pISSN 1229-1153 *J. Fd Hyg. Safety*
Vol. 27, No. 1, pp. 37~41 (2012)

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

복어 중 테트로도톡신 분석법에 관한 연구

강영운 · 이윤숙 · 박성국 · 서정혁 · 김미혜*
식품의약품안전평가원 식품위해평가부 오염물질과

The Study on the Analysis Method of Tetrodotoxin in Puffer Fish

YoungWoon Kang, YoonSuk Lee, SungKug Park, JungHeok Seo, and Meehye Kim*
Food Contaminants Division, Food Safety Evaluation Department, Chungcheongbuk-do, Korea
(Received August 3, 2011/Revised October 10, 2011/Accepted February 15, 2012)

ABSTRACT - The current standard for testing tetrodotoxin (TTX) in foodstuffs is the mouse bioassay (MBA) in Korea as in many other countries. However, this test suffers from potential ethical concerns over the use of live animals. In addition, the mouse bioassay does not test for a specific toxin thus a sample resulting in mouse incapacitation would need further confirmatory testing to determine the exact source toxin (e.g., TTX, STX, brevotoxin, etc.). Furthermore, though the time of death is proportional to toxicity in this assay, the dynamic range for this proportional relationship is small thus many samples must be diluted and new mice be injected to yield a result that falls within the quantitative dynamic range. Therefore, in recent years, there have been many efforts in this field to develop alternative assays. High performance liquid chromatography (HPLC) coupled with mass spectrometry (MS) has been emerged as one of the most promising options. A LC-MS-MS method involves solid-phase extraction (SPE) and followed by analysis using an electrospray in the positive ionization mode and multiple reactions monitoring (MRM). To adopt LC-MS-MS method as alternative standard for testing TTX, we performed a validation study for the quantification of TTX in puffer fish. This LC-MS-MS method showed good sensitivity as limits of detection (LOD) of 0.03~0.08 μg/g and limits of quantification (LOQ) of 0.10~0.25 μg/g. The linearity (r^2) of tetrodotoxin were 0.9986~0.9997, the recovery were 80.9~103.0% and the relative standard deviations (RSD) were 4.3~13.0%. The correlation coefficient between the mouse bioassay and LC/MS/MS method was higher than 0.95.

Key words: Tetrodotoxin, Puffer fish, LC/MS/MS, Mouse bio assay

서 론

복어는 세계의 열대 및 온대지역의 따뜻한 해역에 분포하고 있으며, 세계적으로는 120여종이 알려져 있으나 우리나라 근해에는 복어가 40여종이 분포되어 있다. 그 중 식용으로 하고 있는 복어는 자주복, 참복, 까치복, 은밀복 등 주로 복어목의 참복과와 가시목과로서 20여종에 달하고 있다. 그러나, 식용 복어일지라도 대부분의 복어에는 복어독이 존재하는데, 복어독은 1909년에 일본인 Yoshizumi Tahara[1)]가 처음 분리하여 테트로도톡신(Tetrodotoxin)이라고 명명하였다. 복어독(테트로도톡신)은 복어의 난소와 간에 가장 높은 농도로 존재하고, 장과 껍질 등에도 분포되어있는 천연독소로서 신경세포의 내외부에 Na+의 흡수와 배출을 억제시킴으로서 신경근육의 마비를 일으킨다. 따라서, 운동신경의 말초신경과 가로무늬근을 마비시키고, 다량을 복용했을 경우 호흡 중추까지 마비되어 호흡정지로 사망에 이를 수 있는 치명적인 신경독소이다. 이러한 복어독은 복어 이외에 패류, 갑각류, 해양미생물 및 해양생물 등에도 분포하는 것으로 보고되고 있다[2-7)].

강력한 신경독소인 테트로도톡신은 주로 복어의 내장(난소, 간 등) 및 혈액에 분포되어있는데, 이를 제대로 제거하지 않고 섭취한 경우 식중독 사고가 일어날 수 있으며, 실제 이러한 사례가 빈번하게 보고되고 있다. 현재 복어독 시험법은 식품공전에 마우스를 이용한 동물시험법(Bioassay)으로 명시되어있다. 본 연구에서는 복어 중 테트로도톡신을 액체크로마토그래피/질량분석기/질량분석기(LC/MS/MS)를 이용하여 분석하였고, 동물시험법에 의한 시험결과와 비교하여 상관성을 확인 하였다.

