

LC-MS/MS (Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry)를 이용한 패류 및 피낭류 중 아자스필산 분석법의 유효성 검증

조성래* · 정상현 · 박큰바위¹ · 윤민철¹ · 김동욱¹ · 손광태¹ · 하광수

국립수산과학원 남동해수산연구소, ¹국립수산과학원 식품위생가공과

Verification of Analytical Method of Azaspiracid Toxins in Shellfish and Tunicates by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

Sung Rae Cho*, Sang Hyeon Jeong, Kunbawui Park¹, Minchul Yoon¹, Dong Wook Kim¹, Kwang Tae Son¹ and Kwang Soo Ha

Southeast Sea Fisheries Research Institute, National Institute of Fisheries Science, Tongyeong 53085, Korea
¹Food Safety and Processing Research Division, National Institute of Fisheries Science, Busan 46083, Korea

Although, mouse bioassay for the monitoring of azaspiracids (AZAs) toxins in shellfish has been used previously, the reported method has low sensitivity and it is time-consuming. Recently, there is an interest in the quantitative analysis of AZAs using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The purpose of this study is to verify the simultaneous analysis of AZAs in shellfish and tunicate in Korea using LC-MS/MS. To validate the method, linearity, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), precision, accuracy, and repeatability were determined. All standard compounds were analyzed within 7 min. The correlation coefficients (R^2) of the standard solution was higher than 0.9995 (within the range of 0.8-10.0 $\mu\text{g/L}$). The LODs and LOQs of AZAs in shellfish were 0.08-0.16 $\mu\text{g/kg}$ and 0.23-0.50 $\mu\text{g/kg}$, respectively. The accuracy and precision of the method for determining AZAs in shellfish were 87.1-93.0% and 1.23-4.91%, respectively. Consequently, the verified LC-MS/MS method is suitable to analyze AZAs in shellfish and tunicates in Korea.

Keywords: Azaspiracid toxin, LC-MS/MS, Validation, Shellfish, Tunicate

서론

패류는 수 천년 전부터 인류의 주요 식량 자원으로 이용되어 왔으며, 양식기술의 발달로 인해 굴, 진주담치, 가리비 등 다양한 종류가 대량으로 생산되어 소비되고 있다(Lee et al., 2007). 또한 패류는 서식 생태 특성상 이동성이 거의 없고 여과섭식방법으로 해수 중의 부유하는 플랑크톤 등을 섭취하여 생활한다. 이 과정에서 유독 성분을 함유한 외편모조류 등을 섭취하면서 패류 체내에 독을 축적하게 된다(Schantz et al., 1957, Hall et al., 1991). 패류의 식품 위해인자로는 장염 비브리오 균, 패혈증 비브리오 균, 노로 바이러스, A형 간염 바이러스 등 생물학적 위해 요소뿐만 아니라 자연 독 또한 심각한 문제가 되고 있다(Park et al., 2010; Kim et al., 2012). 패류에서 검출되는 자연 독에는

Alexandrium spp., *Gymnodinium* sp. 등의 플랑크톤이 생산하는 것으로 중독 시 마비를 유발하며 치사율이 높은 신경성 급성 독인 마비성 패류독소(paralytic shellfish poisoning, PSP)가 있으며, *Dinophysis* spp. 및 *Prorocentrum* spp.에 의해 생산되는 것으로 복통과 설사를 동반하는 설사성 패류독소(diarrhetic shellfish poisoning, DSP) 그리고 *Pseudonitzschia* spp.가 생산하는 것으로 신경계 장애를 유발하는 기억상실성 패류독소(amnesic shellfish poisoning, ASP) 등이 알려져 있다(Noguchi, 2003; Toyofuku, 2006; Kim et al., 2012; Lee et al., 2017). 그리고 1995년 네덜란드에서는 아일랜드산(Killary Harbour, Ireland)의 진주담치를 섭취한 사람들 중 최소 8명에게서 어지러움증, 구토, 설사 및 위경련 등의 설사성 패류독소와 유사한 증상이 확인되었고, 설사성 패류독소의 독화조류인 *Dinophy-*

*Corresponding author: Tel: +82. 55. 640. 4763 Fax: +82. 55. 641. 2036

E-mail address: srcho1113@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.2021.0404>

