

# LC-MS/MS를 이용한 패류 및 피낭류 중 마비성 패류독소 분석법의 유효성 검증

조성래 · 김동욱 · 유현재 · 조성해 · 류아라 · 이가정 · 목종수\*

국립수산과학원 식품위생기공과

## Validation of LC-MS/MS Method for Analysis of Paralytic Shellfish Toxins in Shellfish and Tunicates

Sung Rae Cho, Dong Wook Kim, Hean Jae Yu, Seong Hae Cho, Ara Ryu, Ka Jeong Lee and Jong Soo Mok\*

Food Safety and Processing Research Division, National Institute of Fisheries Science, Busan 46083, Korea

The mouse bioassay has been used widely for the monitoring of paralytic shellfish toxins (PSTs) in many countries. However, this method shows low sensitivity and high limit of detection (LOD), as well as it cannot confirm toxic profiles. Recently, LC-MS/MS method was studied for the quantitative of PSTs, however, the method has any problems with unstable retention times by ionization suppression caused by high salt concentration in shellfish extracts. To establish an alternative method for PSTs analysis, we tried to original LC-MS/MS methods adding desalting operation using amorphous graphitized polymer carbon solid-phase extraction cartridges. The method validation was conducted to determine linearity, limit of detection, limit of quantification (LOQ), accuracy, and precision in quantifying PSTs. The correlation coefficients for all tested PSTs maintained over 0.999. The LODs and LOQs for all PSTs were about 0.19-1.05 µg/kg and 0.58-3.18 µg/kg, respectively. The accuracies for PSTs were 95.4-107.7% for saxitoxin group, 97.1-100.9% for gonyautoxin group, 99.0-100.8% for N-sulfocarbamoyl toxin group, and 96.8-104.6% for decarbamoyl toxin group. These results indicate that the modified LC-MS/MS method was appropriate for analyzing the PSTs in shellfish and tunicates.

Keywords: Paralytic shellfish toxin, Solid-phase extraction, LC-MS/MS, Shellfish, Tunicate

### 서론

패류는 이동성이 거의 없고 먹이활동을 여과섭식방법으로 부유하는 플랑크톤 등을 섭취하며 살아간다. 이 과정에서 패류는 식물성 플랑크톤이 생산하는 독소를 체내에 축적하게 되며, 우리나라를 비롯한 전 세계 연안국에서 패류독소 발생이 매년 보고되고 있다(Hall, 1991; Tuner et al., 2019; Park et al., 2000). 이들 패류독소에는 *Alexandrium* spp., *Gymnodinium* sp. 등이 생산하는 것으로 중독 시 마비를 유발하는 마비성 패류독소(paralytic shellfish poison), 와편모조류인 *Dinophysis* spp.와 *Prorocentrum* spp.에 의해 생산되는 것으로 설사를 유발하는 설사성 패류독소(diarrhetic shellfish poison), *Pseudonitzschia*

spp.가 생산하는 것으로 신경계 장애를 유발하는 기억상실성 패류독소(amnesic shellfish poison) 등이 대표적이며, 이 외에도 다수의 독소 성분이 알려져 있다(Noguchi, 2003; Mok et al., 2012; Lee et al., 2017). 마비성 패류독소는 열에 안정하여 가열 조리한 패류를 섭취한 후 중독된 사고가 보고되어있다(Noguchi, 2003; Toyofuku, 2006; Mok et al., 2012). 마비성 패류독소로 인한 최초의 사망 사고는 알래스카에서 1790년 러시아의 탐험대가 홍합(*Mytilus californianus*)을 먹고 100여명이 사망한 사례이며, 그 후 캐나다의 대서양과 태평양 연안에서 발생하였고, 우리나라의 이웃나라인 일본, 중국 또한 이로 인한 사망사고가 보고되어있다(Noguchi, 2003). 우리나라의 경우에는 1986년 부산 감천 만에서 진주담치(*Mytilus edulis*)를 섭취

\*Corresponding author: Tel: +82. 51. 720. 2820 Fax: +82. 51. 720. 2619

E-mail address: mjs0620@korea.kr



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2020.0174>

Korean J Fish Aquat Sci 53(2), 174-180, April 2020

Received 19 December 2019; Revised 13 January 2020; Accepted 18 February 2020

저자 직위: 조성래(석사 후 연구원), 김동욱(연구사), 유현재(연구원), 조성해(연구원), 류아라(석사 후 연구원), 이가정(연구사), 목종수(연구관)

