

LC-MS/MS를 이용한 설사성패류독소의 분석조건 확립

이가정 · 스즈키 도시유키¹ · 김풍호 · 오은경 · 송기철 · 김지회^{2*}

국립수산과학원 식품안전연구단, ¹일본 중앙수산연구소, ²국립수산과학원 양식환경연구소

Establishment of a Method for the Analysis of Diarrhetic Shellfish Poisoning by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

Ka Jeong Lee, Toshiyuki Suzuki¹, Poong Ho Kim, Eun Gyoung Oh, Ki Cheol Song, and Ji Hoe Kim^{2*}

Food Safety Research Center, National Fisheries Research and Development Institute

¹Biochemistry and Food Technology Division, National Research Institute of Fisheries Science, Fisheries Research Agency, Yokohama, Japan

²Aquaculture Environment Research Institute, National Fisheries Research and Development Institute

Abstract To establish and validate a liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for the rapid and accurate quantitation of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins, we compared the results from different mobile phases and columns used for their analysis and collision energies for MS/MS experiments. Clear peaks of okadaic acid (OA) and dinophysistoxin-1 (DTX1) were obtained by using a mobile phase comprising aqueous acetonitrile containing 2 mM ammonium formate and 50 mM formic acid. The collision energies were optimized to facilitate the most sensitive detection for each toxin, namely, OA, DTX1, pectenotoxin-2 (PTX2), or yessotoxin (YTX). Further, the maximum ion response was obtained at a collision energy of 48 V for OA and DTX1. We compared the analytical performance of C₈ and C₁₈ columns. A wide range of toxins namely, OA, DTX1, PTX2, and YTX, except DTX3, were detected by both the columns. Although DTX3 was only detected by the C₈ column, we found that the C₁₈ column was also suitable for the quantitation of OA and DTX1 the toxins responsible for inducing diarrhea. The limit of detection of OA and DTX1 by the established LC-MS/MS conditions was 1 ng/g, and the limit of quantitation of the toxins under the same conditions was 3 ng/g. The process efficiencies were 91-118% for oysters (*Crassostrea gigas*) and 96-117% for mussels (*Mytilus galloprovincialis*) further, we observed no significant effect of matrix during the ionization process in LC-MS/MS. The comparison between mouse bioassay (MBA) and LC-MS/MS yielded varying results because low concentrations of OA and DTX1 were detected by LC-MS/MS in some shellfish samples, which provided positive results on MBA for DSP. The analysis time required by MBA for DSP analysis can be reduced by LC-MS/MS.

Key words: diarrhetic shellfish poisoning, LC-MS/MS, mouse bioassay, okadaic acid, dinophysistoxin-1

서 론

설사성패류독(Diarrhetic shellfish poisoning)은 *Dinophysis* spp.와 *Prorocentrum* spp.에 속하는 해양 식물성 플랑크톤이 생산하는 자연독으로, 중독 시 주로 설사, 복통, 메스꺼움, 구토 등 소화기계 장애를 나타내지만 아직 사망사례는 보고된 바 없다(1). 또한, 설사성패류독 식중독은 유럽에서는 1960년대부터, 일본에서는 1970년대에 각각 발생하였으나(1) 우리나라에서는 아직 공식적인 중독사고가 보고된 바 없다. 국립수산과학원에서는 1991년부터 남해안 주요 패류 생산해역에 대한 설사성패류독 모니터링을 실시하고 있으며, 일부 지역의 패류에서 마우스 시험으로 독성이 검

출되기도 하였다(2). 또 최근에는 우리나라 연안산 패류에서도 외국의 기준치에 훨씬 미달하는 미량이지만 okadaic acid(OA), dinophysistoxins(DTXs) 등의 독소가 존재하는 것이 확인되었다(3).

설사성패류독은 유독 성분의 기본적인 골격의 화학구조 특성에 따라 OA group, pectenotoxin(PTX) group, yessotoxin(YTX) group 등으로 구분된다(4,5). 이러한 독소 중 OA, DTXs 등 OA group 독소가 설사를 주로 유발하는 것으로 확인되어 있으며, 이 독소는 발암 promotor로도 알려져 있다(6,7). PTX group 및 YTX group 독소는 OA group 독소와 함께 검출되어 설사성패류독 성분으로 분류되고 있으나 동물에 경구투여 시 OA group에 비하여 독성이 훨씬 낮을 뿐 아니라(8-10) 설사도 유발하지 않는 것으로 보고되어 있다(6,11). 이에 따라 유럽연합에서는 유독성분별로 각각의 기준을 설정하고 있으며, YTX의 기준을 OA group이나 PTX group 독소보다 훨씬 높게 설정하였다(12). 또한 CODEX에서도 PTX나 YTX에 의한 중독사고가 보고되지 않아 OA, DTXs 등 OA group 독소에 대해서만 기준 설정을 추진하고 있다(13).

