Korean Journal of Life Science
Vol. 10. No. 2. 115~124, 2000

복어간 폐기물로부터 Tetrodotoxin, DHA 및 EPA의 분리

차병윤 · 최진석 · 임정규 · 이동익 · 이원갑 · 이은열 · 김희숙 · 김동수*

경성대학교 공과대학 식품공학과

Separation of Tetrodotoxin, DHA and EPA from Pufferfish Liver Waste

Byung-Yoon Cha, Jin-Seok Choi, Jung-Gyu Ihm, Dong-Ik Lee, Won-Kap Lee,
Eun-Yeol Lee, Hee-Sook Kim and Dong-Soo Kim*

Department of Food Science and Technology, College of Engineering,
Kyungsung University, Pusan 608-736, Korea

Abstract

The present study was undertaken to separate the available components effectively, such as tetrodotoxin(TTX), docosahexaenoic acid(DHA, $C_{22:6,\omega-3}$) and eicosapentaenoic acid (EPA, $C_{20:5,\omega-3}$) from pufferfish liver waste, which are known to have high values as bioactive materials. By using ultrafiltration, it was possible to separate high contents of 68mg TTX from pufferfish liver waste. In contrast, by activated charcoal column, it was to obtain about 54mg TTX. The recovering ratios were 65.3% and 45.0% in the two different methods of ultrafiltration and activated charcoal column, respectively. From the results of HPLC and gas chromatography- mass spectrometry(GC-MS), the obtained toxins were identified to be TTX and its derivatives. In addition, it was also possible to obtain 72.3g DHA and 11.4g EPA from 1kg of pufferfish liver by high performance liquid chromatography (HPLC). These amounts of DHA and EPA were also 17.70% and 1.04% in the total lipid of pufferfish liver oil from analysis of gas chromatography(GC), respectively.

Key words – Tetrodotoxin, DHA, EPA, Pufferfish

서 론

수산물은 다른 식품자원에 비하여 활용되지 못하는 폐기물의 비율이 높다. 수산 폐기물 가운데 게 껍질로부터 분리되고 있는 키친, 키토산 등 일부는 많은 연구자들의 연구결과에 의하여 이미 상업화되기도 했지만 이 이외에도 수산 폐기물에는 고부가가치가 있는 여러 가지의 유용한 물질들이 많이 있으므로 이를 효율적으로 이용할 수 있는 방안이 필요하다고 생각된다.

최근 복어류는 단일 어종으로서는 보기 드물게 그 소비량이 매우 많으며, 대부분 전문도매업자에 의하여 식용부위와 비식용부위로 분리되는 전처리과정을 과정을 거쳐 유통되고 있는데, 이때 어체 폐기물이 많이 발생되고 있어 이를 처리하는데 따르는 어려움이 많을 뿐만 아니라 연안수질 오염의 원인이 되고 있다. 특히 복어의 어체 폐기물 가운데 간장 부위는 어체 중량에 비하여 그 양이 많기 때문에 이를 이용할 수 있는 방법의 개발은 수산 폐자원의 재활용이라는 측면에서도 가치있는 일이다. 복어의 간장에

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : 051-620-4714, Fax : 051-628-4469
E-mail : kdskim@star.kyungsung.ac.kr

는 테트로도톡신이라는 독성분의 함량이 다른 부위에 비하여 높기 때문에 이를 분리하여 이용한다면 경제적으로 의미가 있을 뿐만 아니라 이와 같은 연구가 아직 국내에서는 거의 없는 실정이다.

테트로도톡신은 현재 신경전달물질에 대한 메카니즘을 밝히는 중요한 연구에 필수적인 생화학용시약으로 이용되고 있고, 고가의 의약용으로 이용될 수 있는 잠재성이 높다고 할 수 있다. 테트로도톡신은 이미 류마치스형 관절염 치료약, 말기 암환자의 진통 진정제, 국소 근육 이완제, 무좀 치료, 피부염 치료 등 많은 부분에 효과가 있는 것으로 알려져 있다[6]. 만일 테트로도톡신이 저렴하게 국내생산이 가능하게 되면 이를 이용한 신경계 계통의 다양한 연구와 이와 관련된 유도체들의 개발 및 그 이용에 관한 연구에도 크게 기여하게 될 것으로 생각된다.

한편, 복어의 간장 부위에는 지질의 함량이 높기 때문에 주요한 어유 자원으로 이용 가능성이 높지만, 이 부분에 대한 연구도 진행되고 있지 않다. 대구 간유 및 상어 간유는 오래 전부터 기능성 식품 소재로 이용되고 있는데 복어의 간유도 상업적으로 개발된다면 상품성이 매우 클 것으로 기대된다. 고도불포화지방산 가운데에서도 최근에 주목받고 있는 DHA의 경우 생리기능에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 이러한 지방산의 생리기능은 뇌경색과 심근경색의 예방 및 방지, 식품에 기인한 동맥경화의 예방과 방지 등 심혈관계질환의 예방효과, 항종양 효과, 기억학습능력 저하 예방효과 등[2,5,12]이 알려지고 있으며, 동물실험에서도 그 효과가 인정되고 있다. 그 이외에도 눈의 기능향상, 알레르기 체질의 개선, 당뇨병 합병증의 진행방지, 피부를 윤택하게 하는 등 여러 가지 생리효과도 기대되고 있다.

본 연구에서는 현재까지 이용되지 못하고 다량으로 폐기되고 있는 수산 폐기물 가운데, 복어의 간장부위를 이용하여 유용물질인 테트로도톡신, DHA 및 EPA를 분리하고 그 함량에 대하여 분석 조사하였다.