Korean J Fish Aquat Sci 54(4), 404-410, August 2021

Received 24 June 2021; Revised 13 July 2021; Accepted 26 July 2021

저자 직위: 조성래(연구사), 정상현(연구사), 박큰바위(연구사), 윤민철(연구사), 김동욱(연구사), 손광태(연구관), 하광수(연구관)

*sis acuta*가 발견되어 설사성 패류독소로 인한 식중독인 것으로 예측하였지만, 분석 결과에 따르면 설사성 패류독소의 농도는 낮은 것으로 판명되었다. 이 진주담치의 추출물에서는 설사성 패류독소와 완전히 다른 신경독소가 있는 것으로 밝혀졌고, 이것은 아자스필산(*azaspiracids shellfish poisoning, AZP*)으로 명명되었다(Twiner et al., 2008). 그리고 1997년 아일랜드에서는 아란모어 섬(Arranmore Island, Ireland)에서 채취한 진주담치를 섭취 후 20-24명이 중독된 사례가 보고되었고, 그 이후 이탈리아, 프랑스 등 다른 유럽 여러 나라에서 아일랜드산 진주담치, 가리비 등을 수입하여 중독사고가 반복적으로 발생한 것으로 보고되었다(Twiner et al., 2008). 패류 독화가 일어난 시점에서 해수시료로부터는 독성이 있는 조류를 확인할 수 없었으나, 최근에는 *Azaniidium spinosum* 등의 와편모조류가 원인생물이라고 밝혀졌다(Krock et al., 2009; McCarron et al., 2014; Kim et al., 2017). 또한, 아자스필산은 1998년에 아일랜드산(Killary Harbour, Ireland) 진주담치로부터 분리되었으며, Azaspiracid-1으로 명명되었지만(Satake et al., 1998; Krock et al., 2015), 이후 연구가 진행됨에 따라 2006년에는 Azaspiracid-1의 구조가 개정되어 Azaspiracid-1, 2, 3으로 나뉘었다(Nicolaou et al., 2006; Krock et al., 2015). Azaspiracid (AZA)는 독특한 구조적 특징인 azaspiro ring가 있으며, 8-methyl azaspiracid (AZA-2)와 22-demethyl azaspiracid (AZA-3)의 두가지 유사체 및 산화형태의 유사체인 3-hydroxy-22 demethylazaspiracid (AZA-4), 23-hydroxy-22-demethylazaspiracid (AZA-5)도 보고되었다(Quilliam, 2003). 우리나라에서는 설사성 패류독의 원인플랑크톤인 *Dinophysis* spp.와 *Prorocentrum* spp. 등이 검출되고 있으며(Kim et al., 2008a; Kim et al., 2010; Lee et al., 2015), 연안산 패류에서 okadic acid, dinophysistoxins 등의 독소검출이 보고되었다(Kim et al., 2008b; Lee et al., 2009; Ha et al., 2018). 이에 따라 현재 우리나라는 이매패류에 대한 설사성 패류독소 중 okadic acid, dinophysistoxins에 대해서만 기준이 설정되어 있으며(KMFDS, 2020), 아자스필산에 대한 국내 기준은 정해져 있지 않다. EU, 미국 등에서는 아자스필산으로 인한 식중독 발병 위험에 대한 지속적인 관리를 위해 Azaspiracid-1, 2, 3을 모두 합한 값이 160 µg/kg으로 기준이 설정되어 있다(European Commission, 2004; FDA, 2011). 현재 우리나라에서 아자스필산에 대한 조사는 기후변화에 따른 신종 해양생물독소의 출현 경향 파악 및 외국과 체결한 위생협정의 이행을 위하여 이루어지고 있다.

초기 아자스필산 분석법은 mouse나 rat을 이용한 동물 시험법이 일반적이었으나, 낮은 민감도 등의 문제가 지속적으로 제기되어왔다(Suzuki et al., 2005; Hess et al., 2009). 따라서 최근에는 LC-MS/MS를 이용한 분석법이 개발되어 사용되고 있다(Quilliam, 2003; Suzuki et al., 2005; Lee et al., 2009).

