

# 食品中氮代螺旋酸貝毒之檢驗方法建立

蔡乙禎 張詠聖 楊凱智 張美華 廖家鼎 高雅敏 王德原 陳惠芳

食品藥物管理署研究檢驗組

## 摘要

氮代螺旋酸(azaspiracid, AZA)為脂溶性的海洋毒素，主要是由微型甲藻所產生的代謝產物，雙殼貝類經由濾食，將氮代螺旋酸累積於貝肉組織中，人類誤食經氮代螺旋酸污染之貝類後，造成噁心，嘔吐，腹瀉及胃痙攣等中毒症狀，稱為氮代螺旋酸貝毒(azaspiracid poisoning, AZP)。有鑑於國際間發現貝類中氮代螺旋酸貝毒之案例，且本署預告訂定之「食品中汙染物質及毒素衛生標準草案」訂有其限量，故擬建立該檢驗方法。本研究取均質後之雙殼貝檢體以甲醇萃取氮代螺旋酸後，利用液相層析串聯質譜儀(liquid chromatograph/tandem mass spectrometer, LC/MS/MS)採多重反應偵測(multiple reaction monitoring, MRM)模式進行分析。選用竹蛤空白檢體進行添加回收試驗，添加濃度為2及10 ng/g，氮代螺旋酸AZA-1、AZA-2及AZA-3之五重複平均回收率介於72.6 - 108.6%之間，變異係數(CV%)皆小於15%，本檢驗方法之定量極限為0.002 mg/kg。以建立之方法分析貝類標準參考物質CRM-AZA-Mus，AZA-1、AZA-2及AZA-3檢測值分別為1.42、0.314及0.203 mg/kg與標示值1.16、0.273及0.211 mg/kg略為接近，顯示本方法之準確性佳。另抽驗市售13件雙殼貝類檢體，檢驗結果皆未檢出。

**關鍵詞：**氮代螺旋酸貝毒、雙殼貝、液相層析串聯質譜儀

## 前言

氮代螺旋酸(azaspiracids, AZA)是由微型甲藻*Azadinium spinosum*產生的一種脂溶性多環醚藻毒素，可在人體中累積，引起疾病<sup>(1)</sup>。最早案例於1995年，有幾個荷蘭人在愛爾蘭的基拉里港口食用藍貝(*Mytilus edulis*)後出現中毒症狀而受到注目，其症狀為典型的下痢性貝毒(diarrhetic shellfish poisoning, DSP)綜合徵狀，但該貝類經分析後其DSP毒素含量非常少，Satake等人將來自愛爾蘭有毒貝類進行毒素分離及結構分析，Nicolaou及Frederick等人進行

結構修改，發現其毒素含有氮、聚醚、環胺及羧酸的螺旋多環聚合物。這種新穎的海洋生物毒素被命名為azaspiracid (AZA)<sup>(2)</sup>。之後在歐洲國家及來自非洲的各種雙殼貝類物種中檢測到AZA，貝類包括牡蠣、扇貝和蛤蜊。James等人提出其致病藻類是鞭毛藻(*Protoperidinium crassipes*)，隨後的研究由Tillman等人指出其主要產生致病毒素的是*Azadinium spinosum*，一種新發現的鞭毛藻物種，表示*P. crassipes*可能捕食*Azadinium spinosum*藻類後而產生毒素<sup>(3)</sup>。

AZA-1是最早被分離出來的毒素，利用

質譜分析法(mass spectrometry, MS)及核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)解析AZA-1的結構，並以電灑游離法離子化正離子(positive electrospray ionization, ESI<sup>+</sup>)，游離形成[M+H]<sup>+</sup>離子對 $m/z$ 為842；AZA-1在貝肉中是最常見的類型，為毒素組成中所占比例最高，結構與其他毒素明顯不同，屬脂溶性聚醚化合物，無色非晶質固體，分子量為841.5 g/mol，含有螺旋環的含氮聚醚，末端含有羧基，碳骨架由40個碳原子組成，分子中有20個立體異構中心和9個環狀結構。1997年在愛爾蘭西北海岸的小村莊發生贖貝引起的AZP，經NMR分析後發現2個AZA的類似物，分別於C-8接有甲基及C-22去掉1個甲基分子，各別命名為AZA-2及AZA-3<sup>(4,5)</sup>，其離子對分別為856  $m/z$ 及828  $m/z$ 。

