

M



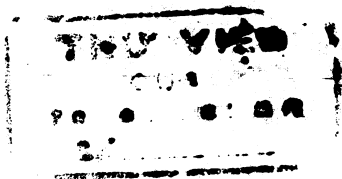
CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM

TIÊU CHUẨN VIỆT NAM

THỊT VÀ SẢN PHẨM CỦA THỊT

Phương pháp xác định dư lượng hoócmon
thyroxin

TCVN 5150-90



HÀ NỘI

Cơ quan biên soạn: Trung tâm kiểm dịch động vật xuất
nhập khẩu Hà nội

Cơ quan đề nghị ban hành:

Bộ Nông nghiệp và Công nghiệp thực phẩm

Cơ quan trình duyệt :

Tổng cục Tiêu chuẩn-Đo lường-Chất lượng

Cơ quan xét duyệt và ban hành:

Ủy ban Khoa học Nhà nước

Quyết định ban hành số 736/QĐ ngày 31 tháng 12
năm 1990

THỊT VÀ SẢN PHẨM THỊT	TCVN
Phương pháp xác định dư lượng hóc môn thyroxin	5150-90
Meat and meat products	Khuyến khích
Determination of thyroxin residues	áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp xác định hóc môn thyroxin tồn dư trong thịt và sản phẩm của thịt dùng làm thực phẩm cho người và thức ăn gia súc.

1. ĐẶC TÍNH CHUNG

Thyroxin tên hoá học là 3,3',5,5'-Tetra-Iodo-Tyroxin là một loại hóc môn. Trong thực phẩm (chủ yếu là thịt động vật) có chứa hàm lượng rất nhỏ chất này (thường từ cỡ nanôgam đến micrôgam). Để phân tích định lượng, trước hết phải chiết nó ra khỏi mẫu, sau đó xác định bằng các phương pháp phân tích có độ nhạy cao. Ngày nay để xác định thyroxin, người ta thường dùng phương pháp sắc ký lỏng cao áp (HPLC).

2. NGUYÊN TẮC

Sau khi xử lý mẫu, thyroxin được chiết vào dung dịch đậm phù hợp. Thí dụ đậm citrát - photphat. Lấy phần dung dịch này bơm vào hệ HPLC với chất nhồi (pha tĩnh) là nhựa RP - 8, RP - 18 hay Hypersil CDS. Khi đó, thyroxin bị hấp thụ trên chất nhồi trong cột sắc ký. Để tách và phân tích thyroxin, người ta rửa giải nó bằng hỗn hợp dung môi (pha động) gồm MeOH/H₂O với tỷ lệ 65/35 có thêm chất đệm và chất phụ gia axit propylic. Thyroxin ra khỏi cột sắc ký được phát hiện bằng détecto UV ở sóng 240 nm và nồng độ của nó được xác định theo phương pháp đường chuẩn.

3. LẤY MẪU

Theo TCVN 4833-89 (ST SEV 2433-80)

4. DỤNG CỤ, THIẾT BỊ VÀ HOÁ CHẤT

4.1. Dụng cụ, thiết bị :

- + Hệ máy HPLC với detector UV
- + Máy li tâm
- + Máy lắc
- + Phễu, chiết cỡ 250 ml
- + Bình định mức các loại
- + Pipét các loại
- + Cốc chịu nhiệt
- + Cột sắc ký loại 250 x 3,2 mm
- + Một vài dụng cụ khác

4.2. Hoá chất : dùng loại tinh khiết cho HPLC

- + Chất nhồi cột RP - 8 hay RP - 18 cỡ của $\varnothing = 5 - 7 \mu\text{m}$
- + Đệm citrát - photphat pH = 8 và 6,4
- + Natrihydro cacbonat (NaHCO_3), dung dịch 0,1 và 1 M
- + Thuốc thử Methanolic
- + Trifluoro acetic axit
- + Methanol (CH_3OH)
- + Nước cất 2 lần
- + Dung dịch gốc tiêu chuẩn của thyroxin nồng độ 1 mg/ml