*Correspondence to: Meehye Kim, Food Contaminants Division, 643 Yeonje-ri, Gangoe-myeon, Cheongwon-gun, Chungbuk 363-951, Korea
Tel: 82-43-719-4251, Fax: 82-43-719-4250
E-mail : meehkim@korea.kr

재료 및 방법

실험재료

복어 검체는 가능한 다양한 종을 확보하기 위하여 복어의 유통이 많이 이루어지고 있는 포항 및 부산 지역에서 수거하였으며, 수거된 검체는 실험실에 도착하는 즉시 영하 20°C 이하의 온도에서 보관하였다. 냉동고에 보관된 검체는 실험시 냉장고에서 해동시킨 후 근육, 껍질 부위로 분리하고 각각 균질화 하여 영하 20°C에서 냉동보관 사용하였으며 실험을 위해서 일정량을 해동하여 사용 하였다.

표준품 및 시약

실험에 사용된 테트로도톡신 표준물질은 Alomon Lab사(T550)에서 구입하였고, 0.1% 초산용액으로 희석하여 사용하였다. 초산 및 메탄올 등은 모두 특급 및 HPLC grade를 사용하였다.

테트로도톡신의 기기분석

복어에서 복어의 껍질과 근육을 분리한 후 0.1% 초산용액을 가하고 끓는 수욕에서 추출하였다. 추출용액을 C_{18} SPE(Solid-phase extraction)카트리지로 정제한 용액을 액체크로마토그래피/질량분석기/질량분석기(LC/MS/MS)로 분석하였다.

추출

균질화된 껍질과 근육 10 g을 각각 비이커에 취하여 0.1% 초산용액 약 25 mL를 가하였다. 끓는 수욕 중에서 교반하면서 10분간 가열 후 냉각하여 여과하고, 여과잔사는 0.1% 초산용액으로 반복 세정하여 여액이 50 mL 되게 하였다.

정제

C_{18} 정제 카트리지를 메탄올 5 mL와 증류수 5 mL로 순차적으로 활성화하여 추출액 5 mL를 통과시켰다. 통과 시킨 용액을 시험관에 모으고, 0.1% 초산용액 5 mL를 통과시키어 시험관에 합한 후 0.1% 초산용액으로 10 mL이 되도록 정용하였다. 이 용액을 시린지필터(0.45 um)로 여과한 용액을 LC/MS/MS로 분석하였다.

LC/MS/MS 분석

테트로도톡신에 대한 분석은 LC/MS/MS를 이용하여 수행하였다. LC/MS/MS는 Surveyor HPLC와 Thermo TSQ Quantum ultra 질량분석기로 구성되어 있으며, Thermo사의 Xcaliber 2.0.7를 사용하여 분석 및 데이터 처리하였다. 액체크로마토그래피에서 이동상 조성 및 gradient 조건을 설정하였으며, 테트로도톡신 모분자 이온(parent ion)에서 깨어지는 깨짐 이온(fragment ion)들 중 세 개의 이온을 선택하여 이온 생성에 필요한 파라미터들을 최적화하였다. 확립한 LC/MS/MS 조건에서 회수율, 검출한계 및 정량한계를 구하였으며, 그 기기 조건은 Table 1에 나타내었다.

