

HPLC에 의한 설사성 패류독소의 분석 방법

변한석 · 이태식* · 김풍호* · 손광태*

국립수산과학원 양식환경연구소, *국립수산과학원 식품위생과

서론

설사성 패류독소(Diarrhetic Shellfish Poisoning, DSP)는 신경학상의 증세가 없이 세계적으로 보고된 장관 질병의 일종으로(Aune & Yndstad 1993) 그 원인은 독성물질에 오염된 패류의 섭취에 의하여 발생한다고 한다. 원인생물은 해양유래의 *Dinoflagellates dinophysis*로서 세계적으로 널리 분포하고 있는 것으로 알려져 있으나 독의 생산유무는 종과 서식위치에 따라서 다르다고 하며, *Dinophysis dinoflagellates*에 의해서 생산된 독성물질은 okadaic acid와 그 유도체로서 적어도 9종 이상의 독소를 생산한다고 한다(Yasumoto et al, 1980, Lee 1989). 우리나라에서 현재 채택하고 있는 DSP 표준 분석법으로는 마우스를 이용한 bio essay 방법이며, DSP 발생상황에 대한 보고가 거의 없는 실정이며, bio essay 방법에 의하여 분석한 DSP의 결과에 대한 재현성이나 신뢰도에 대한 문제가 제기되고 있다. 그리고 DSP에 관한 보다 정확한 발생실태 및 자료의 축적이 요구되고 있는 현실에 부응하기 위하여 그 결과에 대한 신뢰도가 bio essay 방법 보다 높고 정확한 기기분석에 의한 DSP 분석방법의 확립이 시급히 요구되고 있다. 본 연구는 설사성 패류독소의 HPLC에 의한 분석방법을 개선하고 확립하였다.

재료 및 방법

HPLC에 의한 설사성 패류독소 분석을 위하여 Okadaic acid(OA, Sigma Co.)농도별, 9-Anthryl diazo methane(ADAM, Funakoshi 藥品) 농도별, OA와 ADAM시약의 반응 시간별 최적반응조건과 ADAM에 의해 형광유도체화 시킨 OA에 대하여 HPLC의 형광검출기 파장별, 이동상의 용매 조성별 분석조건을 규명하였으며, 얻어진 조건에 따라 각종 패류에 대하여 적용시험을 하였으며 발생한 여러 문제점 등을 보완하여 설사성 패류독소의 원인 물질중 하나인 OA의 HPLC에 의한 분석 방법을 개선·확립하였다.

결과 및 요약

HPLC에 의한 설사성 패류독소 분석을 위하여 Okadaic acid(OA, Shigma Co.)농도별, 9-Anthryl diazo methane(ADAM, Funakoshi 藥品) 농도 및 OA와의 반응 시간별 최적조건

을 규명하기 위하여 각 조건별 형광유도체화한 OA를 정제하여 HPLC로 분석하였다. OA의 농도 0.05ppm~0.5ppm 에 대한 ADAM시약(1mg/ml) 100 μ l 과의 최적반응시간은 4시간으로 나타났으며, OA의 양에 따른 형광유도체화 시약(ADAM)의 최적 반응량을 규명하기 위하여 OA의 양이 20ng~200ng, ADAM의 양을 50 μ g~400 μ g으로 변화시키면서 4시간 동안 반응시켰을 경우, OA의 농도가 200ng까지는 ADAM시약의 농도 2mg/ml 100 μ l을 가하여 4시간 반응시켜 분석하는 것이 가장 우수한 것으로 나타났다.

형광검출기의 파장과 이동상 용매조성별 분석최적조건을 규명하기 위하여 OA와 ADAM (2mg/ml) 100 μ l과 반응시켜 HPLC의 형광검출기의 파장별, 이동상의 용매조성별 조건을 검정하였다. 형광검출기의 각 파장별 분석 결과를 살펴보면 Ex 364nm < 254nm < 248nm 의 순으로 감도가 좋게 분석되었으며 254nm에서 O.A를 분석한 결과는 364nm 보다 약 6배, 248nm에서 분석한 결과는 254nm 에서보다 1.25배 감도가 좋은 것으로 나타났다.

이러한 분석조건하에서 바지락, 진주담치 및 굴에 대하여 O.A 표품을 일정량 첨가하여 분석할 경우 용매 조성에 따라 RT는 달라지지만 바지락과 진주담치의 경우 분석에 문제가 없는 것으로 나타났으나, 표품인 O.A를 굴 시료에 첨가하고 추출하여 분석한 경우 여러 가지 방해 물질들이 OA의 RT 부근에 나타나므로 분석에 어려움이 있었다. 이동상의 조성을 변화시켜 OA와 이들 방해물질의 RT에 있어서 가장 이상적 차이가 나는 조건을 검정한 결과 이동상 용매 조성비가 60% ACN: 10% MeOH : 1%CHCl₃ : 29% GDW 인 경우가 표품과 방해물질이 가장 잘 분리되었으며, 이상을 종합하면 OA 농도가 20ng~200ng 에서 ADAM(2mg/ml) 100 μ l 첨가하여 4시간 반응시킨 것과 Ex 248nm, Em 412nm, 이동상 60% ACN: 10% MeOH : 1%CHCl₃ : 29% GDW의 조건에서 가장 분석이 잘 되는 것으로 나타났다.

참고 문헌

AUNE T., and M. YNDSTAD: Diarrhetic shellfish poisoning. in: IR Falconer (Ed), Algal Toxins in Seafood and Drinking Water. London: Academic Press (1993) 87-104.

LEE, J.S., M. MURATA and T. YASUMOTO: Analytical methods for determination of diarrhetic shellfish toxins. In: S Natori, K Hashimoto, Y Ueno (eds), Mycotoxins and Phycotoxins '88. Amsterdam, Elsevier (1989) 327-334.

YASUMOTO, T., Y. OSHIMA, W. SUGAWARA, Y. FUKUYO, H. OGURI, T. IGARASHI and N. FUJITA: Identification of *Dinophysis fortii* as the causative organism of diarrhetic shellfish poisoning. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries 46 (1980) 1405-1411.