지금까지 설사성패류독 분석을 위하여 acetone 등의 용매로 추출한 독소를 마우스 복강에 투여하는 시험법(1,14)이 일반적으로 사용되어 왔다. 그러나 이 마우스 시험법은 유독성분의 일괄 정

*Corresponding author: Ji Hoe Kim, Aquaculture Environment Research Institute, National Fisheries Research and Development Institute, Tongyeong, Gyeongnam 605-943, Korea
Tel: 82-55-640-4740
Fax: 82-55-641-2036

E-mail: kimjihoe@korea.kr
Received June 11, 2009; revised July 17, 2009;
accepted July 17, 2009

량은 좋은 점이 있으나 각각의 독소를 별도로 정량할 수 없고, 유리지방산 등 혼재하는 다른 성분에 영향을 받으며, 감도도 좋지 못할 뿐만 아니라(15) 동물사용에 따른 윤리적인 문제점도 지적되고 있다(16). 이에 따라 최근 세계 각국에서는 동물을 사용하는 설사성패류독 분석법을 대체하기 위한 고감도 신속 정량법을 개발하고 있으며, 그 중 가장 유력한 분석법으로 고속액체크로마토그래피/질량분석기(LC-MS/MS)를 이용한 시험법이 등장하고 있다(17-20). LC-MS/MS 시험법은 마우스 시험법에 비하면 고가의 장비 사용에 따라 비용은 다소 많이 소요되지만 분석시간을 획기적으로 단축할 수 있고, 또한 미량의 패류독을 성분별로 정량할 수 있는 장점이 있다. 그렇지만 기기분석에서 이동상의 조성이나 컬럼 등 분석조건에 따라 검출할 수 있는 유독 성분이 달라지고, 감도도 크게 변하게 된다.

본 연구에서는 LC-MS/MS를 이용한 설사성패류독의 신속정밀 분석법 확립을 위하여 지금까지 여러 문헌을 통하여 보고된 각종 분석조건을 시험하여 최적의 조건을 확립하고, 확립된 조건에서 유효성 시험을 실시하였으며, 또 마우스 시험법의 결과와도 비교하였다.

재료 및 방법

시약 및 표준독소

분석에 사용된 acetonitrile과 methanol 등 용매는 Merck(Darmstadt, Germany) HPLC grade를, formic acid(Fluka, Buchs, Germany), ammonium formate(Sigma, St. Louis, MO, USA), acetic acid(Sigma) 등은 mass spectrometry grade를 각각 사용하였다. 증류수는 Milli-Q water purification system(Millipore, Bedford, MA, USA)에서 정제하여 사용하였다.

표준독소 중 OA, PTX2, YTX 및 OA와 DTX1이 포함된 certified reference material(CRM-DSP-MUS-b) 등은 Canada의 National Research Council(Halifax, Canada)에서, DTX1과 DTX3은 Wako(Osaka, Japan)에서 각각 구입하여 사용하였다.

패류시료의 처리

시험에 사용된 패류 시료는 탈각한 패육을 균질화하여 1g 칭량하고, 9배량의 90% methanol을 가하여 재균질화한 후 2,500×g에서 5분간 원심분리한 상정액을 0.45 µm filter(Millipore)로 여과하여 분석에 사용하였다.

분석 기기 및 조건

Mass spectrometer는 Thermo Finnigan TSQ Quantum discovery (San Jose, CA, USA)를 사용하였고, 유독성분 분리를 위한 high performance liquid chromatograph(HPLC) 또한 Thermo Finnigan MS Pump plus system(San Jose, CA, USA)을 사용하였다.

분석용 column은 대부분의 시험에서 Luna C₁₈(2)(5 µm, 150×2 mm; Phenomenex, Torrance, CA)를 사용하였으나 column 종류별 분리능 비교를 위해서는 Hypersil-BDS-C₈(3 µm, 50×2.1 mm; Keystone Scientific, Bellefonte, PA, USA)도 사용하였다. MS의 spray voltage는 4.5 kV, capillary temperature는 200°C, 시료검출은 selected reaction monitoring(SRM)법으로 하였으며, 각 성분 분석을 위한 기기의 parameter는 Table 1에 나타내었다.

이동상 조건별 시험

LC-MS/MS를 이용한 설사성패류독 분석을 위한 이동상 조건은 acetic acid 또는 formic acid와 ammonium formate를 일정농도

Table 1. MS/MS parameters for detection of diarrhetic shellfish poisoning toxins

Toxins	Parent ions (<i>m/z</i>)	Fragment ions (<i>m/z</i>)	Mode
OA	803.5	255.4	ES-*
DTX1	817.5	255.4	ES-
DTX3	1055.4	255.4	ES-
PTX2	903.5	137.0	ES-
YTX	1141.5	1061.5	ES-

OA, okadaic acid; DTX1, dinophysistoxin-1; DTX3, dinophysistoxin-3; PTX2, pectenotoxin-2; YTX, yessotoxin.

