pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 38, No. 5, pp. 297~304 (2023)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2023.38.5.297

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

고체상 추출 전처리 및 HPLC-UV를 이용한 수산물 중 domoic acid의 분석

김시은 · 이상유 · 박지은 · 정현진 · 전향숙*
중앙대학교 생명공학대학 식품공학과

Determination of Domoic Acid in Seafood Matrices using HPLC-UV with Solid Phase Extraction Cleanup

Si Eun Kim, Sang Yoo Lee, Ji Eun Park, Hyunjin Jung, Hyang Sook Chun*
School of Food Science and Technology. Chung-Ang University, Anseong, Korea

(Received October 9, 2023/Revised October 17, 2023/Accepted October 18, 2023)

ABSTRACT - Domoic acid (DA), a neurotoxin produced naturally by diatoms, is responsible for incidents of amnesic shellfish poisoning. In this study, a modified analytical method was established to determine domoic acid in seafood using solid phase extraction cleanup and optimizing the amount of sample and extraction solvent to reduce interference effects. The modified method using high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection was validated using three seafood matrices (mussel, red snow crab, and anchovy) at three concentrations (1, 2, and 4 mg/kg) and compared to the Food Code method. Compared to the Food Code method, the modified method showed better performance in terms of linearity (R^2>0.999), detection limit (0.02–0.03 mg/kg), quantification limit (0.05–0.09 mg/kg), intra-/inter-day accuracy (86.2–100.4%), and intra-/inter-day precision (0.2–4.0%). Furthermore, the method was successfully applied for the analysis of 87 seafood samples marketed in Korea, and DA was detected at a low concentration of 140 μg/kg in one anchovy sample. These results suggest that the modified method can be used for routine determination of DA in seafood.

Key words: Amnesic shellfish poisoning, Domoic acid, HPLC-UV, Solid phase extraction

Domoic acid는 기억상실성 패류독소(amnesic shellfish poison, ASP)로서 식중독의 원인이 되는 독소로 규조류에 속하는 일부 *Pseudo-nitzschia* 속에 의해 자연적으로 생성된다(Fig. 1). 인간이 이를 섭취하는 경우 기억상실 등의 증상을 동반한 중독 증상이 유발되며 사망에 이르기도 한다[1,2]. 이 기억상실성 독소는 여과 섭식 해양 생물에 축적되며, 최근 멸치와 고등어 등 어류에서의 발견도 보고되고 있다[3,4].

기후 변화로 인해 발생하는 유해 조류의 증가와 같은 다양한 문제들이 식중독을 유발하는 패류독소의 중요성을 더욱 증가시키고 있으며[5], 한국과 더불어 전 세계 연안국에서 패류독소의 발생이 매년 보고되고 있다. 그 중 기억상실성 패류독소로 인한 최초의 보고는 1987년 캐나다 남동부의 Prince Edward 섬에서 홍합(*Mytilus edulis*)을 섭취한 사람들로부터 구토, 위장 장애, 기억상실 등의 증상과 더불어 일부는 사망에까지 이르게 한 식중독 사례이다[2,6,7]. 한국의 경우 ASP로 인한 식중독 증상이 나타난 경우는 없었으나 국내 유통 중인 동죽(*Mactra veneriformis*)을 비롯한 일부 패류에 domoic acid가 함유되어 있다고 보고되었다[8].

Domoic acid를 생성하는 규조류의 발생 빈도가 전 세계적으로 증가하고 있으며, 인간의 건강과 해양 동물의 안전에 지속적인 위협을 가하고 있다[5,9]. 이에 한국을 비롯한 일본, 캐나다, 유럽 연합 등의 국가에서는 기억상실성 패류 독소를 유발하는 domoic acid에 대해 20 mg/kg으로 법적 규제치를 설정하였으며, 1987년 Prince Edward 사건 이후 인간에게서 domoic acid 중독 사례는 보고되지 않았다[1,9].

패류와 해양 식물성 플랑크톤에서 기억상실성 독소인

*Correspondence to: Hyang Sook Chun, School of Food Science and Technology, Chung-Ang University, Anseong 17546, Republic of Korea
Tel: +82-31-670-3290 Fax: +82-31-670-4853
E-mail: hschun@cau.ac.kr

Copyright © The Korean Society of Food Hygiene and Safety. All rights reserved. The Journal of Food Hygiene and Safety is an Open-Access journal 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.

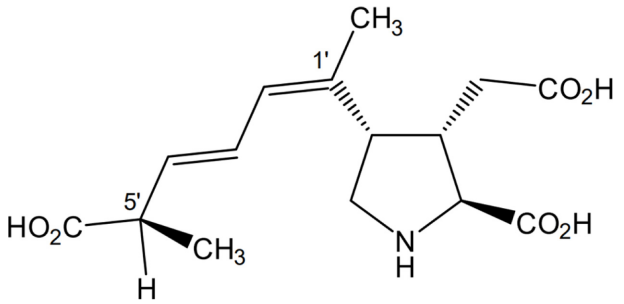

Fig. 1. Structure of domoic acid, as accessed from the National Research Council Canada (Halifax, NS, Canada) (https://doi.org/10.4224/crm.2022.da-h.20210922 (accessed on 31 August 2023)).

