

中华人民共和国国家标准

GB/T 23217—2008

水产品中河豚毒素的测定 液相色谱-荧光检测法

Determination of tetrodotoxin in aquatic products—
HPLC-fluorescence detection method

2008-12-31 发布

2009-05-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

本标准的附录 A、附录 B、附录 C 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国秦皇岛出入境检验检疫局、中华人民共和国福建出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：杨方、钱疆、刘正才、林中、张云、林永辉、陈健、庞国芳。

水产品中河豚毒素的测定

液相色谱-荧光检测法

1 范围

本标准规定了水产品中河豚毒素测定的液相色谱测定方法与液相色谱-串联质谱确证方法。

本标准适用于河豚鱼、织纹螺、虾、牡蛎、花蛤、鱿鱼中河豚毒素的测定与确证。

本标准方法的检出限为 0.05 mg/kg。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 6379.1 测量方法与结果的准确度(正确度与精密度) 第1部分:总则与定义(GB/T 6379.1—2004,ISO 5725-1:1994,IDT)

GB/T 6379.2 测量方法与结果的准确度(正确度与精密度) 第2部分:确定标准测量方法重复性与再现性的基本方法(GB/T 6379.2—2004,ISO 5725-2:1994,IDT)

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法(GB/T 6682—2008,ISO 3696:1987,MOD)

3 原理

试样中含有的河豚毒素采用酸性甲醇提取,提取液浓缩后,过 C_{18} 固相萃取小柱净化,液相色谱-柱后衍生荧光法测定,液相色谱-串联质谱法确证,外标法定量。

4 试剂和材料

除非另有说明,所用试剂均为分析纯,水为 GB/T 6682 规定的一级水。

4.1 甲醇:色谱纯。

4.2 乙酸:色谱纯。

4.3 甲酸:色谱纯。

4.4 乙酸铵。

4.5 氢氧化钠。

4.6 庚烷磺酸钠。

4.7 1%乙酸甲醇溶液:移取 10 mL 乙酸,以甲醇稀释至 1 L。

4.8 1%乙酸溶液:移取 10 mL 乙酸,以水稀释至 1 L。

4.9 乙酸铵缓冲液:称取 4.6 g 乙酸铵和 2.02 g 庚烷磺酸钠,加入约 700 mL 水溶解,以乙酸调节 pH 值为 5.0,以水稀释至 1 L。

4.10 0.1%甲酸水溶液:移取 1 mL 甲酸,加水稀释至 1 L。

4.11 4 mol/L 氢氧化钠溶液:称取 160 g 氢氧化钠,以水溶解并稀释至 1 L。

4.12 河豚毒素标准物质(tetrodotoxin,分子式 $C_{11}H_{17}N_3O_8$,CAS 4368-28-9):纯度 $\geq 98\%$ 。

4.13 标准贮备液(100 mg/L):准确称取河豚毒素 10.0 mg,用少量水溶解后以甲醇定容至 100 mL,该标准贮备液置于 4℃ 冰箱中保存。

- 4.14 标准工作液:根据需要取适量标准贮备液,以0.1%甲酸水溶液+甲醇(9+1,体积比)稀释成适当浓度的标准工作液。标准工作液当天现配。
- 4.15 基质标准工作液:以空白基质溶液配制适当浓度的标准工作液。基质标准工作液要当天配制。
- 4.16 C_{18} 固相萃取柱,500 mg/3 mL,用前依次以3 mL 甲醇、3 mL 1%乙酸溶液(4.8)活化,保持柱体湿润。
- 4.17 滤膜:0.2 μm 。
- 4.18 离心超滤管,截留相对分子质量为3 000,1 mL。

5 仪器

- 5.1 液相色谱仪,带有荧光检测器与柱后衍生装置。
- 5.2 液相色谱-串联四极杆质谱仪,配有电喷雾离子源。
- 5.3 分析天平:感量0.1 mg和0.01 g。
- 5.4 组织捣碎机。
- 5.5 旋涡振荡器。
- 5.6 超声波发生器。
- 5.7 减压浓缩装置。
- 5.8 固相萃取装置。
- 5.9 真空泵:真空度应达到80 kPa。
- 5.10 微量注射器:1 mL~5 mL,100 μL ~1 000 μL 。
- 5.11 离心机:转速达4 000 r/min。
- 5.12 离心机:转速达13 000 r/min,配有酶标转子。
- 5.13 冷冻高速离心机:转速达到18 000 r/min,可致冷4 $^{\circ}\text{C}$ 。
- 5.14 K-D浓缩瓶:100 mL与25 mL。