*Electrospray negative ion

첨가하는 두 가지 방법을 사용하여 비교하였다. 시험에는 용매의 비율이 점진적으로 높아지는 gradient program을 사용하였으며, 유속은 200 µL/min의 조건으로 하였다. 첫 번째 이동상 조건시험에서 A용액은 0.1% acetic acid 수용액, B용액은 acetic acid가 0.1% 함유된 95% acetonitrile 용액을 사용하였다(21,22). 두 번째 시험조건에서는 A용액은 formic acid와 ammonium formate가 각각 50 mM 및 2 mM이 되도록 한 수용액, B용액은 formic acid와 ammonium formate가 각각 50 mM 및 2 mM 농도로 함유된 95% acetonitrile 용액을 사용하였다(23,24). 두 가지 시험조건에서는 동일하게 A용액과 B용액의 비율을 80:20으로 시작하여 10분간에 걸쳐 B용액을 20%에서 100%까지 올린 후, 13분간 유지하여 독성분을 용출한 후 다시 20%로 낮춰 5분간 column의 평형화 시간을 갖도록 설정하였다.

분석법 유효성 시험

확립된 분석조건의 유효성 시험은 미리 설사성패류독이 오염되지 않은 것을 확인한 굴과 진주담치를 사용하여 CODEX에서 기준설정을 추진하고 있는 OA와 DTX1을 대상으로 실시하였다. 즉, 최적의 분석조건에서 각 유독성분의 농도가 1, 5, 10, 50, 100 ng/mL이 되도록 표준용액을 각각 조제하고 LC-MS/MS로 분석하였다.

분석기기의 검출한계(LOD; limit of detection)는 Xcalibur software에서 신호대 잡음비(S/N)가 >3으로 하였으며, 정량한계(LOQ; limit of quantification)는 LOD×3일 때의 농도로 구하였다.

Process efficiency(%)는 균질화한 굴과 진주담치 시료에 OA 및 DTX1 표준용액을 최종농도 10, 50, 100 ng/mL가 되도록 첨가한 후 시료 전처리 방법과 동일하게 전처리하여 LC-MS/MS로 정량하여 산출하였다. Matrix effect(%)는 굴과 진주담치 시료의 90% methanol 추출액에 표준독소를 0.05 µg/mL이 되도록 첨가하여 반복 측정하여 산출하였다. 시험방법의 정밀성은 진주담치 시료에 기지의 농도가 첨가되어 있는 인증표준물질(certified reference material; CRM)을 동일한 전처리법으로 처리하여 분석하였다(*n*=5). 또한 하루에 5번 반복 측정을 시행하여 일내 정밀성(%CV)을 구하였고, 5일간 반복 측정을 시행하여 일간 정밀성(%CV)을 구하였다.

결과 및 고찰

이동상 조건에 따른 비교

Acetic acid와 formic acid로 각각 조제한 두 가지 이동상을 사용하여 Luna C₁₈(2) column에서 OA와 DTX1을 분석한 결과, 0.1% acetic acid 수용액을 사용하였을 때, OA와 DTX1 혼합물에서 OA는 검출되었으나 DTX1은 검출되지 않아 이동상 조건이 맞지 않는 것으로 판단하였다. 그러나 formic acid와 ammonium