Table 1. Operating condition of LC/MS/MS

Parameter	Optimum value		
Column	C18 (4.6 mm × 250 mm, 5 um)		
Mobile solvent	A: 0.1% formic acid in water B: 0.1% formic acid in Methanol		
Gradient	Time	B(%)	A(%)
	Init	10	90
	3.0	10	90
	6.0	95	5
	7.0	95	5
	7.1	10	90
	10.0	10	90
Flow rate	0.4 mL/min		
Injection volume	10 uL		
Ionization mode	ESI(Elecron Spray Ionization) positive		
Spray voltage	4000 V		
Capillary Temp.	320°C		
MS operation mode	MRM(Multiple Reaction Monitoring)		
Collision energy(Q1/Q3)	37eV(320/162), 29eV(320/256), 23eV(320/302)		
Scan time	0.100 sec		

테트로도톡신의 마우스실험

상기의 추출법에 따라 추출한 용액을 0.1% 초산용액으로 희석하여 마우스에 복강 주사 하였고, 마우스의 치사시간을 측정하였다. 측정된 치사시간과 독력의 상관표를 이용하여 독력을 마우스단위(MU : Mouse unit)로 계산하였다. 독력에 검체량과 희석배수를 고려하여 검체의 독력(MU/g)을 계산하였다.

결과 및 고찰

테트로도톡신의 기기분석

검량선 작성

0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 μg/mL의 표준용액 각각 1 mL씩을 시험관에 넣고 질소 농축하였고, 복어의 부위별 시료를 시료전처리 하여 얻은 시험용액을 각각의 표준용액들이 농축된 시험관에 1 mL씩 가하여 충분히 흔들어 용해한 용액을 LC/MS/MS로 분석하여 검량선을 작성하였다. 복어 부위별 테트로도톡신 검량선의 상관계수 (r^2)는 0.99이상으로서 양호한 직선성을 나타내었으며, 이 검량선을 이용하여 복어 시료들의 부위별 테트로도톡신 농도를 계산하였다.

LC/MS/MS 분석

HPLC의 분석에 많이 사용되는 C_{18} 분석 칼럼을 이용하

여 HPLC 이동상 조건 및 시료전처리 조건을 검토하였다. 정제 단계의 검토 중 표준용액을 이용한 회수율 실험결과는 매우 좋은 결과를 획득하였으나, 실제 검체로부터 추출한 추출용액에 표준품을 첨가하여 동일한 정제 단계를 거쳤을 때 회수율이 매우 낮아짐을 확인하였다. 이러한 원인은 보통 두 가지의 원인으로 나눌 수 있는데, 정제단계에서 테트로도톡신의 이온화 억제(suppression) 또는 방해(disturbance)하는 불순물을 충분히 제거하지 못하였거나, HPLC의 분석칼럼에서 이온억제 물질을 분석대상 물질인 테트로도톡신으로부터 분리시키지 못했을 경우이다. 따라서, HPLC의 C_{18}, C_8, Hillic 칼럼들을 사용하여 이온억제 물질의 분리를 시도하였다. 정제단계에서는 이온억제 물질의 제거를 위해 헥산, 에틸아세테이트 등의 유기용매를 이용한 액-액 추출법으로 정제를 시도하였으며, 정제 카트리지를 C18, HLB, MCX, WCX, Charcoal 등의 정제 카트리지를 이용하여 이온억제 물질 제거를 시도하였다. 또한, 두 개의 정제 카트리지를 연결하여 이를 개선하려고 시도 하였으나, 이온억제 물질의 기기적 분리와 시료전처리에서 정제단계에 의한 분리는 만족스러운 결과를 얻지 못하였다.

따라서, 테트로도톡신을 함유하고 있지 않은 복어 검체를 시료전처리하여 획득한 음성시료 시험용액에 표준용액을 농도별로 첨가하고 이를 LC/MS/MS로 분석하여 검량선을 작성하였고, 이 검량선을 이용하여 실제 복어의 부위별 테트로도톡신의 농도를 계산하였으며, 정밀성, 정확성, 감도 및 재현성 등의 밸리데이션을 수행하였다. 이 결과, 이온화 억제 물질의 분리 및 제거를 위해 복잡해졌던 시료 전처리법 및 기기분석조건을 단순화하면서, LC/MS/MS의 뛰어난 감도 및 분별력을 충분히 활용할 수 있는 시험법을 확립하였다. 이에 따라 gradient 조건을 최적화하고, 확립한 HPLC 조건에서 회수율, 검출한계 및 정량한계를 구하였으며, 그 조건에 따라 측정된 크로마토그램은 Fig. 1와 같다.

