

食品中下痢性貝毒檢驗方法之建立

卓憲駿 廖家鼎 林旭陽 周秀冠 陳惠芳

食品藥物管理署研究檢驗組

摘 要

下痢性貝毒(diarrhetic shellfish poisoning toxins, DSP)是由有毒的藻類所產生的化合物，經貝類攝食後而蓄積在體內造成污染，主要污染之食品有文蛤、牡蠣、孔雀蛤、扇貝等貝類。本研究以甲醇萃取孔雀蛤及牡蠣檢體，經離心、過濾後，以液相層析串聯質譜儀(liquid chromatograph/tandem mass spectrometer, LC/MS/MS)檢測，可同步分析下痢性貝毒中較常見之okadaic acid (OA)、dinophysistoxin-1 (DTX-1)及gymnodimine-A (GYM-A)共3種毒素。離子源採電灑游離法(electrospray ionization, ESI)，OA及DTX-1採負離子模式，GYM-A採正離子模式。層析條件以含6.7 mM氫水的90%乙腈溶液與去離子水為移動相進行梯度層析分離，流速為0.2 mL/min，層析管柱為Waters X-bridge C18，注入量為20 μ L。研究結果顯示，3種貝毒之基質匹配檢量線相關係數皆大於0.995；以孔雀蛤及牡蠣為基質，分別添加80、160、240 ppb各毒素標準品，其平均回收率介於81-114%之間(n=3)，變異係數皆小於17.07%。本方法可在20分鐘內同步分析3種下痢性貝毒，相較於傳統小鼠生物試驗法，具有省時、方便、不需犧牲動物、可同步定量分析多種毒素等優點，可實際應用於食品中下痢性貝毒之檢測。

關鍵詞：下痢性貝毒、液相層析串聯質譜儀

前 言

下痢性貝毒(diarrhetic shellfish poisoning toxins, DSP)為一群對熱穩定之脂溶性多環醚類化合物，發現於1976年，日本宮城縣發生因食用貝類而引起的集體食物中毒事件，經調查發現為貝類的中腸線含有可使老鼠致死之脂溶性毒素⁽¹⁾稱為下痢性貝毒。主要來自於有毒的渦鞭毛藻中的鰭藻屬(*Dinophysis*)和原甲藻屬(*Prorocentrum*)等藻類所產生，目前已知在鰭藻屬中主要有*D. fortii*, *D. acuminata*, *D. acuta*, *D. norvegica*, *D. mitra*, *D. rotundata*, *D. tripos*等7種藻類會產毒，而在原甲藻屬主要有*P. minimum*, *P. lima*, *P. concavum*,

*P. redfieldii*等4種藻類會產毒，經常會污染二枚貝類如文蛤、牡蠣、淡菜、扇貝等貝類⁽²⁾。這些有毒的藻類經由濾食性的動物攝食後，再經食物鏈的轉換，最後引發人類誤食有毒貝類而造成食物中毒問題，危害人體健康⁽³⁾。根據其結構上的差異可以分成三種類型，第一類型為酸性化合物，以軟海綿酸(okadaic acid, OA)及其衍生物-鰭藻毒(dinophysistoxin 1-3, DTX 1-3)為主；第二類型為中性化合物，以聚醚內酯類的蛤毒(pectenotoxins, PTXs)為主；第三類型為其他類化合物，以硫酸鹽類的扇貝毒(yessotoxin, YTX)、含氮類化合物(azaspiracid, AZA)、環亞胺類化合物(spirolides, SPXs)及(gymnodimines, GYMs)

為主。下痢性貝毒所引起的食物中毒症狀，與河豚毒和麻痺性貝毒的症狀不同，是引發腸胃炎型中毒症狀，下痢(腹瀉呈水樣便)是此類毒素最主要的症狀，另外也會產生其他症狀，通常於食用後30分鐘內到消化後幾小時，會產生噁心、嘔吐及腹痛等症狀，但不會發燒。症狀可能會持續2-3天，會自行痊癒沒有後遺症，目前無致死案例。會引起腸胃炎型中毒症狀主要以OA、DTX、AZA為主，而PTX與YTX雖然不具明顯下痢性作用，但在肝臟與心臟毒性上，仍具相當的強度，SPX與GYM在人體的毒性症狀還不清楚，但在動物實驗上顯示具有神經毒性⁽⁴⁻⁸⁾。目前歐盟規定食品中下痢性貝毒的限量標準為OA、DTXs及PTX毒素總和不能超過160 ppb，而YTXs的限量標準為1000 ppb，AZAs為160 ppb，至於SPXs及GYMs則還沒有訂定限量標準。