AZA在1 mol/L的乙酸/甲醇溶液或1 mol/L的氨水溶液中加熱150分鐘後毒性不受影響，在冷藏條件下可長期儲存。與DSP毒素類似，人類食入受到AZA污染的貝類數小時後，會出現嚴重的急性症狀包括噁心、嘔吐、腹瀉及胃痙攣等，症狀可持續2 - 3天<sup>(6)</sup>。

歐洲食品安全局(european food safety authority, EFSA)檢視既有之數據並根據急毒性參考劑量(acute reference dose, ARfDs)，以160  $\mu\text{g}$  AZA eq./kg貝肉當作限量標準<sup>(7)</sup>。EFSA將ARfD定義為在食物中可計算的毒素含量；依據體重顯示在24小時內消化後，對攝食者健康風險沒有明顯的影響。而以ARfD作為基礎，AZA-1建議最小允許量是30  $\mu\text{g}$  AZA-1 eq./kg貝肉，顯示每人劑量不會超過12  $\mu\text{g}$  AZA-1 eq./60 kg<sup>(8,9)</sup>。此外，美國食品藥物管理局(food and drug administration, FDA)也以0.16 ppm當量計算的AZA作為限量標準。

目前針對AZA的檢驗方法是以小鼠生物試驗法(mouse bioassay)、高效液相層析(high-performance liquid Chromatography, HPLC)、液相層析串聯質譜法(liquid chromatography/

tandem mass spectrometry, LC/MS/MS)等為主，小鼠生物試驗法具有可廣泛使用、不需複雜設備等優點，但是其靈敏度及重複性不佳，且僅能檢測到貝肉組織中10 - 40%的AZA，僅有高含量AZA的貝肉組織中產生陽性結果<sup>(10,11)</sup>。LC/MS/MS法具有分析快速、靈敏度高及選擇度佳等優點，惟毒素標準品價格昂貴及需較高階的儀器設備<sup>(12)</sup>。

基於國際間曾發生中毒事件，且制定有雙殼貝類中氦代螺旋酸貝毒之限量標準，本研究之目的為建立雙殼貝類中氦代螺旋酸貝毒之檢驗方法，並以建立之方法進行市售貝類中氦代螺旋酸貝毒含量調查，建立背景資料，並將檢驗方法公開作為檢驗執法之依據及外界監測貝毒之所需。

## 材料與方法

### 一、材料與試藥

#### (一)檢體來源

本研究之雙殼貝類檢體係106年11月購自台北地區之傳統市場及大賣場。包括文蛤、馬蹄蛤、竹蛤、血蛤、海瓜子、赤嘴蛤、蚶、生蠔、北寄貝、干貝及白貝，共13件檢體。

#### (二)溶劑與標準品

甲醇採用液相層析級(Merck, Darmstadt, Germany)；甲酸及甲酸銨為試藥特級(Wako, Osaka, Japan) (Sigama-Aldrich, Louis, USA)。氦代螺旋酸AZA-1標準品(1.30 ± 0.07  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、AZA-2標準品(1.22 ± 0.06  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、AZA-3標準品(1.18 ± 0.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )及標準參考物質CRM-AZA-MUS-d (AZA-1含量為1.16 ± 0.10  $\mu\text{g}/\text{g}$ 、AZA-2含量為0.273 ± 0.024  $\mu\text{g}/\text{g}$ 及AZA-3含量為0.211 ± 0.023  $\mu\text{g}/\text{g}$ ) (National Research Council, Halifax, NS, Canada)。

## (三)器材

離心管(50 mL, PP材質)、容量瓶(5 mL及20 mL)、濾膜(孔徑0.22 μm, PTFE材質)。

## (四)標準溶液之配製

各別取氨代螺旋酸AZA-1標準品384.6 μL、AZA-2標準品409.8 μL及AZA-3標準品423.7 μL，以甲醇定容至5 mL，作為標準溶液，於4°C避光儲存備用。

## 二、儀器設備

(一)高效液相層析串聯質譜儀：包括液相層析儀(Acquity UPLC® System, Waters, USA)

