

## 굴과 진주담치 중 마비성 패류독소 분석을 위한 HPLC post-column oxidation method의 시험소 내 유효성 검증

송기철\* · 이가정<sup>1</sup> · 유홍식<sup>1</sup> · 목종수<sup>2</sup> · 김지희 · 임근식<sup>1</sup> · 이미애<sup>1</sup> · 김미혜<sup>3</sup>

서해수산연구소 해역산업과, <sup>1</sup>국립수산물안전센터 식품안전과, <sup>2</sup>남동해수산연구소, <sup>3</sup>식품의약품안전청 오염물질과

### Intra-laboratory Validation of an HPLC Post-column Oxidation Method for the Analysis of PSP Toxins in Oysters and Mussels

Ki Cheol Song\*, Ka-Jeong Lee<sup>1</sup>, Hong-Sik Yu<sup>1</sup>, Jong-Soo Mok<sup>2</sup>, Ji Hoe Kim<sup>1</sup>,  
Keun-Sik Lim<sup>1</sup>, Mi-Ae Lee<sup>1</sup>, and Mee-Hye Kim<sup>3</sup>

West Sea Fisheries Institute, NFRDI

<sup>1</sup>Food Safety Division, NFRDI

<sup>2</sup>Southeast Sea Fisheries Institute, NFRDI

<sup>3</sup>Food Contaminations Division, KFDA

**Abstract** AOAC Mouse Bioassay Analysis (MBA) has been the gold standard for the analysis of paralytic shellfish poisoning toxin (PSP toxin) for more than 50 years. However, this method has inaccurate limit of quantification and cannot be used to determine toxic profiles. An HPLC method (PCOX) was optimized for Korean shellfish to establish an alternative or supplementary method for PSP analysis and was intended to be used for the official monitoring and regulation of food. The recovery rate of the PCOX method was 83.5-112.1% and the limit of quantification for total toxin was about 8.6 µg/100 g. A long-term comparison study showed a good correlation of the PCOX results with the AOAC MBA results: the correlation factors were 0.9534 and 0.9109 for oyster and mussel matrices, respectively. The PCOX method may be used as an alternative or supplementary method for AOAC MBA to monitor the occurrence of PSP and to analyze PSP toxin profile in oysters and mussels.

**Keywords:** paralytic shellfish poisoning toxin, mouse bioassay analysis, post-column oxidation, HPLC

## 서 론

마비성 패류독소는 해수와 담수 환경에서 발생한 특정 플랑크톤에 의해 자연적으로 생산되는 것으로 saxitoxin (STX)과 구조적으로 연관성이 있는 20여개의 독소물질로 구성되어 있다. 이 마비성 패류독소는 여과섭식 특성을 가진 이매패류에 축적되며 인간이 오염된 패류를 섭취하는 경우 심각한 중독증상이 유발되며 사망에 이르기에도 한다(1).

이 마비성 패류독소의 분석에는 AOAC 959.08 official method (OM)에 근거한 mouse bioassay(이하 동물시험법)가 표준법으로 세계적으로 사용되고 있다. 이 방법은 패류 균질액에서 묶은 염산을 이용하여 독소를 추출하고 추출액을 마우스의 복강에 주사하여 사망에 이르는 시간을 측정하여 그 농도를 추정하는 것으로 검출한계는 40 mg STX eq/kg으로 알려져 있다(2). 이와 같은 높은 검출한계에도 불구하고 시료 중 총 독소량 분석에 대한 신

뢰성이 인정되어 지난 50여 년간 지속적으로 이용되어 오고 있다. 그러나 세계적으로 동물윤리가 대두되면서 시험동물의 사용을 억제하거나 금지하고자 하는 여론이 확산되고 있으며, 위해분석을 통한 체계적 위해관리에 필요한 독성 프로파일 정보를 얻을 수 없는 동물시험법의 결점이 부각되고 있다. 그래서 동물시험법의 사용범위 축소나 배제를 위한 대체법 개발의 필요성이 꾸준히 제기되고 있다(3).

그동안 biological assay (4-7), electrophoresis (8), chemosensors (9)와 immunoassays (10,11)를 포함한 다양한 대체 분석법이 개발되었으나, 액체크로마토그래피(HPLC)를 응용한 방법이 가장 신뢰성이 높은 것으로 여겨지고 있다(1,12-14). 또한 HPLC 기반 분석법에 필요한 독소성분 표준품이 상업적으로 시판되거나 제공되기 시작하면서 그 활용도가 높아지고 있다(15). 특히 Lawrence 등(16)이 제안한 HPLC pre-column oxidation method는 AOAC에 의해 MBA 대체법으로 공인된 바 있다(2). 그러나 이 방법은 분석시간이 길고 독소 이성체의 분별이 불가능한 단점을 가지고 있어(17) 이러한 단점을 보완하고자 HPLC post-column oxidation method를 개발(1,14) 하였으며, 개선을 위한 관련 연구가 진행되고 있다(15).