材料與方法

一、材料

於102年間，至台北地區大賣場及生鮮超市抽購孔雀蛤及牡蠣檢體。

二、試藥及試劑

乙腈及甲醇採用液相層析級，皆購自J. T. Baker；氨水為試藥級，購自Sigma-Aldrich；配製液相層析用移動相之水使用去離子水。

三、儀器設備

- (一)液相層析串聯質譜儀(Finnigan TSQ Quantum Ultra, Thermo, USA)，包括TSQ Ultra MS (TQU00868)串聯質譜儀、Surveyor Plus LC Pump (68649)及Surveyor Plus Autosampler (76598)
- (二)層析管柱(X-bridge C18, 2.1 mm × 150 mm, 3.5 μ m, Waters, USA)
- (三)均質機(DLC-1BCH Mini-Prep Processor, Cuisinart, USA)
- (四)離心機(Allegra 25R centrifuge, Beckman

Coulter, USA)

四、移動相溶液之調製

移動相溶液A為6.7 mM氨水溶液，移動相溶液B為含6.7 mM氨水之90%乙腈溶液，以0.22 μ m濾膜抽氣過濾後備用，臨用前以超音波振盪脫氣。

五、標準溶液之配製

下痢性貝毒標準品皆購自加拿大CNRC(Canadian National Research Council)海洋生物資源中心(Halifax, NS, Canada)。okadaic acid (OA)、dinophysistoxin-1 (DTX-1)和gymnodimine-A (GYM-A)等標準品皆溶於甲醇中，原液濃度分別為14.3、15.1及5 μ g/mL。先以甲醇稀釋成3.2 μ g/mL混合標準溶液，儲存於-20℃下，臨用時再以50%甲醇溶液稀釋至2-64 ng/mL，供作標準溶液。

六、檢液之調製

將貝肉以均質機均質切碎後，取約1 g，精確稱定，置於15 mL離心管中，加入甲醇3 mL，旋渦混合1分鐘，再以4,000 rpm離心5分鐘，收集上清液，殘渣重複上述步驟進行2次萃取，合併上清液並定容至10 mL，以0.22 μ m針筒過濾器(PTFE材質)過濾，置於褐色樣品瓶中供作檢液。

七、液相層析串聯質譜儀測定條件

(一)液相層析儀

層析管柱為Waters X-bridge C18 (3.5 μ m, 2.1 × 150 mm)，注入量為10 μ L，移動相為皆含6.7 mM氨水之90%乙腈與去離子水，時間梯度如表一，流速為0.2 mL/min。

(二)串聯質譜儀

離子源採電灑游離法正離子及負離子模式，搭配選擇性反應偵測模式(selected reaction monitoring, SRM)進行偵測。質譜儀之分析參數及SRM偵測之離子對參數如

表一、液相層析移動相溶液之梯度分析條件

Time (min)	A (%)	B (%)
0.0	80	20
10.0	0	100
11.0	0	100
11.5	80	20
20.0	80	20

層析管柱：Waters X-bridge C18，3.5 μm ，2.1 $\times$ 150 mm

移動相流速：0.2 mL/min

移動相溶液A：6.7 mM 氨水溶液

移動相溶液B：含6.7 mM 氨水之90%乙腈溶液

表二、質譜儀分析條件

MRM mode	ESI ⁻	ESI ⁺
Spray voltage (kV)	3.5	3.5
Vaporizer temperature (°C)	200.0	200.0
Capillary temperature (°C)	300.0	300.0
Sheath gas pressure (psi)	40.0	40.0
Aux gas pressure (arb)	45.0	45.0
Ion sweep gas pressure	4.0	4.0
Collision pressure (mTorr)	1.5	1.5
Skimmer offset	10.0	10.0
Peak width Q1 (FWHM)	0.7	0.7
Peak width Q3 (FWHM)	0.7	0.7

表二及表三。

八、基質匹配檢量線之製作

取經均質之文蛤空白檢體各約1 g，精確稱定，依所建立方法進行試驗，於最後步驟所得之檢液中，以後添加方式加入適當標準溶液，使各檢液中含OA、DTX-1及GYM-A之含量相當於2-64 ng/mL等濃度。

