

## 국내산 패류의 신경독소 domoic acid 검색

고은미 · 권훈정\*  
서울대학교 식품영양학과Screening of Domoic Acid, a Marine Neurotoxin,  
in Korean Shellfishes

Eunmi Koh and Hoonjeong Kwon\*

Department of Food and Nutrition, Seoul National University

Domoic acid, an amnesic shellfish poison, is a neurotoxin frequently found in shellfishes. Guidance level for the consumable shellfish has been established as 20 µg domoic acid/g by Health and Welfare Canada and U.S. FDA. Domoic acid is produced by pennate diatom, a *Nitzschia pungens* f. *multiseriata* ingested by the shellfish. Content of domoic acid in shellfish samples collected along the Korean shoreline from May to December of 1999 was analyzed. The collection included 1 Gastropoda (*Murex* shell) and 11 Bivalvias (oyster, little neck clam, orient hard clam, venus clam, surf clam, ark shell, hard-shelled mussel, pen shell, jack-knife clam, pink butterfly shell, and granulated ark shell). Samples were homogenized, extracted with 50% methanol, filtered, and analyzed by reversed-phase liquid chromatography at 242 nm with mobile phase consisting of 10% acetonitrile and 0.1% trifluoroacetic acid. Recovery of the HPLC analysis was 95.80% ( $\pm 1.09$ ). All tested samples showed no domoic acid at the detection limit of 50 ng/g.

**Key words:** domoic acid, amnesic shellfish poison, neurotoxin, *Nitzschia pungens* f. *multiseriata*

## 서 론

해산물 독소가 세계적으로 식중독 원인물질로 점점 중요해지고 있는 이유는 분석 기술의 발달, 국제 무역에서 해산물에 대한 관심 증가, 그리고 환경변화가 유해한 식물성 플랑크톤의 발생을 증가시키고 있기 때문이다<sup>(1)</sup>. 이런 현상은 해수 온도의 증가, 해안바다의 부영양화, 또는 식물성 플랑크톤의 이동에 의해 일어나는 것으로 알려져 있다<sup>(2)</sup>.

1987년 캐나다 남동부의 Prince Edward 섬에서 홍합(*mussels*)을 섭취한 사람들이 오심, 구토, 복통, 두통, 설사, 기억상실 등을 호소하였으며 50세 이상의 노인들이 사망한 식중독 사건이 발생하였다<sup>(2)</sup>. 시료 추출물의 동물실험 결과 마비성 패류 독소와 다른 특징인 기억 상실을 나타내면서 독소 성분이 domoic acid라는 사실이 최초로 보고되었으며, 독소를 생성하는 돌말류가 밝혀지고 기억 상실성 패독(amnesic shellfish poison, ASP)이라고 불려지게 되었다.

1991년 미국 캘리포니아의 Monterey 만에서 *Nitzschia pseu-*

*doseriata*(지금은 *Pseudonitzschia australis*로 명명됨)를 섭취한 anchovies를 먹은 brown pelican과 cormorant가 죽었다. 죽은 사다새의 위 속에 상당량의 *P. australis*가 발견되었으며, anchovies는 domoic acid를 50 ppm 이상 함유하였다고 보고되었다<sup>(2)</sup>. 그 후에도 미국에서 조개 조직 내에 독성물질이 축적되어 있어 기억상실이 일어나는 사건들이 보고되었다.