和串聯式質譜儀(Xevo TQ-S micro, Waters, USA)

(二)液相層析管柱：1.7 μm，內徑2.1 mm × 10 cm (Acquity UPLC® BEH C18, Waters, USA)

(三)離心機(Allegra 25R centrifuge, Beckman Coulter, USA)

(四)旋渦混合器(Vortex Genie-2, Scientific Industries, USA)

(五)高速組織研磨振盪均質機(2010 GenoGrinder®, SPEX SamplePrep, USA)

(六)去離子水製造機(Millipore milli-Q, Millipore, USA)

## 三、檢液之調製

將檢體均質，取約2 g，精確稱定，置於50 mL離心管中，加入甲醇9 mL，旋渦混勻後，以高速組織研磨振盪均質機於1000 rpm振盪1分鐘，於4°C、2000 xg離心10分鐘，收集上清液，殘渣以上述步驟重複一次，合併上清液，再以甲醇定容至20 mL，混合均勻，經PTFE濾膜過濾，供作檢液。

## 四、基質匹配檢量線之製作

取竹蛤空白檢體，依檢液調製以濾膜過濾，分別量取濾液1 mL，以氮氣吹乾，分別加入氨代螺旋酸適量標準溶液2 - 100 μL，再加入甲醇使體積為1 mL，混和均勻，製作成AZA-1、AZA-2及AZA-3 0.2 - 10 ng/mL (0.2、0.5、1、2、5及10 ng/mL)之基質匹配檢量線。

## 五、儀器參數之設定

## (一)UPLC分析條件

移動相溶液A：稱取甲酸銨0.315 g及量取甲酸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。

移動相溶液B：稱取甲酸銨0.315 g及量取甲酸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。

移移動相溶液：如表一。

表一、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

動相流速：0.25 mL/min

注入量：10 mL

## (二)質譜條件

離子化模式：電灑離子化正離子(positive ion electrospray ionization, ESI<sup>+</sup>)

毛細管電壓(capillary voltage)：1.0 kV

管柱溫度(column temperature)：45°C

離子源溫度(ion source temperature)：150°C

溶媒揮散溫度(desolvation temperature)：450°C

溶媒揮散流速(desolvation flow rate)：

850 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)如表二。

表二、氦代螺旋酸標準品之多重反應偵測模式參數

Compound	Ion pair	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
	Precursor ion (m/z) > product ion (m/z)		
AZA-1	842.6 > 824.5 <sup>a</sup>	48	28
	842.6 > 806.5		40
AZA-2	856.6 > 838.5 <sup>a</sup>	38	28
	856.6 > 820.5		42
AZA-3	828.6 > 810.4 <sup>a</sup>	76	26
	828.6 > 792.4		38

<sup>a</sup>MRM transition used for quantitation.

## 六、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，注入液相層析串聯質譜儀，依第五節儀器參數條件進行分析，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比鑑別之，並依下列計算式求出檢體中氦代螺旋酸AZA-1、AZA-2或AZA-3之含量：

檢體中氦代螺旋酸AZA-1、AZA-2或AZA-3之含量(mg/kg) =  $\frac{C \times V}{M \times 1000}$

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

V：檢液最後定容之體積(mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

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%)，容許範圍如表三。

## 七、添加回收試驗

取經均質貝肉2 g，置於離心管中，分別加入100 ng/mL標準溶液40及200 μL，相當於

表三、相對離子強度容許範圍

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

每克檢體中分別添加2及10 ng之標準品，依檢液調製流程操作並進行分析，經帶入基質匹配檢量線比對後，與添加濃度比較。前處理方法進行五重複試驗，同時操作空白試驗，計算五重複試驗間之平均回收率及變異係數(coefficient of variation, CV)，以評估本方法之準確度及精密度。

## 八、基質效應(matrix effect)評估

分別建立標準曲線(calibration curve in solvent)及基質匹配檢量線(matrix-matched calibration curve)，並依下列計算公式評估基質效應。

基質效應 = (基質匹配檢量線之斜率 - 標準曲線之斜率) / 標準曲線之斜率 × 100%。

## 九、定量極限之評估

取標準溶液分別進行空白樣品之一系列添加回收試驗，依前述方法進行分析，就所得波峰之訊號強度計算其訊噪比(S/N ratio)，就分析物之定量離子訊噪比 ≥ 10且回收率及變異係數符合本署食品化學確效規範<sup>(13)</sup>之最低濃度為檢驗方法之定量極限(limit of quantification, LOQ)。