九、回收率(Recovery)分析試驗

將下痢性貝毒標準溶液添加至貝類空白檢體內，各添加低、中、高三個濃度(80、160、240 ppb)之標準溶液，續以上述步驟調製檢液，經LC/MS/MS分析後求得之濃度除以添加濃度，再乘以100%即為回收率。進行3重複分析，並計算其平均值。

結果與討論

一、液相層析串聯質譜法條件之探討

為確認前驅離子(precursor ion)片段，先將標準品經由針筒注射進入質譜儀調校儀器設定參數，在全質譜掃描範圍中，較強之片段訊號分別OA 803.5 m/z 、DTX-1 817.5 m/z 、GYM-A 508.4 m/z 。此3種毒素離子源為電灑游離法，OA及DTX-1採負離子模式，GYM-A採正離子模式。接著利用儀器自動調校功能(auto-tune)設定spray voltage、capillary temperature、source CID (collision-induced dissociation)、tube lens等參數之最佳數值，目的為將前驅離子之感度提高，以便後續能清楚確認前驅離子斷裂成產物離子片

表三、以LC/MS/MS分析下痢性貝毒之選擇性偵測離子及分析參數

Compound	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	Collision energy (mV)	Retention time (min)	Ionization mode
Okadaic acid (OA)	803.5	255.2 ^a	45	10.94	ESI ⁻
		113.1	50	10.94	
		150.8	45	10.94	
Dinophysistoxin-1 (DTX-1)	817.5	255.2 ^a	45	12.17	ESI ⁻
		113.1	58	12.17	
		150.8	50	12.17	
Gymnodimine-A (GYM-A)	508.4	392.4 ^a	37	15.62	ESI ⁺
		202.4	34	15.62	

a. Transitions used for quantitation.

Q1, first quadrupole; Q3, third quadrupole.

段之位置。確認前驅離子之後須進行產物離子 (product ion) 片段之確認，在選擇性反應偵測模式下，給予撞擊能量將前驅離子斷裂成數段產物離子片段。將感度最強之產物離子片段設定為定量離子，感度次之的產物離子片段設定為定性離子。本研究各毒素之前驅離子、產物離子片段與碰撞能量如表三。

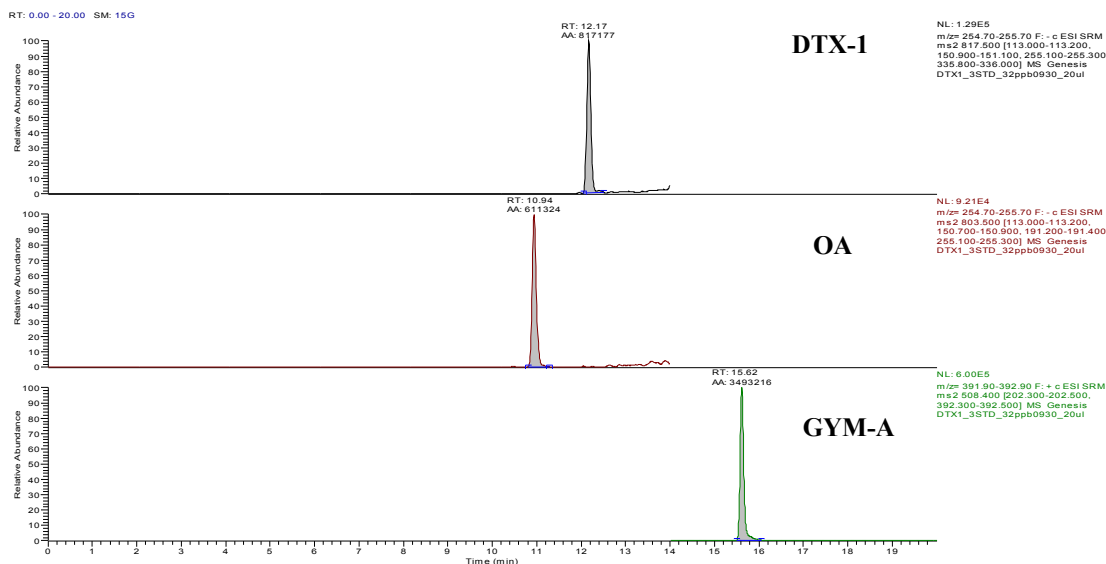
在此LC/MS/MS同生毒素分析之管柱選擇，多為C8及C18的管柱，使用的管柱有X-Bridge™ C8 (3.5 μm , 2.1 $\times$ 50 mm)、X-Bridge™ C18 (3.5 or 5 μm , 3 $\times$ 150 mm)、X-Bridge™ C18 (3.5 μm , 2.1 $\times$ 150 mm)、Acquity UPLC® BEH C18 (1.7, 2.1 $\times$ 50 mm)⁽¹⁰⁻¹¹⁾。經測試結果，最後選用X-Bridge™ C18 (3.5 μm , 2.1 $\times$ 150 mm)的管柱，可在20分鐘內可測得3種下痢性貝毒，各化合物可明顯分離且時間在10-16分鐘之間顯示有滯留分離效果(圖一)。