domoic acid를 분석할 수 있는 방법으로 mouse bioassay[10], liquid chromatography-ultraviolet detection (HPLC-UV)[11], enzyme-linked immunosorbent assay[12], liquid chromatography-tandem mass spectrometry(LC-MS/MS)[13] 등이 보고되었다. 그 중 가장 일반적으로 사용되는 방법은 HPLC-UV 방법이다. 한국에서도 패류와 갑각류 중 domoic acid의 식품공전 시험방법은 물과 메탄올의 혼합액을 이용하여 추출하고, 원심분리를 거친 후 실린지 필터로 정제한 시험용액을 HPLC-UV로 분석한다[14]. 그러나 복잡한 매질로 이루어진 수산물의 추출물 중 domoic acid의 분석을 위해 HPLC-UV에만 전적으로 의존하는 것은 위양성(false positive) 결과가 초래된다고 보고되었다[15]. 특히 단백질은게 등과 같은 갑각류와 홍합 및 가리비 등과 같은 패류를 비롯하여 멸치 등과 같은 어류의 구성 성분 중 하나로 알려져 있는데[16-18], 그 중에서도 필수아미노산인 트립토판(tryptophan)과 그 유도체가 245 nm에서 빛을 흡수하며 머무름 시간이 domoic acid와 유사하여 방해물질로 작용한다고 보고되었다 [19,20].

따라서 본 연구에서는 수산물에서 domoic acid을 분석함에 있어서 수산물의 매질 특성으로 인한 위양성 결과를 최소화할 수 있는 고체상 추출 전처리법을 적용한 HPLC-UV 분석법을 확립하였다. 그런 다음 특이성, 검출한계, 정량한계, 정확성, 정밀성 측면에서 기존 식품공전법과 유효성을 비교 평가하고 수산물에 대한 적용가능성을 살펴보고자 하였다.

Materials and Methods

실험재료

Domoic acid 분석을 위해 인터넷에서 유통되고 있는 6종 수산물인 지중해담치(*Mytilus galloproinacialis*), 참담치(*Mytilus coruscus*), 멸치(*Engraulis japonicus*), 홍게(*Chionoecetes japonicus*), 꽃게(*Portunus trituberculatus*) 그리고 바지락(*Ruditapes philippinarum*)에 대하여 각각 23건, 15건 29건, 12건, 8건 그리고 1건으로 총 88건을 2023년에 구입하였다. 구입한 수산물 시료는 제주대학교 최광식 교수로부터 종 동정을 확인한 다음 분석용 시료로 사용하였다. 수산물 시료는 식품공전 제8. 일반시험법. 9. 식품 중 유해물질 시험법. 9.1 중금속. 9.1.1 시험시료[14]에 따라 각 시료의 특성을 고려하여 비가식부위를 제거한 다음 균질화 시킨 후에 영하 18°C에서 보관하면서 사용하였다.

표준품 및 시약

Domoic acid 표준품은 인증표준물질(certified reference material)인 CRM-DA-h을 National Research Council (Halifax, Canada)로부터 구입하여 사용하였고, 아세토니트릴(acetonitrile), 메탄올(methanol) 그리고 물은 Honeywell Burdick & Jackson (Muskegon, MI, USA)사의 HPLC급 제품을 사용하였다. 그 외 트리플루오로아세트산(trifluoroacetic acid)는 Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)사, 포름산(formic acid)은 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)사, 시료 정제에 사용된 카트리지는 Bond Elut SAX cartridge (500 mg, 6 mL) 제품으로 Agilent (Santa Clara, CA, USA)사에서 구입하여 사용하였다.

시료추출 및 정제

Domoic acid는 식품공전 제8. 일반시험법. 9. 식품 중 유해물질 시험법. 9.8 패독소. 9.8.4 기억상실성 패독[14]에 기술된 방법을 참고하여 분석하였다. 균질화된 수산물 검체 10 g을 물:메탄올(50:50, v/v) 혼합액 40 mL를 가하여 15분간 분당 회전수가 300이 되도록 하여 진탕한 다음, 10°C, 10,000×g에서 5분간 원심 분리한 후 상층액을 0.2 μm 멤브레인 필터(polyvinylidene difluoride)로 여과한 것을 시험용액으로 하였다. 최적 검체 및 추출용매의 양을 결정하기 위해 검체와 추출용매의 비율은 1:4로 동일하게 고정한 채 2, 4 그리고 10 g의 검체를 취하고 domoic acid 표준품을 4 mg/kg의 농도로 첨가한 다음 각각 추출용매 8, 16 그리고 40 mL로 추출하였다. 수산물 검체의 추출물 중 domoic acid 분석에 간섭효과를 나타낼 수 있는 물질들을 정제하기 위해 음이온 교환(strong anion exchange, SAX) 카트리지의 사용여부에 따른 효과를 조사하였다. 식품공전 시험법에 기술에 따라서 추출 및 원심분리한 다음 SAX 카트리지를 메탄올 6 mL, 물 3 mL 그리고 물:메탄올(50:50, v/v) 혼합액 3 mL로 활성화하였다. 시료 추출액 4 mL을 SAX 카트리지에 가한 후, 15% 아세토니트릴 6 mL로 카트리지를 세척하고 아세토니트릴:물:포름산(10:88:2, v/v/v) 혼합액 2 mL로 domoic acid를 용출시킨 다음 멤브레인 필터로 여과한 것을 시험용액으로 하였다.