재료 및 방법

시험재료

부산시 소재 자갈치 어시장에서 1999년 4월에 선도가 양호한 냉동 까치복을 구입하여 -20℃의 냉장고에 저장하여 두고 실험에 사용하였다.

독성의 검사

독성시험은 Ministry of Health and Welfare 중의 복어독 검사법[15]에 의거하여 시행하였다. 즉, 시료 10g에 0.1% 초산완충 용액을 25ml 가하고 열탕 중에서 가열하여 충분히 독소를 추출한 후 Toyo filterpaper(No.5)로 여과하고 잔사는 0.1% 초산용액으로 다시 세정하여 여액을 합쳐 50ml로 정량하여 공시액으로 하였다. 공시액은 증류수로 알맞게 희석하여 ICR계 생쥐(수컷, 19-21g)의 복강에 1ml 주사한 후, 독성치를 TTX의 치사시간으로부터 계산하여 MU (mouse unit) 단위로 나타내었다. 1MU는 주사한 후 30분 이내에 치사시킬 수 있는 양에 해당하는 TTX를 의미한다.

테트로도톡신의 분리 및 정제

독소는 Fig. 1과 같은 방법으로 분리하고 부분 정제하였다[7]. 즉, 복어의 간장에 1% 초산/메탄올 용액을 첨가하여 3,000rpm에서 15분간 원심분리하였다. 잔사에 다시 동일한 방법으로 2회 독소를 추출하여 모은 상층액을 디클로로메탄으로 탈지하였다. 수용성 층을 분리하여 잔류하여 있는 디클로로메탄을 진공증발기내에서 제거한 후 Diaflo YM-2 (Amicon)로 한외여과하였다. 여액을 감압 농축하여 Bio-gel P-2 칼럼(5.6cm I.D.×50cm)에 넣어 0.1M 초산용액으로 용출시켜 독성획분을 얻어 농축하였다. 독성획분은 다시 Bio-gel P-2 칼럼(2.0cm I.D.×94cm) 상에서 0.03M 초산용액으로 용출시켜 독성획분을 모아 동결 농축하여 정제하고, 이것을 기기분석에 사용하였다. 한편 한외여과법 대신에 활성탄 칼럼(2.0cm I.D.×25cm)을 사용하여 20% ethyl alcohol에 용해시켜 만든 1% acetic acid로써 독성획분을 용리하고 그 이후는 상기의 방법과 동일하게 독소를 정제하였다.

HPLC에 의한 독소의 분석[16]

HPLC 분석기기는 Gilson 712 system을 사용하였으며, YMC-Pack AM-314 ODS column(6mm ID×300 mm)상에서 2mM sodium 1-heptane sulfonate / 0.05M potassium phosphate buffer (pH 7.0) 용액과 methanol 혼합액(99 : 1)을 1 ml/min의 속도로 흘려 용출시키고, 3N NaOH로 100

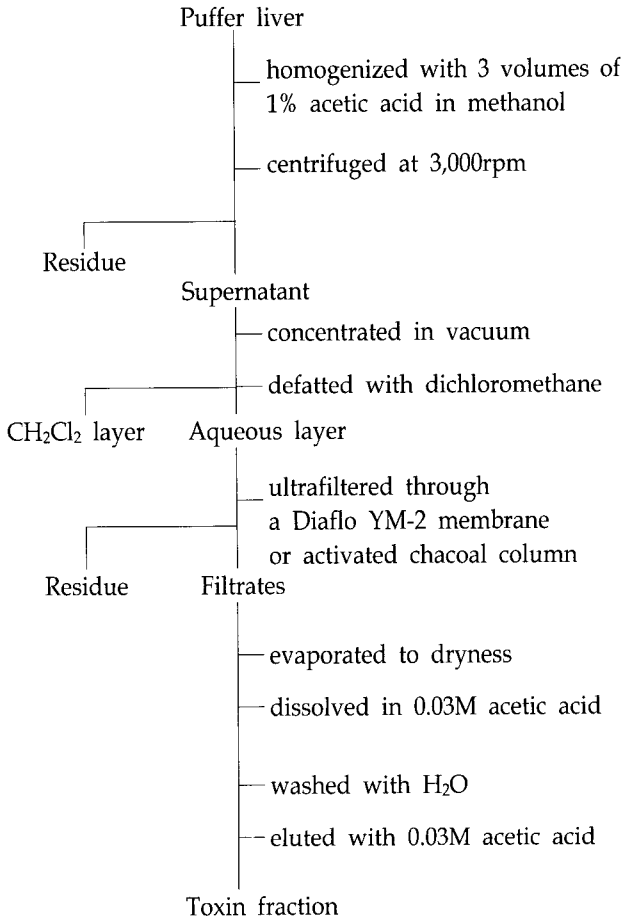


Fig. 1. Partial purification of pufferfish toxin.

℃에서 가열한 후 형광 검출기로 분석하여, 여기파장 380 nm, 형광파장 505nm에서 검출하였다.

GC-MS에 의한 독소의 동정[19]

복어의 간장으로부터 추출, 정제한 TTX 획분을 농축하여, Fig. 2의 과정과 같이 전처리하여 분석하였다. 즉, 시료를 1ml의 2N NaOH에 녹이고, 비등 수욕조에서 45분간 가열하여 TTX 및 그 유도체를 C_9-base로 전환시켜 방냉한 후, 20% HCl로 pH를 4.0으로 조정한 다음 2ml의 n-butanol로 3회 반복 추출하였다. 각 추출액을 섞고 vacuum evaporator에서 농축한 후 동결건조하여 BSA (N.O-bis(triemthylsilyl) acetamide)-TMCS(Trimethyl chlorosilane)- pyridine (2:1:1) 용액에 녹인 다음 30분간 방치시켜 GC-MS로 분석을 하였다. TTX 및 그 유도체의 동정을 위한 GC-MS 분석 조건은 Table 1과 같다.

