

食品中海洋生物毒素之檢驗方法－河豚毒素之檢驗(二)

Method of Test for Marine Biotoxin in Foods - Test of Tetrodotoxin (2)

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於水產品及其製品中河豚毒素(tetrodotoxin)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(electrospray ionization, ESI)。
 - 2.1.1.2. 層析管：TSK-GEL Amide-80, 3 μm , 內徑2.0 mm \times 15 cm, 或同級品。
 - 2.1.2. 均質機(Homogenizer)。
 - 2.1.3. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
 - 2.1.4. 離心機(Centrifuge)：可達3000 \times g以上者。
 - 2.1.5. 超音波振盪器(Ultrasonicator)。
 - 2.1.6. 氮氣濃縮裝置(Nitrogen evaporator)。
 - 2.2. 試藥：甲酸銨、甲酸及冰醋酸均採用試藥特級；乙腈採用液相層析級；去離子水(比電阻於25 $^{\circ}\text{C}$ 可達18 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ 以上)；河豚毒素對照用標準品。
 - 2.3. 器具及材料：
 - 2.3.1. 離心管：50 mL, PP材質。
 - 2.3.2. 容量瓶：10 mL。
 - 2.3.3. 濾膜：孔徑0.22 μm , Nylon材質。
 - 2.4. 試劑之調製：
 - 2.4.1. 50%乙腈溶液：

取乙腈50 mL, 加去離子水使成100 mL。
 - 2.4.2. 95%乙腈溶液：

取乙腈950 mL, 加去離子水使成1000 mL。
 - 2.4.3. 含1%醋酸之50%乙腈溶液：

取冰醋酸1 mL, 加50%乙腈溶液使成100 mL。
 - 2.5. 移動相溶液之調製：

2.5.1. 移動相溶液A：

取甲酸銨315.3 mg及甲酸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。

2.5.2. 移動相溶液B：

取甲酸銨315.3 mg及甲酸1 mL，以95%乙腈溶液溶解使成1000 mL，經濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液B。

2.6. 標準溶液之配製：

取河豚毒素對照用標準品約1 mg，精確稱定，以含1%醋酸之50%乙腈溶液溶解並定容至10 mL，作為標準原液，冷凍貯存。臨用時取適量標準原液，以含1%醋酸之50%乙腈溶液稀釋至50~1000 ng/mL，供作標準溶液。

2.7. 檢液之調製：

將檢體細切均質後，取約2 g，精確稱定，置於離心管中，加入含1%醋酸之50%乙腈溶液6 mL，超音波振盪20分鐘後，以3000×g離心10分鐘，收集上清液，以含1%醋酸之50%乙腈溶液定容至10 mL，經濾膜過濾後，供作檢液。

2.8. 基質匹配檢量線之製作：

取空白檢體依2.7.節調製空白檢液。分別取不同濃度標準溶液1 mL，以氮氣吹乾後，加入空白檢液1 mL，混合均勻，經濾膜過濾後，供作基質匹配檢量線溶液，依下列條件進行液相層析串聯質譜分析，就河豚毒素之波峰面積與對應之河豚毒素濃度，製作基質匹配檢量線。

液相層析串聯質譜分析測定條件^(註)：

層析管：TSK-GEL Amide-80，3 μm，內徑2.0 mm × 15 cm。

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 (%)
0.0 → 2.0	20 → 35	80 → 65
2.0 → 6.0	35 → 50	65 → 50
6.0 → 10.0	50 → 55	50 → 45
10.0 → 10.2	55 → 20	45 → 80
10.2 → 12.0	20 → 20	80 → 80

移動相流速：0.2 mL/min。

注入量：10 μL。

毛細管電壓(Capillary voltage)：0.6 kV。

離子源溫度(Ion source temperature)：150°C。

離子化模式：ESI正離子。

溶媒揮散溫度(Desolvation temperature)：500°C。

溶媒揮散流速(Desolvation flow)：1000 L/hr。

偵測模式：多重反應偵測(multiple reaction monitoring, MRM)。偵測離子對、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)		
河豚毒素	320 > 302*	40	24
	320 > 162	40	44

*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。

2.9. 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2.8節條件進行分析。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河豚毒素含量(µg/kg)：

$$\text{檢體中河豚毒素之含量}(\mu\text{g/kg}) = \frac{C \times V}{M}$$

C：由基質匹配檢量線求得檢液中河豚毒素之濃度(ng/mL)

V：檢體定容之體積(mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

註：相對離子強度由定性離子對與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為250 µg/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：

Ochi, N. 2021. Simultaneous determination of ten paralytic shellfish toxins and tetrodotoxin in scallop and short-necked clam by ion-pair solid-phase extraction and hydrophilic interaction chromatography with tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1651: 462328.