분석기기 및 조건

Domoic acid를 분석하기 위하여 UV 검출기(Agilent

G1314F)가 장착된 HPLC system (Agilent 1260 Infinity)을 242 nm로 설정하여 이용하였다. 컬럼은 Agilent사의 Zorbax Extended C18 (4.6 mm×150 mm, 5 μm) 제품을 사용하였으며, 컬럼오븐온도는 35°C로 하였다. 이동상 A는 0.1% 트리플루오로아세트산을 함유한 물을, 이동상 B는 0.1% 트리플루오로아세트산을 함유한 아세토니트릴을 사용하여 식품공전 시험법인 method 1의 경우, 이동상 A:B=85:15(v/v)로 용매구배(gradient)가 없이 사용하였다. 본 연구에서 확립된 분석법인 method 2의 경우, 이동상 B를 5%로 시작하여 1.0분까지 15%로 올려주었다가 3.5분간 유지한 후 6.0분에 95%까지 증가시켜 1분간 유지하였다. 그 후 8.0분까지 5%로 감소시켜 2분간 유지하는 용매구배 조건을 사용하였으며, 총 분석시간은 10분이었다. 두 방법 모두 이동상은 1 mL/min의 유속으로 흘려주었고, 시료는 20 μL를 주입하였다.

분석법의 검증

식품공전 시험법을 method 1로, SAX 카트리지 정제, 검체 및 추출용매의 양의 변경과 더불어 이동상을 용매구배 조건으로 변경시킨 시험법을 method 2로 구분하여 method 1과 2의 유효성을 검증 및 비교하였다. 이를 위해 검정곡선, 분리도(resolution, Rs), 검출한계(limit of detection, LOD) 및 정량한계(limit of quantification, LOQ)에 대한 실험을 진행하였으며 검증용 바탕시료로 지중해담치, 홍게 및 멸치를 사용하였다. 지중해담치와 홍게는 식품공전 상 기억상실성 패독의 시험법이 수산물 중 패류와 갑각류를 대상으로 적용되며, 지중해담치는 domoic acid가 처음 발견된 패류이고, 홍게는 갑각류 중 높은 생산량을 차지(2020년 기준)한다는 점을 고려하여 선정하였다. 멸치는 최근 어류 중 멸치와 고등어에서도 domoic acid가 검출된다고 보고되었으며[3,4], 패류와 갑각류와는 다른 매트릭스 특성을 보인다는 점에서 선정하였다.

Domoic acid의 직선성을 알아보기 위해 총 다섯 가지 농도(0.25, 0.5, 1, 2, 4 mg/kg)에 대하여 각각 3회 주입하여 검량선을 구하였으며 결정계수(coefficient of determination, R^2) 값으로 직선성을 확인하였다. 피크의 분리도는 이론단수(efficiency, N), 머무름 인자(k') 및 선택성(α)을 고려하여 아래와 같은 식으로 계산하였으며, method 1에서는 domoic acid와 트립토판의 분리도를 나타내었고 method 2에서는 domoic acid와 미확인 물질(unknown)의 피크사이의 분리도를 산출하였다.

$$Rs = \frac{k'}{(k'+1)} \cdot \frac{(\alpha-1)}{\alpha} \cdot \frac{\sqrt{N}}{4}$$

LOD는 검량선의 최저 농도에 대한 표준편차를 기울기로 나눈 값에 3.3을 곱하여 계산하였으며, LOQ는 검량선의 최저 농도에 대한 표준편차를 기울기로 나눈 값에 10을 곱하여 계산하였다. 정확도(accuracy)는 회수율(recovery %)로 나타내었으며 LOQ 이상의 세 가지 농도(1, 2, 4 mg/kg)에 대하여 1일 3회 분석 및 1일 3회 분석을 3일간 분석하여 각각 일내(intra-day) 및 일간(inter-day) 정확도를 산출하였다. 정밀도는 상대표준편차(relative standard deviation, RSD)로 나타내었으며 농도 별로 3회 분석하여 일내 정밀도(반복성, repeatability)를 구하였다. 또한 1일 3회 반복하여 3일간 분석함으로써 일간 정밀도(재현성, reproducibility)를 산출하였다.

Results and Discussion

전처리방법의 최적화

본 연구에서는 domoic acid시험분석에 있어서 위양성 결과를 방지하고자 지중해담치, 홍게, 멸치에서 SAX 카트리지의 사용 여부, 검체 및 추출용매의 양을 달리한 최적 전처리조건을 살펴보고자 하였다(Fig. 2 및 Table 1).