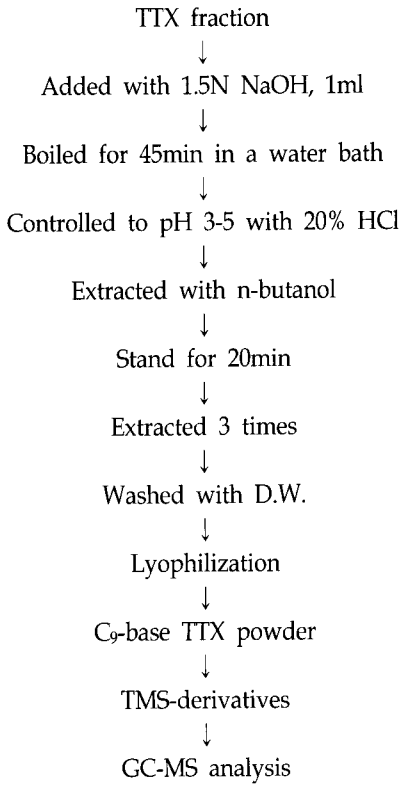


Fig. 2. Procedure for GC-MS analysis of TTX and related substance.

Table 1. Conditions of GC-MS for detecting TTXs

Instrument	Hewlett Packard(HP 5989A)
Column	Ultra-2(Cross linked 5% Phenyl Methyl Sylicone), 50m×0.02mm ×0.11㎛
Split	30-40 : 1
Column temp.	140℃ to 300℃, 5℃/min
Flow rate	1.1ml/min
Ionizing voltage	70eV
Ion source temp.	200℃
Scanning mass range	m/z 50-400 at 2sec intervals
Carrier gas	He

총지질의 추출 및 정제

시료의 총지질은 Bligh and Dyer법[3]에 따라 추출하였다. 즉, 시료 50g을 취하여 10ml의 증류수를 첨가한 후 100 ml의 메탄올과 50ml의 클로로포름의 혼합용액을 넣어 homogenizer에서 2분간 마쇄하였다. 이 혼합액에 50ml의 클로

로포름을 첨가하고 30초간 더 균질화하였다. 이 균질액을 Toyo filterpaper (No.5)를 사용하여 buchner funnel로 약하게 흡인여과시킨 후 활성탄(Wako pure chemical)을 사용하여 색소를 제거한 후 그 여액을 분액여두로 옮겨 에테르를 붓고 세게 흔들어 순수 지방질만을 추출한 후 이것을 무수 Na_2SO_4를 통해 수분을 제거시킨 뒤 총지질을 얻었다. 지방질의 추출에 사용된 모든 용매는 질소기류 하에서 vacuum evaporator로 제거하며 지질의 양은 중량법에 의하여 계산하였다. 한편, 정제한 지질은 소량의 에테르에 녹여 질소가스로 충진한 후 -20℃의 냉동실에 보관하면서 모든 지방질의 분석시료로 사용하였다.

복어 간유 지질 조성의 분석

각 조직으로부터 추출한 정제된 총지질을 Rouser 등[18]의 방법에 따라 silicic acid column chromatography(SSC)에 의하여 중성지질, 당지질 및 인지질 획분을 분리하였다. 즉, silicic acid (70~230mesh, Merck社)를 증류수로 씻어서 미립자를 제거하고 메탄올로 다시 씻은 후 110℃에서 하룻밤동안 활성화시켰다. 활성화된 silicic acid 약 15g을 클로로포름으로 slurry를 만든 후 glass wool이 1~2cm 채워진 column (i.d. 2.5×30cm)에 충진하고 총지질 200mg을 주입한 후 질소 gas를 통과시켜 용매의 유출속도를 1분당 약 3ml되게 조절하면서 관 부피의 10배량의 클로로포름으로 중성지질 획분을 얻은 다음 관 부피의 20배가량의 아세톤과 다시 10배량의 메탄올로 각각 용출시켜 극성지질인 당지질 및 인지질 획분으로 분획하며 용매를 제거한 후 중량법에 의하여 이들의 함량을 계산하였다.

GC에 의한 지방산 분석

정제된 총지질의 지방산 분석은 0.5N methanolic sodium hydroxide 용액으로 비누화 시킨 후 지방산을 분리하며 이것을 Metcalfe등[14]의 방법에 의하여 14% BF_3/methanol용액을 사용하여 methylation시켜 이를 GC로 분석하였으며 이때의 분석조건은 Table 2와 같다. 그리고 상대 머무름 부피 및 머무름 시간을 동일한 조건에서 표준지방산과 시료의 peak를 서로 비교하여 지방산을 확인하고 각 peak 면적의 비율(%)은 총 면적에 대한 백분율로 표시하였다.

Table 2. Operating conditions for GC analysis of fatty acid methyl ester

Instrument	Hewlett Packard(HP-5890A)
Column	Capillary column(Length 25m)
Packing materials	Cross linked FFAP
Oven temp.	230℃
Injector temp.	240℃
Detector temp.	240℃
Initial temp.	230℃
Final temp.	230℃
Detector	Flame Ionization Detector(FID)
Carrier gas	Nitrogen

HPLC에 의한 DHA 및 EPA의 분리[17]

총지질 중의 DHA 및 EPA 함량의 분석은 GC 분석과 마찬가지로 시료를 검화한 후, methylation시켜 이를 HPLC로 분석하였으며, 이때의 분석조건은 Table 3과 같다. 그리고 머무름 시간을 동일 조건하에서 표준품 DHA 및 EPA와 시료의 peak를 서로 비교하여 확인하고 GC와 같은 방법으로 면적 백분율로 나타내었다.