이 연구에서는 HPLC post-column oxidation method(이하, PCOX 법) 관련 선행연구를 검토하여 우리나라 마비성 패류독소 발생특성을 반영한 분석조건을 수립하였으며, 시험소 내 유효성 검증을 실시하여 모니터링을 목적으로 한 분석환경에서 활용 가

\*Corresponding author: Ki Cheol Song, West Sea Fisheries Research Institute, National Fisheries Research & Development Institute, Incheon 400-420, Korea  
Tel: 82-32-745-0750  
Fax: 82-32-745-0619  
E-mail: kcsong76@korea.kr  
Received September 14, 2012; revised March 15, 2013;  
accepted March 19, 2013

능성을 평가하였다.

## 재료 및 방법

### 시약 및 이동상 조제

분석에 사용된 deionized water (DW)는 18  $\Omega$  resistance 또는 동등 순도를 가진 것을 사용하였으며, 모든 용매와 시약은 HPLC 급을 사용하였다. 또한, 조제된 이동상과 post-column 시약은 0.45  $\mu$ m membrane filter (Millipore, Bedford, MA, USA)로 여과하여 사용하였다.

표준독소의 희석에 사용하는 DW는 10% acetic acid (Sigma, St. Louis, MO, USA)로 pH를 5.00으로 조정하였고, 독소의 유도 체화를 위한 post-column oxidant는 100 mM phosphoric acid (Sigma) 및 5 mM periodic acid (Sigma)의 혼합용액으로 pH는 5 M sodium hydroxide (Sigma)를 사용하여 7.8로 조정하여 사용하였다.

물질의 분리를 위한 이동상은 GTXs/STXs 그룹을 분석하기 위한 이동상과 C toxins 을 분리하기 위한 이동상을 따로 조제하였다. GTXs/STXs 그룹을 위한 이동상에서 용액 A는 11 mM heptane sulphonate (Fluka, Buchs, Germany) 및 5.5 mM phosphoric acid 수용액, 용액 B는 11 mM heptane sulphonate 및 16.5 mM 11.5% phosphoric acid가 함유된 acetonitrile (Merck, Darmstadt, Germany) 용액을 사용하였다. 이동상의 pH는 Ammonium hydroxide (Sigma)를 사용하여 7.1로 조정하였다.

C toxins을 위한 이동상은 용액 C는 2 mM tetrabutyl ammonium phosphate (Sigma) 및 용액 D는 2 mM tetrabutyl ammonium dihydrogen phosphate (Sigma)를 함유한 4% acetonitrile 용액을 조제하였으며, pH는 10% (v/v) acetic acid 또는 1% ammonium hydroxide을 사용하여 5.8로 조정하였다.

### 표준독소

분석에 사용된 표준독소(CRM; certified reference material)는 C1 (N-sulfocarbamoylgonyautoxin-C1), C2 (N-sulfocarbamoylgonyautoxin-C2), dcGTX2 (decarbomoylgonyautoxin-2), dcGTX3 (decarbomoylgonyautoxin-3), dcSTX (decarbomoyl saxitoxin), GTX1 (gonyautoxin-1), GTX2 (gonyautoxin-2), GTX3 (gonyautoxin-3), GTX4 (gonyautoxin-4), GTX5 (gonyautoxin-5), NEO (neosaxitoxin) 및 STX를 National Research Council Institute for Marine Biosciences (Halifax, NS, Canada)에서 구입하여 사용하였다(Table 1).

Stock solutions 조제를 위하여 GTXs/STXs 그룹 독소는 0.003 M HCl로, C toxins은 DIW (pH 5.0)를 사용하여 희석한 후 농도를 계산하였다(Table 1). 그리고 나서 Working solutions 혼합액은 첫 번째 그룹은 C1 및 C2로 구성하였고, 두 번째 그룹은

**Table 1. Concentrations of reference, stock and working standard solutions**

Toxin	CRM ( $\mu$ M)	Stock standard solution ( $\mu$ M)	Working standard solution ( $\mu$ M)
GTX4	19.7	4.9	1.00
GTX1	60.4	15.1	3.13
dcGTX3	26.1	6.5	1.13
dcGTX2	116.0	29.0	5.10
GTX5	65.0	16.3	3.13
GTX3	43.4	18.5	2.13
GTX2	114.2	28.5	5.63
NEO	65.6	16.4	2.50
dcSTX	62.0	15.5	2.50
STX	65.0	16.2	3.00
C1	114.0	28.5	6.75
C2	35.0	8.7	2.00

dcGTX2, dcGTX3, dcSTX, GTX1, GTX2, GTX3, GTX4, GTX5, NEO 및 STX로 구성하여 두 그룹으로 구분하였다. 독소성분 별 stock solution에 GTXs/STXs 그룹에는 0.003 M HCl를 가하고, C toxin에는 DIW (pH 5.0)를 가하여 5.0 mL로 정용한 후 용량 플라스크 최종무게를 측정하여 용액의 부피를 계산하고 Stock solution의 농도와 희석비율을 고려하여 최종농도를 계산하였다. 회수율 등의 실험방법의 유효성을 알아보기 위한 Matrix fortified working standards (Spiked samples)은 무독소 패류의 탈단백 처리 추출액을 희석액으로 사용하여 상기 표준용액 조제법에 따라 조제하였다.