식품공전 시험방법에 따르면, domoic acid의 분석은 시료 10 g을 물:메탄올(50:50, v/v) 혼합액 40 mL로 균질화, 추출 및 원심분리한 다음 상등액을 멤브레인 필터(0.2 μm)로 여과하는 전처리 과정을 거친 후 HPLC-UV를 이용하여 분석한다[14]. 먼저 3종 수산물 시료를 추출 및 원심분리한 다음 SAX 카트리지의 사용여부가 domoic acid 분석에 미치는 영향을 살펴본 결과는 Fig. 2와 같다. SAX 카트리지를 사용하지 않은 method 1에 따라 분석한 결과(Fig. 2a, 2b 및 2c), domoic acid의 피크가 나타난 이후에 바로 트립토판 피크가 검출되었다(분리도 0.94-1.28). 지중해담치, 홍게 및 멸치 매트릭스 별로 domoic acid와 트립토판 피크 간의 분리도는 각각 1.28±0.02, 1.14±0.04 및 0.94±0.03으로 나타나 약간 차이가 있었다. 또 다른 패류인 바지락의 경우 식품공전법으로 분석했을 때 분리도가 0.35±0.09로 더욱 떨어지는 것으로 나타났다(data not shown). 이와 같은 결과는 트립토판이 domoic acid분석에 간섭효과를 나타낼 수 있음을 시사하는데, 트립토판 혹은 그 유도체의 머무름 시간이 domoic acid와 유사하여 방해물질로 작용한다는 보고[19,20] 와 일치한다. Quilliam 등 [21]은 실온에 방치된 가리비 시료를 분석한 결과, 조직 침출액에서 domoic acid의 체류 시간과 일치하는 피크가 관찰되었으나 UV 스펙트럼이 domoic acid와 다르고 트립토판과 유사하여 트립토판의 산화 생성물일 것이라고 보고하였다.

SAX 카트리지를 사용한 method 2의 결과는 Fig. 2d, 2e 및 2f와 같이 홍게와 멸치 시료에서 트립토판 피크가 나타나지 않았다. 홍합 시료의 경우, 트립토판 피크는 나타나지 않았지만 다른 간섭물질 피크가 관찰되어 이동상을 용매구배 조건으로 변경함에 의해 domoic acid와 잘 분리되었다(분리도 1.93). Hess 등[15]은 식품공전 시험법과 거의 유사한 조건(50% 메탄올 16 mL로 추출)으로 시료를

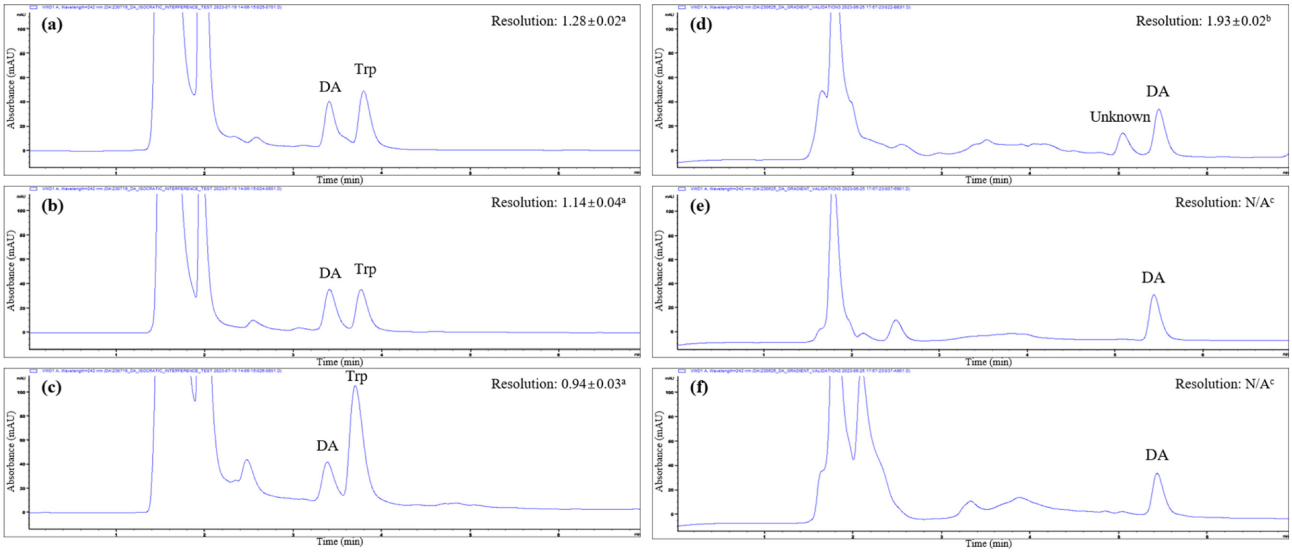

Fig. 2. Chromatograms of three seafood matrices spiked with 4 mg/kg of domoic (DA) acid. (a) mussel, (b) red snow crab, and (c) anchovy were analyzed by Food Code method without SAX cleanup procedure (d) mussel, (e) red snow crab, and (f) anchovy were analyzed by the method with SAX cleanup procedure. [a] Resolution between DA and tryptophan (Trp) peaks; [b] Resolution between DA and unknown peaks; [c] N/A, not applicable.

Table 1. Comparison of recovery for domoic acid based on the amount of mussel and extractant

Sample weight (g)	Food Code method without SAX clean-up				Method with SAX clean-up			
	Solvent volume (mL)	Spiked con. (mg/kg)	Recovery (%)	RSD (%)	Solvent volume (mL)	Spiked con. (mg/kg)	Recovery (%)	RSD (%)
2	8	4	89.0	1.6	8	4	85.7	3.2
4	16	4	90.7	0.5	16	4	87.6	1.2
10	40	4	86.4	0.8	40	4	87.0	2.1

전처리한 다음 스코틀랜드 조개류 시료를 HPLC-UV로 분석한 결과 2개의 시료에서 위양성 결과가 나타나 조개류의 정기적인 모니터링을 위해 SAX 카트리지를 이용한 정제과정이 필요하다고 하였다. 이에 최근 북아드리아해에서 채취된 조개류에서 domoic acid의 발생을 조사한 연구에서는 SAX 카트리지를 사용하여 정제하는 방법이 사용되었다[22].