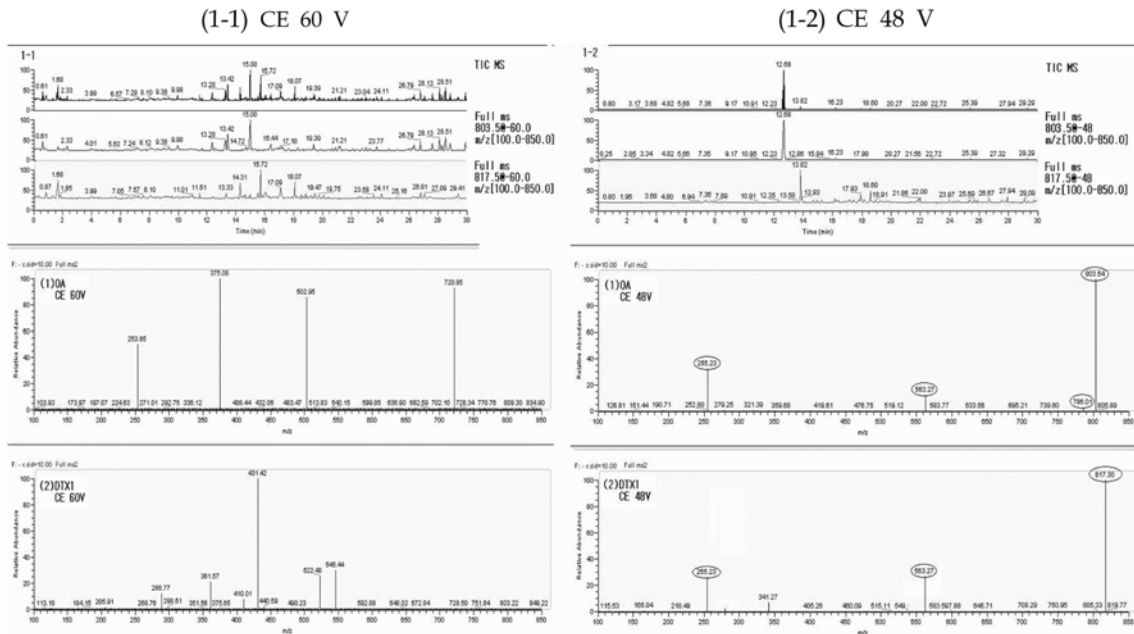


Fig. 1. LC-MS/MS chromatograms (total ion current) of a mixture of okadaic acid (OA) and dinophysistoxin-1 (DTX1) and fragment ion chromatograms of each toxin obtained using different collision energies.

formate 농도가 각각 50 mM 및 2 mM인 이동상을 사용하였을 때에는, OA와 DTX1이 완전히 분리되어 acetic acid 보다 formic acid와 ammonium formate를 사용하는 조건이 적합한 것으로 판단되었다.

Collision energy에 따른 비교

OA와 DTX1이 혼합된 표준용액을 collision energy를 변화시키며 full scan하여 ion이 조각되는 패턴을 분석하였다. Collision energy는 MS/MS에서 fragment ion의 생성에 중요한 parameter로 collision energy를 크게 주었을 경우, fragment ion들의 ion spectra를 제대로 확인할 수 없었고(Fig. 1-1), 48 V 정도의 collision energy를 주었을 때는 OA와 DTX1 고유의 fragment ion들이 최적의 intensity로 확인되었다(Fig. 1-2).

Full scan 분석은 고유한 fragment ion들을 확인하여 정성분석을 할 수 있는 것이 장점이지만, quadrupole type의 mass spectrometry인 기기의 특성과 matrix effect에 의한 방해물질의 제한을 위하여 negative mode에서 분석을 하는 특성상 정성분석보다는 정량분석의 감도가 더 높다. 따라서 본 연구에서는 정량분석을 위해서 SRM(selected reaction monitoring)법을 사용하였다. 이때는 분석 물질에 따라 collision energy를 다르게 주어야 하며, 본 시험에 적용한 collision energy를 Table 2에 나타내었다.

Column의 종류에 따른 비교

Column의 종류에 따른 독성분 분리능 비교를 위하여 C₈과 C₁₈ column을 사용하여 위에서 확립한 이동상 조건으로 OA, DTX1, DTX3, PTX2, YTX 등 5가지의 혼합 표준용액(100 ng/mL)을 분석하였다. C₁₈ column 사용 시, OA, DTX1, PTX2 및 YTX는 대단히 잘 검출되었으나 DTX3는 검출되지 않았다. 그러나 C₈ column으로 분석하였을 경우, 5가지 성분을 모두 검출할 수 있었다(Fig. 2). C₈ column을 사용하였을 때 retention time은 DTX3의 검출시간이 늦어 OA, DTX1, PTX2 및 YTX 보다 15분정도 더 연장되었다. 이렇게 DTX3의 retention time이 지연되는 것은 화

Table 2. The optimum collision energies for detection of toxins and retention times of toxins obtained from different columns

Toxins	Collision energy (V)	Retention time (min)	
		C ₈ column ¹⁾	C ₁₈ column ²⁾
OA	48	7.4	11.2
DTX1	48	8.7	12.9
DTX3	60	21.1	-
PTX2	60	7.9	11.8
YTX	40	6.3	12.7

OA, okadaic acid; DTX1, dinophysistoxin-1; DTX3, dinophysistoxin-3; PTX2, pectenotoxin-2; YTX, yessotoxin.

¹⁾Hypersil-BDS-C₈ column (3 μm, 50×2.1 mm; Keystone Scientific, Bellefonte, PA, USA).

²⁾Luna C₁₈(2) column (5 μm, 150×2 mm; Phenomenex, Torrance, CA, USA).

학적 특성에 기인하는데 DTX3는 OA, DTX1 혹은 DTX2에 지방산이 7-O-acyl esters 결합된 복합체로서 극성도가 다른 독성분에 비하여 낮기 때문이다(6). DTX3는 플랑크톤에서는 발견되지 않으며 폐류의 체내에서 변환되는 유도체로 이 독소를 alkali로 가수분해하여 지방산이 유리되면 원래의 독성분(OA, DTX1 또는 DTX2)으로 변환된다(6).

