

LC-MS/MS를 이용한 설사성 패류독소 함량 조사

김수언* · 육동현 · 박영애 · 김진아 · 박애숙 · 김연천
서울시보건환경연구원 수산물검사팀

Analysis of Diarrhetic Shellfish Poisoning Toxins by Liquid Chromatography-electrospray Ionization Mass Spectrometry

Su Un Kim*, Dong Hyun Yuk, Young Ae Park, Jin Ah Kim, Ae Sook Park, and Yun Chun Kim

Seoul Metropolitan Government Research Institute of Health and Environment, Fisheries Products Inspection Team

Abstract Diarrhetic shellfish poisoning toxins were investigated by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry (LC-MS/MS). Okadaic acid (OA), Dinophysistoxin-1 (DTX1), Pectenotoxin2, (PTX2) and Yessotoxin (YTX) in bivalves were quantified. OA were found in four samples; mussel *Mytilus edulis* (0.001 µg/g), Oyster *Crassostrea gigas* (0.004 and 0.001 µg/g) and manila clam *Ruditapes philippinarum* (0.001 µg/g). DTX1, PTX2, and YTX were not detected from all of the samples examined.

Keywords: diarrhetic shellfish poisoning, okadaic acid, dinophysistoxin-1

서 론

패류는 서식 생태 특성상 정착성으로 주변 환경으로부터의 오염을 피할 수 없을 뿐 아니라, 대부분의 패류 서식 환경이 폐쇄 내만에 집중되어 있기 때문에 다른 이동성의 수산 생물에 비해 오염에 상대적으로 많이 노출되어 있다.

패류에서 공중 위생상 문제가 되고 있는 자연독은 치사율이 높은 신경성 급성독인 마비성패독(paralytic shellfish poison, PSP)과 지용성의 설사성 패독(diarrhetic shellfish poison, DSP), 기억상실성 패독(amic shellfish poison, ASP)이 있으며, 그 외 신경성 패독(neurotoxic shellfish poison, NSP) 등이 알려져 있다(1). 최근 아일랜드의 진주담치에서 새로이 설사성 패독과 유사한 지용성의 독소가 발견되어 azaspiracid shellfish poison(AZP)로 명명되었다(2). 이 중 우리나라 뿐 아니라 전 세계적으로 가장 문제시 되고 있는 것이 마비성 패독으로, 우리나라에서는 매년 봄철 수온이 8~15°C일 때 발생하며 매년 정기적으로 모니터링을 실시하고 있다. 이처럼 자연계에서 패류가 독소들에 의해 유독화하는 현상은 연안 오염의 증가와 더불어 계절과 해역에 관계없이 유독 플랑크톤에 의한 적조가 빈번히 발생하면서 더욱 심각해져가고 있다.

설사성 패독은 유독 성분의 기본적인 골격의 화학구조 특성에 따라 okadaic acid(OA) group, pectenotoxin(PTX) group, yessotoxin (YTX) group 등으로 구분된다(3,4). 이러한 독소 중 OA, DTXs 등 OA group 독소가 설사를 주로 유발하는 것으로 확인되어 있

으며 이 독소는 발암 promotor로도 알려져 있다(5,6). PTX group 및 YTX group 독소는 설사성 패독으로 분류되어 있으나 설사를 유발하지 않는 것으로 보고되어 있다(5). 유럽연합에서는 DSP 중 OA 및 DTX 함량이 0.16 ppm, YTX는 0.1 ppm, azaspiracid(AZA)는 0.16 ppm으로 기준이 설정되어 있으며 캐나다의 경우 DSP 중 OA 및 DTX의 합계로 0.2 ppm, PTX도 0.2 ppm으로 기준이 설정되어 있다. 최근 CODEX나 WHO 산하의 연구기관들에서도 OA group 독소에 대해서 기준설정을 추진하고 있다(7).

우리나라에서는 패류 및 그 가공품에 대해 마비성 패독만 규격이 설정되어 있고 설사성 패독 등 그 이외의 패독에 대해서는 기준이 없었으나 2009년 처음으로 이때패류에 대해 설사성 패독의 기준 규격이 설정되었다. 설사성 패독의 시험법으로는 acetone 등의 용매로 추출한 독소를 마우스 복강에 투여하는 시험법이 일반적이었으나(8), 최근에는 LC-MS/MS를 이용한 분석법이 개발되고 있다(9,10). 본 연구에서는 서울에서 유통 중인 패류에서의 설사성 패독을 LC-MS/MS(10)로 분석하여 안전관리를 위한 기초 자료로 제공하고자 한다.