결과 및 고찰

어체 조직부위별 중량, 독성 및 지질의 함량

실험에 사용된 까치복 10개체에 대한 전장, 체중 및 조직부위별 중량을 Table 4에 나타내었다. 본 실험에 사용한 것은 전장이 22.5~27.8cm(평균, 25.3±1.3cm), 체중이 400~480g(평균, 441±21g)이었다. 부위별 중량은 간장이 30.1~39.1g(평균, 35.7±2.4g), 내장이 12.2~23.4g(평균, 17.7±2.9g), 껍질이 48.6~59.5g(평균, 54.7±3.6g), 근육 및 기타 부위가 308.3~351.0g(평균, 332.9±13.8g)이었다. 이 가운데

Table 3. HPLC operating conditions for fatty acid analysis

Instrument	Hewlett Packard(HP-1100)
Column	Lichrospher 100 RP-18(5㎛) (5mm I.D.×250mm)
Flow rate	1ml/min
Mobile phase	Methanol-D.W.(90:10, v/v)
Column temp.	40℃
Detector	UV detector(at 215nm)

Table 4. The weight of the anatomical part in the pufferfish *Fugu xanthopterus*(Korean name, Ggachi-bog)

Specimen No.	Total length (cm)	Body weight (g)	Sex	Weight(g)			
				Liver	Intestine	Skin	Muscle
1	27.0	470	F	36.1	23.4	59.5	351.0
2	25.4	450	M	39.1	18.5	51.0	341.1
3	27.8	480	M	38.4	19.9	62.6	359.1
4	24.5	440	M	36.5	21.2	54.7	327.6
5	26.2	450	M	37.5	17.9	57.3	337.3
6	25.5	460	M	38.6	19.5	56.8	345.1
7	26.4	430	M	35.8	16.6	55.1	322.5
8	23.2	410	F	32.7	13.6	48.6	315.1
9	24.6	420	M	32.4	14.1	51.7	321.8
10	22.5	400	M	30.1	12.2	49.4	308.3
Mean	25.3±1.3	441±21		35.7±2.4	17.7±2.9	54.7±3.6	332.9±13.8

비식용 부위로서 폐기되고 있는 간장의 경우 평균 중량이 어체 중량의 약 8.1%이었고 내장의 경우는 약 4.1%로서 비교적 그 양이 많은 편이지만 이용되지 못하고 있을 뿐만 아니라 폐기물로서 처리하는 데에도 부담이 되고 있다. 따라서 이들 비식용 부위에 함유되어 있는 주요 유용성분을 분리, 이용하기 위한 시도가 필요할 것으로 생각되었다. Table 5에는 복어의 조직부위별 독성과 지질함량을 나타내었다. 독성을 비교하여 보면 비식용 부위인 간장과 내장의 평균독력이 각각 56±40 MU/g 및 33±22 MU/g으로서 식용부위인 껍질이나 근육부위보다 높았다. 이러한 결과로부터 시판되고 있는 다른 종류의 복어의 독성과 비교하여 보면, 까칠복[11], 중국산 삼채복[10], 인도네시아산 흰 밀복[9]의 경우보다 높은 독력을 나타내었다. 또한 Jeong 등[8]이 보고한 국내산 검은 밀복 및 자주복과, 중국산 황복[9]의 경우와 비교할 때에도 그 독력이 높았다. 한편, 조직부위별 지방의 평균 함량은 간장이 40.7±1.2%, 내장이 3.6±0.4%, 껍질이 1.1±0.2%, 근육부위가 0.2±0.1%로서 간장이 다른 부위에 비하여 지질 함량이 현저히 높았다. 이러한 결과로 보아 이들 비식용 부위로서 폐기되고 있는 복어 간장 부위로부터 TTX 및 어유를 효과적으로 회수하여 이

Table 5. The lipid contents and toxicity in the anatomical part of pufferfish *Fugu anthopterus*(Korean name, Ggachi-bog)

Specimen No.	Lipid contents(%) and toxicity(MU/g)							
	Liver		Intestine		Skin		Muscle	
	Lipid	Toxicity	Lipid	Toxicity	Lipid	Toxicity	Lipid	Toxicity
1	42.7	127	3.8	43	1.2	7	0.2	ND
2	41.3	ND	4.1	6	1.2	ND	0.3	ND
3	39.9	26	3.1	12	0.9	6	0.2	ND
4	43.0	8	4.0	ND	1.2	ND	0.3	ND
5	38.4	64	3.1	76	0.9	11	0.1	ND
6	38.9	32	3.2	17	0.9	ND	0.1	ND
7	40.8	ND	4.1	ND	1.3	ND	0.2	ND
8	41.5	115	4.1	68	1.4	8	0.3	ND
9	40.3	19	3.2	24	1.0	ND	0.2	ND
10	40.1	ND	3.2	16	1.0	ND	0.2	ND
Mean	40.7±1.2	56±40	3.6±0.4	33±22	1.1±0.2	8±2	0.2±0.1	ND

Table 6. The recovering ratio(%) of toxin by each separation step

Separation step	Total toxicity(MU) UF[*1]	ACC[*2]	Recovering ratio UF	ACC	Remarks
1st step	40,000		100		Defatted with CH_2Cl_2
2nd step	36,000	21,000	72.6	52.5	Ultrafiltration or activated charcoal column
3rd step	32,000	18,000	65.3	45.0	Bio gel P-2 column

[*1] : Ultrafilteration
[*2] : Activated charcoal column

용하는 것은 가치가 있을 것으로 판단되었다.