하고 2명이 사망한 사고가 최초의 기록이며, 이후에도 경남 연안의 진해만 등에서는 매년 반복적으로 마비성 패류독소가 검출되고 있다(Chang et al., 1989; Mok et al., 2013). 우리나라를 비롯한 세계 여러 나라에서는 소비자에게 안전한 패류 제공을 위해 마우스 복강주사법을 이용한 동물시험법을 채택하여 사용하고 있으며, 우리나라 식품공전(KMFDS, 2019a)에서는 마비성 패류독소의 허용기준치를 0.8 mg/kg으로 정하여 관리하고 있다(Chang et al., 1987; Murakami et al., 2000; Jang et al., 2005; Toyofuku, 2006; Mok et al., 2013; KMFDS, 2019b). 동물시험법은 검출한계가 약 40 µg STX equivalent/100 g로 알려져 있으며(Hall, 1991), 비교적 높은 검출한계에도 불구하고 다수의 시료를 신속하게 분석 가능하고 시료 중 총 독소 량 분석에 적합한 방법으로 1965년 AOAC에 채택된 이후 약 50년 이상 지속적으로 이용되어오고 있다(Barbera-Sanchez et al., 2004). 그러나 실험동물 사용을 최소화하자는 국제적 압력이 높아지고 있으며, 각각의 독소 조성에 대한 정보를 얻을 수 없는 단점이 부각되고 있다(Mok et al., 2013). 실제 마비성 패류독소는 20종류 이상의 성분으로 구성되어 있다(Oshima, 1995; Luckas et al., 2003; Song et al., 2013). 많은 연구자들은 동물시험법을 대체할 수 있으며 각각의 독성 성분을 한번에 정량 가능한 액체크로마토그래프 형광 검출법(pre-column oxidation, post-column oxidation)을 주목 하였으나(Turner et al., 2019), 이 방법들은 높은 감도를 가지지만 시료 전처리 및 장비분석시간이 긴 단점을 가지고 있다(Dell'Aversano et al., 2005; Song et al., 2013; Yang et al., 2017). 한편, hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry법은 짧은 분석시간과 동시분석이 가능하다는 점에서 많은 연구가 이루어지고 있지만(Quilliam et al., 1989; Dell'Aversano et al., 2005), 높은 염에 의해 이온화가 저해된다는 문제점이 있다고 보고되었으며, 이에 따라 고상 추출 방법을 통하여 염을 제거한 후 분석하는 방법이 연구되고 있다(Turner et al., 2015; Yang et al., 2017).

본 연구에서는 우리나라 마비성 패류독소의 공인 시험법인 동물시험법을 대체할 수 있는 최적 기기분석법을 확립하기 위하여 liquid chromatograph-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)를 이용한 분석법에 대한 선행연구를 검토하여 최적의 분석조건을 제시하였다(Quilliam et al., 1989; Song et al., 2013; Turner et al., 2015). 그리고 이 분석법에 대한 유효성을 검증하고, 우리나라 연안 주요 패류 및 피낭류의 생산품종 특성에 부합하는지 그 타당성을 검토하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 시약 및 표준독소

마비성 패류독소 분석을 위한 표준독소는 인증표준물질(certified reference material) 등급의 saxitoxin (STX), decarbamoyl-saxitoxin (dcSTX), gonyautoxin (GTX) 1 & 4, GTX 2 &

3, GTX 5, decarbamoyl-gonyautoxins (dcGTX) 2 & 3, neosaxitoxin (NEO) 및 protogonyautoxin (C) 1 & 2를 National Research Council (NRC; Halifax, Canada)에서 구입하여 분석에 사용하였다. 그리고 실험에 사용된 모든 시약은 analytical 또는 LC grade를 사용하였으며, 마비성 패류독소 추출용매는 acetic acid (Merck, Darmstadt, Germany), 25% ammonium hydroxide (Sigma, St. Louis, MO, USA)을 사용하였다. 고상추출(solid phase extraction, SPE) 카트리지는 EN-VI-Carb SPE cartridge (250 mg/3 mL, Sigma, St. Louis, MO, USA)를 사용하였고, 카트리는 활성화 시킨 후 추출물을 흡착시켜 염을 정제하는 과정에 사용되었다. 정제에 사용된 용매는 acetic acid, acetonitrile (Merck, Darmstadt, Germany) 및 ammonium hydroxide (Sigma, St. Louis, MO, USA)을 사용하였다. 이동상 제조에는 formic acid (Fluka, Buchs, Germany), ammonium hydroxide (Sigma, St. Louis, MO, USA), acetonitrile (Merck, Darmstadt, Germany)을 사용하였으며, 탈 이온수는 Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, MA, USA)에서 정제하여 사용하였다.

