

LC-MS/MS 法测定贝类中的软骨藻酸作业指导书 (SOP)

标准号：GB 5009.198-2016

■ 参考标准

《食品安全国家标准 贝类中失忆性贝类毒素的测定》第三法 液相色谱 - 串联质谱法

■ 方法概述

2.1 方法编制说明

GB 5009.198-2016 规定了贝类中失忆性贝类毒素测定的酶联免疫吸附法、液相色谱法和液相色谱 - 串联质谱法。

2.2 方法使用范围

本标准中液相色谱法和液相色谱 - 串联质谱法适用于贝类及其制品（不包括盐渍制品）中失忆性贝类毒素软骨藻酸的测定。

2.3 方法技术指标

本方法的检出限为 0.005 $\mu\text{g/g}$ ，定量限 0.02 $\mu\text{g/g}$ 。

■ 方法原理

试样经甲醇溶液 (50%) 提取，强阴离子固相萃取柱净化，液相色谱 - 串联质谱检测，外标法定量。

■ 仪器设备及辅助设备

4.1 仪器设备

岛津 LCMS-8045 三重四极杆液相色谱质谱联用仪，ESI 离子源

4.2 辅助设备

分析天平：Shimadzu AP224W；

均质器：九阳碎肉机；

超声清洗仪：ANPEL 2150T；

离心机：BECKMAN COULTER Allegra X-30 Centrifuge；

涡旋仪：Talboys；

冰箱：海尔 BCD-656WDPT；

固相萃取装置：GL Science InertSep Manifold；

氮吹仪：ANPEL DC-12；

移液枪：5 mL，1 mL，100 μL ，10 μL

■ 标准品、试剂、耗材

软骨藻酸标准品：购自上海安谱实验科技股份有限公司，纯度 96%；

乙腈：色谱级；

甲醇：色谱级；

甲酸：色谱级；

甲酸铵：色谱级；

离心管：50 mL；

离心管：10 mL；

强阴离子固相萃取柱：500 mg/3 mL；
无针注射器：5 mL
微孔过滤膜：SHIMSEN 亲水聚四氟乙烯针头滤器 0.22 μm；

■ 操作步骤

6.1 标准工作曲线制作

6.1.1 标准储备液配制

以 10% 乙腈水溶液溶解软骨藻酸标准品（1 mg）并转移定容至 10 mL，得 0.1 mg/mL 标准储备液。4°C 避光保存，有效期 6 个月。

6.1.2 空白基质溶液的制备

取空白基质样品，采用与样品同样的前处理方法制成空白基质溶液。

6.1.3 基质标准中间液配制

准确移取 0.1 mL 标准储备液，以空白基质溶液稀释定容至 1 mL，得 10 μg/mL 基质标准中间液。现配现用。

6.1.3 基质标准工作溶液配制

将基质标准中间液逐级稀释，得浓度分别为 2.5、5、10、50、250、1000 ng/mL 的基质标准工作溶液系列。现配现用。

6.2 仪器条件

液相色谱条件：

色谱柱：Shim-pack Velox SP-C18, 100 mm×2.1 mm I.D., 2.7μm (SGLC, P/N: 227-32003-03)

流动相：A-2 mM 甲酸铵水溶液；B- 甲醇

流速：0.35 mL/min

柱温：30 °C

进样量：5 μL

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 10%，时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.30	Pumps	Pump B Conc.	10
1.30	Pumps	Pump B Conc.	95
2.50	Pumps	Pump B Conc.	95
2.60	Pumps	Pump B Conc.	10
6.00	Controller	Stop	

质谱条件：

分析仪器：LCMS-8045

加热模块温度：300°C

离子源：ESI+

DL 温度：250°C

雾化气流速：3.0 L/min

离子源温度：400°C

加热气流速：10.0 L/min

扫描模式：多反应监测 (MRM)

干燥气流速：10.0 L/min

MRM 参数：见表

表 2 MRM 参数

序号	化合物名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias (V)
1	软骨藻酸	312.20	266.10*	-22.0	-17.0	-30.0
			248.10	-22.0	-16.0	-26.0

* 表示定量离子

6.3 样品前处理

- 1) 将冷冻贝肉室温下放至半冷冻状态，准确称取 100 g 解冻的贝肉，以碎肉机搅碎，备用。
- 2) 准确称取 5 g (精确至 0.01 g) 样品，置于 50 mL 聚苯乙烯聚塞离心管中。
- 3) 向离心管中加入 12 mL 甲醇溶液 (50%)，涡旋混合 1 min，超声提取 10 min，再涡旋混合 1 min，以 4000 r/min 离心 10 min，移出上清液。
- 4) 残渣中再用 5 mL 甲醇溶液 (50%) 重复提取两次，合并上清液，以甲醇溶液 (50%) 定容至 25 mL，混匀。
- 5) 提取液于 -18°C 下放置 2h 后，5°C 下 10000 r/min 离心 15 min，上清液待净化。
- 6) 强阴离子固相萃取柱依次以 6 mL 甲醇、3 mL 水和 3 mL 甲醇溶液 (50%) 活化。
- 7) 准确吸取 5 mL 提取上清液于活化好的固相萃取柱中，控制流出液速度约为每秒 1 滴。
- 8) 分别用 5 mL 乙腈溶液 (10%) 和 0.3 mL 甲酸溶液 (0.3%) 淋洗，弃去流出液。
- 9) 用 4 mL 甲酸溶液 (0.3%) 洗脱，收集洗脱液，甲酸溶液 (0.3%) 稀释至 4 mL (相当于 1 g 试样)，混匀后以 0.22 μm 滤膜过滤待测。

6.4 测定

按照 6.2 的仪器分析条件进行分析，得到响应的峰面积，以基质标准溶液的浓度为横坐标，对应的峰面积为纵坐标，绘制外标法曲线。待测样品进样后所得峰面积代入曲线得到相应的浓度。

6.5 计算和报告

6.5.1 定性分析

进行样品测定时，如果检出的色谱峰的保留时间与基质标准液中软骨藻酸保留时间之间偏差不超过 2.5%，且定性离子相对丰度与基质标准溶液的定性离子相对丰度满足下方表格中允许偏差要求的，则可判断样品中存在软骨藻酸。

定性离子相对丰度	允许的相对偏差
> 50%	±20%
> 20% ~ 50%	±25%
> 10% ~ 20%	±30%
≤ 10%	±50%

6.5.2 定量分析

试样中软骨藻酸的含量按照下式计算：

$$X = \frac{\rho \times V}{m \times 1000}$$

X — 试样中软骨藻酸含量，单位为 μg/g；

ρ — 由基质标准工作曲线得到的试样溶液中软骨藻酸的浓度，单位为 ng/mL；

V — 洗脱液的定容体积，单位为 mL；

m — 与洗脱液相当的试样质量，单位为 g；

1000 — 换算因子；

■ 质量控制

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 15%

岛津应用云