在移動相方面，大多使用去離子水及90-95%乙腈溶液為移動相，根據添加物的不同會有酸性、中性及鹼性三種條件，在酸性條件下會添加2 mM甲酸銨及50 mM甲酸，在中性條件下會添加5 mM甲酸銨或5 mM 碳酸氫銨，

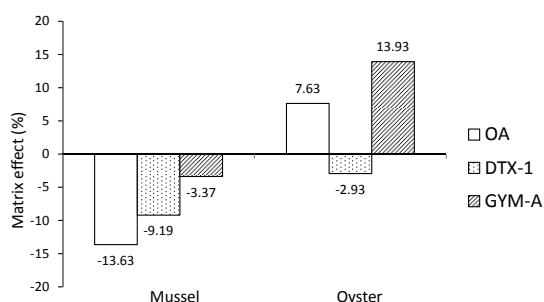
在鹼性條件下會添加6.7 mM氨水，加入酸和鹼的目的主要是要提高化合物離子化效果，而加入鹽類的目的是為了要穩定波峰峰型，因此不同的移動相條件對於不同下痢性貝毒會有其適合條件，而在鹼性條件下可以涵蓋最多種下痢性貝毒，因此在移動相的選擇是以鹼性條件為主⁽¹⁰⁻¹¹⁾。而不同的移動相條件對於梯度條件的設定也不盡相同，在流速的選擇上，使用0.2 mL/min之流速進行分析可將雜質分開，以降低背景值的干擾。

二、前處理的探討

在萃取下痢性貝毒時，以甲醇為萃取溶劑，文獻針對萃取效率做測試，分別將樣品萃取了5次，第1到4次用甲醇萃取，第5次用丙酮萃取，並分別計算其回收率，結果發現以甲醇萃取3次的效率最好，可以完全的將下痢性貝毒萃取出來，因此本實驗就選擇萃取3次為萃取的次數。文獻也對固相萃取管柱(SPE)使用的有無做了測試，結果發現SPE使用的有無對回收率沒有太大的差異，但是使用SPE在異日的RSD會比較小，檢量線的線性也會比較好，顯示使用SPE會有較好的方法穩定性⁽¹²⁾。



圖一、下痢性貝毒標準品之層析圖譜



圖二、孔雀蛤及牡蠣之基質效應

三、基質匹配檢量線

為了瞭解使用上述前處理方法的基質效應，選擇國內外常食用的孔雀蛤及牡蠣作為實驗的基質進行測試，將以標準曲線和基質匹配檢量線的斜率做比較並算出基質效應，結果顯示在孔雀蛤基質中3種毒素皆為抑制效應，分別為OA：13.63%、DTX-1：9.19%、GYM-A：3.37%；在牡蠣基質中OA及GYM-A為增加效應，分別為7.63%及13.93%，而DTX-1為2.93%之抑制效應(圖二)。以上結果顯示基質效應皆小於15%，但是不同貝類基質對不同下痢性貝毒的

基質效應也不同，因此後續的實驗皆採用基質匹配檢量線進行定量分析。

四、回收率、同日內及異日間之重複性

貝類檢體中分別添加低、中、高3種濃度毒素標準品，添加濃度為80、160、240 ppb，依所建立方法進行檢液製備，經LC/MS/MS分析，以基質匹配檢量線計算檢液中各毒素之濃度，以評估回收率及同日內之重複性，異日間之重複性則於三個不同日評估之。