분석법 유효성 시험결과

위의 조건으로 C₈ column을 사용하여 분석하면 5종의 유독성분의 정량이 가능하지만 독소가 검출되는 retention time, 규제 대상 유독성분 및 alkali 가수분해에 의해 DTX3이 OA, DTX1 또는 DTX2로 변환되는 점 등을 고려하여 C₁₈ column으로 분석법의 유효성을 시험하였다. 기기분석으로 개별 유독성분 정량 시 실사성폐류독의 허용기준은 미국의 경우 OA와 DTX1을 합한 량으로 200 μg/kg(25), EU에서는 OA, DTX1 및 PTX를 합하여 160 μg/kg, YTX는 1,000 μg/kg(26)으로 설정하고 있으므로, 진주담치 및 굴 시료에 대해 OA와 DTX1을 중심으로 측정하였다.

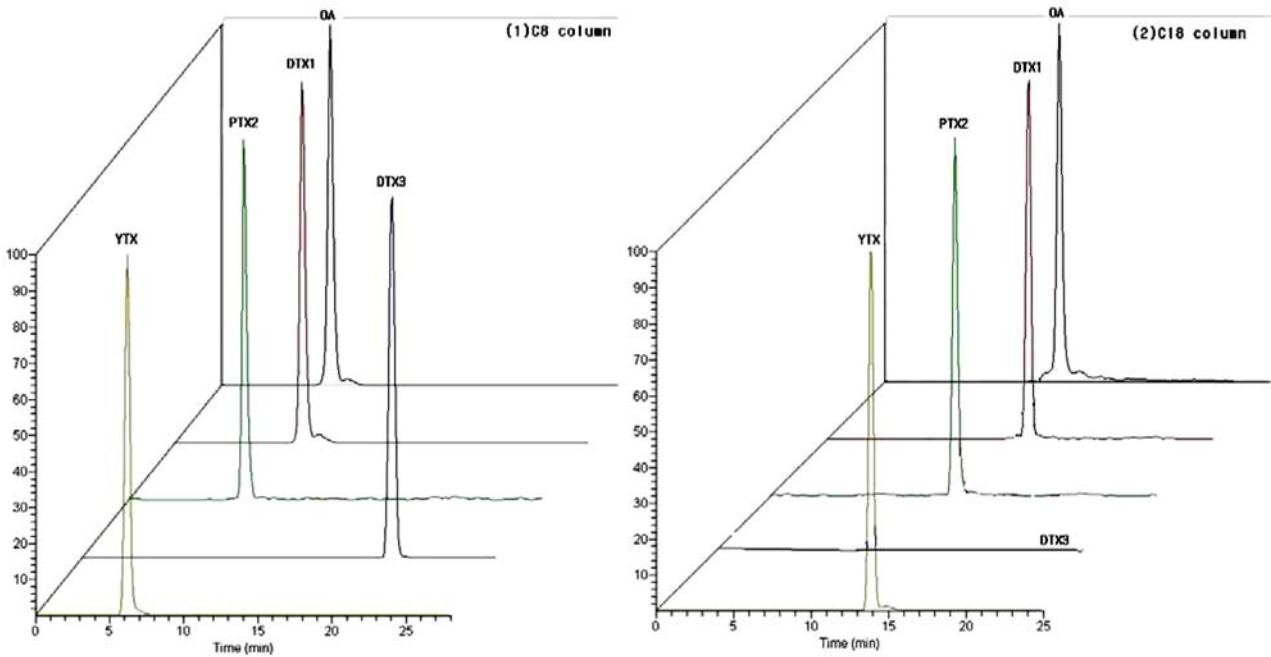


Fig. 2. LC-MS/MS SRM chromatograms for a mixture (100 ng/mL) of standard toxins obtained by C₈ column and C₁₈ column.

본 연구에서 확립한 분석조건에 따라 1, 5, 10, 50, 100 ng/mL 이 되도록 혼합표준용액을 제조하고 LC-MS/MS에 주입하여 측정값을 구하고 계산식에 대입하여 농도를 구하였다. OA는 상관 계수(r^2)가 0.9999, DTX1은 0.9996으로 각 농도 범위에서 양호한 직선성을 나타내었다.

분석기기의 검출한계(LOD)를 확인한 실험 결과, 신호대잡음비 (S/N)를 >3으로 보았을 때 OA와 DTX1의 검출한계는 모두 1 ng/g이었으며, 정량한계(LOQ)는 각각 3 ng/g이었다.

