

食品中海洋生物毒素之檢驗方法－失憶性貝毒軟骨藻酸之檢驗

Method of Test for Marine Biotoxin in Foods- Test of Amnesic Shellfish Poisoning Toxin Domoic Acid

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於雙殼貝類中失憶性貝毒軟骨藻酸(domoic acid)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)：轉速可達4300 ×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：甲醇與乙腈均採用液相層析級；三氟乙酸(trifluoroacetic acid)採用試藥級；去離子水(比電阻於25°C可達18 MΩ·cm 以上)；軟骨藻酸對照用標準品。
 - 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. 試劑之調製：
 - 2.4.1. 10%乙腈溶液：
取乙腈10 mL，加去離子水使成100 mL。
 - 2.4.2. 50%甲醇溶液：
取甲醇50 mL，加去離子水使成100 mL。

2.5. 移動相溶液之配製：

取去離子水900 mL與乙腈100 mL混合後，加入三氟乙酸0.35 mL，混勻後，經濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液。

2.6. 標準溶液之配製：

取適量軟骨藻酸對照用標準品，以10%乙腈溶液稀釋至10 µg/mL，作為標準原液，冷藏避光貯存。臨用時，取適量標準原液，以10%乙腈溶液稀釋至5~300 ng/mL，供作標準溶液。

2.7. 檢液之調製：

將檢體均質，取約1 g，精確稱定，置於離心管中，加入50%甲醇溶液5 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，以4300 ×g離心3分鐘，取上清液，殘留物重複萃取三次，合併上清液，以50%甲醇溶液定容至20 mL，經濾膜過濾，供作檢液。

2.8. 鑑別試驗及含量測定：

精確量取檢液及標準溶液各10 µL，分別注入液相層析串聯質譜分析儀中，依下列條件進行分析，就檢液與標準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2)鑑別之，並依下列計算式求出檢體中軟骨藻酸之含量(mg/kg)：

$$\text{檢體中軟骨藻酸之含量(mg/kg)} = \frac{C \times V}{M \times 1000}$$

C：由標準曲線求得檢液中軟骨藻酸之含量(ng/mL)

V：檢體最後定容之體積(mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

液相層析串聯質譜分析測定條件^(註1)：

層析管：BEH C18，1.7 µm，內徑2.1 mm × 10 cm。

移動相溶液：依2.5.節所調製之溶液。

移動相流速：0.25 mL/min。

注入量：10 µL。

毛細管電壓(Capillary voltage)：3.2 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)：400°C。

溶媒揮散流速(Desolvation flow)：700 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)		
軟骨藻酸	312 > 266*	35	16
	312 > 248	35	17

*定量離子對

註：1. 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. 相對離子強度由定性及定量離子對之波峰面積相除而得($\leq 100\%$)。

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為0.1 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：

Ujević, I., Ninčević-Gladan, Ž., Roje, R., Skejić, S., Arapov, J. and Marasović, I. 2010. Domoic acid - a new toxin in the Croatian Adriatic shellfish toxin profile. *Molecules* 15: 6835-6849.