본 연구에서는 미국, EU 등의 국가에서 주로 이용되고 있는 아자스필산 분석법에 대한 유효성을 확인하고, 우리나라 연안

에서 주로 생산되는 패류 및 피낭류 분석의 적합성을 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

시약 및 표준독소

아자스필산 분석에 활용한 표준물질은 National Research Council (NRC; Halifax, Canada)에서 구입한 인증표준물질(certified reference material) 등급의 Azaspiracid-1 (AZA-1), Azaspiracid-2 (AZA-2), Azaspiracid-3 (AZA-3)를 사용하였다. 그리고 모든 분석에는 analytical 또는 LC grade에 해당하는 시약을 사용하였으며, 아자스필산 추출용매는 methanol (Merck, Darmstadt, Germany)을 사용하였다. 이동상 제조에 사용된 시약은 ammonium hydroxide (Sigma, St. Louis, MO, USA), formic acid (Fluka, Buchs, Germany), acetonitrile (Merck)을 사용하였으며, 탈 이온수는 Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, MA, USA)에서 정제하여 사용하였다.

시료 전처리 및 추출

시험에 사용된 패류 시료를 탈각 한 후 패육을 균질화하여 시료 2 g을 칭량하여 50 mL 폴리프로필렌 시험관에 넣고, 90% methanol 18 mL를 가하여 혼합한 후 추출하였다. 추출한 시료는 3,000 g에서 5분간 원심 분리하였고, 분리된 상등액을 취한 후 0.22 µm syringe filter (Millipore, Burlington, MA, USA)로 여과하여 분석에 사용하였다.

LC-MS/MS 분석조건

아자스필산 분석을 위하여 Xevo TQ-S tandem quadrupole mass spectrometer (Waters, Milford, MA, USA)와 acquity UPLC H-class (Waters)를 사용하였고, column은 acquity UPLC BEH C18 column (1.7 µm, 2.1 mm × 100 mm; Waters)을 사용하였다. 이동상으로 A 용액은 각각 50 mM formic acid와 2 mM ammonium formate가 되도록 제조한 수용액을 사용하였고, B 용액은 A 용액과 동일 농도의 formic acid와 ammonium formate가 함유된 95% acetonitrile 용액을 제조하여 사용하였다. 또한 LC-MS/MS를 이용한 아자스필산의 질량분석은 electrospray ionization (ESI)법의 positive ion mode를 사용하였으며, multiple reaction monitoring (MRM) 조건으로 분석하였다(Table 1, Table 2).

분석법 검증

LC-MS/MS를 이용하여 확립된 아자스필산 3종 동시분석법은 Codex Alimentarius Commission (2014) 가이드라인에 따라 직선성(linearity), 정밀성(precision), 정확성(recovery), 검출한계(limit of detection, LOD), 정량한계(limit of quantitation, LOQ)에 대해 유효성을 검증하였다.

LC-MS/MS를 이용한 아자스필산 분석법 검증의 직선성은

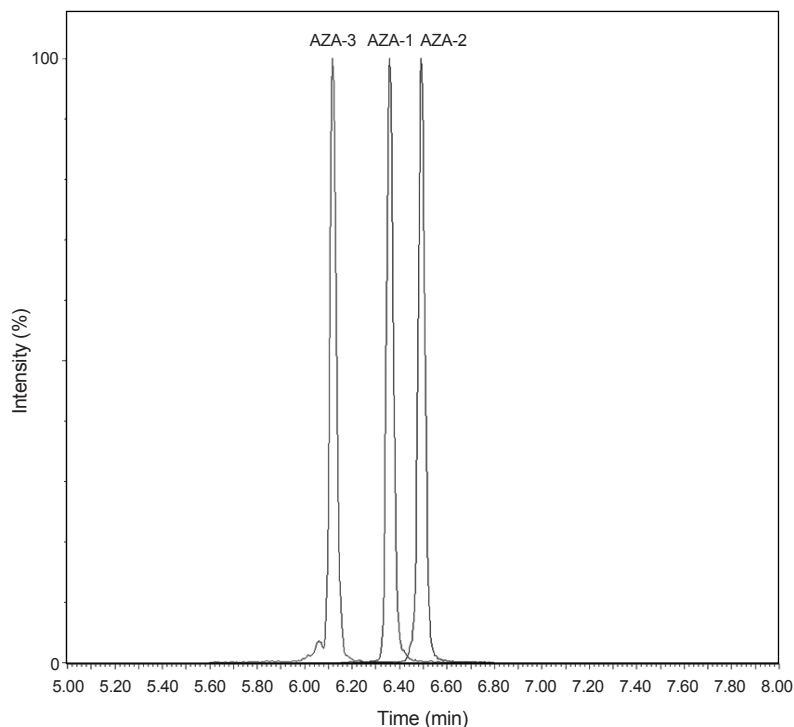


Fig. 1. LC-MS/MS chromatogram of standard solution of azaspiracid shellfish toxins. AZA, azaspiracid.