6 试样的制备与保存

制样操作过程中应防止样品受到污染或发生残留物含量的变化。由于河豚毒素为剧毒物质,对于可能含有河豚毒素的产品,应避免直接接触或误食,相关的器皿和器具可以采用4%碳酸钠溶液浸泡加热去毒处理。

6.1 试样制备

从所取全部样品中取出有代表性样品的可食部分约500 g,切成小块,放入组织捣碎机均质,充分混匀,装入清洁容器内,并标明标记。

6.2 试样保存

试样于-18 $^{\circ}\text{C}$ 以下保存,新鲜或冷冻的组织样品可在2 $^{\circ}\text{C}$ ~6 $^{\circ}\text{C}$ 贮存72 h。

7 测定步骤

7.1 提取

称取5.00 g匀浆样品置于50 mL聚丙烯离心管中,加入20 mL 1%乙酸甲醇溶液(4.7),旋涡振荡2 min,50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴超声提取20 min,4 000 r/min离心5 min,取上清液,在残渣中再加入20 mL 1%乙酸甲醇溶液,重复以上步骤,合并上清液,过滤至100 mL K-D浓缩瓶中,60 $^{\circ}\text{C}$ 旋转蒸发浓缩至近干,加入2 mL 1%乙酸溶液(4.8),振荡洗涤浓缩瓶,转移至10 mL聚丙烯离心管中,4 $^{\circ}\text{C}$ 下于18 000 r/min离心10 min,取上清液待净化。

7.2 净化

将7.1所得的澄清溶液以约1 mL/min的流速过柱,用10 mL 1%乙酸溶液(4.8)洗脱,合并流出液

与洗脱液,置于 25 mL K-D 浓缩瓶中,于 60 °C 下减压浓缩至近干,用 1% 乙酸溶液(4.8)定容 1 mL,过 0.2 μm 滤膜,供液相色谱分析。进行液相色谱-串联质谱确证时,将样液装入离心超滤管中,13 000 r/min 离心 15 min,取滤液测定。

7.3 空白基质溶液的制备

称取阴性样品 5.00 g,按 7.1 和 7.2 操作。

7.4 测定条件

7.4.1 液相色谱参考条件

- 色谱柱:Purospher Star PR-18e C₁₈ 柱,5 μm,250 mm×4.6 mm(内径)或相当者;
- 柱温:30 °C;
- 流动相:乙腈-乙酸铵缓冲液(4.9)(1+19);
- 流速:1.0 mL/min;
- 激发波长:385 nm,发射波长:505 nm;
- 进样量:40.0 μL。

7.4.2 柱后衍生参考条件

- 衍生溶液:4 mol/L 氢氧化钠溶液(4.11);
- 衍生溶液流速:0.5 mL/min;
- 衍生管温度:110 °C。

7.4.3 色谱测定

根据试样中被测物的含量情况,选取响应值适宜的标准工作液进行色谱分析。标准工作液和待测样液中河豚毒素的响应值应在仪器线性响应范围内。标准工作液与待测样液等体积进样。在上述色谱条件下,河豚毒素的参考保留时间为 10.3 min,根据标准溶液色谱峰的保留时间和峰面积,对样液的色谱峰进行定性并外标法定量。标准品高效液相色谱图参见图 A.1。

7.5 确证

7.5.1 液相色谱-串联质谱条件

- 色谱柱:Atlantis™ HILIC Silica¹⁾ 3 μm,150 mm×2.1 mm(内径)或相当者;
- 流动相:乙腈-0.1%甲酸溶液(4.10)(17+8);
- 柱温:30 °C;
- 进样量:10 μL;
- 流速:200 μL/min;
- 离子源:电喷雾源 ESI,正离子模式;
- 扫描方式:多反应监测(MRM);
- 离子源温度:500 °C;
- 雾化气、气帘气、辅助加热气、碰撞气均为高纯氮气及其他合适气体;使用前应调节各气体流量以使质谱灵敏度达到检测要求;
- 仪器工作所需电压值应优化至最优灵敏度;
- 定性离子对、定量离子对、碰撞池出口电压和碰撞气能量见表 1。