### 추출 및 정제

균질화된 패류시료 5 g을 50 mL 폴리프로필렌 시험관에 넣고, 5 mL 1% acetic acid을 가하여 혼합한 후 water bath에서 100°C, 5분간 가열 추출하였고, 실온에서 냉각하였다. 추출한 시료는 5,000 rpm (2,750 g)에서 5분간 원심 분리하였다. 분리된 상등액 1 mL을 취한 후 5 µL 25% ammonium hydroxide을 더해 pH 5.0-6.0으로 중화시켜 사용하였다.

고상추출 카트리는 3 mL의 20% acetonitrile (0.1% acetic acid 함유)와 3 mL의 0.025% ammonium hydroxide을 순차적으로 흘려 활성화하였다. 시료 추출액 400 µL을 활성화된 카트리에 3 mL/min로 흘린 후 700 µL의 증류수로 세척하였다. 그리고 2 mL의 20% acetonitrile (0.1% acetic acid 함유)로 용출하여 시험용액으로 사용하였다.

### LC-MS/MS 분석조건

LC-MS/MS를 이용한 마비성 패류독소 분석법 확립을 위하여 Xevo TQ-S tandem quadrupole mass spectrometer (Waters, Milford, MA, USA)와 Acquity UPLC H-class (Waters, Milford, MA, USA)를 사용하였고, column은 Acquity BEH Amide UPLC column (1.7 µm, 2.1 mm×50 mm; Waters, Milford, MA, USA)을 사용하였다. 이동상으로 A 용액은 0.015% formic acid와 0.06% ammonium hydroxide가 되도록 제조하여 사용하였고, B 용액은 70% acetonitrile과 0.01% formic acid가 되도록 제조하여 사용하였다. 마비성 패류독소의 질량분석은 electrospray ionization (ESI)법의 positive 또는 negative ion mode를 사용하였으며, multiple reaction monitoring (MRM) 조건으로 분석하였다(Table 1, 2).

## 분석법 검증

LC-MS/MS 분석법의 유효성 검증을 위하여 직선성(linearity), 검출한계(limit of detection, LOD), 정량한계(limit of quantitation, LOQ), 정확성(recovery), 정밀성(precision) 등을 Codex Alimentarius Commission (2014)의 지침에 따라 검토하였다. 정확성과 정밀성은 패류(담치)에 총 12종의 마비성패류독소 표준물질[NRC, CRM (certified reference material)]을 3가지 농도로 조제 후 첨가하여 위와 동일한 방법으로 추출한 다음 일내(intra-day)정밀성을 1일 5회 및 일간(inter-day)정밀성실험을 3일 5회 반복 측정하였다. 검출한계와 정량한계는 표준용액을 5회 반복 측정된 검량선을 작성하여 검량선의 기울기와 y절편의 표준편차를 이용하여 구하였으며, 검량선 y절편 값의 표준편차에 3.3배를 곱한 값을 기울기 평균값으로 나눈 값을 검출한계, 10배를 곱한 값을 기울기 평균값 나눈 값을 정량한계로 설정하여 평가하였다.

또한, LC-MS/MS 분석법이 우리나라 연안 주요 패류 및 피낭류 생산품종특성에 부합하는지 이에 따른 타당성을 검토하기 위해 독이 없는 것으로 확인된 담치(*Mussel Mytilus galloprovincialis*), 굴(*Oyster Crassostrea gigas*), 바지락(*Short-necked clam Ruditapes philippinarum*), 개조개(*Butter clam, Saxidomus purpuratus*), 키조개(*Comb pen shell Atrina pinnata*), 가리비(*Scallop Argopecten irradians*), 새조개(*Ark shell Scapharca broughtonii*) 등 패류 7종과, 멧게 (*Sea squirt Halocynthia roretzi*), 미더덕(*Warty sea squirt Styela clava*) 등 피낭류 2종의 시료에 총 12종의 마비성 패류독소 표준물질을 첨가하여 위와 동일한 방법으로 추출한 후 회수율을 확인하였다.