정제 방법에 따른 복어독의 회수율 및 생산량

복어독의 정제는 Fig. 1에 기술한 바와 같이 시행하였다. 즉, 복어독을 초산으로 추출하고 디클로로메탄으로 탈지한 후 한외여과법 및 활성탄 칼럼법으로 복어독을 각각 분리한 후, Bio-gel P-2 칼럼크로마토그래피에 의하여 정제하였다. 한편, 분리 정제 과정 중 처리방법에 따른 복어독 회수율을 조사하여 Table 6에 나타내었다. 즉, 한외여과는 독력이 40,000MU인 시료액을 NaOH로서 pH 4~5로 조정한 후 한외여과법으로 분자량 1,000dalton이하의 것만을 얻은 다음, 대형 Bio-gel P-2 칼럼(5.6cm I.D.×50cm)으로 부분정제한 후, 다시 소형 Bio-gel P-2 칼럼(2cm I.D.×96cm)으로 다시 정제하였다. 최종 단계로부터 분리된 독력은 32,000MU이었으며, 회수율은 65.3%이었다. 한편 활성탄 칼럼(2cm I.D.×25cm)을 사용한 경우에는 최종 단계로부터 분리된 독력은 18,000MU이었고, 회수율은 45.0%로서 한외여과법에 비하여 정제과정 중 독소의 손실이 큰 것으로 생각되었다. Table 7은 이들 2종류의 방법을 이용하여 복어독을 정제한 경우 까치복 간장 1kg에서 얻을 수 있는 TTX의 양을 계산한 것이다. 즉, TTX 1mg은 약 5,000MU의 독력[4]을 나타내기 때문에 이에 근거하여 계산하였을 경우 한외여과법을 사용한 것은 약 68mg, 활성탄을 사용한 것은 약 54mg의 TTX을 얻을 수 있었다.

Table 7. The amounts of TTX obtained from 1kg liver of pufferfish by using two different methods in the course of toxin separation

Method	Toxicity(MU)	TTX(mg)[*3]
UF[*1]	340,000	68
ACC[*2]	270,000	54

[*1]: Ultrafilteration
[*2]: Activated charcoal treatment
[*3]: Calculated by the equation of 5,000MU toxicity per mg TTX

독소의 분석 및 동정

Fig. 3은 분리된 독소의 HPLC 분석결과를 나타내었다. 즉, TTX 표준품의 경우 3개의 peak가 나타났는데, 이것은 TTX(머무름 시간, 7.52 min) 및 그 유도체들이다. TTX는 tetrodonic acid(TDA), anhydro TTX 등의 유도체를 가지고 있는데, 이들의 머무름 시간은 각각 5.14 min 및 9.27 min 이었다(Fig. 3, a). 복어 간장으로부터 얻은 시료에서도 같

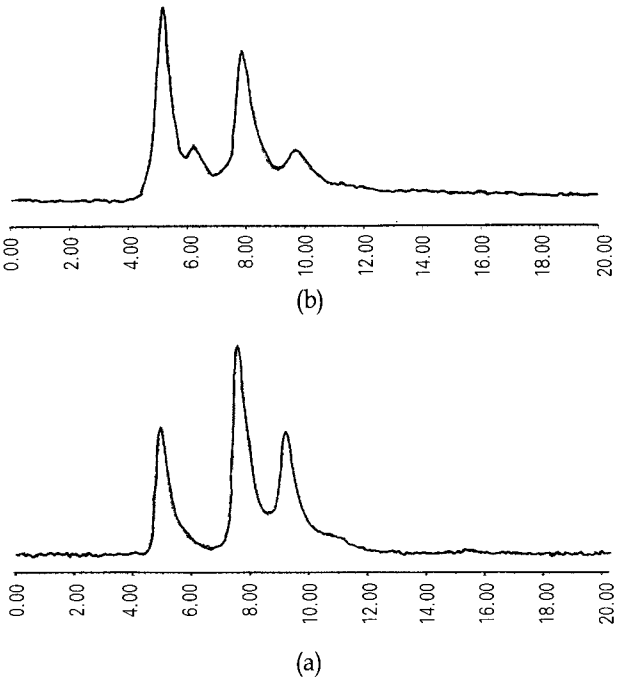
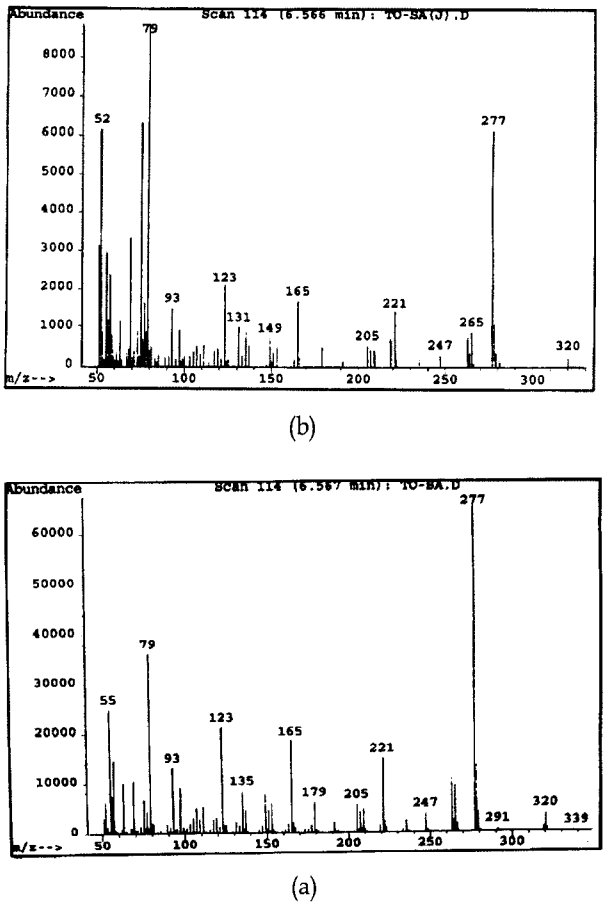