한편, process efficiency는 균질화시킨 굴과 진주담치 시료에 OA 및 DTX1 표준용액을 최종 농도 10, 50, 100 ng/mL가 되도록 첨가한 후 시료 전처리 방법과 동일하게 전처리하여 측정하였다. 굴과 진주담치를 대상으로 측정한 process efficiency는 굴의 경우 91-118%, 진주담치에서는 96-117%로 시험 농도에서 양호한 결과를 얻을 수 있었다(Table 3).

Matrix effect는 굴 및 진주담치 시료의 90% methanol 추출액에 OA, DTX1, PTX2, YTX를 0.05 µg/mL이 되도록 첨가하여 반복 측정한 결과로서 Table 4에 나타내었다. 측정된 matrix effect는 진주담치 및 굴 등 시료에 관계없이 OA는 105-106%, TX1은 96-98%로 확립된 분석조건에서 matrix의 영향은 거의 없는 것으로 판단되었다.

Table 3. Process efficiency of toxins spiked into bivalve samples

Species	Concentration (ng/g)	Recovery (%) ¹⁾	
		OA	DTX1
Oyster	10	115±6.0	111±6.2
	50	118±4.1	113±3.2
	100	91±0.7	105±0.3
Mussel	10	117±8.8	96±6.6
	50	102±2.5	114±5.6
	100	116±2.9	107±1.4

¹⁾Mean±SD (n=5)

OA, okadaic acid; DTX1, dinophysistoxin-1

로 판단되었다.

그리고 분석법의 정밀성(%CV)은 OA와 DTX1이 진주담치 시료에 함유 되어있는 CRM을 사용하여 시료 전처리 방법과 같이 추출하고, 얻어진 추출액을 단계별로 희석한 후 반복 측정하여 구하였다. 정밀성은 두 표준물질 모두 ±5% 이내의 범위에 들어 본 시험방법이 매우 양호한 것임이 확인되었다(Table 5). 또한 본 분석법의 일내 정확성 및 정밀성의 경우, OA는 95.2-102.5%의 정확성과 1.4-5.8%의 정밀성을 나타내었고, DTX1은 99.7-106.7%의 정확성과 2.9-5.5%의 정밀성을 나타내었다. 일간 정확성 및 정밀성의 경우, 5일간 시험을 반복 시행하여 구하였으며, OA는 99.2-105.3%의 정확성과 1.3-4.2%의 정밀성을 나타내었고, DTX1은 91.2-109.1%의 정확성과 1.8-4.4%의 정밀성을 나타내었다(Tabel 6).

Table 4. Effect of matrix on recovery of toxins spiked into 90% methanol extracts of shellfish

Toxins	Recovery (%) ¹⁾	
	Mussels	Oysters
OA	106±5.8	105±4.3
DTX1	98±7.0	96±5.0

¹⁾Mean±SD (n=5)

OA, okadaic acid; DTX1, dinophysistoxin-1

Table 5. Average precision (%CV, n=5) of peak areas of certified reference material (CRM)

Concentration (ng/g)	Toxins	
	OA	DTX1
10	2.2	2.4
50	1.7	3.6
100	3.0	0.2

OA, okadaic acid; DTX1, dinophysistoxin-1

Table 6. Intra-day and inter-day accuracy and precision for OA and DTX1 analyzed using LC-MS/MS method

Analyte	Concentration (ng/g)	Intra-day (n=5)		Inter-day (n=5)	
		Accuracy (%)	CV (%)	Accuracy (%)	CV (%)
OA	10	95.2	3.2	105.3	4.2
	50	102.5	5.8	99.2	3.2
	100	99.4	1.4	100.0	1.3
DTX1	10	106.7	5.5	109.1	4.4
	50	101.1	2.9	91.2	2.2
	100	99.7	2.9	100.1	1.8

OA, okadaic acid; DTX1, dinophysistoxin-1

Table 7. LC-MS/MS analysis results of the shellfish samples which provided positive results on mouse bioassay for diarrhetic shellfish poisoning

Collected month	Collected area	Species	Toxin concentration ($\mu\text{g/g}$, whole meat)	
			OA	DTX1
April, 2007	Tongyeong	Oyster	ND ¹⁾	ND
		Mussel	ND	ND
May, 2007	Tongyeong	Oyster	ND	ND
		Mussel	ND	ND
	Masan	Mussel	0.005	0.008
		Mussel	ND	ND
June, 2007	Tongyeong	Mussel	0.003	ND
	Masan	Mussel	0.022	0.005
July, 2007	Tongyeong	Mussel	ND	ND
August, 2007	Yeosu	Oyster	ND	ND
	Tongyeong	Mussel	ND	ND
September, 2007	Masan	Mussel	0.014	0.014

¹⁾ND, not detected

OA, okadaic acid; DTX1, dinophysistoxin-1

마우스 시험법과 LC-MS/MS에 의한 패류독 분석결과 비교

2007년 1월부터 12월까지의 설사성패류독소 모니터링에서 마우스 시험법(14)으로 0.05 mouse unit(MU)/g을 나타낸 진주담치 및 굴 등의 시료를 LC-MS/MS로 분석하여 그 결과를 Table 7에 나타내었다. 정량 시 정량한계 이하로 검출된 것은 모두 불검출로 간주하였다. 1월부터 3월까지, 10월부터 12월까지의 시료에서는 마우스 시험법으로 독성이 검출되지 않았다.