SAX 카트리지를 사용하지 않거나 사용한 두 방법에서 검체와 추출용매의 비율은 1:4로 동일하게 고정한 채 검체의 양(2, 4 그리고 10 g)과 추출용 유기용매의 양(8, 16 그리고 40 mL)을 달리한 다음 회수율을 비교한 결과는 Table 1과 같다. SAX 카트리지를 사용하지 않고 기존 식품공전 시험법(method 1)으로 진행한 회수율은 검체량이 각각 2, 4 그리고 10 g일 때 89.0, 90.7 그리고 86.4% 였고, SAX 카트리지를 사용한 분석법(method 2)에서의 회수율은 85.7, 87.6 그리고 87.0%이었다. 이 두 방법 모두 회수율 측면에서는 CODEX 가이드라인(CXS 292-2008)[23]을 만족하였다. 유럽 연합 등 국외의 공인 시험법[24]에서는 시료와 추출용매의 양을 각각 4 g과 16 mL로 사용하고 있다. 추출 용매 중 유기용매의 사용량이 많아지면 분석비용을 높이고 분석자의 유기용매 노출이 증가하여 건강에 좋지 않은 영향을 미칠 수 있다. 또한 국외 공인 시험법과의 국제적인 조화를 위해서도 시료는 4 g, 유기용매는 16 mL을 사용하는 것이 좋을 것으로 생각된다.

시험법의 유효성 검증

직선성, 검출한계 및 정량한계

지중해담치, 홍합 및 멸치의 3종 수산물 매트릭스에서 식품공전 시험법을 method 1로 SAX 카트리지 정제, 검체 및 추출용매의 양의 변경과 더불어 이동상을 용매구매 조건으로 변경시킨 시험법을 method 2로 구분하여 확인한 domoic acid의 직선성, LOD 및 LOQ는 Table 2와 같다. Method 1 및 2 모두 3종 수산물 매트릭스에서 결정계수(R^2)는 0.999 이상으로 양호한 직선성을 보였다. Domoic acid와 트립토판 피크 간의 분리도는 method 1의 경우

Table 2. Linearity, LOD and LOQ of domoic acid in seafood matrices

Method	Parameter	Matrix		
		Mussel	Red snow crab	Anchovy
Method 1[a]	Linear range (mg/kg)	0.25-4.00	0.25-4.00	0.25-4.00
	Slope	86.63	80.83	71.79
	Intercept	81.06	1.83	0.15
	Linearity (R^2)	1.000	1.000	1.000
	Resolution[c] (Rs)	1.23	1.20	0.93
	LOD[d] (mg/kg)	0.10	0.09	0.24
	LOQ[e] (mg/kg)	0.29	0.26	0.73
Method 2[b]	Linear range (mg/kg)	0.25-4.00	0.25-4.00	0.25-4.00
	Slope	82.80	87.50	81.68
	Intercept	7.84	-2.13	4.34
	Linearity (R^2)	1.000	1.000	1.000
	Resolution[f] (Rs)	1.74	N/A[g]	N/A
	LOD (mg/kg)	0.03	0.02	0.02
	LOQ (mg/kg)	0.09	0.05	0.06

[a] Method in Korean Food Code; [b] Modified method; [c] Resolution between domoic acid and tryptophan peaks; [d] Limit of detection; [e] Limit of quantification; [f] Resolution between domoic acid and unknown peaks; [g] N/A, not applicable.

1.50-2.13의 범위였으나, method 2의 경우 정제과정을 통해 트립토판 피크는 나타나지 않았다. Method 2에서 domoic acid와 미확인 피크 간의 분리도는 1.5 이상으로 비교적 양호하였다. 3종 수산물 매트릭스에서 LOD는 method 1 및 2에서 각각 0.09-0.24 mg/kg 및 0.02-0.03 mg/kg로 method 2가 더 낮았다. LOQ역시 method 1 및 2에서 각각 0.26-0.73 mg/kg 및 0.05-0.09 mg/kg로 method 2가 더 우수한 것으로 나타났다. 이는 SAX 카트리지를 사용하여 HPLC-UV로 domoic acid를 분석한 Ujević 등[25]이 나타낸 LOD 0.10 mg/kg과 LOQ 0.34 mg/kg보다 낮은 수준으로 미량의 domoic acid 분석도 가능할 것으로 기대된다.

