin poisoning evidenced by solid-phase extraction combining with liquid chromatography-tandem mass spectrometry", *Journal of Chromatography B*, 871, 95-100.

8. Kawatsu K., Y. Hamano, T. Yoda, Y. Terano, T. Shibata (1997), "Rapid and highly sensitive enzyme immunoassay for quantitative determination of tetrodotoxin", *Jpn. J. Med. Sci. Biol.*, 50, 133-150.

9. Rong Chen, Shin-Ho Chung (2014), "Mechanism of tetrodotoxin block and resistance in sodium channels", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 446, 370-374.

10. Sabrah M. M., El-Ganainy, A. A, Zaky, M. A. (2006), "Biology and toxicity of the pufferfish *Lagocephalus sceleratus* (GMELIN, 1789) from the Gulf of Suez", *Egyptian journal of aquatic research*, 32 (1), 283-297.

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

12. Yasumoto T., T. Mitshita (1985) "Fluorometric determination of tetrodotoxin by high performance liquid chromatography". *Agric. Biol. Chem.*, 49, 3077-3080.

13. Zhang Xiu-Yao, Cai Xin-Xin (2009), "Rapid determination of tetrodotoxin in human urine and plasma using hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry", *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 37 (12), 1829-1833.

14. Trần Việt Hùng, Phùng Minh Dũng, Trần Minh Ngọc, Dương Minh Tân, Phạm Thanh Bình, Nguyễn Hoài Nam, Nguyễn Tiến Đạt (2014), "Tetrodotoxin Constituents in the Vietnamese Sea Pufferfish *Takifugu oblongus*", *The International Journal of Science & Technology*, 2 (13).

(Ngày nhận bài: 13/01/2015 - Ngày duyệt đăng: 03/02/2015)