Fig. 3. HPLC chromatogram for authentic TTX(a) and the pufferfish liver toxin(b).

은 머무름 시간에서 TDA, TTX 및 anhydro TTX peak를 얻을 수 있었으며 전형적인 TTXs의 peak 패턴을 나타내었다. 그런데 미지의 작은 peak(머무름 시간, 6.21 min)가 한 개 더 나타나, 표준품과 시료가 약간의 다른 것은 TTX 유도체들의 조성이 시료에 따라 다소 다르기 때문이라 생각된다. 또한 GC-MS에 의한 분석결과는 Fig. 4에 나타내었다. Suenaga 등[19]은 TTX의 tri-TMS-C_9- base의 mass spectrum은 base peak가 m/z 392, parent peak가 m/z 407이며, intense peak가 m/z 376 등의 peak가 나타나지만, di-TMS-C_9-base인 경우에는 base peak가 m/z 277이며, parent peak는 없고, intense peak가 165, 221, 320 등의 peak가 나타난다고 보고한 바 있다. 본 실험에서 얻은 독소를 2N NaOH로 가수분해시킨 후 TMS화하여 분석한 결과, base peak m/z 277, intense peak 165, 221, 320과 일치하는 di-TMS-C_9-base의 peak로 보아 TTX 및 그 유도체임이 확인되었다.



(b)

(a)

Fig. 4. GC-MS spectrum of authentic TTX(a) and pufferfish liver TTXs(b).

복어 간유의 지질조성, DHA 및 EPA 함량

고도불포화지방산은 사람의 건강 유지에 좋은 효과를 나타낸다는 사실이 널리 인정되고 있어, 인간의 생리작용에 미치는 효과에 대하여 영양학적, 임상학적 연구가 활발히 진행되고 있다. 즉 이들 지방산은 심장질환, 고혈압, 소염, 암치료 및 예방에 효과가 있으며, 특히 DHA는 뇌의 구조지질의 약 60%를 차지하고 있으며, 알츠하이머 질병과도 관련이 있어 뇌의 정상적인 성장 및 기능 개발에 필수적이며, EPA로부터 합성되는 것[20]으로 알려져 있다.

복어 간유의 총지질 조성은 Table 8에서 보는 바와 같이 중성지질, 인지질 및 당지질의 함량 비율이 96.3%, 2.3% 및 1.4%로서 중성지질의 함량이 대부분을 차지하였다. 복어 간유 총지질의 지방산 조성을 GC에 의하여 분석한 결과는 Table 9에 나타내었다. 즉, 까치복의 간유 중의 DHA(22:6) 및 EPA (20:5) 함량이 각각 17.70% 및 1.04%이었다. Ackman 등[1]의 보고와 비교해 보면 DHA는 대구간에는 9.5%, 청어는 8.0%, 고등어는 11%, 꽁치는 9%이었고 정어리는 10%로 본 실험에 사용된 까치복 간유의 경우가 함량 비율이 높은 것으로 나타났다. 또한 이 등[13]의 보고에 따르면 DHA의 경우 고등어는 21.9%, 꽁치는 28.3%, 청어는 13.2%, 전갱이는 24.6%, 방어가 27.7%로 청어를 제외하고는 까치복 간유가 그 함량이 적었다. EPA의 경우에는 고등어 10.7%, 꽁치 9.8%, 청어 14.6%, 전갱이 9.7%, 방어 8.4%로 보고되어 있어 까치복 간유의 경우가 이들 어류에 비하여는 그 함량이 다소 적었다. 한편 이 등[13]이 보고한 시중에 판매되고 있는 6종류의 어유 제품의 DHA의 함량 비율은 4.3~13.3%로 본 실험에 이용된 까치복 간유의 경우가 함량이 높았으며, EPA의 함량은 시판 어유제품(19.2

Table 8. The contents ratio of neutral lipid, phospholipid and glycolipid in the pufferfish liver oil, *Fugu xanthopterus*(Korean name, Ggachi -bog)

Lipid classes	Ratio(%)
Neutral lipid	96.3
Phospholipid	2.3
Glycolipid	1.4

Table 9. Composition of fatty acids in the total lipid of the pufferfish liver oil, *Fugu xanthopterus*, by GC analysis

Fatty acids	Composition(%)
14 : 0	2.58
16 : 0	16.32
16 : 1	8.53
17 : 0	1.05
18 : 0	5.05
18 : 1	22.66
18 : 2	1.49
18 : 3	1.36
20 : 1	3.16
20 : 4	1.40
20 : 5	1.04
22 : 1	7.57
22 : 6	17.70
SFA*1	25.00
MUFA*2	41.92
PUFA*3	22.99
PUFA/SFA	0.92
EPA+DHA	18.74

SFA*1 : Saturated fatty acids
MUFA*2 : Mono unsaturated fatty acids
PUFA*3 : Poly unsaturated fatty acids

~50.3%)보다는 그 함량이 낮았다.