Table 1. Mass spectrometry parameters

Toxins <sup>1</sup>	Precursor (M/Z)	Product (M/Z)	Mode	Cone (V) <sup>2</sup>	CE (eV) <sup>3</sup>
STX	300	204	ESI+	10	22
NEO	316	126	ESI+	10	26
GTX1	410	367	ESI-	10	15
GTX2	394	351	ESI-	10	20
GTX3	394	333	ESI-	10	20
GTX4	410	367	ESI-	10	15
GTX5	380	300	ESI+	10	16
C1	474	122	ESI-	10	28
C2	396	298	ESI+	16	20
dcSTX	257	126	ESI+	10	20
dcGTX2	351	164	ESI-	10	30
dcGTX3	353	255	ESI+	10	18

<sup>1</sup>STX, saxitoxin; NEO, neosaxitoxin; GTX, gonyautoxin; C, protogonyautoxin, dcSTX, decarbamoyl-saxitoxin; dcGTX, decarbamoyl-gonyautoxin. <sup>2</sup>Cone (V), cone voltage in volts. <sup>3</sup>CE (eV), collision energy in electron volts.

## 결과 및 고찰

### LC-MS/MS 분석법 유효성 검증

확립된 LC-MS/MS 분석법 유효성검증을 위하여 표준물질 12종을 섞은 mixture를 6개의 농도범위로 제조하여 직선성을 검토하였다. 시험 시 오차범위를 확인하기 위해 5회 반복 분석한 결과 12종의 모든 표준물질의 상관계수(R<sup>2</sup>)는 0.99이상을 유지하는 높은 직선성을 나타내었다(Table 3).

STX group (STX, NEO)의 검출한계는 각각 0.19 및 1.05 µg/kg, 정량한계는 0.58 및 3.18 µg/kg이었으며, GTX group (GTX1, 2, 3, 4)의 검출한계는 각각 0.62, 0.50, 0.34 및 0.22 µg/kg, 정량한계는 1.88, 1.52, 1.03 및 0.65 µg/kg이었다. N-sulfo-carbamoyl toxin group (GTX5, C1, C2)의 검출한계는 0.42, 1.03 및 0.23 µg/kg, 정량한계는 1.26, 3.11 및 0.69 µg/kg이었으며, decarbamoyl toxin group (dcSTX, dcGTX2, 3)의 검출한계는 0.27, 0.53 및 0.23 µg/kg, 정량한계는 0.81, 1.61 및 0.69 µg/kg으로 나타났다(Table 3). 또한 Rey et al. (2017)는 HPLC를 이용하여 pre-column oxidation, post-column oxidation방법으로 검출한계, 정량한계를 분석한 결과 pre-column oxidation에서 검출한계가 7.31-51.08 µg/kg, 정량한계는 13.23-102.03 µg/kg이었으며, 그리고 post-column oxidation에서는 검출한계가 0.91-29.92 µg/kg, 정량한계는 1.47-64.77 µg/kg이었다. 이를 보았을 때 본 시험의 결과는 양호한 수준으로 확인되었다.

시험법의 정확성을 확인하기 위해 우리나라 대표 이매패류 중 하나인 담치를 선택하였고 독이 없음을 확인하고 실험을 진행

Table 2. LC-MS/MS operating condition for the analysis of paralytic shellfish toxins

Parameter	Condition			
Column	Amide column (2.1 mm I.d.×50 mm, 1.7 µm)			
Column temp.	60°C			
Injection volume	2 µL			
Gradient	Time (min)	Flow (mL/min)	Mobile phase	
			A (%)	B (%)
	initial	0.4	5	95
	4.0	0.4	5	95
	7.5	0.4	50	50
	9.0	0.5	50	50
	9.5	0.5	95	5
	9.8	0.8	95	5
	10.6	0.8	95	5
	11.0	0.4	95	5
Ionization	Electrospray ionization mode			
Desolvation temp.	450°C			
Capillary voltage	3 kV			