表 1 定性离子对、定量离子对、碰撞池出口电压和碰撞气能量

化合物中文名称	化合物英文名称	定性离子对(<i>m/z</i>)	定量离子对(<i>m/z</i>)	碰撞气能量/V	碰撞池出口电压/V
河豚毒素	tetrodotoxin	320/302	320/162	30	60
		320/162		30	60

1) Atlantis™ HILIC Silica 色谱柱是 Waters 公司产品的商品名称,给出这一信息是为了方便本标准的使用者,并不是表示对该产品的认可。如果其他等效产品具有相同的效果,则可使用这些等效产品。

7.5.2 液相色谱-串联质谱确证

将基质标准工作液和 7.2 中所得滤液(必要时用乙腈稀释至适当浓度)用 LC-MS/MS 测定。如果样液中与标准工作液相同的保留时间有检测离子峰出现,则对其进行质谱确证。河豚毒素标准溶液的液相色谱-串联质谱图参见图 B.1。

7.5.3 定性标准

7.5.3.1 保留时间

待测样品中化合物色谱峰的保留时间与标准溶液相比变化范围应在±2.5%之内。

7.5.3.2 信噪比

待测化合物的定性离子的重构离子色谱峰的信噪比应大于等于 3($S/N \geq 3$)。

7.5.3.3 定量离子、定性离子及子离子丰度比

每种化合物的质谱定性离子必须出现,至少应包括一个母离子和两个子离子,而且同一检测批次,对同一化合物,样品中目标化合物的两个子离子的相对丰度比与浓度相当的标准溶液相比,其允许偏差不超过表 2 规定的范围。

表 2 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差 %

相对离子丰度 K	$K > 50$	$20 < K < 50$	$10 < K < 20$	$K \leq 10$
允许的相对偏差	±20	±25	±30	±50

7.6 平行试验

按以上步骤,对同一试样进行平行试验测定。

7.7 回收率试验

在阴性样品中添加适量标准溶液,按 7.1 和 7.2 操作,测定后计算样品添加的回收率。河豚毒素的添加浓度及其回收率范围的试验数据参见表 C.1。

8 结果计算

用数据处理软件中的外标法,或绘制标准曲线,按式(1)计算试样中河豚毒素含量:

$$X = \frac{(c - c_0) \times V}{m} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

- X ——试样中河豚毒素含量的数值,单位为微克每千克($\mu\text{g/kg}$);
- c ——由标准曲线而得的样液中河豚毒素含量的数值,单位为微克每升($\mu\text{g/L}$);
- c_0 ——由标准曲线而得的空白实验中河豚毒素含量的数值,单位为微克每升($\mu\text{g/L}$);
- V ——样品最终定容体积,单位为毫升(mL);
- m ——最终样液代表的试样量,单位为克(g)。

计算结果应扣除空白值。

9 精密度

9.1 一般规定

本标准的精密度数据是按照 GB/T 6379.1 和 GB/T 6379.2 的规定确定的,重复性和再现性的值以 95%的可信度来计算的。

9.2 重复性

在重复性条件下,获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过重复性限(r),被测物的添加浓度范围及重复性方程见表 3。

表 3 河豚毒素的添加浓度范围及重复性和再现性方程 单位为毫克每千克

化合物名称	添加浓度范围	样品基质	重复性限 r	再现性限 R
河豚毒素	50~500	河豚鱼	$\lg r=0.800\ 6\lg m-0.268\ 9$	$\lg R=0.947\ 1\lg m-0.432\ 9$
		织纹螺	$\lg r=0.866\ 7\lg m-0.233\ 8$	$\lg R=0.982\ 6\lg m-0.667\ 3$
注： m 为两次测定结果的算术平均值。				

如果差值超过重复性限,应舍弃试验结果并重新完成两次单个试验的测定。

9.3 再现性

在再现性条件下,获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过再现性限(R),被测物的添加浓度范围及再现性方程见表 3。