재료 및 방법

시약 및 표준독소

시험에 사용된 acetonitrile과 methanol 등 용매는 Merck(Darmstadt, Germany) HPLC grade, formic acid(Fluka, Buchs, Germany), ammonium formate(Sigma, St. Louis, MO, USA), acetic acid (Sigma)는 mass spectrometry grade를 각각 사용하였다. 증류수는 ELGA(18.2 Mohm·cm, Bucks, UK)로 초순수로 제조된 물을 사용하였다.

독소표준품 OA, PTX2, YTX와 certified reference material (CRM-DSP-MUS-b) 등은 Canada의 National Research Council (Halifax, Canada)의 것을, DTX1은 Wako(Osaka, Japan)것을 사용하였다.

*Corresponding author: Su Un Kim, Seoul Metropolitan Government Research Institute of Health and Environment, Seoul 138-701, Korea
Tel: 82-2-570-3233
Fax: 82-2-570-3243
E-mail: suun111@seoul.go.kr
Received March 2, 2012; revised April 24, 2012;
accepted May 2, 2012

Table 1. LC-MS/MS conditions for analysis

LC separation	
Solvent A	H ₂ O+2 mM CHOONH ₄ +50 mM CHOOH
Solvent B	95% Aqueous MeCN+2 mM CHOONH ₄ +50 mM CHOOH
Flow rate (mL/min)	0.4
Injection volume (μL)	10
Gradient elution (min)	solvent B (%)
0	30
3	90
4.5	90
4.6	30
6.6	0
MS/MS	
Ionization mode	ES+/ES capillary
Voltage	+/- 2.5 kV
Acquisition	MRM mode
Source temperature	120°C
Desolvation gas	850 L/h N ₂ at 350°C
Cone gas	50 L/h N ₂

Table 2. MS/MS parameters for detection of diarrhetic shellfish poisoning toxins

Toxins	Parent ions (m/z)	Fragment ions (m/z)	Mode
OA	803.45	255.1/113.0	ES-*
DTX1	817.45	255.1/113.0	ES-
PTX2	857.45	137.0	ES-
YTX	1141.5	1061.5/855.45	ES-

OA, okadaic acid; DTX1, dinophysistoxin-1; PTX2, pectenotoxin-2; YTX, yessotoxin

*Electrospray negative ion

분석기기 및 조건

Ultra performance liquid chromatography(UPLC)가 부착된 mass spectrometer는 Waters Xevo TQ(Milford, massachusetts, USA)제품을, 분석용 column은 acquity UPLC BEH C18(1.7 μm, 2.1×100 mm; Milford, massachusetts, USA)를 사용하였다. UPLC와 LC-MS/MS의 분석조건은 Table 1과 같으며 시료검출은 multiple reaction monitoring(MRM)법으로 하였으며, 각 성분 분석을 위한 기기의 parameter는 Table 2와 같다.

표준용액의 조제 및 회수율 측정

OA, DTX1, PTX2, YTX 표준품의 농도가 1-100 ng/mL이 되도록 조제하여 표준용액으로 하였다. 분석기기의 검출한계(LOD; limit of detection)는 신호대 잡음비(S/N)가 >3으로 하였으며, 정량한계(LOQ; limit of quantification)는 LOD×3일때의 농도로 구하였다.

진주담치를 기질로 하는 표준인증물질(CRM-DSP-MUS-b)에는 OA와 DTX1만 함유되어 있어 시료와 동일하게 처리하여 각각의 회수율을 구하였으며, 굴에 허용기준의 0.5배 농도로 4개 독소 표준용액을 첨가하여 시험방법의 회수율을 검증하였다. 모든 실험은 3회 반복하여 평균값과 표준편차를 구하였다.