## 十、標準參考物質之評估

標準參考物質CRM-AZA-Mus-d之基質為*Mytilus edulis*之均質的貝肉組織。稱取標準參考物質約2 g，精確稱定，依檢液調製流程操作並進行分析，經帶入基質匹配檢量線比對後，與已知濃度比較，前處理方法進行三重

試驗，計算三重複試驗間之平均回收率及變異係數，以評估本方法之可行性。

## 十一、市售雙殼貝類調查

於台北地區之傳統市場及大賣場抽購市售雙殼貝類，以本研究所建立之方法分析，據以了解本方法之適用性及雙殼貝肉中氮代螺旋酸AZA-1、AZA-2及AZA-3之含量。

## 結果與討論

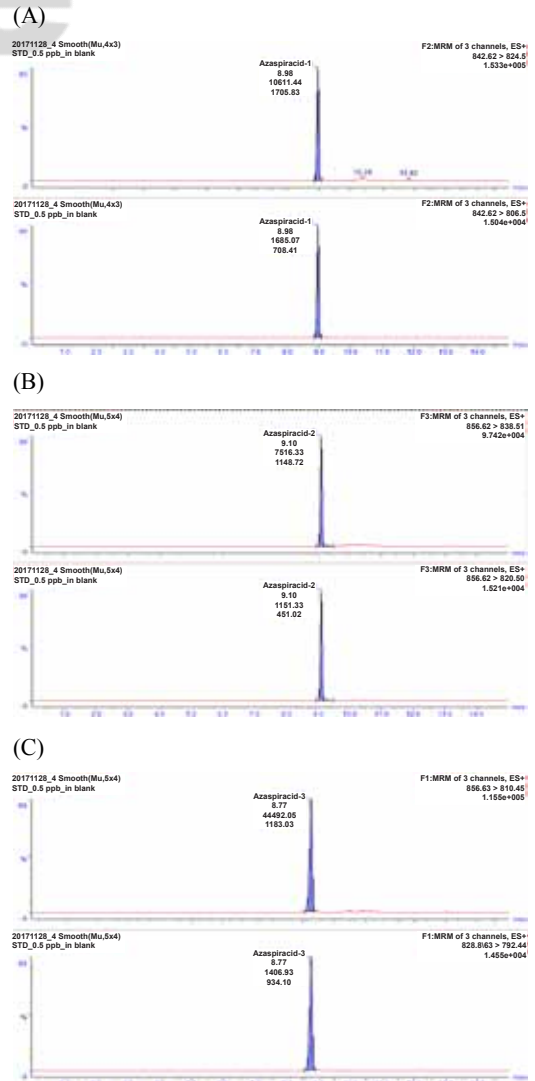
### 一、儀器分析條件

以液相層析四極柱式串聯質譜儀做為檢測儀器，採用電灑游離法(electrospray ionization, ESI)，偵測方式為多重反應MRM模式，為促進離子化及增加質譜分析之感度，本研究於移動相中添加0.1%甲酸，以形成氫加成之離子片段 $[M+H]^+$ 。首先探討分析物氮代螺旋酸貝毒AZA-1、AZA-2及AZA-3之質譜最佳參數，設定適當之毛細管電壓、溶媒揮散溫度、氣體流速、進樣錐電壓及碰撞能量等，使分析物可順利離子化，選定前驅離子(precursor ion)及產物離子(product ion)，以獲得最大偵測感度。圖一為0.5 ng/mL氮代螺旋酸AZA-1、AZA-2及AZA-3標準溶液之MRM層析圖譜，分析時間為15分鐘。