하였다. 3가지 농도의 표준용액을 첨가하여 5회 반복 측정하였고 일내(intra-day) 및 일간(inter-day) 실험을 통해 정확성과 정밀성을 확인하였다. STX group의 일내 정확성과 정밀성은 각각 95.4-107.7% 및 1.34-3.30%의 범위를 나타내었고, GTX group의 일내 정확성과 정밀성은 각각 97.1-100.9% 및 0.78-4.47%를 나타내었다. N-sulfocarbamoyl toxin group의 일내 정확성과 정밀성은 99.0-100.8% 및 0.86-3.53%를 나타내었고, decarbamoyl toxin group에서의 일내 정확성과 정밀성은 96.8-104.6% 및 0.58-2.20%의 결과를 나타내었다(Table 4). 또한, 일간 정확성 및 정밀성은 3일간 5회 반복 측정하여 나타내었다. STX group의 일간 정확성과 정밀성은 각각 96.7-106.6%의 정확성과 1.89-3.85%의 정밀성을 나타내었고, GTX group의 일간 정확성과 정밀성은 각각 96.6-101.3%의 정확성과 1.40-5.23%의 정밀성을 나타내었다. N-sulfocarbamoyl toxin group의 일간 정확성과 정밀성은 98.7-100.5%의 정확성과 1.06-3.53%의 정밀성을 나타내었고, Decarbamoyl toxin group에서의 일간 정확성과 정밀성은 98.1-103.5%의 정확성 그리고 1.04-2.93%의 정밀성의 결과를 나타내었다(Table 4). Codex Alimentarius Commission (2014)과 AOAC (2013)의 표준물질 첨가 농도에 따른 정확성 및 정밀성의 권장기준을 확인하였을 때, 정확성은 10 µg/kg에서 60-115% 그리고 100 µg/kg에서 80-110%를 요구하고 있으며, 정밀성의 경우 10 µg/kg에서 21%보다 낮은 정밀성을 요구하며 그리고 100 µg/kg는 15%보다 낮은 정밀성을 요구하고 있다. 따라서 본 시험방법은 이에 부합하는 결과를 나타내었다.

Table 3. Linearity, limits of detection (LOD) and limits of quantitation (LOQ) of paralytic shellfish toxins (n=5)

Toxins <sup>1</sup>	Concentration (µg/L)	Linearity (r <sup>2</sup> )	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)
STX	1.2-49.0	0.9986	0.19	0.58
NEO	1.0-41.0	0.9995	1.05	3.18
GTX1	1.2-47.0	0.9993	0.62	1.88
GTX2	2.0-81.0	0.9997	0.50	1.52
GTX3	0.9-34.0	0.9993	0.34	1.03
GTX4	0.4-14.8	0.9958	0.22	0.65
GTX5	1.1-42.0	0.9998	0.42	1.26
C1	2.7-108.0	0.9993	1.03	3.11
C2	0.8-32.0	0.9997	0.23	0.69
dcSTX	1.1-43.0	0.9996	0.27	0.81
dcGTX2	1.8-71.0	0.9995	0.53	1.61
dcGTX3	0.5-21.0	0.9998	0.23	0.69

<sup>1</sup>STX, saxitoxin; NEO, neosaxitoxin; GTX, gonyautoxin; C, protogonyautoxin; dcSTX, decarbamoyl-saxitoxin; dcGTX, decarbamoyl-gonyautoxin.

Table 4. Accuracy, intra-day repeatability and inter-day reproducibility of analytical method for paralytic shellfish toxins (n=5)

Toxins <sup>1</sup>	Spiked concentration (µg/kg)	Intra-day		Inter-day	
		Accuracy (%)	RSD <sup>2</sup> (%)	Accuracy (%)	RSD (%)
STX	49.0	95.4	1.34	96.7	2.13
	24.5	104.6	2.11	102.6	2.18
	12.3	107.6	2.36	106.6	1.89
NEO	41.0	95.9	2.34	98.1	2.36
	20.5	103.7	3.30	102.2	2.77
	10.3	107.7	3.30	104.8	3.85
GTX1	47.0	99.9	1.93	98.8	3.43
	23.5	99.6	1.98	98.9	1.85
	11.8	100.9	2.90	100.5	2.34
GTX2	81.0	100.1	0.78	100.4	1.40
	40.5	99.1	1.50	99.1	1.76
	20.3	100.8	2.33	100.5	2.55
GTX3	34.0	100.7	1.68	100.8	2.37
	17.0	99.1	1.71	99.0	2.53
	8.5	97.2	2.36	99.6	3.24
GTX4	14.8	100.4	3.21	100.5	3.71
	7.4	97.1	4.34	96.6	4.06
	3.7	99.5	4.47	101.3	5.23
GTX5	42.0	100.8	0.86	100.2	1.85
	21.0	99.0	0.93	99.3	1.06
	10.5	99.1	0.96	99.5	1.49
C1	108.0	100.2	1.13	100.5	2.46
	54.0	99.0	3.53	98.7	2.38
	27.0	100.5	3.36	99.2	3.53
C2	32.0	100.3	1.12	100.2	1.38
	16.0	100.0	1.33	99.4	1.52
	8.0	99.3	1.23	99.8	1.33
dcSTX	43.0	96.8	1.63	98.1	2.75
	21.5	103.4	0.87	102.1	1.77
	10.8	104.6	1.95	103.5	1.65
dcGTX2	71.0	98.8	1.10	99.8	2.93
	35.5	101.8	1.06	99.6	2.53
	17.8	101.5	2.20	101.2	2.44
dcGTX3	21.0	101.0	0.58	100.7	1.46
	10.5	98.9	1.06	98.9	1.04
	5.3	99.1	1.36	99.6	1.98

<sup>1</sup>STX, saxitoxin; NEO, neosaxitoxin; GTX, gonyautoxin; C, protogonyautoxin; dcSTX, decarbamoyl-saxitoxin; dcGTX, decarbamoyl-gonyautoxin. <sup>2</sup>RSD, relative standard deviation.

