

食品中海洋生物毒素之檢驗方法－氮代螺旋酸貝毒之檢驗

Method of Test for Marine Biotoxins in Foods -

Test of Azaspiracid Shellfish Poisoning Toxin

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於雙殼貝類中氮代螺旋酸(azaspiracid, AZA)之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經萃取後，以液相層析串聯質譜儀(liquid chromatograph/tandem mass spectrometer, LC/MS/MS)分析之方法。
 - 2.1. 裝置：
 - 2.1.1. 液相層析串聯質譜儀：
 - 2.1.1.1. 離子源：電灑離子化正離子(positive ion electrospray ionization, ESI⁺)。
 - 2.1.1.2. 層析管：BEH C18，1.7 μm，內徑2.1 mm × 10 cm，或同級品。
 - 2.1.2. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
 - 2.1.3. 離心機(Centrifuge)：可達2000 ×g以上者。
 - 2.1.4. 高速組織研磨振盪均質機(SPEX SamplePrep 2010 GenoGrinder®)：1000 rpm以上，或同級品。
 - 2.2. 試藥：甲醇採用液相層析級；甲酸銨及甲酸均採用試藥級；去離子水(比電阻於25°C可達18 MΩ.cm以上)；氮代螺旋酸AZA-1、AZA-2及AZA-3對照用標準品。
 - 2.3. 器具及材料：
 - 2.3.1. 離心管：50 mL，PP材質。
 - 2.3.2. 容量瓶：5 mL及20 mL。
 - 2.3.3. 濾膜：孔徑0.22 μm，PTFE材質。
 - 2.4. 移動相溶液之配製：
 - 2.4.1. 移動相溶液A：

稱取甲酸銨0.315 g，加入甲酸1 mL，以去離子水溶解使成1000 mL，經濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液A。
 - 2.4.2. 移動相溶液B：

稱取甲酸銨0.315 g，加入甲酸1 mL，以甲醇溶解使成1000 mL，經濾膜

過濾，取濾液供作移動相溶液B。

2.5. 標準溶液之配製：

取適量氦代螺旋酸AZA-1、AZA-2及AZA-3對照用標準品混合，以甲醇稀釋至100 ng/mL，供作標準溶液，冷藏避光貯存。

2.6. 檢液之調製：

將檢體均質，取約2 g，精確稱定，置於離心管中，加入甲醇9 mL，旋渦混勻，以高速組織研磨振盪均質機於1000 rpm振盪1分鐘，於4°C，以2000 ×g離心10分鐘，取上清液，殘留物以上述步驟重複萃取一次，合併上清液，以甲醇定容至20 mL，經濾膜過濾，供作檢液。

2.7. 基質匹配檢量線之製作：

取空白檢體，依2.6.節調製檢液，分別量取1 mL，以氮氣吹乾，加入標準溶液2~100 μL及適量甲醇，使體積為1 mL，混合均勻，供作基質匹配檢量線溶液。依下列條件進行分析，就各氦代螺旋酸之波峰面積，與對應之各氦代螺旋酸濃度，分別製作0.2~10 ng/mL之基質匹配檢量線。

液相層析串聯質譜分析測定條件^(註)：

層析管：BEH C18，1.7 μm，內徑2.1 mm × 10 cm。

層析管溫度：45°C。

移動相溶液：A液與B液以下列條件進行梯度分析

時間(min)	A (%)	B (%)
0 → 9	95 → 0	5 → 100
9 → 12	0 → 0	100 → 100
12 → 13	0 → 95	100 → 5
13 → 15	95 → 95	5 → 5

移動相流速：0.25 mL/min。

注入量：10 μL。

毛細管電壓(Capillary voltage)：1.0 KV。

離子源溫度(Ion source temperature)：150°C。

離子化模式：ESI⁺。

溶媒揮散溫度(Desolvation temperature)：450°C。

溶媒揮散流速(Desolvation flow)：850 L/hr。

偵測模式：多重反應偵測(multiple reaction monitoring, MRM)。偵測離子、進樣錐電壓(cone voltage)與碰撞能量(collision energy)如下表：

分析物	離子對	進樣錐 電壓 (V)	碰撞 能量 (eV)
	前驅離子(m/z) > 產物離子(m/z)		
AZA-1	842.5 > 824.5*	48	28
	842.5 > 806.5		40
AZA-2	856.5 > 838.5*	38	28
	856.5 > 820.5		42
AZA-3	828.5 > 810.5*	76	26
	828.5 > 792.5		38

*定量離子對

註：上述測定條件分析不適時，可依所使用之儀器，設定適合之測定條件。

2.8. 鑑別試驗及含量測定：

精確量取檢液及基質匹配檢量線溶液各10 μL，分別注入液相層析串聯質譜儀中，依下列條件進行分析，就檢液與基質匹配檢量線溶液所得波峰之滯留時間及多重反應偵測相對離子強度^(註)鑑別之，並依下列計算式求出檢體中氬代螺旋酸之含量(mg/kg)：

$$\text{檢體中氬代螺旋酸之含量(mg/kg)} = \frac{\sum C \times V}{M \times 1000}$$

C：由基質匹配檢量線求得檢液中氬代螺旋酸AZA-1、AZA-2或AZA-3之含量(ng/mL)

V：檢體最後定容之體積(mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

註：相對離子強度由定性及定量離子對之波峰面積相除而得(≤100%)，容許範圍如下：

相對離子強度(%)	容許範圍(%)
> 50	± 20
> 20~50	± 25
> 10~20	± 30
≤ 10	± 50

附註：1. 本檢驗方法之定量極限，AZA-1、AZA-2及AZA-3均為0.002 mg/kg。

2. 檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

參考文獻：

Blanco, J., Arevalo, F., Morono, A., Correa, J., Muníz, S., Marino, C. and Martín, H. 2017. Presence of azaspiracids in bivalve molluscs from Northern Spain. *Toxicon* 137: 135-143.