정확도 및 정밀도

앞서 직선성, 분리도, LOD 및 LOQ 측면에서 우수한 것으로 나타난 method 2를 사용하여 3종 수산물 매트릭스에 세 가지 농도(1, 2, 4 mg/kg) 수준으로 첨가한 domoic acid의 정확도(회수율)와 정밀도(상대표준편차)를 나타낸 것은 Table 3과 같다. 세 가지 농도에 대하여 일내 회수율과 상대표준편차는 각각 89.7-100.4%, 0.2-3.3%의 범위였으며, 일간 회수율과 상대표준편차는 각각 86.2-96.0%와 0.6-4.0%의 범위로 모두 CODEX 가이드라인(회수율80-110%, 상대표준편차 ≤20%)을 만족하였다. Quilliam 등[26]은 패류 시료를 50% 메탄올로 추출한 후 SAX 카트리지로 정제과정을 거쳐 HPLC로 분석한 결과 회수율이 85-113%이였다고 보고하여 본 연구결과와 유사하였다. 또한 method 2의 유효성을 추가적으로 확인하기 위하여 실험실 내 사람 간 회수율 및 표준편차를 Table 4에 나타내었다. 그 결과 1, 2, 4 mg/kg의 세 가지 농도에 대하여 각 농도별 회수율은 85.0-96.7%, 83.7-96.8% 그리고 83.1-95.7%이었으며, 상대표준편차는 0.9-8.3%, 0.5-3.8% 그리고 0.9-7.0%의 범위로 나타났다. 앞서 살펴본 유효성 지표들을 살펴볼 때 본 시험법은 수산물 중 domoic acid를 분석하기 위해 활용이 가능할 것으로 판단된다.

Table 3. Intra-day and inter-day precision and accuracy of for the determination of domoic acid in three seafood matrices[*]

Matrix	Spiked con. (mg/kg)	Recovery (%) ± RSD (%)	
		Intra-day	Inter-day
Mussel	1	97.2±0.8	95.9±1.3
	2	95.3±1.6	93.9±0.7
	4	96.2±0.8	94.9±0.6
	Average	96.2±1.1	94.9±0.9
Red snow crab	1	99.3±1.2	92.5±4.0
	2	100.4±1.1	96.0±2.0
	4	98.3±3.3	95.7±3.7
	Average	99.3±1.9	94.1±3.7
Anchovy	1	99.8±0.2	90.7±1.7
	2	91.5±0.6	89.2±1.4
	4	89.7±3.1	86.2±2.5
	Average	93.7±1.3	88.7±1.9

[*]Precision and accuracy were evaluated for method 2.

Table 4. Precision and accuracy of the cross validation by three different analysts*

Matrix	Spiked con. (mg/kg)	Analyst 1	Analyst 2	Analyst 3
		Recovery (%) ± RSD (%)	Recovery (%) ± RSD (%)	Recovery (%) ± RSD (%)
Mussel	1	89.1 ± 0.9	89.3 ± 3.3	85.0 ± 2.9
	2	88.8 ± 0.5	89.2 ± 2.1	85.2 ± 1.5
	4	92.0 ± 0.9	88.5 ± 1.4	88.4 ± 2.9
Red snow crab	1	89.7 ± 8.3	86.6 ± 1.5	88.5 ± 2.8
	2	94.5 ± 2.2	87.7 ± 3.3	83.7 ± 3.6
	4	95.7 ± 3.3	87.5 ± 7.0	83.1 ± 1.1
Anchovy	1	90.8 ± 2.7	96.7 ± 6.4	85.2 ± 3.2
	2	96.8 ± 2.2	89.5 ± 3.8	85.6 ± 2.2
	4	93.6 ± 3.3	86.9 ± 3.4	90.8 ± 4.0

* Precision and accuracy were evaluated for method 2.

Table 5. Application of the method 1 and 2 to marketed samples

Method	Factor	Matrix		
		Mussel	Crab	Anchovy
Method 1[a]	No. of samples	38	20	29
	No. of positive samples	n.d.[c]	n.d.	n.d.
	Total mean (mg/kg)	n.d.	n.d.	n.d.
	Positive mean (mg/kg)	n.d.	n.d.	n.d.
	Median (mg/kg)	n.d.	n.d.	n.d.
	Range (mg/kg)	n.d.	n.d.	n.d.
Method 2[b]	No. of samples	38	20	29
	No. of positive samples	n.d.	n.d.	1
	Total mean (mg/kg)	n.d.	n.d.	-
	Positive mean (mg/kg)	n.d.	n.d.	0.14 ± 0.02
	Median (mg/kg)	n.d.	n.d.	-
	Range (mg/kg)	n.d.	n.d.	-

[a] Method in Korea Food Code; [b] Modified method; [c] Not detected (below LOD).

유통 수산물 중 domoic acid 시험법의 적용

국내 유통중인 지중해담치, 참담치, 멸치, 홍게, 꽃게 5종의 국내산 수산물을 87건을 수집한 다음 method 1과 2의 적용가능성을 비교 평가하였다. 그 결과 Table 5와 같이, method 1을 적용하였을 때 domoic acid가 검출된 시료는 없었다. 그러나 method 2를 적용하였을 때 멸치 29건 중 1건에서 140 μg/kg의 domoic acid가 검출되었으나 이는 한국의 기준치인 20 mg/kg보다 매우 낮은 수준이었다. 이는 method 2가 method 1에 비하여 LOD 및 LOQ가 더 낮기 때문으로 생각된다. Domoic acid는 1987년 캐나다에서 처음 검출된 이후 미국, 뉴질랜드, 유럽 등지에서 지속적으로 검출되는 것으로 보고되고 있다[27]. 최근 Zheng 등[28]은 SAX 카트리지를 사용한 후 LC-MS/MS에 의해 domoic acid를 분석한 결과, 중국 해안의 지중해담치(*Mytilus galloprovincialis*)에서 257.80 μg/kg, 굴(*Crassostrea gigas*)에서 942.86 μg/kg 그리고 가리비(*Chlamys farreri*)에서 523.09 μg/kg수준으로 검출되었다고 보고했다. Kvrgić 등[22]에 따르면 크로아티아의 북 아드리아해에서 수집한 굴(*Ostrea edulis*) 및 가리비(*Aequipecten opercularis*)에서 각각 212 μg/kg 및 810 μg/kg의 domoic acid가 검출되었다. 특히 Lim 등[29]이 2011년 진해만에 출현하는 식물플랑크톤의 분포를 조사한 결과 domoic acid를 생산하는 것으로 알려져 있는 *Pseudo-nitzschia* 속이 전 조사기간 동안 빈번하게 출현하고 있다고 보고하였다. 이러한 결과들을 살펴볼 때, 낮은 수준이긴 하나 기억상실성 패류독소가 세계적으로 여러 종의 패류에서 꾸준히 발생한다는 것을 알 수 있다. 따라서 추후 국내에서 유통되는 다양한 종의 수산물을 대상으로 domoic acid을 모니터링함으로써 그 안전성을 확보하는 것이 필요하다고 생각되며 본 연구에서 검증된 개선된 domoic acid 분석법(method 2)이 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

