

食品中海洋生物毒素之檢驗方法－麻痺性貝毒之檢驗(二)

Method of Test for Marine Biotoxin in Foods- Test of Paralytic Shellfish Poisoning Toxins (2)

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於貝類中巨蚌毒素(saxitoxin)等 6 品項麻痺性貝毒(見附表)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：TSK-Gel Amide-80, 5 μm, 內徑 2.0 mm × 25 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 × g 以上者。
 - 2.1.5. 振盪器(Shaker)。
 - 2.2. 試藥：甲酸銨、甲酸及鹽酸均採用試藥特級；乙腈採用液相層析級；去離子水(比電阻於25°C可達18 MΩ·cm以上)；巨蚌毒素等6品項麻痺性貝毒對照用標準品。
 - 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、20 mL、200 mL 及 1000 mL。
 - 2.3.3. 濾膜：孔徑 0.22 μm, Nylon 材質。
 - 2.3.4. 塑膠針筒：1 mL。
 - 2.4. 試劑之調製：
 - 2.4.1. 0.003N 鹽酸溶液
取鹽酸 50 μL, 緩緩加入去離子水 100 mL 中, 再加去離子水使成 200 mL。
 - 2.4.2. 含 0.1% 甲酸之 80% 乙腈溶液
取甲酸 1 mL 及乙腈 800 mL, 加去離子水使成 1000 mL。

2.4.3. 95%乙腈溶液

取乙腈 950 mL，加去離子水使成 1000 mL。

2.5. 移動相溶液之調製：

2.5.1. 移動相溶液 A

取甲酸銨 0.189 g 及甲酸 0.166 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 0.189 g 及甲酸 0.166 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：

精確量取適量巨蚌毒素等 6 品項麻痺性貝毒對照用標準品，以 0.003N 鹽酸溶液稀釋至 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，作為混合標準原液，於 4°C 貯存。臨用時分別取適量混合標準原液混合，以含 0.1%甲酸之 80%乙腈溶液稀釋至 10~1000 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 5 g，精確稱定，置於離心管中，加入含 0.1%甲酸之 80%乙腈溶液 10 mL，旋渦混合 1 分鐘後，振盪 10 分鐘，以 3000 \times g 離心 15 分鐘，取上清液，以含 0.1%甲酸之 80%乙腈溶液定容至 20 mL，經濾膜過濾，取濾液供作檢液。

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 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 混合標準原液 2~200 μL ，以氮氣吹乾後，加入空白檢液 1 mL，混合均勻，依下列條件進行液相層析串聯質譜分析。就各麻痺性貝毒之定量離子波峰面積，與對應之各麻痺性貝毒濃度，製作成 10~1000 ng/mL 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-80，5 μm ，內徑 2.0 mm \times 25 cm。

層析管溫度：26°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 (%)
0.0 \rightarrow 20.0	20 \rightarrow 40	80 \rightarrow 60
20.0 \rightarrow 30.0	40 \rightarrow 40	60 \rightarrow 60
30.0 \rightarrow 35.0	40 \rightarrow 20	60 \rightarrow 80
35.0 \rightarrow 45.0	20 \rightarrow 20	80 \rightarrow 80

移動相流速：0.2 mL/min。

注入量：20 μ L。

霧化電壓(Spray voltage)：4.0 kV。

毛細管溫度(Capillary temperature)：300 $^{\circ}$ C。

蒸發溫度(Vaporizer temperature)：250 $^{\circ}$ C。

鞘氣體壓力(Sheath gas pressure)：40 psi。

輔助氣壓力(Aux gas pressure)：30 arb。

偵測模式：多重反應偵測(multiple reaction monitoring, MRM)。偵測離子與碰撞能量(collision energy)如附表。

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：

精確量取檢液及標準溶液各20 μ L，分別注入液相層析串聯質譜儀中，依2.8.節進行分析，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)鑑別之，並依下列計算式求出檢體中各麻痺性貝毒之含量(ppb)：

$$\text{檢體中各麻痺性貝毒之含量(ppb)} = \frac{C \times V}{M}$$

C：由基質匹配檢量線求得檢液中各麻痺性貝毒之濃度 (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離子對與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如附表。

2. 食品中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

附表、巨蚌毒素等 6 品項麻痺性貝毒之多重反應偵測模式參數及定量極限

分析物		離子對	碰撞能量 (eV)	定量極限 (ppb)
中文名	英文名(縮寫)	前驅離子(m/z) > 產物離子(m/z)		
巨蚌毒素	saxitoxin (STX)	300>204*	25	100
		300>282	19	
新巨蚌毒素	neosaxitoxin (NEO)	316>298*	16	100
		316>220	24	
膝溝毒素 1	gonyautoxin 1 (GTX 1)	412>332*	17	100
		412>314	26	
		412>110	47	
膝溝毒素 2	gonyautoxin 2 (GTX 2)	396>316*	14	100
		396>298	24	
		396>220	34	
膝溝毒素 3	gonyautoxin 3 (GTX 3)	396>298*	24	50
		396>316	14	
		396>220	34	
膝溝毒素 4	gonyautoxin 4 (GTX 4)	412>314*	26	50
		412>332	17	
		412>110	47	

*定量離子對