식품 수급표(1998)에 따르면 한국인의 하루 조개 섭취량은 1.3 g(81년), 2.8 g(85년), 4.0 g(90년), 5.1 g(95년), 5.0 g(99년, 잠정적 추정치)으로 증가 추세였다<sup>(3)</sup>. 우리나라의 식중독 발생 현황을 보면 5~9월에 집중적으로 발생하고 있으나 점차 연중 발생하는 양상으로 바뀌고 있다. 어패류와 그 가공품에 의한 식중독 발생 건수는 37(98년), 69(99년), 27(2000년), 12(2001년)이었으며, 살모넬라균과 장염비브리오균이 주원인균이었다<sup>(4)</sup>. 하지만 식중독 원인이 밝혀지지 않은 발생건수는 전체의 42%로 마비성, 설사성 및 기억상실성 패독이 원인이었을 것으로 추정되었다. 우리나라에서는 마비성 패독에 대해서는 가식부 100 g당 80 µg으로 규제치를 설정하고 있으나 기억상실성 패독에 대한 연구가 미비하고 법적인 기준이 마련되어 있지 않은 실정이다. 미국 FDA와 캐나다 보건 후생청은 패류의 섭취에 대한 domoic acid의 법적 규제치(guide level)을 20 µg/g로 설정하고 식품내 함량을 계속 모니터링하고 있다<sup>(2,5)</sup>.

Prince Edward 섬에서 *P. multiseriata*와 *P. pungens*의 세포

\*Corresponding author : Hoonjeong Kwon, Department of Food and Nutrition, Seoul National University, San 56-1, Shillim-dong, Kwanak-gu, Seoul 151-742, Korea  
Tel: 82-2-880-6835  
Fax: 82-2-884-7555  
E-mail: hjkwon@snu.ac.kr

**Table 1. Shellfishes for the domoic acid analysis**

Shellfishes		Sampling region in each season					
Common name	Genus species	May	Jun.	Jul.	Aug.	Oct.	Dec.
Murex shell	<i>Rapana venosa</i>	Yeosu	Janghang	Yeosu	Yeosu	Janghang	- <sup>1)</sup>
Oyster	<i>Crassostrea gigas</i>	Yeosu	Tongyeong	Tongyeong	Tongyeong	Tongyeong	Tongyeong
Little neck clam	<i>Ruditapes philippinarum</i>	Incheon	Samcheonpo	Samcheonpo	Incheon	Incheon	Samcheonpo
Orient hard clam	<i>Meretrix lusoria</i>	Yeosu	Incheon	Janghang	Yeosu	Namhae	Yeosu
Venus clam	<i>Cyclina sinensis</i>	Incheon	Incheon	Incheon	Incheon	Incheon	Incheon
Surf clam	<i>Mactra veneriformis</i>	Janghang	Incheon	Incheon	Janghang	Janghang	Incheon
Ark shell	<i>Scapharca broughtonii</i>	Janghang	Yeosu	Janghang	Janghang	Yeosu	Yeosu
Hard-shelled mussel	<i>Mytilus coruscus</i>	Yeosu	Yeosu	Yeosu	Yeosu	Yeosu	Yeosu
Pen shell	<i>Atrina(Servatrina) pectinata</i>	Yeosu	Yeosu	Yeosu	Yeosu	Yeosu	Yeosu
Jack-knife clam	<i>Sinonovacula constricta</i>	Incheon	Incheon	Janghang	Incheon	Incheon	Incheon
Pink butterfly shell	<i>Peronidia venulosa</i>	Gangwondo	-	Gangwondo	Gangwondo	Sokcho	-
Granulated ark shell	<i>Tegillarca granosa</i>	Beolgyo	Beolgyo	Beolgyo	-	Beolgyo	Beolgyo

<sup>1)</sup>It means that the sample was not collected since it was not a production season for the particular shellfishes. The places collected is Yeosu (Jeollanamdo), Tongyeong (Gyeongsangnamdo), Incheon (Gyunggido), Samcheonpo (Gyeongsangnamdo), Janghang (Chungcheongnamdo), Beolgyo (Jeollanamdo), Sokcho (Gangwondo) and Namhae (Gyeongsangnamdo).

농도에 비례하여 진주담치 내에 domoic acid도 증가하였다고 보고되었으며<sup>6)</sup>, 우리 나라에도 *P. multiseris*가 분포하며 발생 시기가 5월로 보고되었다<sup>7)</sup>. 따라서 봄부터 domoic acid가 패류에 여과 섭취되어 조개류에 축적될 것으로 사료되어 한국인에 대한 domoic acid의 위해 여부를 평가하기 위하여 한국인이 상용하는 조개류를 1999년 봄부터 겨울까지 수집하여 분석하였다.