Acknowledgement

본 연구는 2023년도 식품의약품안전처의 연구개발비(20163MFDS641, 21153MFDS605)로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

국문요약

본 연구는 패류 독소 중 기억상실성 독성을 유발하는 domoic acid의 분석법 개선, 검증 및 분석적용성을 살펴보았다. SAX 카트리지 정제, 검체 및 추출용매 양의 변경과 더불어 이동상을 용매구배 조건으로 변경시킨 분석법은 지중해담치, 홍게 그리고 멸치의 세 가지 매트릭스를 대상으로 세 농도에 대하여 식품공전법과 비교하여 유효성을 검증하였다. 그 결과 변경된 분석법은 LOD 0.02-0.03 mg/kg, LOQ 0.05-0.09 mg/kg, 일내 및 일간 정확도 86.2-100.4%와 일내 및 일간 정밀도 0.2-4.0%로 CODEX가이드라인을 만족하는 우수한 분석능을 나타내었다. 특히 변경된 시험법에서는 domoic acid와 유사한 머무름 시간을 갖는 방해물질이 검출되지 않아 위양성 결과를 방지할 수 있을 것으로 생각된다. 더 나아가 본 분석법이 국내 유통 중인 수산물을 대상으로 적용될 수 있는지 확인하고자 식품공전의 기억상실성 패독 분석법과 함께 수산물에 적용하여 분석하였다. 그 결과 5종의 수산물 87건 중 공전시험법으로 분석했을 때 domoic acid가 검출된 시료는 없었으나 변경된 분석법을 통하여 멸치 1건에 대하여 0.14 mg/kg의 domoic acid이 미량 검출되었다. 따라서 본 연구에서 확립된 분석법은 수산물 중 domoic acid 분석에 활용이 가능할 것으로 보인다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

Kim Si Eun https://orcid.org/0000-0003-3826-7248
Lee Sang Yoo https://orcid.org/0000-0002-3550-209X
Park Ji Eun https://orcid.org/0000-0002-0016-1483
Jung Hyunjin https://orcid.org/0000-0001-8877-5983
Chun Hyang Sook https://orcid.org/0000-0003-2522-4847

References

1. Lefebvre, K.A., Robertson, A., Domoic acid and human exposure risks: a review. *Toxicon.*, **56**, 218-230 (2010).
2. Zabaglo, K., Chrapusta, E., Bober, B., Kaminski, A., Adamski, M., Bialczyk, J., Environmental roles and biological activity of domoic acid: A review. *Algal Res.*, **13**, 94-101 (2016).
3. Ben-Gigirey, B., Soliño, L., Bravo, I., Rodríguez, F., Casero, M. V., Paralytic and amnesic shellfish toxins impacts on seabirds, analyses and management. *Toxins.*, **13**, 454 (2021).
4. Kershaw, J.L., Jensen, S.K., McConnell, B., Fraser, S., Cummings, C., Lacaze, J.P., Hermann, G., Bresnan, E., Dean, K. J., Turner, A.D., Davidson, K., Hall, A.J., Toxins from harmful algae in fish from Scottish coastal waters. *Harmful Algae.*, **105**, 102068 (2021).
5. Gibble, C.M., Kudela, R. M., Knowles, S., Bodenstein, B., Lefebvre, K. A., Domoic acid and saxitoxin in seabirds in the United States between 2007 and 2018. *Harmful Algae.*, **103**, 101981 (2021).
6. Jeffery, B., Barlow, T., Moizer, K., Paul, S., Boyle, C., Amnesic shellfish poison. *Food Chem. Toxicol.*, **42**, 545-557 (2004).
7. Wright, J.L.C., Boyd, R.K., Freitas, A.D., Falk, M., Foxall, R.A., Jamieson, W.D., Laycock, M.V., McCulloch, A.W., Mclnnes, A.G., Odense, P., Pathak, V.P., Quilliam, M.A., Ragan, M.A., Sim, P.G., Thibault, P., Walter, J.A., Gilgan, M., Richard, D.J.A., Dewar, D., Identification of domoic acid, a neuroexcitatory amino acid, in toxic mussels from eastern Prince Edward Island. *Can. J. Chem.*, **67**, 481-490 (1989).
8. Choi, K.D., Lee, J.S., Lee, J.O., Oh, K.S., Shin, I.S., Investigation of domoic acid in shellfish collected from Korean fish retail outlets. *Food Sci Biotechnol.*, **18**, 842-848 (2009).
9. Petroff, R., Hendrix, A., Shum, S., Grant, K.S., Lefebvre, K.A., Burbacher, T.M., Public health risks associated with chronic, low-level domoic acid exposure: A review of the evidence. *Pharmacol. Ther.*, **227**, 107865 (2021).
10. AOAC., AOAC Official Method 959.08. Paralytic shellfish poison, biological method. Official methods of analysis of AOAC International, AOAC International, Gaithersburg, Maryland, USA (2000).
11. AOAC., AOAC Official Method 991.26. Domoic acid in mussels, liquid chromatographic method. Official methods of analysis of AOAC International. AOAC International, Gaithersburg, Maryland, USA (2000).
12. AOAC., AOAC Official Method 2006.02. Domoic acid toxins in shellfish. Biosense ASP. Official methods of analysis of AOAC International. AOAC International, Gaithersburg, Maryland, USA (2006).
13. Furey, A., Lehane, M., Gillman, M., Fernandez-Puente, P., James, K.J., Determination of domoic acid in shellfish by liquid chromatography with electrospray ionization and multiple tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.,* **938**, 167-174 (2001).
14. KFDA., Korean Food Standard. Chapter 8. Korea Food and Drug Administration, Cheongju, Korea (2023).
15. Hess, P., Gallacher, S., Bates, L.A., Brown, N., Quilliam, M. A., Determination and confirmation of the amnesic shellfish poisoning toxin, domoic acid, in shellfish from Scotland by liquid chromatography and mass spectrometry. *J. AOAC Int.*,