아자스필산 3종의 인증표준물질을 0.8-10.0 $\mu\text{g/L}$ 의 농도로 희석하여 조제하였으며, 각각의 농도 범위에 대한 피크 면적으로 검량선 작성 및 검량선의 상관계수(coefficient of correlation, r^2)를 구하였다. 또한, 검출한계 및 정량한계는 표준용액을 5회 분석한 검량선의 기울기와 y절편 값의 표준편차를 활용하여, 검량선 y절편 값의 표준편차에 3.3배를 곱하고 기울기의 평균값으로 나눈 값을 검출한계, 10배를 곱한 값에 기울기의 평균값을 나눈 값을 정량한계로 설정하였다.

시험방법의 정확성과 정밀성은 패류 시료(지중해담치)에 총 3종의 아자스필산 표준물질을 1.0-4.0 $\mu\text{g/L}$ 농도로 조제 후 첨가하여 위와 동일한 방법으로 추출한 다음 일내(intra-day) 및 일간(inter-day) 정밀성실험을 1일 5회 및 3일 5회 반복 측정하였다.

Table 1. Mass spectrometry parameters for detection of azaspiracid shellfish toxins

Toxins ¹	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Mode	Cone (V) ²	CE (eV) ³
AZA-1	842.5	824.5	ESI+	40	40
AZA-2	856.5	820.5	ESI+	40	40
AZA-3	828.5	810.5	ESI+	40	40

¹AZA-1; azaspiracid-1; AZA-2, azaspiracid-2; AZA-3, azaspiracid-3. ²Cone (V), cone voltage in volts. ³CE (eV), collision energy in electron volts.

LC-MS/MS를 이용한 아자스필산 분석법이 우리나라 연안에서 생산되는 주요 패류 및 피낭류 품종의 분석에 적합한지 확인하기 위해 독이 없는 것으로 확인된 지중해담치(Mussel *Mytilus*)

Table 2. LC-MS/MS parameter for the analysis of azaspiracid shellfish toxins

Parameter	Condition			
	Time (min)	Flow (mL/min)	Mobile phase	
			A (%)	B (%)
Column	Acquity UPLC® BEH C ₁₈ (2.1 mm I.d.×50 mm, 1.7 μm)			
Column temp.	40°C			
Injection volume	2 μL			
Gradient	initial	0.35	80	20
	0.2	0.35	80	20
	1.5	0.35	80	20
	5.0	0.35	5	95
	7.5	0.35	5	95
	9.0	0.35	80	20
Ionization mode	Electrospray ionization mode(positive)			
Desolvation temp.	450°C			
Capillary voltage	3 kV			

lus galloprovincialis), 바지락(Short-necked clam *Ruditapes philippinarum*), 가리비(Scallop *Argopecten irradians*), 피조개(Ark shell *Scapharca broughtonii*), 굴(*Oyster Crassostrea gigas*), 키조개(Comb pen shell *Atrina pinnata*), 개조개(Butter clam *Saxidomus purpuratus*) 등 패류 7종과, 미더덕(Warty sea squirt *Styela clava*), 멧게 (Sea squirt *Halocynthia roretzi*) 등 피낭류 2종의 시료에 3종의 아자스필산 표준물질 혼합 용액을 첨가하여 위와 동일한 방법으로 추출하여 회수율을 측정하였다.

결과 및 고찰

분석법 유효성 시험결과

LC-MS/MS를 이용한 아자스필산 분석법을 이용하여 아자스필산 3종의 표준물질 혼합 용액을 분석한 결과 7분 이내에 모든 독소가 분리되었으며, 주변에 정량을 방해하는 peak는 검출되지 않았다(Fig. 1). 확립된 시험방법의 유효성검증을 위하여 표준물질 3종을 섞은 혼합 표준용액을 0.8-10.0 µg/L 범위로 단계적으로 희석하여 직선성을 검토하였다. 시험 시 오차범위를 확인하기 위해 5회 반복 측정된 결과, 아자스필산 3종 표준물질의 상관계수(r²)는 0.9995이상으로 Codex Alimentarius Commission (2014) 가이드라인에서 제안하는 r²≥0.98 이상의 높은 결과값을 나타내었다(Table 3).