마우스 시험법에서 0.05 MU/g의 독성을 나타낸 시료들을 LC-MS/MS로 분석하였을 때 일부 시료에서 설사성패류독 성분이 검출되었으나 검출량은 낮은 수준으로 생물시험과 기기분석의 결과에는 다소 차이가 있었다.

따라서 향후 마우스 시험법보다 높은 감도와 신속하고 정확하게 독의 조성을 파악할 수 있는 LC-MS/MS법으로 설사성패류독을 정량하는 것이 타당한 것으로 판단되었다.

요 약

설사성패류독의 신속정밀 분석조건 확립을 위하여 LC-MS/MS를 사용하여 이동상, 분석용 column 및 collision energy 등을 변화시키면서 시험하였다. 50mM formic acid와 2mM ammonium formate가 함유된 acetonitrile 수용액을 이동상으로 사용하였을 때 OA와 DTX1이 검출되었다. Collision energy는 독소 성분에 따라 달리하는 것이 다성분 동시분석에 적합하였으며 OA와 DTX1 고

유의 fragment ion들은 48 V 정도에서 최적의 intensity로 확인되었다. Column의 종류에 따라서는 C₈ column의 경우 OA, DTX1, DTX3, PTX2 및 YTX 모두 검출 가능하였으나 실제 검출 대상이 OA와 DTX1인 경우에는 일반적으로 사용되는 C₁₈ column도 적합한 것으로 확인되었다. 본 연구에서 확립한 LC-MS/MS 분석 조건의 검출한계는 OA와 DTX1 모두 1ng/g, 정량한계는 각각 3 ng/g이었고, 표준독 성분을 첨가한 시료에서 process efficiency는 굴의 경우 91-118%, 진주담치에서는 96-117%이었고, matrix의 영향은 거의 없었다. 마우스 시험에서 양성을 나타낸 시료를 LC-MS/MS법으로 분석한 결과, 일부 시료에서만 OA 및 DTX1이 검출되어 두 시험법의 독성은 일치하지 않았으며 LC-MS/MS법은 마우스 시험법보다 하루 이상 분석시간을 단축할 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 국립수산물품질관리원 수산시험연구과제인 독물학적 위생 안전 위해관리 연구(RP-2009-FS-011)의 일부로 수행되었습니다.

문 헌

1. Yasumoto T, Oshima Y, Yamaguchi M. Occurrence of a new type of shellfish poisoning in the Tohoku district. Nippon Suisan Gakk. 44: 1249-1255 (1978)
2. Lee TS, Kim JH, Park JH, Lee HJ, Kim PH, Son KT, Byeon HS,