Validation

부위별 테트로도톡신의 회수율(recovery)을 구하기 위하여 복어의 근육, 껍질, 난소, 간에 각각 표준용액을 첨가(Spiking)하여 검체 농도가 1.0, 2.0, 4.0 mg/kg이 되도록 제조하였고 일정시간 동안 방치한 후 시료전처리 하여 LC/MS/MS로 분석하였다. 회수율은 음성 시료를 시료 전처리한 음성시험용액에 농도별로 표준물질을 용해하고 분석하여 테트로도톡신의 질량을 계산하고 주입한 테트로도톡신의 질량을 비교하여 산출하였다. 그결과, 회수율은 80.9%~103.0%이었으며 검출한계(LOD)는 부위에 따라 0.03~0.08 μg/g이었고, 정량한계(LOQ)는 0.10~0.25 μg/g이었다. 검량선의 상관계수(r^2)는 0.9986~0.9997이고, 상대표준편차(RSD)는 4.3%~13.0%로서 적합한 시험법임을 확인하였다(Table 2).

기기분석법과 동물시험법 데이터 상관성 분석

기기분석법 결과 값 대비 동물시험법 결과 값의 상관성 그래프를 그렸을 때 검출전체농도 범위인 1.0~100 μg/mL에서 상관계수(r^2)가 0.9817로서 매우 좋은 상관관계를 나타내었으며, 근육과 껍질 중 테트로도톡신으로 한정했을

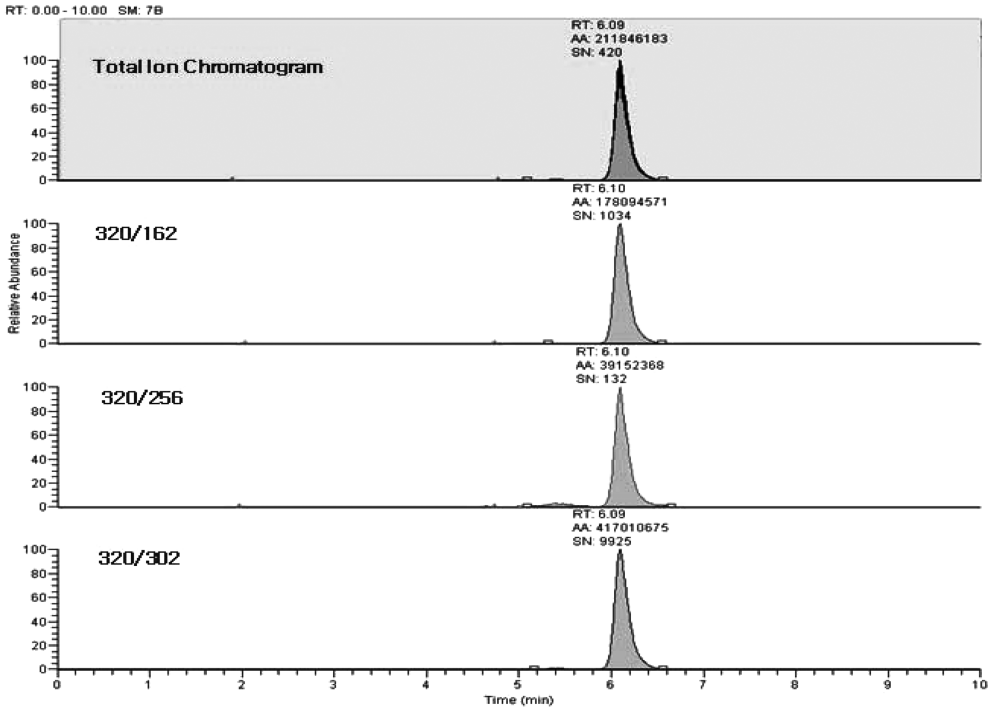

Fig. 1. MRM(Multiple reaction monitoring) chromatogram of tetrodotoxin in puffer fish.