HPLC에 의한 DHA 및 EPA의 분리

어유 중의 DHA 및 EPA의 정량은 보통 GC법에 의하여 행하여지고 있으나, 정량 뿐만 아니라 조제에도 유효한 것으로는 HPLC법이 있으며, GC법에 비교하여 감도가 좋기 때문에 DHA 및 EPA의 정량법으로 적합한 것으로 보고[17]되어 있다. 즉 고도불포화지방산의 경우 GC에 의한 분석방법보다 HPLC에 의한 방법이 높은 검출감도를 나타내며 분리물의 회수가 가능하기 때문에 산업적으로 활용가능성이 높다. 복어 간유의 총지질로부터 DHA 및 EPA를 효과적으로 분리 회수하기 위하여 HPLC에 의하여 분석한 결과를 Fig. 5 및 Table 10에 나타내었다. 즉 Fig. 5에서 보는 바와 같이 그 분리능이 우수함을 알 수 있었다. HLPC에 의하여 까치복 간유를 분석한 결과 Table 10에서 보는 바와 같이 DHA 및 EPA는 각각 56.09±3.33% 및 7.59±

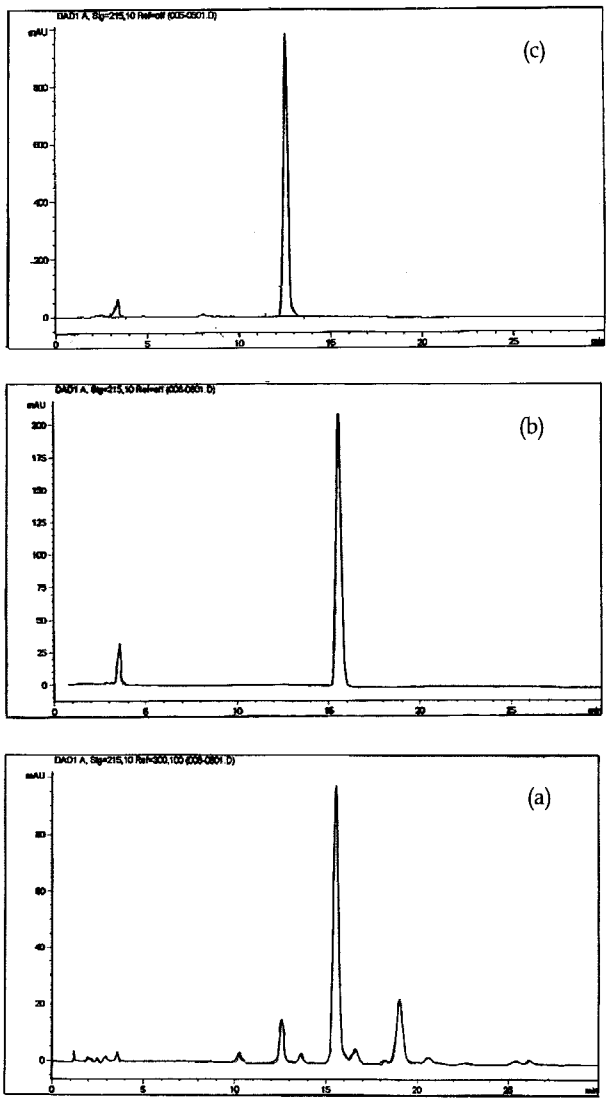


Fig. 5. HPLC chromatogram of authentic EPA(c), authentic DHA(b) and fatty acids(a) in the pufferfish liver oil, *Fugu xanthopterus*.

0.81%이었으며, 까치복 간장 1kg당 얻을 수 있는 양으로 환산하면 DHA 및 EPA는 각각 72.3g 및 11.4g이었다.

요 약

수산 폐기물에는 고부가가치가 있는 여러 가지의 유용한 물질들이 많이 함유되어 있다. 이를 효율적으로 이용할 수 있는 방안을 모색하기 위하여 현재까지 이용되지 못하고 대량으로 폐기되고 있는 복어의 비식용부위 가운데, 까

Table 10. DHA and EPA in the pufferfish liver oil, *Fugu xanthopterus*, obtained by HPLC analysis

Fatty acids	Composition(Area %)			
	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Mean value
DHA	61.09	54.39	52.81	56.09±3.33
EPA	8.68	7.73	6.37	7.59±0.81
DHA+EPA	69.77	62.12	59.18	63.68±4.05
Other fatty acids	30.23	37.88	40.82	37.32±4.05

치복의 간장부위를 이용하여 유용물질인 테트로도톡신, DHA 및 EPA를 분리하고 그 함량 등에 대하여 분석 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

까치복 10개체의 전장은 22.5~27.8cm(평균, 25.3±1.3 cm), 체중은 400~ 480g(평균, 441±21g)이었으며, 간장은 30.1~39.1g(평균, 35.7±2.4g)으로서 평균 중량이 어체 중량의 약 8.1%를 차지하였다. 비식용 부위인 간장의 평균 독력은 56±40 MU/g이었으며, 지방의 평균 함량은 40.7± 1.2%이었다.