**재료 및 방법**

**조개 수집**

한국인이 많이 섭취하는 12종류의 조개, 즉 굴, 바지락, 백합, 가무락, 동죽, 피조개, 홍합, 피조개, 가리막조개, 삔뿔고동, 비단조개, 고막을 5월, 6월, 7월, 8월, 10월, 12월에 각각 1 kg씩 수협을 통하여 수집한 후, 가식 부위만을 균질화하여 -20°C에 저장하였다.

**시약**

Domoic acid는 Sigma Chemical Co.(MO, USA)에서 구입하였다. 메탄올, 아세트니트릴, trifluoroacetic acid은 Fisher Scientific(Fair Lawn, NJ, USA) 제품을 사용하였다.

**Domoic acid의 추출과 정량**

조개 조직내의 domoic acid를 추출하기 위하여 Wekell 등<sup>8)</sup>의 방법을 적용하여 냉동 저장했던 시료를 상온에서 해동한 후 4g을 칭량하여 50% 메탄올(메탄올 : 물 = 50 : 50, v/v) 16 mL를 첨가하여 추출하였다. 균질시료를 원심분리(4000 rpm, 10 min)하고 상층액을 0.2 µm membrane filter로 여과하고 HPLC(Hewlett Packard 1090 series II, Hewlett Packard Co. USA)를 이용하여 domoic acid를 분석하였다. 분석칼럼은 µ-Bondapak TM C18(125 Å, 10 µm, 3.9×300 mm, Waters Co, USA)으로 guard column(Rainin Instrument CO. Inc., MA, USA)과 연결하여 사용하였다. 이동상은 0.1% trifluoro-

acetic acid를 함유한 10% 아세트니트릴로 구배전개없이 30 분 동안 242 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**결과 및 고찰**

Domoic acid를 생성하는 *P. multiseires*는 우리나라에서도 전 연안에서 출현한 기록이 있으며<sup>8)</sup>, 국립수산진흥원<sup>9)</sup>은 한국에서 기억상실성 패독을 일으키는 종이 포함되어 있는 *Nitzschia* spp.는 800-4,500,000 cells/L 범위로 변화의 폭이 크고 연중 출현하고 있으며 특히 봄철인 4월과 5월, 가을철인 9월과 10월에 많은 양이 발생하였다고 보고하였다<sup>10)</sup>. 따라서 본 연구에서는 식중독 발생이 높고 *Nitzschia* spp.가 최대로 증식하는 5월, 식중독이 많이 발생하는 6월, 7월, 8월, 가을철인 10월, 그리고 수온이 낮을 때 오히려 증가한다는 외국 문헌의 보고와 비교하고자 겨울철인 12월에 수집하였다.

수집한 조개 시료는 12종으로 복족류(Gastropoda) 1종과 이매패류(Bivalvia) 11종이었다. 복족류는 삔뿔고동(*Rapana venosa*)이며, 이매패류는 피조개(*Scapharca broughtonii*), 고막(*Tegillarca granosa*), 홍합(*Mytilus coruscus*), 키조개(*Atrina(Servatrina) pectinata*), 굴(*Crassostrea gigas*), 동죽(*Mactra veneriformis*), 비단조개(*Peronidia venulosa*), 가리막조개(*Sinonovacula constricta*), 가무락(*Cyclina sinensis*), 백합(*Meretrix lusoria*), 바지락(*Ruditapes philippinarum*)이다. 시중에서 판매되고 있는 것을 수집하였기 때문에 같은 종류의 조개일지라도 수집 시기에 따라 생산 지역이 달라지기도 하였다(Table 1). 삔뿔고동과 피조개는 전라남도 여수와 충청남도 장항, 고막은 전라남도 별교, 홍합과 키조개는 여수, 굴은 경상남도 통영, 동죽은 장항과 경기도 인천, 비단조개는 강원도 속초, 가리막조개는 인천과 장항, 가무락은 인천, 백합은 여수, 인천, 장항, 남해에서 그리고 바지락은 인천과 경상남도 삼천포에서 생산된 것이었다.