Table 5. Recovery of paralytic shellfish toxins in shellfish (n=5)

Toxins <sup>1</sup>	Spiked conc. (µg/kg)	Mussel		Oyster		Short neck clam		Ark Shell		Comb pen shell		Butter clam		Scallop	
		Recovery (%)	RSD <sup>2</sup> (%)	Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)
STX	12.25	103.4	1.43	112.3	2.50	105.3	0.95	87.5	2.32	100.7	1.58	103.8	3.07	100.6	1.06
NEO	10.25	115.7	2.20	126.8	2.88	117.5	2.73	95.6	1.02	116.5	3.48	106.9	4.68	107.5	0.76
GTX1	11.75	95.7	2.05	86.3	1.12	88.0	2.01	88.5	0.68	86.1	2.46	88.0	2.01	85.4	3.04
GTX2	20.25	94.7	0.93	91.2	2.50	94.9	1.13	93.0	1.97	89.7	1.33	91.1	1.19	94.0	0.95
GTX3	8.50	96.9	1.84	85.9	1.68	91.1	2.52	84.5	3.02	77.4	3.47	83.3	3.37	77.4	3.29
GTX4	3.70	103.8	2.33	107	3.83	104.3	1.42	91.9	2.08	100.5	3.50	106.5	5.26	93.5	2.59
GTX5	10.50	106.5	0.75	99.4	1.29	110.5	2.02	112.0	1.14	112.4	0.60	104.8	4.22	115.0	1.08
C1 <sup>5</sup>	27.00	91.5	4.02	46.8	3.19	82.4	2.94	74.9	5.49	77.3	3.73	70.0	2.34	81.1	4.21
C2	8.00	110.5	1.72	97.3	2.11	106.5	0.98	97.3	1.68	75.5	1.48	84.3	1.33	84.3	1.33
dcSTX	10.75	105.7	2.89	112	1.26	108.7	1.12	85.2	1.24	106.8	1.43	108.7	1.12	97.7	0.67
dc-GTX2	17.75	95.2	1.73	87.2	2.26	91.5	1.77	89.0	1.42	84.2	1.02	88.5	2.11	85.8	1.42
dc-GTX3	5.25	110.1	0.77	103.6	1.64	115.0	0.91	108.2	1.93	99.8	1.71	96.4	2.25	99.4	3.15

<sup>1</sup>STX, saxitoxin; NEO, neosaxitoxin; GTX, gonyautoxin; C, protogonyautoxin; dcSTX, decarbamoyl-saxitoxin; dcGTX, decarbamoyl-gonyautoxin. <sup>2</sup>RSD, relative standard deviation.

### 패류 및 피낭류에 대한 시료 적용성

우리나라 연안 주요 패류 7종 및 피낭류 2종에 대하여 확립된 LC-MS/MS를 이용한 마비성 패류독소 분석법을 적용하여 그 타당성을 검토하였고, 일정 농도의 표준용액 제조 후 시료에 첨가하여 위와 같은 방법으로 추출한 후 5회 반복 측정하여 품종 별 회수율을 확인하였다. 패류 7종 중 담치의 회수율은 91-115%, 굴에서 46-126%, 바지락에서 82-117%, 새꼬막에서