시료의 전처리

패류는 서늘 시중에 유통 중인 것을 구입하여 실험에 사용하였다. 탈각한 패육을 균질화한 후 1g을 칭량하고, 9배량의 90%

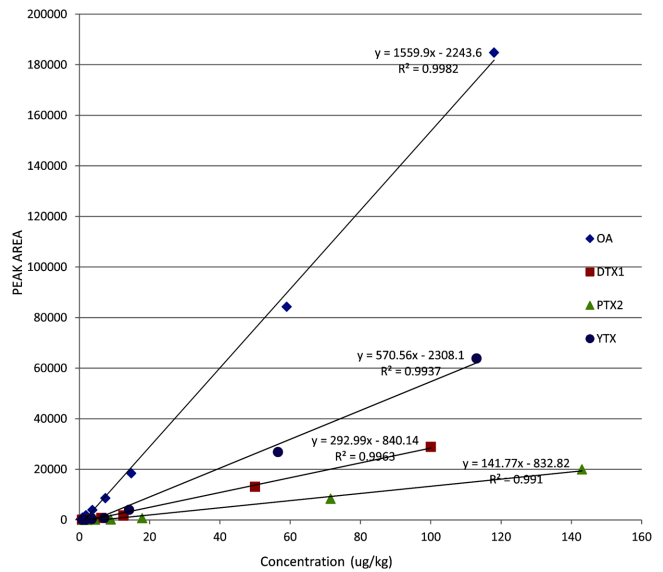


Fig 1. Calibration curves of 4 diarrhetic shellfish poisoning toxins

Table 3. LOD and LOQ for detection of OA, DTX1, PTX2, YTX

Toxins	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	R ²
OA	0.003	0.01	0.9982
DTX1	0.03	0.1	0.9963
PTX2	0.2	0.7	0.9909
YTX	0.1	0.2	0.9936

OA, okadaic acid; DTX1, dinophysistoxin-1; PTX2, pectenotoxin-2; YTX, yessotoxin

methanol을 가하여 재균질화 한 후 2,500×g에서 5분간 원심분리한 상정액을 0.45 μm nylon syringe filter(Whatman, Brentford, UK)로 여과하여 사용하였다.

결과 및 고찰

직선성, 검출한계 및 정량한계

OA, DTX1, PTX2, YTX 등 4종에 대한 표준검량선은 Fig. 1과 같다. OA의 각 농도(0.46, 0.922, 1.844, 3.688, 7.375, 14.75, 59.0, 118 ppb), DTX1의 각 농도(0.781, 1.563, 3.125, 6.250, 12.5, 50, 100 ppb), PTX2의 각 농도(1.117, 2.234, 4.469, 8.938, 17.875, 71.5, 143 ppb), YTX의 각 농도(0.883, 1.766, 3.531, 7.062, 14.125, 56.5, 113 ppb)를 측정 후 1차 회귀식으로부터 얻은 R²값은 각각 0.9982, 0.9963, 0.9909, 0.9936로 양호한 직선성을 나타내었으며, 검출한계는 0.003-0.2 ppb, 정량한계는 0.01-0.7 ppb였다(Table 3).

회수율 검증

표준인증물질의 OA와 DTX1의 회수율은 Table 4와 같이 93.1%(RSD 4.9%)와 77.7%(7.8%)로 양호하게 나타났으며 굴에 표준용액을 첨가하여 구한 회수율은 Table 5와 같다. 독소별 회수율은 OA 97.1%, DTX1 107%, PTX2 86.7%, YTX 98.9%였다.

OA의 회수율은 표준물질과 표준용액을 첨가하였을 경우가 93.1과 97.1로 서로 비슷하지만 DTX1은 표준용액을 첨가했을 경우에는 107.0으로 높고 표준인증물질의 경우 77.7%로 낮아 이는 기질의 차이에서 기인된 것으로 생각된다.

Table 4. Measurement of certified reference material (CRM)

Analyte	Unit	Certified		Measured		% Recovery	% RSD
		Mean	SD	Mean	SD		
OA	mg/kg	10.1	0.8	9.4	1.458	93.1	4.9
DTX1	mg/kg	1.3	0.2	1.01	0.079	77.7	7.8

OA, okadaic acid; DTX1, dinophysistoxin-1

Table 5. Recovery (%) of toxins spiked into bivalve samples

Toxins	Concentration (ng/g)	Recovery (%)
		Oysters
OA	59	97.1
DTX1	50	107.0
PTX2	71.5	86.7
YTX	56.5	98.9

OA, okadaic acid; DTX1, dinophysistoxin-1; PTX2, pectenotoxin-2; YTX, yessotoxin

Table 6. LC-MS/MS analysis results of the shellfish samples

Species (n)	Number of sample toxin detected	Toxin contents (µg/g, whole meat)			
		OA	DTX1	PTX2	YTX
Oyster (28)	2	0.004	ND ¹⁾	ND	ND
		0.001	ND	ND	ND
Mussel (40)	1	0.001	ND	ND	ND
bloody clam (17)	0	ND	ND	ND	ND
manila clam (15)	1	0.001	ND	ND	ND
razor clam (1)	0	ND	ND	ND	ND
short-necked clam (14)	0	ND	ND	ND	ND
clam (2)	0	ND	ND	ND	ND
ark shell clam (7)	0	ND	ND	ND	ND