지금까지 보고된 domoic acid 추출 방법은 최초에는 뜨거운 염산을 이용하는 AOAC 마비성 패류독소 추출법을 이용

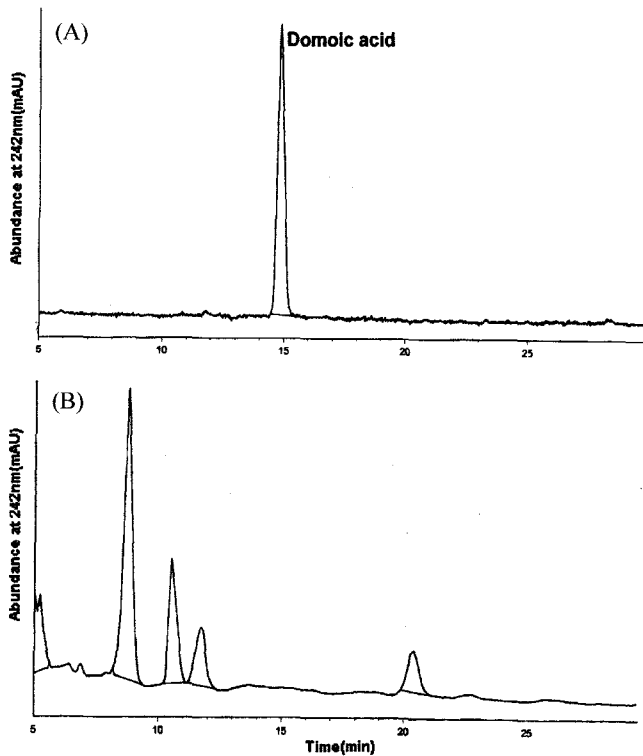


Fig. 1. Isocratic reversed-phase HPLC chromatograms of standard domoic acid (A) and an extract of mussel sample (B). Conditions:  $\mu$ -Bondapak TM C18 (125 Å, 10  $\mu$ m, 3.9 $\times$ 300 mm) column with 1.0 mL/min  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/\text{TFA}$  (10:90:0.1) at 242 nm

하였지만 가열 시간에 비례하여 domoic acid가 감소하며 추출 후 상온에 보관시 그 농도가 급감하는 단점이 있다<sup>9)</sup>. 그 후로 다양한 극성 용매를 비교하였을 때 domoic acid가 물과 메탄올에 용해도가 높다는 보고가 있으며<sup>10)</sup>, 동시에 추출되는 다른 성분들을 정제하기 위하여 고체상으로 C18<sup>11)</sup>과 strong anion exchanger<sup>5)</sup>를 이용하는 방법이 제안되었다. 한편, 검출 감도를 높이는 방법으로 domoic acid를 butyl isothiocyanate(BITC)<sup>12)</sup>나 fluorenylmethoxycarbonyl(FMOC)로 유도체화 시키는 방법<sup>13)</sup>이 고안되었다. 그러나 기존의 방법은 정제 과정에서 domoic acid의 회수율이 낮아지고 유도체화 과정이 불안정하다는 단점이 있었다.

본 연구에서는 domoic acid를 극성 용매로 추출한 후 유도체화 시키지 않는 Wekell 등<sup>5)</sup>의 분석 방법을 적용하였다. 본 실험은 국내 조개의 domoic acid 함량이 외국의 규제치를 초과하는지에 초점을 맞추었다. 따라서 외국의 법적 규제치(20  $\mu\text{g}$  domoic acid/g shellfish tissue)를 기준으로 조개 시료에 표준 물질인 domoic acid 80  $\mu\text{g}$ 을 첨가하고(20  $\mu\text{g}$  domoic acid/g shellfish) 추출한 후, HPLC를 이용하여 domoic acid를 분리하고, 표준물질과 같은 시간대에 나타난 피크를 Falk 등<sup>14)</sup>이 보고한 UV 스펙트럼과 비교하여 확인하였다. 본 실험 방법의 검출 한계는 50 ng/g으로서 뜨거운 염산을 이용하는 AOAC 마비성 패류독소 추출법의 검출한계(50  $\mu\text{g}/\text{g}$ )<sup>9)</sup>보다는 높고, BITC(5~10  $\mu\text{g}/\text{g}$ )<sup>12)</sup>나 FMOC(15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )<sup>13)</sup>로 유도체화 시키는 방법보다는 낮았다. 검출한계가 유도체화 시키는 방법보다는 낮았지만 미국과 캐나다에서 제