84, 1657-1667 (2001).
16. de Souza, M.M.M., da Boa Morte, E.S., Cardoso, L.G., Nunes, D.V., de Souza, C.O., Druzian, J.I., Cardoso, R.D.C.V., Nutritional contribution of shellfish from the biodiversity of Todos os Santos Bay, Brazil. *J. Food Compos. Anal.*, **102**, 103999 (2021).
17. Wright, A.C., Fan, Y., Baker, G.L., Nutritional value and food safety of bivalve molluscan shellfish. *J. Shellfish Res.*, **37**, 695-708 (2018).
18. Kari, N.M., Ahmad, F., Ayub, M.N.A., Proximate composition, amino acid composition and food product application of anchovy: a review. *Food Res.*, **6**, 16-29 (2022).
19. Lopez-Rivera, A., Suarez-Isla, B.A., Eilers, P.P., Beaudry, C.G., Hall, S., Fernandez Amandi, M., Furey, A., James, K. J., Improved high-performance liquid chromatographic method for the determination of domoic acid and analogues in shellfish: effect of pH. *Anal. Bioanal. Chem.*, **381**, 1540-1545 (2005).
20. Maroulis, M., Monemvasios, I., Vardaka, E., Rigas, P., Determination of domoic acid in mussels by HPLC with post-column derivatization using 4-chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1, 3-diazole (NBD-Cl) and fluorescence detection. *J. Chromaatogr. B.*, **876**, 245-251 (2008).
21. Quilliam, M.A., Sim, P.G., McCulloch, A.W., McInnes, A.G., High-performance liquid chromatography of domoic acid, a marine neurotoxin, with application to shellfish and plankton. *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, **36**, 139-154 (1989).
22. Kvrgić, K., Lešić, T., Džafić, N., Pleadin, J., Occurrence and Seasonal Monitoring of Domoic Acid in Three Shellfish Species from the Northern Adriatic Sea. *Toxins.*, **14**, 33 (2022).
23. Codex Alimentarius Commission, Standard for Live and Raw Bivalve Molluscs CXS 292-2008. Rome, Italy, 1-9 (2015).
24. EURLMB., EU-Harmonised Standard Operating Procedure for determination of domoic acid in shellfish and finfish by RP-HPLC using UV detection. Vigo, Spain, 1-12 (2008).
25. Ujević, I., Roje-Busatto, R., Ezgeta-Balić, D., Comparison of amnesic, paralytic and lipophilic toxins profiles in cockle (Acanthocardia tuberculata) and smooth clam (Callista chione) from the central Adriatic Sea (Croatia). *Toxicon.*, **159**, 32-37 (2019).
26. Quilliam, M.A., Xie, M., Hardstaff, W.R., Rapid extraction and cleanup for liquid chromatographic determination of domoic acid in unsalted seafood. *J. AOAC Int.*, **78**, 543-554 (1995).
27. EFSA., Marine biotoxins in shellfish – Domoic acid. *EFSA J.*, **1181**, 1-61 (2009).
28. Zheng, G., Wu, H., Che, H., Li, X., Zhang, Z., Peng, J., Guo, M., Tan, Z., Residue analysis and assessment of the risk of dietary exposure to domoic acid in shellfish from the coastal areas of China. *Toxins.*, **14**, 862 (2022).
29. Lim, W.A., Park, K.W., Suh, Y.S., Seasonal changes in phytoplankton composition in Jinhae Bay, 2011. *J. Korean Soc. Mar. Environ. Saf.*, **18**, 520-529 (2012).