Table 2. Validation data of tetrodotoxin in puffer fish

Puffer fish	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)	r^2	Fortified Con. (mg/kg)	Recovery (%)
Muscle	0.03	0.10	0.9990	1.0	82.7 ± 12.4[a]
				2.0	80.9 ± 5.3
				4.0	84.3 ± 13.0
Skin	0.04	0.12	0.9991	1.0	96.2 ± 10.7
				2.0	99.0 ± 4.3
				4.0	101.1 ± 6.6
Ovary	0.08	0.25	0.9917	1.0	103.0 ± 10.0
				2.0	99.0 ± 4.3
				4.0	98.1 ± 7.1
Liver	0.05	0.15	0.9997	1.0	90.1 ± 11.4
				2.0	90.6 ± 4.7
				4.0	84.0 ± 5.1

a : R.S.D.(Relative standard deviation)

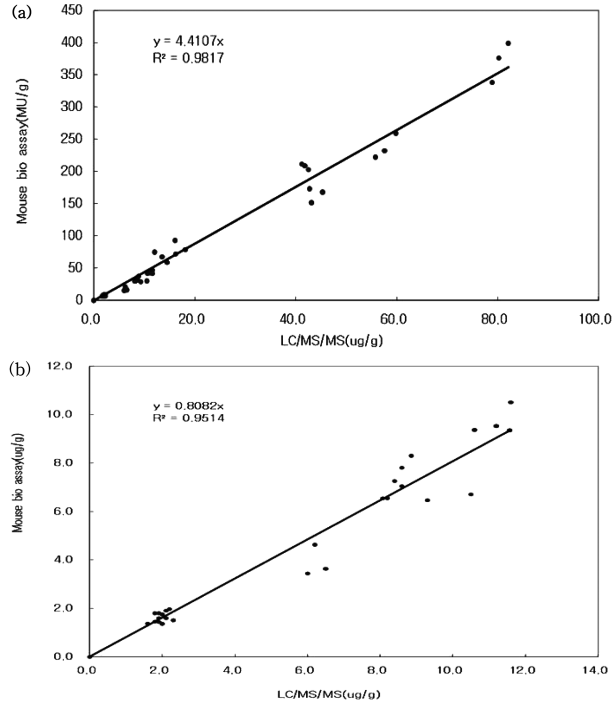

Fig. 2. Corelation between LC/MS/MS analysis and Mouse bio assay of tetrodotoxin in (a) all(muscle, skin, ovary and liver) and (b) muscle and skin of puffer fish.

때에도 0.9514로서 0.95 이상의 좋은 상관관계를 나타내었다(Fig. 2).

결 론

복어를 식용으로 하고 있는 나라들에서 복어독의 시험법은 현재까지 동물시험법으로 설정되어 있으나, 지속적으로 복어독에 의한 식중독 사건이 발생함에 따라 일반 기업이나 연구소에서 접근하기 쉬운 기기분석법의 개발이 필요함에 따라 많은 연구가 수행되어 왔다. 본 연구에서는 복어독의 주성분이고 독성이 제일 강한 테트로도톡신의 기기분석 시험법 개발을 수행하였으며, 비교적 간단한 시료 전처리를 이용하고 LC/MS/MS의 높은 감도 및 선택성을 극대화할 수 있는 시험법을 개발하였다. 개발된 시험법은 AOAC의 밸리데이션 가이드라인에 의거하여 평가를 수행하였으며, 그 결과 회수율은 80%이상이었고, 상대표준편차는 15%이내로서 시험법이 유효함을 확인하였다. 또한, 기기분석의 정량한계는 0.1~0.25 ppm 수준으로서 동물시험법의 정량한계에 비하여 높은 감도를 가지고 있다. 또한 작성된 검량선의 상관계수는 복어 부위별 모두 0.99이상으로서 좋은 직선성을 가지고 있음을 확인하였다.