### 二、方法確效

#### (一) 定量方式評估

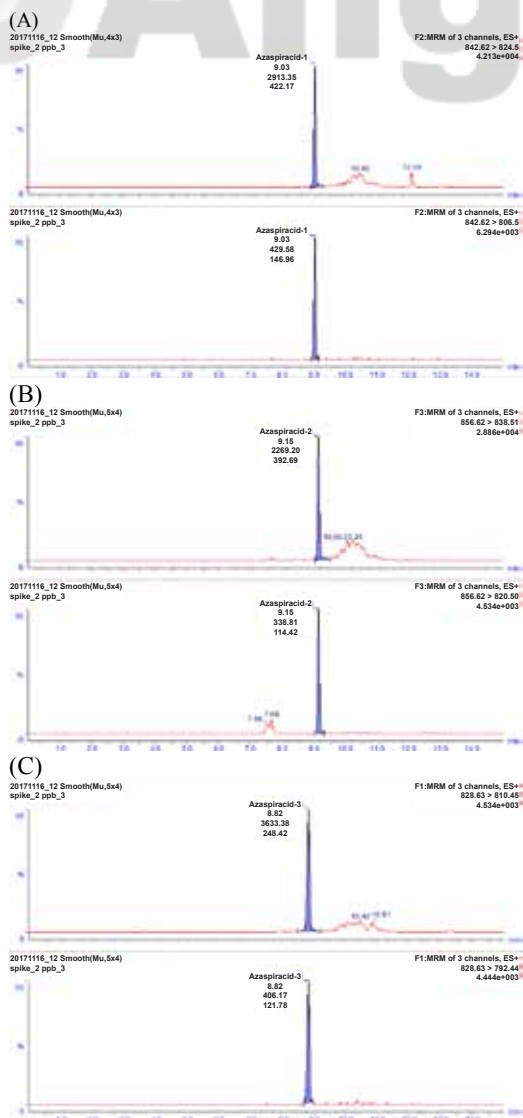
分別製作標準曲線及基質匹配檢量線，以評估基質效應。標準曲線係標準品以甲醇稀釋至0.2 - 10 ng/mL之標準溶液所製備，另取空白檢體，依檢液調製流程後添加標準品配製成0.2 - 10 ng/mL之基質匹配檢量線，結果如表四所示，標準曲線及基質匹配檢量線之線性回歸方程式之 $r^2$ 值皆在0.99以上，顯示於該濃度範圍內線性



圖一、以LC/MS/MS分析0.5 ng/mL氮代螺旋酸標準溶液AZA-1(A)、AZA-2 (B)及AZA-3 (C)之MRM層析圖譜

表四、基質效應之評估

Compound	Solvent		Matrix		Matrix effect (%)
	Slope	$r^2$	Slope	$r^2$	
AZA-1	24023.5	0.9964	15289.8	0.9986	-36.4
AZA-2	21085.9	0.9977	12864.7	0.9974	-39.0
AZA-3	24948.2	0.9957	20418.6	0.9992	-18.2



圖二、本檢驗方法氫代螺旋酸AZA-1 (A)、AZA-2 (B)及AZA-3(C)之定量極限MRM層析圖譜

關係良好。基質效應評估之結果顯示，AZA-1、AZA-2及AZA-3之曲線斜率差異在-39.0至-18.2%之間，顯示分析定量受基質干擾，因此，本研究選擇以基質匹配檢量線進行定量分析。

方法定量極限(limit of quantitation, LOQ)

一般是以最小標準品添加濃度的S/N比值大於10者即認定為LOQ。本研究考量S/N比值與回收率數據之結果，貝肉組織中氫代螺旋酸AZA-1、AZA-2及AZA-3皆為0.002 mg/kg (圖二)。

(二)添加回收試驗

於均質貝肉2 g中分別加入100 ng/mL標準溶液40及200 μL，相當於每克檢體中分別添加2及10 ng之標準品，進行添加回收試驗，氫代螺旋酸AZA-1、AZA-2及AZA-3之五重複平均回收率介於72.6 - 99.5%，同日內變異係數(CV%)介於2.8 - 10.4%(表五)，異日間變異係數介於4.0 - 10.8% (表六)，皆符合確效規範，顯示此方法有良好的準確度及精密度。

三、標準參考物質

表五、雙殼貝類中氫代螺旋酸之回收率及變異係數(同日間)

Compound	Spiked level (ng/g)			
	2		10	
	Recovery <sup>a</sup> (%)	CV (%)	Recovery (%)	CV (%)
AZA-1	72.6	2.8	98.6	7.2
AZA-2	82.8	3.5	99.5	10.4
AZA-3	84.6	4.8	99.1	9.3