附录 A
(资料性附录)
标准物质液相色谱图

河豚毒素标准物质液相色谱图见图 A.1。

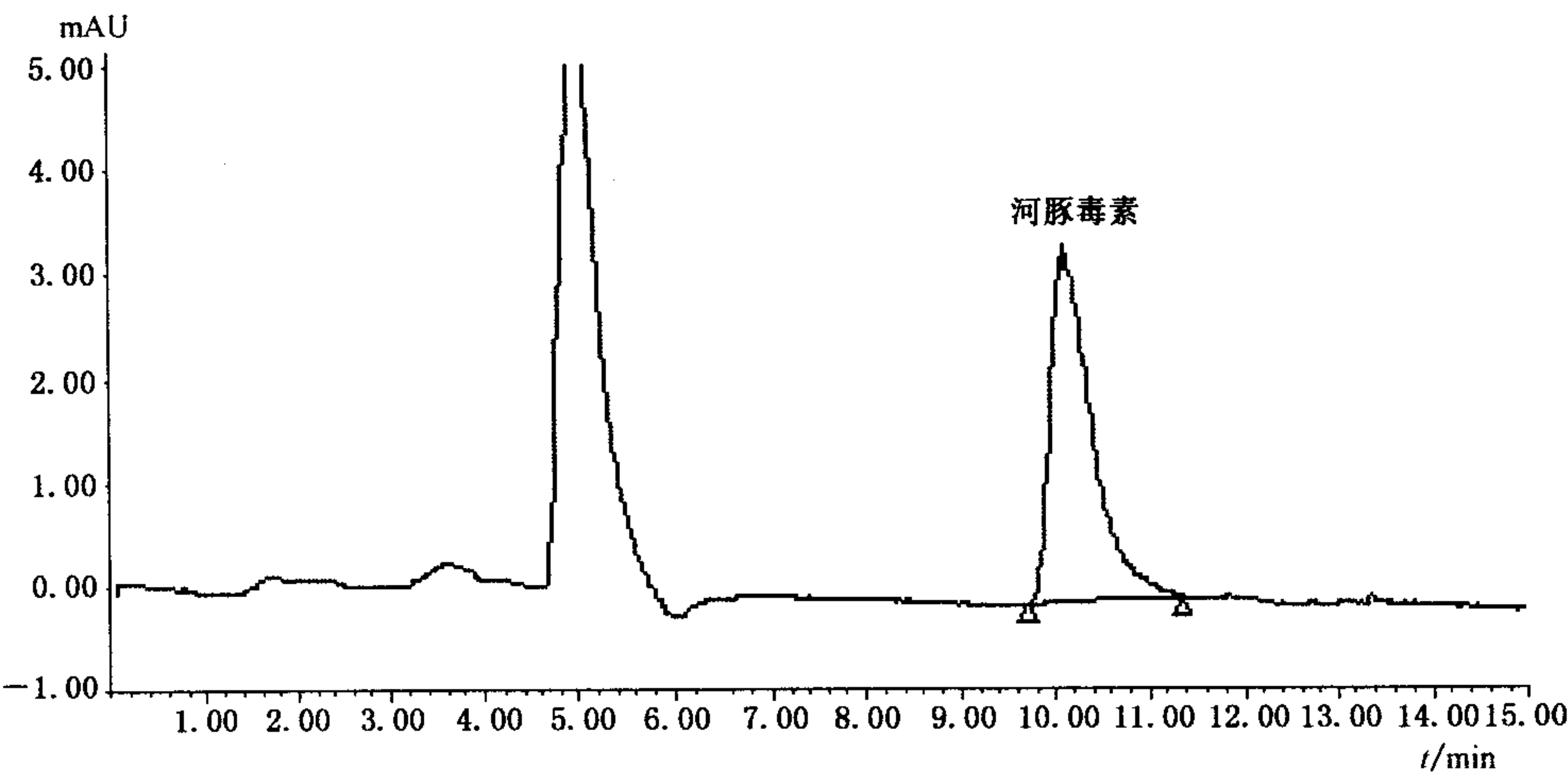


图 A.1 河豚毒素标准物质液相色谱图

附 录 B
(资料性附录)
标准物质多反应监测(MRM)色谱图

河豚毒素标准物质多反应监测(MRM)色谱图见图 B.1。

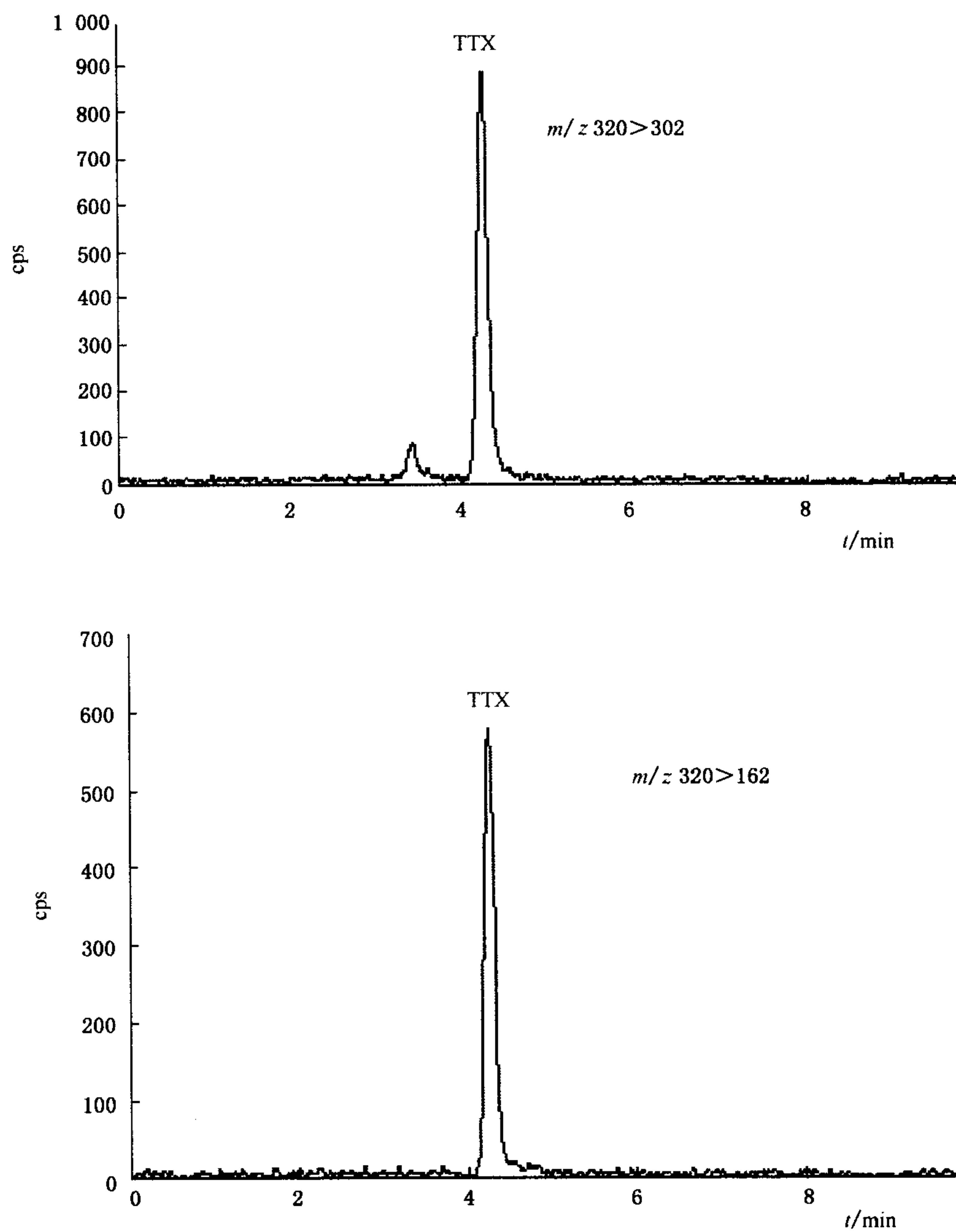


图 B.1 河豚毒素标准品的多反应监测(MRM)色谱图

附 录 C
(资料性附录)
回 收 率

河豚毒素的添加浓度及其平均回收率的试验数据见表 C.1。

表 C.1 河豚毒素的添加浓度及其平均回收率的试验数据

添加浓度/ (mg/kg)	平均回收率/%					
	鱿鱼	花蛤	河豚鱼	虾	织纹螺	牡蛎
0.05	89.5	92.8	89.3	95.1	91.1	95.3
0.10	80.6	77.5	83.0	83.8	85.2	82.5
0.25	82.4	78.5	82.3	82.3	93.9	94.7
0.50	97.4	86.8	85.4	84.6	87.9	92.9