복어검체를 부위별(근육, 껍질, 난소, 간)로 분리하여 테트로도톡신의 함량을 확립된 기기분석 시험법을 이용하여 분석하였다. 테트로도톡신의 함량은 난소, 간, 껍질, 근육 순서로 나타났으며, 동물시험법에 의한 분석에서도 유사한 결과가 도출되었다. 동일 검체에서 추출한 추출액에 대하여 동물시험법과 기기분석시험법에 의하여 분석한 결과 값에서 차이가 존재하는데, 이는 테트로도톡신의 유사체들이 원인이라고 판단된다. 테트로도톡신 유사체들이 테트로도톡신에 비하여 독성이 매우 낮으나 동물시험법에서는 구별할 수 없으며, 기기분석시험법에서 유사체들은 정량에서 제외하였기 때문이라고 생각된다. 테트로도톡신의 유사체는 테트로도톡신에 비하여 불안정하고 표준품을 구하기 매우 어렵고 상용화 되지 않아 식중독 관리를 위한 시험법에서는 제외하였으나 현재까지도 유사체들의 독성이 모두 밝혀진 것이 아니므로 세계적인 연구 동향 및 정보를 주시하여 시험법의 추가적인 개선을 위해 대비할 필요가 있다.

기기분석법 결과 값 대비 동물시험법 결과 값의 상관성 그래프를 그렸을 때 검출전체농도 범위인 1.0~100 μg/g에서 상관계수(r^2)가 0.9817로서 매우 좋은 상관관계를 나타내었으나, 근육 및 껍질에 한정했을 때는 0.9514로서 낮은 농도 범위에서는 상관성이 약간 떨어지나 0.95 이상으로서 충분히 유의적인 상관관계를 가짐을 확인하였다(Fig. 2). 그러나, 현재 관리기준인 10 MU/g에 해당하는 2 μg/g 근처에서 기기분석값과 동물실험값의 차이가 상당히 존재한다. 향후 테트로도톡신 유사체들의 기기분석 및 상대독성 값에 대한 연구 결과에 따라 이 차이는 많이 줄어 들 것으로 기대된다. 이상의 두 시험법간의 상관계수 결과 값은 복어독에 관련된 다른 연구결과와 비교해 볼 때 좋은 결과를 보임을 확인할 수 있었다(Table 3).

또한, 동물시험법과 기기분석시험법을 비교해 볼 때 동물시험법은 고가의 장비나 표준품 등이 필요 없으나 정확성이나 정밀성 및 효율성 면에서 기기분석시험법에 비하여 떨어진다. 특히, 동물에게 고통을 주는 동물실험에 대한 윤리적 문제를 고려한다면 기기분석시험법으로의 전환이 필요하나 복어독을 관리하는 다른 나라들과의 국제적 조화

Table 3. Comparison of Assay method of tetrodotoxin in different application areas

Matrix	Analysis	Clean up	Recovery	Results	Correlation factor(r^2)	Reference
Puffer fish	LC/FLD	LLE	91.0 ± 5.2%	32.9~442.0 μg/specimen	0.9871	[8]
	MBA[a]	-	-			
	LC/FLD	Centrifuge	-	2.1~130 μg/g	0.9258	[9]
	MBA	-	-	0.9~160 μg/g		
	EIA[b]	-	102.1 ± 8.4%	-	0.9742	[10]
	MBA	-	98.1 ± 7.5%	-		
	EIA	-	-	2.6~48.9 μg/g	-	[11]
	MBA	-	-	21.6~231 MU/g	-	[12]
	LC/MS/MS	SPE	-	13~110 μg/g	-	[13]
	LC/MS	SPE	-	1.35 μg/g	-	[14]
	MBA	-		6.76 ± 2.63 MU/g	-	

a : Mouse bio assay, b : Enzyme imunoassay

를 고려하여 신중히 접근할 필요가 있다.

요 약

현재 복어독의 표준 시험법은 다른 나라들과 마찬가지로 마우스를 이용한 동물시험법으로 명시되어 있다. 그러나, 살아있는 동물에게 고통을 주는 동물실험의 규제 확대로 인해 기기분석 시험법으로의 개선이 요구되고 있다. 또한, 동물시험법의 감도나 정밀성 및 정확성의 한계로 최근에 동물시험법을 대체할 수 있는 시험법에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 본 연구에서 LC/MS/MS 시험법은 시료에서 테트로도톡신을 추출한 후 SPE(Solid phase extraction) 정제칼럼을 이용하여 정제하고 양이온 모드에서 MRM(multiple reaction monitoring)방법으로 분석하는 시험법으로서 밸리데이션 결과 검출한계(LOD)는 부위에 따라 0.03~0.08 μg/g이었고, 정량한계(LOQ)는 0.10~0.25 μg/g이었다. 검량선의 상관계수(r^2)는 0.9986~0.9997이고, 회수율은 80.9%~103.0%이었으며 상대표준편차(RSD)는 4.3%~13.0%로서 적합한 시험법임을 확인하였다. 이 시험법을 이용하여 복어 검체의 부위별로 분석을 실시하였으며, 동물시험법의 시험결과와의 상관관계를 분석한 결과, 상관계수는 0.95이상의 상관성을 확인하였다.