AZA-1, 2, 3의 검출한계는 각각 0.16, 0.13 및 0.08 µg/kg이었으며, 정량한계는 각각 0.50, 0.40 및 0.23 µg/kg로 확인되었다(Table 3). Otero et al. (2019)는 LC-MS/MS를 이용하여 패류 시료(지중해담치)에서 AZA-1, 2, 3을 동시분석한 결과, AZA-1, 2, 3의 검출한계는 0.30 µg/kg, 정량한계는 0.90 µg/kg 수준으로 보고하였고, Yang et al. (2020)은 LC-MS/MS를 이용하여 CRM-Zero-Mus에 표준 용액을 첨가하여 AZA-1, 2, 3를 분석한 결과, AZA-1, 2, 3의 정량한계는 0.30-0.33 µg/kg의 범위로 본 연구결과의 검출한계 및 정량한계는 만족할 만한 수준으로 확인되었다.

시험법의 정확성(accuracy)과 정밀성(precision)은 우리나라 주요 생산 패류 중 하나인 지중해담치를 대상으로 하였고, 독이 없음을 확인한 후 일내(intra-day) 및 일간(inter-day) 반복하여 시험을 실시하였다. 또한, 3종의 혼합 표준용액을 3가지 농

Table 3. Linearity, limits of detection (LOD) and limits of quantitation (LOQ) of analysis for the azaspiracid shellfish toxins (n=5)

Toxins ¹	Concentration (µg/L)	Linearity (r ²)	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)
AZA-1	0.8-10.0	0.9999	0.16	0.50
AZA-2	0.8-10.0	0.9995	0.13	0.40
AZA-3	0.8-10.0	0.9998	0.08	0.23

¹AZA-1, azaspiracid-1; AZA-2, azaspiracid-2; AZA-3, azaspiracid-3.

도로 첨가하여 1일 5회 및 3일간 5회 반복 측정된 결과, AZA-1의 일내 정확성과 정밀성은 각각 87.5-89.4% 및 3.41-4.91%의 범위를 나타내었고, AZA-2의 일내 정확성과 정밀성은 각각 88.8-93.0% 및 2.34-4.34%를 나타내었다. AZA-3의 일내 정확성과 정밀성은 87.1-91.6% 및 1.23-3.33%의 결과 값을 확인하였다(Table 4). 또한, 일간 정확성 및 정밀성은 3일간 5회 반복 측정하였으며, AZA-1의 일간 정확성과 정밀성은 각각 83.0-88.9% 및 4.45-6.57%를 나타내었고, AZA-2의 일간 정확성과 정밀성은 각각 86.7-90.2% 및 4.92-6.06%로 확인되었다. 또한, AZA-3의 일간 정확성과 정밀성은 85.5-88.4% 및 2.72-4.18%의 결과를 나타내었다(Table 4). Codex Alimentarius Commission (2014)과 AOAC (2013)에서 제시하는 시험법 검증 가이드라인의 표준물질 첨가에 따른 권장 기준에 따라, 정확성은 10 µg/kg에서 60-115%, 정밀성은 10 µg/kg에서 15%보다 낮은 정밀성을 요구하고 있다. 따라서 본 분석법은 Codex와 AOAC의 기준을 만족하는 것으로 나타났으며, 따라서 확립된 시험법이 패류 중 아자스필산을 분석하는데 적합한 방법임을 확인할 수 있었다.

분석법에 대한 시료 적용성 검토

본 연구를 통해 확립된 아자스필산 분석법의 적합성을 확인하기 위하여 국내에서 생산되는 대표적인 패류 및 피낭류 9종에 대한 회수율을 확인하였다. 시료에 일정 농도의 혼합 표준 용액을 제조 후 첨가하여 위와 동일한 방법으로 추출 한 후 5회 반복 측정하여 시료에 대한 적합성을 확인하였다. 패류 7종 중 지중해담치에서 아자스필산의 회수율은 87.6-93.8%, 굴에서 91.4-93.4%, 바지락에서 76.4-92.1%, 피조개에서 86.8-93.2%, 키조개에서 91.1-96.0%, 개조개에서 91.7-93.2%, 가리비에서는 93.0-94.6%의 범위를 나타내었다(Table 5). 피낭류 2종 중