74-112%, 키조개에서 75-116%, 개조개에서 70-106%, 가리비에서는 77-115%의 결과를 보였다(Table 5). 피낭류 2종 중 멧게의 회수율은 77-138%, 미더덕에서는 70-141%의 결과를 나타냈다(Table 6). 본 실험결과에 따르면 굴에서 C1 값이 46%로 낮은 회수율을 보였으며, 피낭류 2종에서 C2 값이 138-141%로 높은 회수율을 보였다. Turner et al. (2015)은 패류 시료를 SPE cartridge를 이용해 염을 제거하여 LC-MS/MS로 분석한 결과 C1의 값은 45%, NEO의 값은 155%이었다고 보고하여 본 연구결과와 유사하였다. 하지만, Turner et al. (2015)에서 PSP 구성독소의 비독성은 STX group 중 STX, NEO 각각 1.00, 1.00 이었고, GTX group 중 GTX 1, 2, 3, 4에서 각각 1.00, 0.40, 0.60, 0.70이었고, N-sulfocarbamoyl toxin group 중 GTX 5에서 0.10, C1, 2에서 각각 0.01, 0.10이였으며, decarbamoyl toxin group 중 dcSTX에서 1.00, 그리고 dcGTX 2, 3에서 각각 0.20, 0.40이었다. 상대 비독성을 고려하였을 때, C1, C2의 상대비독성은 각각 0.01, 0.10 이었고, 나머지 마비성 패류독소 구성성분과 비교해 상대적으로 낮은 값을 나타내고 있었으며 굴에서 C1의 회수율이 비교적 낮았고, 피낭류 2종에서 C2의 회수율이 비교적 높았지만 전체 독량을 대비하여 보았을 때 큰 영향을 미치지 않을 것으로 보인다. 따라서 본 연구에서 확립한 LC-MS/MS를 이용한 마비성 패류독소 분석법은 우리나라 주요 패류 및 피낭류 분석에 있어서 문제가 없을 것으로 판단된다. 또한, LC-MS/MS를 이용한 마비성 패류독소 분석법은 비교적 낮은 검출한계와 약 12가지의 마비성 패류독소 성분을 동시에 정량할 수 있다는 장점이 있다. 나아가 우리나라 시기 또는 해역에 따른 마비성 패류독소 구성성분의 양상 확인 등에 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

Table 6. Recovery of paralytic shellfish toxins in tunicates (n=5)

Toxins <sup>1</sup>	Spiked concentration (µg/kg)	Sea squirt		Warty sea squirt	
		Recovery (%)	RSD <sup>2</sup> (%)	Recovery (%)	RSD (%)
STX	12.25	81.3	1.14	74.4	3.33
NEO	10.25	93.3	0.94	87.8	3.04
GTX1	11.75	89.5	0.80	90.2	2.75
GTX2	20.25	99.6	0.98	92.5	1.39
GTX3	8.50	95.1	4.05	96.2	2.79
GTX4	3.70	98.4	4.17	121.1	3.67
GTX5	10.50	111.2	0.72	111.2	1.65
C1 <sup>5</sup>	27.00	77.3	5.52	70.6	5.65
C2	8.00	138.8	1.56	141.8	1.01
dcSTX	10.75	82.6	2.01	76.7	1.38
dcGTX2	17.75	86.2	1.39	85.3	0.89
dcGTX3	5.25	119.6	1.74	116.6	1.37

<sup>1</sup>STX, saxitoxin; NEO, neosaxitoxin; GTX, gonyautoxin; C, protogonyautoxin; dcSTX, decarbamoyl-saxitoxin; dcGTX, decarbamoyl-gonyautoxin. <sup>2</sup>RSD, relative standard deviation.

## 사 사

이 논문은 국립수산물품질관리원 수산물안전연구사업 수출패류 생산해역 및 수산물 위생조사(R2019050)의 지원으로 수행된 연구이며 연구비 지원에 감사드립니다.