참고문헌

1. Clark RF, Williams SR, Nordt SP, Manoguerra AS : *Rev. selec. seafood poison.*, **26(3)**, 175-184 (1999).
2. Yotsu-Yamashita, M., Mebs, D., Flachsenberger, W. : Distribution of tetrodotoxin in the body of the blue-ringed octopus (Hapalochlaena maculosa), *Toxicon* **49**, 410-412 (2007).
3. Kao, C.K.: Tetrodotoxin, saxitoxin and their significance in the study of excitation phenomena, *Pharmacol. Rev.*, **18**, 997-1048 (1966).
4. Noguchi, T., Hashimoto, Y. : Isolation of tetrodotoxin from a goby Gobius criniger, *Toxicon* **11**, 305-307 (1973).
5. Narita, H. Noguch, T., Maruyama, J., Ueda, Y., Hashimoto, K. Watanabe, Y., Hida, K. : Occurrence of tetrodotoxin in trumpet shell, "Boshubora" Charonia sauliae. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish,* **47**, 935-941 (1981).
6. Kungsuwan, A., Nagashima, Y., Noguchi, T., Shida, Y., Suvapeepan, S., Suwansakornkul, P.,Hashimoto, K. : Tetrodotoxin in the horseshoe crab Carcinoscorpius rotundicauda inhabiting Thailand. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish,* **53**, 261-266 (1987).
7. Tsai, Y. H., Hwang, D. F., Chai, T. J., Jeng, S. S. : Occurrence of tetrodotoxin and paralytic shellfish poison in the Taiwanese crab Lophozozymus pictor. *Toxicon* **33**, 1669-1673 (1995).
8. Chih-Yu Chen, Hong-Nong Chou : Detection of Tetrodotoxin by High Performance Liquid Chromatography in Lined-Moon Shell and Puffer Fish, *Acta Zoologica Taiwanica*, **9(1)**, 41-48 (1998).
9. E. J. Nunez-Vazquez, M. Yotsu-Yamashita, A.P. Sierra-Beltran, T. Yasumoto, J.L. Ochoa : Toxicities and distribution of tetrodotoxin in the tissues of puffer fish found in the coast of the Baja California Peninsula, Mexico, *Toxicon* **38**, 729-734 (2000).
10. Kentaro KAWATSU, Yonekazu HAMANO, Tomoko YODA, Yoshitake TERANO, Tadayoshi SHIBATA : *Jpn. J. Med. Sci. Biol.,* **50**, 133-150 (1997)
11. Kendo Matsumura : Tetrodotoxin Concentrations in Cultured Puffer Fish, Fugurubripes, *J. Agric. Food Chem.,* **44(1)**, 1-2 (1996).
12. Hyun-Dae Kim, Yeung-Ho Park, Dong-soo Kim : Tetrodotoxin in a Pufferfish, Fugu xanthopterus, *J. Korean Soc. Food Nutr.,* **23(3)**, 502-508 (1994).
13. Hsiao-Chin Jen, Shin-Jung Lin, Yung-hsiang Tsai, Chun-Hsiang Chen, Zu-Chun Lin, Deng-Fwu Hwang : Tetrodotoxin poisoning evidenced by solid-phase extraction combining with liquid chromatography.tandem mass spectrometry, *J. Chrom. B.,* **871**, 95-100 (2008).
14. Hong-Nan Huang, Jie Lin, Hong-Lin Lin : Identification and quantification of tetrodotoxin in the marine gastropod Nassarius by LCMS, *Toxicon* **51**, 774-779 (2008).