Table 4. Accuracy and precision of intra-day and inter-day for azaspiracid shellfish toxins (n=5)

Toxins ¹	Spiked concentration (µg/kg)	Intra-day		Inter-day	
		Accuracy (%)	RSD ² (%)	Accuracy (%)	RSD (%)
AZA-1	4.0	87.5	3.88	83.0	6.33
	2.0	88.9	3.41	86.3	6.57
	1.0	89.4	4.91	88.9	4.45
AZA-2	4.0	89.6	4.34	86.7	4.92
	2.0	93.0	2.34	90.2	6.06
	1.0	88.8	3.68	86.8	5.86
AZA-3	4.0	87.1	1.84	85.5	2.75
	2.0	86.5	1.23	87.0	2.72
	1.0	91.6	3.33	88.4	4.18

¹AZA-1, azaspiracid-1; AZA-2, azaspiracid-2; AZA-3, azaspiracid-3. ²RSD, relative standard deviation.

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

Toxins ¹	Original conc. (µg/kg)	Spiked conc. (µg/kg)	Mussel		Oyster		Short neck clam		Ark shell		Comb pen shell		Butter clam		Scallop	
			Recovery (%)	RSD ² (%)	Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)
AZA-1	ND ³	2.0	89.9	5.74	92.8	2.96	80.2	5.62	86.8	4.67	91.1	5.12	93.2	3.72	93.0	2.94
AZA-2	ND	2.0	93.8	4.67	91.4	3.51	76.4	4.92	88.7	3.68	94.9	4.47	91.7	2.39	94.6	2.19
AZA-3	ND	2.0	87.6	3.83	93.4	2.08	92.1	3.54	93.2	1.88	96.0	3.43	92.5	3.10	93.3	1.11

¹AZA-1, azaspiracid-1; AZA-2, azaspiracid-2; AZA-3, azaspiracid-3. ²RSD, relative standard deviation. ³ND, not detected.

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

Toxins ¹	Original conc. (µg/kg)	Spiked concentration (µg/kg)	Sea squirt		Warty sea squirt	
			Recovery (%)	RSD ² (%)	Recovery (%)	RSD (%)
AZA-1	ND ³	2.0	91.5	3.97	87.8	3.08
AZA-2	ND	2.0	90.9	4.78	88.6	3.85
AZA-3	ND	2.0	89.2	1.29	94.5	1.97

¹AZA-1, azaspiracid-1; AZA-2, azaspiracid-2; AZA-3, azaspiracid-3. ²RSD, relative standard deviation. ³ND, not detected.

명계의 회수율은 89.2-91.5%, 미더덕에서는 87.8-94.5%의 범위로 확인되었다(Table 6). 본 실험결과는 Codex Alimentarius Commission (2014) 가이드라인의 권장기준을 만족하였다. 하지만 바지락에서 AZA-2의 값이 76.4%로 다른 시료에 비해 다소 낮은 회수율을 나타내었다. Garcia-Altare et al. (2013)은 지중해담치, 굴, 대합조개(clam), 성게(sea urchin)를 대상으로 LC-MS/MS를 이용해 AZA-1을 분석한 결과 92.5-117.3%이었고, Yang et al. (2020)은 진주담치, 굴, 대합조개에 대상으로 LC-MS/MS를 이용하여 AZA-1, 2, 3을 분석한 결과, AZA-1에서 78.8-102%, AZA-2에서 78.1-94.5%, AZA-3의 값이 66.2-104%로 본 연구결과와 유사하였다. 따라서 본 실험결과는 전체적으로 패류 및 피낭류 총 9개 시료의 회수율은 76.4-94.9%로 매우 양호한 수준으로 확인되었다.

최근 각종 패류 독이 세계 여러 지역으로 확산되는 사례가 보고되고 있으며, 우리나라 연안의 아열대화로 인해 신종 유독플랑크톤의 검출도 지속적으로 보고되고 있다. 따라서 국내 패류의 위생학적 안전성확보를 위해서 아자스필산에 대한 적극적인 모니터링이 요구된다.

본 연구에서 사용한 LC-MS/MS를 이용한 아자스필산 분석법은 국제적인 유효성 기준을 만족하는 것으로 확인되었으며, 우리나라에서 생산되는 주요 패류 및 피낭류에서 아자스필산을 분석하는데 적합한 것으로 평가되었다.