<sup>a</sup>n=5

表六、雙殼貝類中氫代螺旋酸之回收率及變異係數(異日間)

Compound	Spiked level (ng/g)			
	2		10	
	Recovery <sup>a</sup> (%)	CV (%)	Recovery (%)	CV (%)
AZA-1	73.0	4.0	104.0	7.3
AZA-2	81.9	4.0	108.6	10.8
AZA-3	87.8	5.5	106.9	9.7

<sup>a</sup>n=10

表七、標準參考物質CRM-AZA-Mus中氮代螺旋酸之檢測結果

Compound	Certified value	Detected value <sup>a</sup>	CV
	(mg/kg)	(mg/kg)	(%)
AZA-1	1.160	1.420	4.5
AZA-2	0.273	0.314	3.6
AZA-3	0.211	0.203	4.6

<sup>a</sup>n=3

表八、市售雙殼貝類中氮代螺旋酸之含量檢測結果

編號	種類	產地	AZA (mg/kg) <sup>a</sup>
1	文蛤	台灣	N.D. <sup>b</sup>
2	馬蹄蛤	台灣	N.D.
3	海瓜子	台灣	N.D.
4	赤嘴蛤	台灣	N.D.
5	竹蛤	台灣	N.D.
6	血蛤	台灣	N.D.
7	牡蠣	台灣	N.D.
8	台灣蚵	台灣	N.D.
9	奧斯特生蠔	法國	N.D.
10	日本海瓜子	日本	N.D.
11	北寄貝	日本	N.D.
12	活白貝	日本	N.D.
13	生食干貝	日本	N.D.

<sup>a</sup>n=3<sup>b</sup>N.D.: 未檢出, AZA-1、AZA-2及AZA-3之定量極限皆為0.002 mg/kg

以建立之方法分析購自加拿大國家委員會之貝類參考物質CRM-AZA-Mus, 表七顯示氮代螺旋酸AZA-1、AZA-2及AZA-3檢測值分別為1.42、0.314及0.203  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 與標示值1.16、0.273及0.211  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 接近, 分別為標示值之122、115及96%, 且變異係數介於3.6 - 4.6%之間, 顯示本方法具準確性。

#### 四、市售雙殼貝類檢體之調查結果

自行抽驗市售雙殼貝類檢體, 包含1件文蛤、1件馬蹄蛤、1件海瓜子、1件日本海瓜

子、1件赤嘴蛤、1件竹蛤、1件血蛤、1件牡蠣、1件蚵、1件生蠔、1件活白貝、1件北寄貝及1件干貝, 共計13件(附錄一), 產地包括台灣、法國及日本, 分析結果如表八所示, 13件檢體皆未檢出氮代螺旋酸。

## 結 論

本研究建立以LC/MS/MS分析雙殼貝類中氮代螺旋酸貝毒之檢驗方法, 方法經確效評估, 回收率與重複性良好, 符合食品化學確效規範, 以建立之方法分析貝類標準參考物質CRM-AZA-Mus-d, 檢測值與標示值極為接近, 準確度佳, 靈敏度亦符合法規要求。本方法方便簡單、分析快速及靈敏度佳, 將來可供各衛生單位與檢驗機構參考使用。

## 參考文獻

1. Twiner, M.J., Rehmann, N., Hess, P. and Doucette, G.J. 2008. Azaspiracid shellfish poisoning: a review on the chemistry, ecology, and toxicology with an emphasis on human health impacts. *Mar. Drugs* 6: 39-72.
2. Tillmann, U., Elbrächter, M., Krock, B., John, U. and *et al.* 2009. *Azadinium spinosum* gen. et sp. nov. (*Dinophyceae*) identified as a primary producer of azaspiracid toxins. *Eur. J. Phycol.* 44: 163-179.
3. Castro, N.O., Domingos, P. and Moser, G.A.O. 2016. National and international public policies for the management of harmful algal bloom events. A case study on the Brazilian coastal zone. *Ocean Coast. Manage.* 128: 40-51.
4. Ofuji, K., Satake, M., McMahon, T., Silke, J. and *et al.* 1999. Two analogs of azaspiracid isolated from mussels, *mytilus edulis*, involved