시한 규제치 농도보다 낮았기 때문에 규제치를 벗어나는지에 대한 여부를 평가하는데 적절하다고 사료되었다. 회수율은 95.80%( $\pm 1.09$ )이었으며, 표준물질과 시료의 크로마토그램을 Fig. 1에 제시하였다.

68개의 모든 시료에서 domoic acid가 검출되지 않았으며, 이러한 결과는 국립수산진흥원<sup>15)</sup>의 남해안 10개소에 대한 1993년의 결과와 일치하였다. 그러나 1994년 진해 일부지역의 진주담치(blue mussels)에서 domoic acid가 미량이지만(2.1~5.2  $\mu\text{g}/\text{g}$ ) 검출되었다는 보고와 차이가 있었다. 또한 1998년 6월부터 12월말까지 남해안 18개 지점의 패류를 조사한 결과 일부 지역의 굴과 진주담치에서 domoic acid가 검출되었다고 하였다. 수집된 지역과 시기에 따라 domoic acid 농도가 차이를 보였다. Prince Edward 섬에서 홍합의 domoic acid 농도가 40~50일에 거의 무시할만한 농도로 감소하고<sup>15)</sup>, 조개가 더 이상 domoic acid에 노출되지 않으면 domoic acid가 점차적으로 수용성 형태로 전환되거나 배설물과 함께 조직으로부터 방출된다고 보고되었다<sup>16)</sup>. 이와 같이 domoic acid는 환경에 따라 증감을 하므로 단기간의 한정된 결과로 한국인에 대한 위해를 무시할 수 있다고 단정 지을 수 없다. 앞으로 우리나라에서도 기억 상실을 나타내는 식중독 사건에 대한 기록이 체계화되어야 하고, domoic acid를 생성하는 것으로 알려진 *Nitzschia* spp.의 증식 특성과 발생에 영향을 주는 환경 조건에 대한 연구가 필요하다. 그리고 조개류내 domoic acid에 대한 모니터링이 지속되어야만 기억 상실성 패류 독에 의한 식중독을 미연에 방지할 수 있다고 사료된다.

## 요 약

Domoic acid는 기억 상실성 패류독으로 알려진 신경독소로서 위장관에서 흡수되어 중추신경계에 손상을 주어 기억 상실을 야기한다고 알려져 있다. 미국 FDA와 캐나다 보건 후생성은 가식부 g당 20  $\mu\text{g}$ 으로 조개류의 domoic acid 함량을 법적으로 규제하고 있다. 돌말류인 *Nitzschia pungens* f. *multiseriis*에 의하여 생성된 domoic acid는 조개에 섭취되면서 축적이 일어난다. *Nitzschia pungens* f. *multiseriis*는 우리나라 남부 해안에 5월경 발생하는 식물성 플랑크톤이다. 조개의 섭취량이 높은 한국인의 domoic acid에 대한 노출 정도를 평가하기 위하여 복족류인 뽕굴 고동과 이매패류인 굴, 바지락, 백합, 가무락, 동죽, 피조개, 홍합, 피조개, 가리막조개, 비단조개, 고막을 1999년 5월, 6월, 7월, 8월, 10월, 12월에 수집하였다. Domoic acid의 미국 및 캐나다의 법적 규제치인 20  $\mu\text{g}/\text{g}$ 에 상응하는 농도를 기준으로 조개 시료에 80  $\mu\text{g}$ 을 첨가하고 추출한 결과 회수율은 95.80%( $\pm 1.09$ )이었으며 검출 한계는 50 ng/g이었다. 수집된 68개 모든 시료에서 검출되지는 않았지만 한국인이 전혀 노출되지 않았다고 단정 지을 수는 없다. 앞으로 우리나라에서도 기억 상실을 나타내는 식중독 사건에 대한 연구가 지속되어야 기억 상실성 패류 독소에 의한 식중독을 미연에 방지할 수 있다고 사료된다.