- Jo MR, Lim WA, Lee SJ. Monitoring of shellfish toxins. Technical Report of the National Fisheries Research & Development Institute, Korea. 2004: 61-76 (2003)
3. Kim JH, Suzuki T, Lee KJ, Kim PH, Kamiyama T, Lee TS. The first detection of okadaic acid and its derivatives in Korean bivalves by liquid chromatography-mass spectrometry. *Fish. Sci.* 74: 433-438 (2008)
 4. Yasumoto T, Murata M, Oshima Y, Sano M, Matsumoto GK, Clardy J. Diarrhetic shellfish toxins. *Tetrahedron* 41: 1019-1025 (1985)
 5. Yasumoto T, Murata M. Marine toxins. *Chem. Rev.* 93: 1897-1909 (1993)
 6. Blanco J, Moroño A, Fernández ML. Toxic episodes in shellfish, produced by lipophilic phycotoxins: An overview. *Galician J. Mar. Resources* 1: 1-70 (2005)
 7. Fujiki H, Suganuma M, Suguri H, Yoshizawa S, Takagi K, Uda N, Wakamatsu K, Yamada K, Murata M, Yasumoto T, Sugimura T. Diarrhetic shellfish toxin, dinophysistoxin-1, is a potent tumor promoter on mouse skin. *Jpn. J. Cancer Res.* 79: 1089-1093 (1988)
 8. Miles CO, Wilkins AL, Munday R, Dines MH, Hawkes AD, Briggs LR, Sandvik M, Jensen DJ, Cooney JM, Holland PT, Quilliam MA, MacKenzie AL, Beuzenberg V, Towers NR. Isolation of pectenotoxin-2 from *Dinophysis acuta* and its conversion to pectenotoxin-2 seco acid, and preliminary assessment of their acute toxicities. *Toxicon* 43: 1-9 (2004)
 9. Ogino H, Kumagai M, Yasumoto T. Toxicologic evaluation of yessotoxin. *Nat. Toxins* 5: 255-259 (1997)
 10. Aune T, Sorby R, Yasumoto T, Ramstad H, Landsverk T. Comparison of oral and intraperitoneal toxicity of yessotoxin towards mice. *Toxicon* 40: 77-82 (2002)
 11. Terao K, Ito E, Yanagi T, Yasumoto T. Histopathological studies on experimental marine toxin poisoning. I. Ultrastructural changes in the small intestine and liver of suckling mice induced by dinophysistoxin-1 and pectenotoxin-1. *Toxicon* 24: 1141-1151 (1986)
 12. European Commission. Commission Decision 2002/25/EC laying down detailed rules for the implementation of Council Directive 91/492/EEC as regards the maximum levels and the methods of analysis of certain marine biotoxins in bivalve molluscs, echinoderms, tunicates, and marine gastropods. *Off. J. Eur. Commun.* L75: 62-64 (2002)
 13. Food and Agriculture Organization of the United Nation (FAO), Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO (IOC), World Health Organization (WHO): Report of the Joint FAO/IOC/WHO ad hoc Expert Consultation on Biotoxins in Bivalve Molluscs. Oslo, Norway, Sept. 26-30 (2004)
 14. Japanese Ministry of Health and Welfare. Method of testing for diarrhetic shellfish toxin. *Food Sanitation Res.* 7: 60-65 (1981)
 15. Ramstad H, Hovgaard P, Yasumoto T, Larsen S, Aune T. Monthly variations in diarrhetic toxins and yessotoxin in shellfish from coast to the inner part of the Sognefjord, Norway. *Toxicon* 39: 1035-1043 (2001)
 16. Combes RD. The mouse bioassay for diarrhetic shellfish poisoning: A gross misuse of laboratory animals and scientific methodology. *ATLA* 31: 595-610 (2003)
 17. Draisci R, Palleschi L, Giannetti L, Lucentini L, James KJ, Bishop AG, Satake M, Yasumoto T. New approach to the direct detection of known and new diarrhoeic shellfish toxins in mussels and phytoplankton by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 847: 213-221 (1999)
 18. Quilliam MA, Hess P, Dell'Aversano C. Recent developments in the analysis of phycotoxins by liquid chromatography-mass spectrometry. pp. 383-391. In: *Mycotoxins and Phycotoxins in Perspective at the Turn of the Millennium.* de Koe WJ, Samson RA, van Egmond HP, Gilbert J, & Sabino M (eds). Wageningen, The Netherlands (2001)
 19. Goto H, Igarashi T, Yamamoto M, Yasuda M, Sekiguchi R, Watai M, Tanno K, Yasumoto T. Quantitative determination of marine toxins associated with diarrhetic shellfish poisoning by liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 907: 181-189 (2001)
 20. Stobo LA, Lacaze JP, Scott AC, Gallacher S, Smith EA, Quilliam MA. Liquid chromatography with mass spectrometry-detection of lipophilic shellfish toxins. *J. AOAC Int.* 88: 1371-1382 (2005)
 21. Suzuki T, Yasumoto T. Liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry of the diarrhetic shellfish-poisoning toxins okadaic acid, dinophysistoxin-1 and pectenotoxin-6 in bivalves. *J. Chromatogr. A* 874: 199-206 (2000)
 22. Paz B, Daranas AH, Cruz PG, Franco JM, Pizarro G, Souto ML, Norte M, Fernández JJ. Characterisation of okadaic acid related toxins by liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *Toxicon* 50: 225-235 (2007)
 23. Suzuki T, Jin T, Shirota Y, Mitsuya T, Okumura Y, Kamiyama T. Quantification of lipophilic toxins associated with diarrhetic shellfish poisoning in Japanese bivalves by liquid chromatography-mass spectrometry and comparison with mouse bioassay. *Fish. Sci.* 71: 1370-1378 (2005)
 24. Ciminiello P, Aversano CD, Fattorusso E, Forino M, Magno S, Santelia F, Tsoukatou M. Investigation of the toxin profile of Greek mussels *Mytilus galloprovincialis* by liquid chromatography-mass spectrometry. *Toxicon* 47: 174-181 (2006)
 25. US FDA. Fish and fisheries products hazards and controls guidance. United States Food and Drug Administration, Washington, DC, USA. p. 74 (2001)
 26. European Union. Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for on the hygiene of foodstuffs. *Off. J. Euro. Union* L39: 55-205 (2004)