- in human intoxication in Ireland. *Nat. Toxins* 7: 99-102.
5. Satake, M., Ofuji, K., Naoki, H., James, K.J. and *et al.* 1998. Azaspiracid, a new marine toxin having unique spiro ring assemblies, isolated from Irish mussels, *mytilus edulis*. *J. Am. Chem. Soc.* 120: 9967-9968.
  6. McCarron, P., Giddings, S.D., Reeves, K.L., Hess, P. and *et al.* 2014. A mussel (*Mytilus edulis*) tissue certified reference material for the marine biotoxins azaspiracids. *Anal. Bioanal. Chem.* 407(11): 2985-2996.
  7. Food and Drug Administration (FDA). 2011. Fish and fishery products hazards and controls guidance. [<https://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceRegulation/UCM251970.pdf>].
  8. European Food Safety Authority (EFSA). 2009. Marine biotoxins in shellfish-Pectenotoxin group I scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain. *EFSA J.* 1109: 1-47.
  9. Furey, A., O'Doherty, S., O'Callaghan, K., Lehane, M. and *et al.* 2010. Azaspiracid poisoning (AZP) toxins in shellfish: toxicological and health considerations. *Toxicon* 56: 173-190.
  10. Blay, P.K.S., Brombacher, S. and Volmer, D.A. 2003. Studies on azaspiracid biotoxins. III. Instrumental validation for rapid quantification of AZA 1 in complex biological matrices. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17: 2153-2159.
  11. Draisci, R., Palleschi, L., Ferretti, E., Furey, A. and *et al.* 2000. Development of a method for the identification of azaspiracid in shellfish by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 871: 13-21.
  12. James, K.J., Sierra, M.D., Lehane, M., Magdalena, A.B. and *et al.* 2003. Detection of five new hydroxyl analogues of azaspiracids in shellfish using multiple tandem mass spectrometry. *Toxicon* 41: 277-283.
  13. Ló pez-Rivera, A., O'Callaghan, K., Moriarty, M., O'Driscoll, D. and *et al.* 2010. First evidence of azaspiracids (AZAs): a family of lipophilic polyether marine toxins in scallops (*Argopecten purpuratus*) and mussels (*Mytilus chilensis*) collected in two regions of Chile. *Toxicon* 55: 692-701.
  14. Blanco, J., Arevalo, F., Moroño, A., Correa, J. and *et al.* 2017. Presence of azaspiracids in bivalve molluscs from Northern Spain. *Toxicon* 137: 135-143.

# Method of Test for Azaspiracid Shellfish Poisoning Toxin in Food

YI-CHEN TSAI, YUNG-SHENG CHANG, KAI-CHIH YANG,  
MEI-HUA CHANG, CHIA-DING LIAO, YA-MIN KAO, DER-YUAN WANG  
AND HWEI-FANG CHENG

Division of Research and Analysis, TFDA

## ABSTRACT

Azaspiracids (AZAs) are lipophilic polyether marine toxins that accumulate in various shellfish species in the tissue of bivalves through filter-feeding. Humans ate poisonous shellfish containing AZAs may cause nausea, vomiting, diarrhea, and stomach cramps, known as azaspiracids poisoning (AZP). In view of the incidents of AZP were happened internationally, this study aimed on the establishment of the analytical method for azaspiracids in foods. Liquid chromatograph/ tandem mass spectrometer (LC/MS/MS) with the multiple reaction monitoring mode (MRM) was applied. Bivalves samples were homogenized, extracted with methanol and analyzed by LC/MS/MS. Recovery studies were performed by spiking of 2 and 10 ng/g standards (AZA1-3) into blank calm samples. The average recoveries were between 72.6 and 108.6% and the coefficients of variation were between 2.8 and 1.8%. The limit of quantitation was 0.002 mg/kg. The established method was validated by testing of certified reference material (CRM-AZA-Mus). The detected values of AZA-1, AZA-2, and AZA-3 in CRM was 1.42, 0.314, and 0.203 mg/kg, respectively, which were closed to the certified value of 1.16, 0.273, and 0.211 mg/kg. Thirteen commercial samples of bivalves were surveyed. The results showed AZA-1, AZA-2, and AZA-3 were not found in all samples.

**Key words:** azaspiracids poisoning, bivalves, LC/MS/MS