분리한 독소를 HPLC로 분석한 결과, TTX 및 그 유도체들로 생각되는 peak를 얻을 수 있었으며, 또한 GC-MS에 의한 분석결과 base peak m/z 277, intense peak 165, 221, 320과 일치하는 di-TMS-C_9-base의 peak로 보아 TTX 및 그 유도체임이 확인되었다. 복어독을 효과적으로 분리하기 위하여 분리정제 방법에 따른 복어독의 회수율을 비교한 결과, 한외여과법의 경우 65.3%이었으며, 활성탄 칼럼법에 의한 경우에는 45.0%이었다. 또한 한외여과법 및 활성탄 칼럼법에 의하여 까치복 간장 1kg로부터 회수할 수 있었던 독소의 양은 각각 약 68mg 및 54mg이었다.

복어 간유의 지질 조성은 중성지질, 인지질 및 당지질이 각각 96.3%, 2.3% 및 1.4%로서 중성지질의 함량이 대부분을 차지하였다. 복어 간유 총지질을 GC에 의하여 분석한 결과, DHA 및 EPA의 함량은 각각 17.70% 및 1.04%이었다. 또한 HPLC에 의한 경우에는 DHA 및 EPA의 함량이 각각 50.09±3.33% 및 7.59±0.81%이었으며, 이를 까치복 간장 1kg당 얻을 수 있는 양으로 환산하면 각각 72.3g 및 11.4g이었다.

감사의 글

본 논문은 한국학술진흥재단의 지원(과제번호: 1998-023-H00026)에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Ackman, R. G. and J. Connel. 1980. Advances in fish science and technology. *England, Fishing News Books.* pp. 86.
2. Bang, H. O., J. Dyerberg and H. M. Sinclair. 1980. The composition of the Eskimo food in North western Greenland. *Am. J. Clin. Nutr.* **33**, 2657-2661.
3. Bligh, E. G. and W. J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipidextraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911-917.
4. Fuchi, Y., S. Morisaki, T. Nagata, K. Shimazaki, T. Noguchi, N. Ohtomo and K. Hashimoto. 1988. Determination of tetrodotoxin in pufferfish and shellfish by high performance liquid chromatography. *J. Food Hyg. Soc. Japan.* **29**, 306-312.
5. Herold, P. M. and J. E. Kinsella. 1986. Fish oil consumption and decreased risk of cardiovascular disease ; A comparison of finding from animal and human feeding trial. *Am. J. Clin. Nutr.* **107**, 890-894.
6. Hille, B. 1975. The receptor for tetrodotoxin and saxitoxin. *Biophys. J.* **15**, 615-619.
7. Hwang. D. F., T. Noguchi, O. Arakawa, T. Abe and K. Hashimoto. 1998. Toxicological studies on several species of puffer in Taiwan. *Nippon suisan Gakkaishi.* **54**, 2001-2008.
8. Jeong, D. Y., D. S. Kim, M. J. Lee, S. R. Kim, D. S. Byun, H. D. Kim and Y. H. Park. 1994. Toxicity of several puffers collected at a fish market of Pusan. *Korea. Bull. Korean. Fish. Soc.* **27**, 682-688.
9. Kim, D. S., H. J. Lee, M. J. Lee, M. J. Lee and H. D. Kim. 1996. Anatomical Toxicity of Pufferfishes, Chinese *Fugu obscurus* and Indonesian *Lagocephalus wheeleri*. *J. Korean Food and Nutr.* **9**, 361-365. (in Korean)

10. Kim, D. S., S. R. Kim, M. J. Lee, M. H. Seol, D. Y. Jeong and H. D. Kim. 1995. toxicity of the imported pufferfish, *Fugu flavidus* ("Samchaebog"), from china. *J. Korean Fish. Soc.* **28**, 533-538. (in Korean)
11. Kim, K. C., J. W. Park, M. J. Lee, S. R. Kim, D. S. Kim, H. D. Kim and Y. H. Park. 1995. Toxicity of the Pufferfish *Fugu stictonutus* ("Ggachilbog") Collected at a Fish Market of Pusan. *J. Korean Fish. Soc.* **28**, 31-34. (in Korean)
12. Kinsella, J. E. 1987. Seafoods and fish oil in human health and disease, Marcel Dekker, *New York.* pp.175-184.
13. Lee, K. H., I. H. Jeong, J. S. Suh and J. H. Ryuk. 1988. Utilization of Polyunsaturated Lipids in red Muscled Fishes, 3. The Conditions of Refining, Decoloring, and Deodorization for Processing of Refined Sardine Oil. *Bull. Korean Fish. Soc.* **21**, 225-231. (in Korean)
14. Metcalfe, I.D., A. A. Schmitz and J. R Pelka. 1996. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. *Analytical Chemistry.* **38**, 514-521.
15. Ministry of Health and Welfare. 1991. Shokuhin Eisei Kensa Shishin. **2**, pp. 296-300. (in Japanese)
16. Nagashima, Y., J. Maruyama, T. Noguchi and K. Hashimoto. 1987. Analysis of paralytic shellfish poison and tetrodotoxin by ion-pairing high performance liquid chromatography. *Nippon Suisan Gakaishi.* **53**, 819-823.
17. Nakajima, S., I. Matsushita and T. Tsuchiya. 1993. Determination of EPA and DHA Content in Extracted Fish Oil by Modified HPLC. *Nippon Suisan Gakkaishi.* **59**, 1431.
18. Rouser, G., G. Kritchevsky and G. Siomon. 1967. Quantitative analysis of brain ad spinach leaf lipids employing silicic acid column chromatography and acetone for elution of glycolipids. *Lipids.* **2**, 37-44.
19. Suenaga, K. and S. Kotoku. 1980. Detection of tetrodotoxin in autopsy materials by gas chromatography. *Arch. Toxicol.* **44**, 291-297.
20. Ward O. P. 1995. Microbial production of long chain PUFAs. *INFORM.* **6**, 683-688.