在孔雀蛤基質中，由表四之結果可知，OA之回收率介於94.96-99.00%，同日內變異係數值介於1.08-5.11%，異日間變異係數介於3.11-4.63%；DTX-1之回收率介於100.19-105.96%，同日內變異係數值介於0.99-5.97%，異日間變異係數介於5.02-8.63%；GYM-A之回收率介於89.96-100.17%，同日內變異係數值介於1.91-7.99%，異日間變異係數介於9.74-17.07%。在牡蠣基質中，由表五之結果可知，OA之回收率介於81.74-87.00%，同日內變異係數值介於2.88-4.22%，異日間變異係數介於7.80-9.68%；DTX-1之回收率介於82.05-

表四、3種下痢性貝毒添加於孔雀蛤基質之回收率、同日內及異日間之變異係數

Spiked level (ppb)	Recovery (%) (n=3)	CV (%)	
		Intra-day precision	Inter-day precision
<u>Okadaic acid (OA)</u>			
80	99.00 ± 1.07	1.08	3.66
160	97.60 ± 1.32	1.35	4.63
240	94.96 ± 4.85	5.11	3.11
<u>Dinophsistoxin-1 (DTX-1)</u>			
80	105.96 ± 3.67	3.46	5.02
160	100.40 ± 0.99	0.99	6.23
240	100.19 ± 5.98	5.97	8.63
<u>Gymnodimine-A (GYM-A)</u>			
80	100.17 ± 8.01	7.99	9.74
160	93.52 ± 1.78	1.91	17.07
240	89.96 ± 2.32	2.57	13.46

表五、3種下痢性貝毒添加於牡蠣基質之回收率、同日內及異日間之變異係數

Spiked level (ppb)	Recovery (%) (n=3)	CV (%)	
		Intra-day precision	Inter-day precision
<u>Okadaic acid (OA)</u>			
80	81.74 ± 2.35	2.88	8.26
160	86.00 ± 3.67	4.22	7.80
240	87.00 ± 2.75	3.16	9.68
<u>Dinophsistoxin-1 (DTX-1)</u>			
80	83.44 ± 5.56	6.66	6.39
160	82.05 ± 2.82	3.44	8.29
240	85.15 ± 5.61	6.60	8.45
<u>Gymnodimine-A (GYM-A)</u>			
80	113.93 ± 3.77	3.31	4.03
160	114.13 ± 2.34	2.05	5.23
240	114.80 ± 2.30	2.00	2.38

85.15%，同日內變異係數值介於3.44-6.66%，異日間變異係數介於6.39-8.45%；GYM-A之回收率介於113.93-114.80%，同日內變異係數值介於2.00-3.31%，異日間變異係數介於2.38-5.23%。結果顯示使用基質匹配檢量線能有效的校正貝類基質中的毒素回收率，使各毒素回收率皆介於81.74-114.80%，同日內變異係數皆小於7.99%，異日間(同一人操作)變異係數皆小於17.07%，皆符合食品化學檢驗方法之確效規範所要求(回收率：70-120%，同日變異係數<20%，異日變異係數<22%)，表示此法的準確度及精密度良好⁽¹³⁾，本方法中OA、DTX-1及AZA之定量極限皆為20 ppb。

結 論

本研究建立以LC/MS/MS同步分析下痢性貝毒中較常見之OA、DTX-1、GYM-A之檢驗方法。以甲醇萃取孔雀蛤及牡蠣檢體，經離心、過濾後，以液相層析串聯質譜儀(LC/MS/MS)分析，離子源採電灑游離法(electrospray ionization, ESI)，OA及DTX-1採負離子模式，GYM-A採正離子模式。LC/MS/MS方法相較於傳統小鼠生物試驗法，具有省時、方便、不需犧牲動物、可定量分析、定量極限低、可同步分析多種毒素等優點。各毒素基質匹配檢量線相關係數皆大於0.99，表示線性良好。添加各毒素於孔雀蛤及牡蠣檢體中之平均回收率介於81.74-114.80%，同日內變異係數皆小於7.99%，異日間變異係數皆小於17.07%，表示此法的準確度及精密度良好。本方法檢驗流程簡單容易，方法靈敏可靠，在20分鐘內可同步分析此3種下痢性貝毒，可實際應用於市售水產品中下痢性貝毒之污染量背景值調查，以作為行政管理單位未來訂定限量標準之參考。