## 감사의 글

본 논문은 2002학년도 서울대학교 생활과학연구소의 일부

연구비 지원으로 수행되었음에 이에 감사하는 바입니다.

## 문 헌

1. Park, J.S. Eco-toxicological studies of toxic marine phytoplankton in Korean coastal waters. National Fisheries Research and Development Institute (1994)
2. Todd, E.C.D. Domoic acid and amnesic shellfish poisoning-a review. *J. Food Prod.* 50: 69-83 (1993)
3. Korea Rural Economic Institute. Table on Demand Supply of Food. Seoul, Korea (1998)
4. Korean Food & Drug Administration. Occurrence of Food Poisoning and Prevention. Seoul, Korea (2002)
5. Wekell, J.C., Gauglitz, E.J., Barnett, Jr. H.J., Hatfield, C.L., Simons, D. and Ayres, D. Occurrence of domoic acid in Washington State Razor clams (*Siliqua patula*) during 1991-1993. *Natural Toxins* 2: 197-205 (1994)
6. Wright, J.L.C., Boyd, R.K., De Freitas, A.S.W., Falk, M., Foxall, R.A., Jamieson, W.D., Laycock, M.V., McCulloch, A.W., McInnes, 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., and 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)
7. Lee, J.H. and Baik, J.H. Neurotoxin-producing *Pseudonitzschia multiseries* (Hasle) Hasle, in the coastal waters of southern Korea II. Production of domoic acid. *Algae* 12: 31-38 (1997)
8. Lee J.H. Neurotoxic-producing diatom, *Pseudonitzschia pungens* Grunow f. multiseries Hasle, off the coastal waters of southern Korea. I. *Morphological* features. *Korean J. Phycol.* 9: 125-134 (1994)
9. Lawrance, J.F., Charbonneau, C.F., Page, B.D. and Lacroix, G.M.A. Confirmation of domoic acid in molluscan shellfish by chemical derivatization and reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 462: 419-425 (1989)
10. Falk, M., Seto, P.F. and Walter, J.A. Solubility of domoic acid in water and in non-aqueous solvents. *Can. J. Chem.* 69: 1740-1744 (1991)
11. Quilliam, M.A., Sim, P.G., McCulloch, A.W. and 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)
12. Lawrence, J.F. and Menard, C. Confirmation of domoic acid in shellfish using butyl isothiocyanate and reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 550: 595-601 (1991)
13. Pocklington, R., Melley, J.E., Batest, S.S., Bird, C.J., De Freitas, D.E. and Quilliam, M.A. Trace determination of domoic acid in seawater and phytoplankton by high-performance liquid chromatography of the fluorenylmethoxycarbonyl (FMOC) derivative. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 38: 351-368 (1990)
14. Falk, M., Walter, J.A. and Wiseman, P.W. Ultraviolet spectrum of domoic acid. *Can. J. Chem.* 67: 1421-1425 (1989)
15. Grimmelt, B., Nijjar, M.S., Brown, J., MacNair, N., Wagner, S., Johnson, G.R. and Ahmend, J.F. Relationship between domoic acid levels in the blue mussel (*Mytilus edulis*) and toxicity in mice. *Toxicon*. 28: 501-508 (1990)
16. Novacek, I., Madhyasthe, M.S., Ablett, R.F., Johnson, G., Mijjar, M.S. and Sims, D.E. Uptake, disposition and depuration of domoic acid by blue mussels (*Mytilus edulis*). *Aquat. Toxicol.* 21: 103-118 (1991)

(2002년 8월 16일 접수; 2002년 11월 27일 채택)