5. CHUẨN BỊ THỬ

5.1. Chuẩn bị mẫu phân tích :

Mẫu thịt cần phân tích được thái nhỏ, nghiền mịn, trộn đều và cân một lượng bằng 10g cho vào bình nón. Thêm 15 ml dung dịch đệm citrát - photphat pH = 8. Đậy nút lại và lắc kỹ trong 30 phút. Lọc hay li tâm lấy dung dịch trong. Thêm 1 ml natrihydrocacbonat 0,1M và 2ml thuốc thử methanolic, lắc kỹ và để trong chậu nước đá trong 30 phút. Sau đó

làm bay hơi đến cạn ở 30 - 35°C. Thêm 0,5 ml trifluoroacetic axit, lắc nhẹ và để ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Sau đó trung hoà bằng 2 - 4 ml natrihydrocacbonat, dung dịch 1M. Ly tâm lấy kết tủa, hoà tan kết tủa này trong hỗn hợp methanol/ natrihydrocacbonat 0,1 M với tỷ lệ 1/1 (về thể tích) và định mức bằng nước cất đến 10 ml sau đó ly tâm lấy dung dịch trong bơm vào cột sắc ký để phân tích thyroxin.

5.2. Pha dãy dung dịch chuẩn :

Dùng dung dịch gốc tiêu chuẩn của thyroxin nồng độ 1 mg/ml, tính lấy lượng phù hợp để pha và định mức bằng nước cất đến 25 ml sao cho nồng độ thyroxin trong các bình định mức là 2 - 4 - 6 - 8 - 10 - 12 µg/ml.

5.3. Mẫu trắng :

Mẫu trắng phải được chuẩn bị cùng một điều kiện như mẫu phân tích nhưng không có mẫu phân tích, và vì vậy phải tiến hành làm đồng thời với mẫu phân tích.

5.4. Các điều kiện thực nghiệm :

- + Hệ thống HPLC với detector UV sóng đo 240 nm
- + Cột tách HPLC : 250 x 3,2 mm nhồi nhựa RP - 18 có cỡ hạt 5 - 7 µm Ø
- + Máy ghi pic sắc ký (recorder) có thể ghi 10 - 20 mV và tốc độ giấy là 5 - 10 mm/phút
- + Pha động : methanol/dung dịch đệm citrat-phốtphat pH-6 và tỷ lệ là 60/40 (về thể tích).
- + Tốc độ pha động : 1 ml/phút
- + Lượng mẫu bơm vào cột : 50 µl/lần thí nghiệm
- + Nhiệt độ thí nghiệm là 25°C
- + Các điều kiện khác chọn phù hợp với hệ HPLC.

6. TIẾN HÀNH THỬ

- + Đặt các thông số đã chọn ở mục 5.4 cho máy HPLC
- + Cho máy chạy, bơm pha động để ổn định cột tách và đường nền. Khi đường nền thẳng là được.
- + Bơm lần lượt các mẫu chuẩn, mẫu trắng rồi đến mẫu phân tích (mỗi mẫu bơm 3 lần lấy giá trị trung bình) vào cột tách và ghi pic sắc ký tương ứng.
- + Hiệu chỉnh giá trị của mẫu trắng (nếu có)
- + Dùng đường chuẩn theo hệ toạ độ H - C. Trong đó H là chiều cao của pic sắc ký tương ứng với các nồng độ C của mẫu chuẩn.
- + Xác định nồng độ Cx của mẫu phân tích theo đường chuẩn trên.

7. TÍNH KẾT QUẢ

Hàm lượng thyroxin, tính bằng dlg/g , trong mẫu phân tích được tính theo công thức sau :

$$C_0 = (C_x \cdot V) / a$$

Trong đó : a là lượng mẫu thật để phân tích (10g) và định mức trong thể tích V ml. Theo mục 5.1
- thì V = 10-ml. Cx là nồng độ thyroxin của dung dịch phân tích tìm được qua đường chuẩn.