參考文獻

1. Yasumoto, T., Oshima, Y., and Yamaguchi, M. 1978. Occurrence of new type of shellfish poisoning in the Tohoku District. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 44: 1249-1255.
2. Gerssen, A., Pol-Hofstad, I. E., Poelman, M. and *et. al.* 2010. Marine toxins: chemistry, toxicity, occurrence and detection, with Special reference to the Dutch situation. Toxins. 2: 878-904.
3. James, K. J., Saez, M. J. F., Fuery, A. and *et. al.* 2004. Azaspiracid poisoning, the food borne illness associated with shellfish consumption. Food Addit. Contam. 21: 879-892.
4. European Food Safety Authority. 2008. Scientific opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on marine biotoxins in shellfish-okadaic acid and analogues. EFSA J. 589: 1-62.
5. European Food Safety Authority. 2008. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on marine biotoxins in shellfish-azaspiracid group. EFSA J. 723: 1-52.
6. European Food Safety Authority. 2009. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on marine biotoxins in shellfish-pectenotoxin group. EFSA J. 1109: 1-47.
7. European Food Safety Authority. 2008. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on marine biotoxins in shellfish-yessotoxin group. EFSA J. 907: 1-62.
8. European Food Safety Authority. 2010. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on marine biotoxins in shellfish-cyclic imines(spirolides, gymnodimines, pinnatoxins and pteriatoxins). EFSA J. 8(6): 1628.

9. European Food Safety Authority. 2009. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on marine biotoxins in shellfish-Summary on regulated marine biotoxin. EFSA J. 1306: 1-23.
10. García-Altare, M., Diogène, J. and de la Iglesia, P. 2013. The implementation of liquid chromatography tandem mass spectrometry for the official of lipophilic toxins in seafood: single-laboratory validation under four chromatography conditions. J. Chromatogr. A 1275: 48-60.
11. EURLMB. 2011. EU-Harmonised SOP-LIPO-LC-MS/MS. v. 4. [http://aesan.msssi.gob.es/CRLMB/docs/docs/metodos_analiticos_de_desarrollo/EU-Harmonised-SOP-LIPO-LCMSMS_Version4.pdf].
12. Gerssen, A., van Olst, E. H. W., Mulder, P. P. J. and *et. al.* 2010. In-house validation of a liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the analysis of lipophilic marine toxins in shellfish using matrix-matched calibration. Anal. Bioanal. Chem. 397: 3079-3088.
13. 行政院衛生署。2012。食品化學檢驗方法確效規範。 [<http://www.fda.gov.tw/TC/siteList.aspx?pn=9&sid=1574>]。

Simultaneous Quantification of Diarrhetic Shellfish Poisoning Toxins in Bivalve Molluscs Using LC-MS/MS

HSIEN-CHUN CHO, CHIA-DING LIAO, HSU-YANG LIN,
HSIU-KUAN CHOU AND HWEI-FANG CHEN

Division of Research and Analysis, FDA

ABSTRACT

Diarrhetic shellfish poisoning toxins (DSP) are produced by algae and can accumulate in filter feeding bivalves. A method to determine the lipophilic marine biotoxins from extracts of different species of bivalve molluscs was developed. Okadaic acid (OA), dinophysistoxin-1 (DTX-1) and gymnodimine-A (GYM-A) were determined. Mussel and Oyster were extracted with methanol and analyzed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) with an electrospray (ESI) ionization interface. Using the positive and negative ion mode, the parent ion and product ions of each diarrhetic shellfish poisoning toxin were selected. The LC separation was performed using a Waters X-bridge C18 column with the mobile phase consisting of gradient program of water and 90% acetonitrile with 6.7mM ammonia, at a flow rate of 0.2 mL/min. Regression coefficient for matrix-match calibration curve has to be at least 0.995. Good recoveries were found among various diarrhetic shellfish poisoning toxins, ranging from 81 to 114% (n=3). The coefficient of variance was below 17%, indicating this method is reliable. Three diarrhetic shellfish poisoning toxins could be simultaneously analyzed in a single 20-min run. This method provided higher sensitivity and accuracy than the mouse assay and did not require to sacrifice animals. This method could be applied for routine DSP analysis.

Key words: diarrhetic shellfish poisoning toxins, LC/MS/MS