¹⁾ND, not detected

OA, okadaic acid; DTX1, dinophysistoxin-1; PTX2, pectenotoxin-2; YTX, yessotoxin

설사성 패독 함량

2011년 3월부터 6월까지 서울시내에 유통 중인 패류 114건에서 설사성 패독을 측정된 결과는 Table 6과 같다. 설사성 패독이 검출된 것은 4건으로 3.5%의 검출률을 보였으며 모두 기준 이하였다. 굴 2건(0.004, 0.001 µg/g), 진주담치 1건(0.001 µg/g), 바지락 1건(0.001 µg/g)에서 모두 OA(Okadaic acid)가 검출되어 우리나라 연안에서는 주로 OA와 DTX1이 검출된다는 Kim 등(9)의 결과와 비슷하였다. 다만, 본 연구에서는 Kim 등(9), Lee 등(10)과 달리 OA 만이 검출되었고 굴과 진주담치 뿐만 아니라 바지락에서도 설사성 패독이 검출되었다. 이는 다양한 검체와 많은 시료건수에 기인된 것으로 생각된다.

4건의 검출은 식품공전상의 방법대로 하나씩의 parent ion과 fragment ion만으로 일치하는지 확인하여 검출한 것으로, 두 개의 fragment ion를 비교하였을 때, 일치하는 것은 하나도 없어 논의가 필요할 것으로 보인다. 한편, Kim 등(9)에서처럼 간, 체장만을 대상으로 실험을 한 경우에는 다양한 종에서 OA와 DTXs 들이 검출되는 것을 볼 때 향후 내장만을 따로 실험하는 것이 필요할 것으로 보이며, 특히 가리비나 키조개처럼 내장이 패육보다 훨씬

많은 패류의 설사성 패독의 모니터링이 필요할 것으로 생각된다. 이때패류 특성상 전체 패육 대비 내장의 비율이 적고 본 실험에서는 내장을 포함한 전체 패육을 대상으로 한 결과라서 Kim 등(9)과 달리 적은 농도로 검출된 것으로 보인다. 한편, 동일 시료를 마우스시험법으로 마비성 패독을 실험한 결과 설사성 패독과의 유의성은 보이지 않았다.

요 약

LC/MS/MS로 패류 114건에서 설사성패독인 OA, DTX1, PTX2, YTX를 정량한 결과 110건(96.5%)에서는 설사성패독이 불검출이었으며, 굴 2건(0.004, 0.001 µg/g), 진주담치 1건(0.001 µg/g), 바지락 1건(0.001 µg/g)에서 OA(Okadaic acid)가 검출되어 3.5%의 검출률을 나타내었으며 동일 시료를 마우스시험법으로 마비성 패독을 실험한 결과 설사성 패독과의 유의성은 보이지 않았다.

문 헌

1. Tamao N. Shellfish toxins. Hygienic Chem. 29: 10-25 (1983)
2. Ofuji K, Satake M, McMahan T, James KJ, Naoko H, Oshima Y, Yasumoto T. Structures of azaspiracid-4 and azaspiracid-5, causative toxins of azaspiracid poisoning in Europe. Biosci. Biotech. Bioch. 65: 740-742 (2001)
3. Yasumoto T, Murata M, Oshima Y, Sano M, Matsumoto GK, Clardy J. Diarrhetic shellfish toxins. Tereahedron 41: 1019-1025 (1985)
4. Yasumoto T, Murata M. Marine toxins. Chem. Rev. 93: 1897-1909 (1993)
5. Blanco J, Morono A, Fernandez ML. Toxic episodes in shellfish, produced by lipophilic phycotoxins: An overview. Galician J. Mar. Resources 1: 1-70 (2005)
6. Fujiki H, Suganuma M, Suguri H, Yoshizawa S, Takagi K, Uda N, Wakamatsu K, Yamada K, Murata M, Yasumoto T, Sugimura T. Diarrhetic shellfish toxin, dinophysistoxin-1, is a potent tumor promoter on mouse skin. Jpn. J. Cancer Res. 79: 1089-1093 (1988)
7. Food and Agriculture Organization of the United Nation (FAO), Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO (IOC), World Health Organization (WHO): Report of the Joint FAO/IOC/WHO ad hoc Expert Consultation on Biotoxins in Bivalve Molluscs. Oslo, Norway. pp. 13-27 (2004)
8. Lee JS, Shin IS. Establishment of Analytical Method and Monitoring for Shellfish Poisons. The KFDA Report of Research, Seoul, Korea. pp. 25-28 (2006)
9. Kim JH, Suzuki T, Lee KJ, Kim PH, Kamiyama T, Lee TS. The first detection of okadaic acid and its derivatives in Korean bivalves by liquid chromatography-mass spectrometry. Fish. Sci. 74: 433-438 (2008)
10. Lee KJ, Suzuki T, Kim PH, Oh EG, Song KC, Kim JH. Establishment of a method for the analysis of diarrhetic shellfish poisoning by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Korean J. Food Sci. Technol. 41: 458-463 (2009)