## References

- AOAC (Association of Official Methods of Analysis). 2013. Appendix K: Guidelines for dietary supplements and botanicals. AOAC International, Gaithersburg, MS, U.S.A., 8-9.
- Barbera-Sanchez AL, Soler JF, Astudillo LR and Chang-Yen I. 2004. Paralytic shellfish poisoning (PSP) in Margarita island, Venezuela. *Rev Biol Trop* 52, 89-98.
- Chang DS, Shin IS, Pyeun JH and Park YH. 1987. A study on paralytic shellfish poison of sea mussel, *Mytilus edulis*-food poisoning accident in Gamchun Bay, Pusan, Korea, 1986. *Bull Kor Fish Soc* 20, 293-299.
- Chang DS, Shin IS, Kim JH, Pyeun JH and Choe WK. 1989. Detoxification of PSP and relationship between PSP toxicity and *Protogonyaulax* sp. *Bull Kor Fish Soc* 22, 177-188.
- Codex Alimentarius Commission. 2014. Principle for the establishment of Codex methods of analysis. In: Procedural manual, twenty-first edition. Rome, Italy, 63-73.
- Dell'Aversano CD, Hess P and Quilliam MA. 2005. Hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry for the analysis of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins. *J Chromatogr A* 1081, 190-201. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.05.056>.
- Hall S. 1991. Natural toxins. In: Microbiology of marine food products. Ward DR and Hackney CR, eds. Van Nostrand Reinhold, New York, NY, U.S.A., 301-330.
- Jang JH, Yun SM and Lee JS. 2005. Paralytic shellfish poison profile in commercial shellfishes. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34, 924-928. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2005.34.6.924>.
- KMFDS (Korea Ministry of Food and Drug Safety). 2019a. Korea food code. Retrieved from <https://www.foodsafetykorea.go.kr/portal/safefoodlife/food/foodRvLv/foodRvLv.do> on Sep 24, 2019.
- KMFDS (Korea Ministry of Food and Drug Safety). 2019b. Korea food code. Retrieved from [https://www.foodsafetykorea.go.kr/foodcode/01\\_03.jsp?idx=12](https://www.foodsafetykorea.go.kr/foodcode/01_03.jsp?idx=12) on Sep 27, 2019.
- Lee KJ, Kwon SJ, Jung YJ, Son KT, Ha KS, Mok JS and Kim JH. 2017. Comparison of analytical methods for the detection of paralytic shellfish toxins. *Korean J Fish Aquat Sci* 50, 669-674. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2017.0669>.
- Luckas B, Hummert C and Oshima Y. 2003. Analytical methods for paralytic shellfish poisons. In: Manual on harmful marine microalgae, Hallegraeff GM, Andersen DM, Cembella DA and Enevoldsen HO, eds. UNESCO, Paris, France, 191-209.
- Mok JS, Oh EG, Son KT, Lee TS, Lee KJ, Song KC and Kim JH. 2012. Accumulation and depuration of paralytic shellfish poison in marine organisms. *Korean J Fish Aquat Sci* 45, 465-471. <http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2012.0465>.
- Mok JS, Song KC, Lee KJ and Kim JH. 2013. Validation of precolumn HPLC oxidation method for analysis of paralytic shellfish poison. *Korean J Fish Aquat Sci* 46, 147-153. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2013.0147>.
- Murakami R and Noguchi T. 2000. Paralytic shellfish poison. *J Food Hyg Soc Jan* 41, 1-10. <https://doi.org/10.3358/shokueishi.41.1>.
- Noguchi T. 2003. Marine toxins. *Nippon Suisan Gakkaishi* 69, 895-909. <https://doi.org/10.2331/suisan.69.895>.
- Oshima Y. 1995. Post-column derivatization liquid-chromatographic method for paralytic shellfish toxins. *J AOAC Int* 78, 528-532.
- Park MJ, Lee HJ, Son KT, Byun HS, Park JH and Jang DS. 2000. Comparison of paralytic shellfish poison contents and components in the different bivalve species. *J Fd Hyg Safe* 15, 293-296.
- Quilliam MA, Thomson BA, Scott GJ and Siu KW. 1989. Ion spray mass spectrometry of marine neurotoxins. *Rapid Commun Mass Spectrom* 3, 145-150. <https://doi.org/10.1002/rcm.1290030508>.
- Rey V, Botana AM and Botana AM. 2017. Quantification of PSP toxins in toxic shellfish matrices using post-column oxidation liquid chromatography and pre-column oxidation liquid chromatography methods suggests post-column oxidation liquid chromatography as a good monitoring method of choice. *Toxicol* 129, 28-35. <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2017.02.003>.
- Song KC, Lee KJ, Yu HS, Mok JS, Kim JH, Lim KS and Lee MA. 2013. Paralytic shellfish poisoning (PSP) analysis using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Korean J Fish Aquat Sci* 46, 154-159. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2013.0154>.
- Toyofuku H. 2006. Joint FAO/WHO/IOC activities to provide scientific advice on marine biotoxins (research report). *Mar Pol Bull* 52, 1735-1745. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2006.07.007>.
- Turner AD, Hatfield RG, Maskrey BH, Algoet M and Lawrence JF. 2019. Evaluation of the new European Union reference method for paralytic shellfish toxins in shellfish: A review of twelve years regulatory monitoring using pre-column oxidation LC-FLD. *Trend Anal Chem* 113, 124-139. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.02.005>.
- Turner AD, McNabb PS, Harwood DT, Selwood AI and Boundy MJ. 2015. Single-laboratory validation of a multitoxin ultra performance LC-hydrophilic interaction LC-MS/MS method for quantitation of paralytic shellfish toxins in bivalve shellfish. *J AOAC Int* 98, 609-621. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.14-275>.
- Yang X, Zhou L, Tan Y, Shi X, Zhao Z, Nie D, Zhou C and Liu

H. 2017. Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method coupled with dispersive solid-phase extraction for simultaneous quantification of eight paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish. *Toxins* 9, 206. <https://doi.org/10.3390/toxins9070206>.