사 사

이 논문은 국립수산물과학원 수산과학연구소 수산물생산해역 및 수산물 위생조사(R2021060)의 지원으로 수행된 연구이며 연구비 지원에 감사드립니다.

References

- AOAC (The Association of Official Agricultural Chemists). 2013. Guidelines for dietary supplements and botanicals. Appendix K, 8-9. In: Official methods of analysis. AOAC, Gaithersburg, MS, U.S.A.
- Codex Alimentarius Commission. 2014. Principle for the establishment of Codex methods of analysis. In: Procedural manual, twenty-first edition. FAO/WHO, Rome, Italy, 63-73.
- European Commission. 2004. Regulation (EC) No 853/2004 of the European parliament and of the council of 29 April 2004 laying down specific hygiene of foodstuffs. Off J Eur Commun L139, 99-100.
- FDA (Food and Drug Administration). 2011. National shellfish sanitation program guide for control of molluscan shellfish 2011 revision. Retrieved from <http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/FederalStateFoodPrograms/ucm2006754.htm> on Jun 22, 2021.
- Garcia-Altare M, Diogene J and Iglesia de la P. 2013. The implementation of liquid chromatography tandem mass spectrometry for the official control of lipophilic toxins in seafood: Single-laboratory validation under four chromatographic conditions. J Chromatogr A 1275, 48-60. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.12.021>.
- Ha KS, Lee KJ, Jeong YJ, Mok JS, Kim PH, Kim YK, Lee HJ, Kim DW and Son KT. 2018. Evaluation of sanitary safety for shellfish in Hansan-Geojeman, Korea. J Food Hyg Saf 33, 404-411. <https://doi.org/10.13103/JFHS.2018.33.5.404>.
- 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.
- Hess P, Butter T, Petersen A, Silke J and McMahon T. 2009.

- Performance of the EU-harmonised mouse bioassay for lipophilic toxins for the detection of azaspiracids in naturally contaminated mussel *Mytilus edulis* hepatopancreas tissue homogenates characterized by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Toxicon* 53, 713-722. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.02.015>.
- Kim SU, Yuk DH, Park YA, Kim JA, Park AS and Kim YC. 2012. Analysis of diarrhetic shellfish poisoning toxins by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Korean J Food Sci Technol* 44, 390-392. <https://doi.org/10.9721/KJFST.2012.44.4.390>.
- Kim S, Kang YG, Kim HS, Yih W, Coats DW and Park MG. 2008a. Growth and grazing responses of the mixotrophic dinoflagellate *Dinophysis acuminata* as functions of light intensity and prey concentration. *Aquat Microb Ecol* 51, 301-310. <https://doi.org/10.3354/ame01203>.
- Kim JH, Lee KJ, Suzuki T, Kang YS, Kim PH, Song KC and Lee TS. 2010. Seasonal variability of lipophilic shellfish toxins in bivalves and water, and abundance of *Dinophysis* spp. in Jinhae Bay, Korea. *J Shellfish Res* 29, 1061-1067. <https://doi.org/10.2983/035.029.0408>.
- Kim JH, Suzuki T, Lee KJ, Kim PH, Kamiyama T and Lee TS. 2008b. The first detection of okadaic acid and its derivatives in Korean bivalves by liquid chromatography-mass spectrometry. *Fish Sci* 74, 433-438. <https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2008.01541.x>.
- Kim JH, Tillmann U, Adams NG, Krock B, Stutts WL, Deeds JR, Han MS and Trainer VL. 2017. Identification of *Azanidium* species and a new azaspiracid from *Azanidium poporum* in Puget sound, Washington state, USA. *Harmful Algae* 68, 152-167. <http://doi.org/10.1016/j.hal.2017.08.004>.
- KMFDS (Korea Ministry of Food and Drug Safety). 2020. Korea food code. Retrieved from https://www.foodsafetykorea.go.kr/foodcode/01_03.jsp?idx=12 on Jan 11, 2021.
- Krock B, Tillmann U, John U and Cembella AD. 2009. Characterization of azaspiracids in plankton size-fractions and isolation of an azaspiracid-producing dinoflagellate from the North Sea. *Harmful Algae* 8, 254-263. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2008.06.003>.
- Krock B, Tillmann U, Potvin E, Jeong HJ, Drebing W, Kilcoyne J, Al-Jorani A, Twiner MJ, Gothel Q and Kock M. 2015. Structure elucidation and in vitro toxicity of new azaspiracids isolated from the marine dinoflagellate *Azanidium poporum*. *Mar Drugs* 13, 6687-6702. <https://doi.org/10.3390/md13116687>.
- 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>.
- Lee KJ, Suzuki T, Kim PH, Oh EG, Song KC and Kim JH. 2009. Establishment of a method for the analysis of diarrhetic shellfish poisoning by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Korean J Food Sci Technol* 41, 458-463.
- Lee JS, Yun SM, Jang JH, Shin IS and Lee JO. 2007. Detection of diarrhetic shellfish poison by LC-MS/MS. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36, 926-931. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2007.36.7.926>.
- Lee S, Hwang BS, Kim HS, Yih W, Jeong EJ and Rho JR. 2015. A new diol ester derivative of dinophysistoxin-1 from cultures of *Prorocentrum lima* collected in South Korea. *Bull Korean Chem Soc* 36, 395-398. <https://doi.org/10.1002/bkcs.10031>.
- McCarron P, Giddings SD, Reeves KL, Hess P and Quilliam MA. 2014. A mussel *Mytilus edulis* tissue certified reference material for the marine biotoxins azaspiracids. *Anal Bioanal Chem* 407, 2985-2996. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8250-5>.
- Nicolaou KC, Frederick MO, Petrovic G, Cole KP and Loizidou EZ. 2006. Total synthesis and confirmation of revised structures of azaspiracid-2 and azaspiracid-3. *Angew Chem Int Ed* 45, 2609-2615. <http://doi.org/10.1002/anie.200600295>.
- Noguchi T. 2003. Marine toxins. *Nippon Suisan Gakkaishi* 69, 895-909. <https://doi.org/10.2331/suisan.69.895>.
- Otero P, Miguens N, Rodriguez I and Botana LM. 2019. LC-MS/MS analysis of the emerging toxin pinnatoxin-G and high levels of esterified oa group toxins in Galician commercial mussels. *Toxins* 11, 394. <https://doi.org/10.3390/toxins11070394>.
- Park K, Jo MR, Kwon JY, Son KT, Lee DS and Lee HJ. 2010. Evaluation of the bacteriological safety of the shellfish-growing area in Gangjinman, Korea. *Korean J Fish Aquat Sci* 43, 614-622. <http://doi.org/10.5657/kfas.2010.43.6.614>.
- Quilliam MA. 2003. Chemical methods for lipophilic shellfish toxins. In: *Manual on harmful marine microalgae*. Hallegraeff GM, Anderson DM and Cembella AD, eds. Monographs on oceanographic methodology, Paris, Italy, 211-246.
- Satake M, Ofuji K, Naoki H, James KJ, Furey A, McMahon T, Silke J and Yasumoto T. 1998. Azaspiracid, a new marine toxin having unique spiro ring assemblies, isolated from Irish mussels, *Mytilus edulis*. *J Am Chem Soc* 120, 9967-9968. <https://doi.org/10.1021/ja981413r>.
- Schantz EJ, Mold JD, Stranger DW, Shavel J, Riel FJ, Bowden JP, Lynch JM, Wyler RS, Reigel B and Sommer H. 1957. Paralytic shellfish poison. A procedure for the isolation and purification of the poison from toxic clams and mussel tissues. *J Am Chem Soc* 79, 5230-5235. <https://doi.org/10.1021/ja01576a044>.
- Suzuki T, Jin T, Shiota Y, Mitsuya T, Okumura Y and Kamiyama T. 2005. 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. <https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2005.01104.x>.
- 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>.

Twiner MJ, Rehmann N, Hess P and Doucette GJ. 2008. Azaspiracid shellfish poisoning: a review on the chemistry, ecology, and toxicology with an emphasis on human health impacts. *Mar Drugs* 6, 39-72. <https://doi.org/10.3390/md6020039>.

Yang L, Shigh A, Lankford SK, Stuart J, Rice D, Wu WH and Hungerford JM. 2020. A rapid method for the detection of diarrhetic shellfish toxins and azaspiracid shellfish toxins in Washington state shellfish by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J AOAC Int* 103, 792-799. <https://doi.org/10.1093/jaoacint/qsaa009>.