### 패류시료의 처리

2010년 3월부터 6월까지 통영시 및 거제시 연안 해역에서 양식산 굴(*Crassostrea gigas*)과 진주담치(*Mytilus galloprovincialis*)를 직접 채취하여 시험재료로 사용하였다.

흐르는 수돗물로 패류의 외부를 완벽하게 세척하고 연체부가 손상되지 않도록 패각근을 잘라 패각을 열고 내부를 수돗물로 헹구어 모래와 기타 이물질을 제거하였다. 탈각된 12-15 패류 개체를 No. 10 sieve에 담아 5분간 물을 빼고 패각 부스러기와 이물질이 있으면 제거한 후 균질화 하였다.

동물시험법을 위한 독소추출은 균질액 100 g을 대상으로 AOAC official Method 959.08(2)에 따라 실시하였다. HPLC 분석을 위해 추출액 500  $\mu$ L에 25  $\mu$ L 30%(w/v) TCA를 가하고 혼합한 후 원심분리(16,000 $\times$ g, 5분)하여 단백질을 제거하고, 30  $\mu$ L 1 M NaOH를 가하고 vortex mixer로 혼합하여 TCA를 중화한 후 다시 원심분리(16,000 $\times$ g, 5분) 하였다. 그리고 0.2  $\mu$ m syringe filter (Milli-

**Table 2. List of column for column ruggedness evaluation of PCOX method**

No.	Column	Toxin
1	Phenomenex, 00F-4424-EO, Fusion-RP, 4.6 $\times$ 150 mm, 4 $\mu$ m	GTXs & STXs
2	Agilent, 863668-901, ZorbaxBonus-RP, 4.6 $\times$ 150 mm, 3.5 $\mu$ m	GTXs & STXs
3	Waters, Symmetryshield, RPC18, 4.6 $\times$ 150 mm, 5 $\mu$ m	GTXs & STXs
4	Phenomenex, 00F-4053-E0, Jupiter300, 4.6 $\times$ 150 mm, 5 $\mu$ m	GTXs & STXs
5	Thermo, 71405-254630, Betabasic8, 4.6 $\times$ 250 mm, 5 $\mu$ m	C toxins
6	Phenomenex, 00G-4307-E0, Phenosphere-NEXT, 4.6 $\times$ 250 mm, 5 $\mu$ m	C toxins
7	Phenomenex, 00G-4249-E0, LunaC8 (2), 4.6 $\times$ 250 mm, 5 $\mu$ m	C toxins

**Table 3. Step gradient conditions for post-column reaction and GTXs/STXs and C toxins analysis**

Toxin	Time (min)	Solvent (%)	Flow rate (mL/min)		
			LC	Oxidant	Acid
GTXs/STXs	0	0	0.8	0.4	0.4
	7.9	0	0.8	0.4	0.4
	8	100	0.8	0.4	0.4
	18.5	100	0.8	0.4	0.4
	18.6	0	0.8	0.4	0.4
	24	0	0.8	0.4	0.4
C toxins	0	0	0.8	0.4	0.4
	8	0	0.8	0.4	0.4
	15	100	0.8	0.4	0.4
	16	100	0.8	0.4	0.4
	19	0	0.8	0.4	0.4
	24	0	0.8	0.4	0.4

**Table 4. Relative toxicity of paralytic shellfish toxins**

Toxin	ReTx	Toxin	ReTx
STX	1.0000	GTX5	0.0644
NEO	0.9243	dcSTX	0.5131
GTX1	0.9940	dcGTX2	0.1538
GTX2	0.3592	dcGTX3	0.3766
GTX3	0.6379	C1	0.0060
GTX4	0.7261	C2	0.0963

pore, Bedford, MA, USA)로 여과하여 HPLC autosampler vial에 여액을 취하였다. GTXs/STXs와 C toxins 분석을 다른 장비에서 실시하는 경우에는 여액을 분취하였다.

## 장비

분석 시스템의 구성은 아래와 같으며 ChromQuest 4.2.34 ver. 3.16 (Thermo Electron, San Jose, CA, USA)을 사용하여 분석을 실시하고 데이터를 처리하였다.

독소의 분리를 위한 HPLC와 fluorescence detector는 Finnigan Surveyor Plus와 Finnigan Surveyor FL Plus Detector (Thermo Electron, San Jose, CA, USA)를 각각 사용하였고, detector의 excitation wavelength는 330 nm, emission wavelength는 390 nm로 설정하였다. Post-column reaction system은 post-column derivatizer (Pickering Laboratories, Mountain View, CA, USA)를 사용하여 반응온도를 85°C로 유지하였다. 또한, 분석용 column은 제안 시험법의 column에 대한 둔감도 평가를 위해 시판 column 중 마비성 패류독소 분석에 적용 가능한 제품을 구매하여 Table 2와 같이 독소 성분 별로 적용하여 분석을 실시하였다.

## HPLC Post-column 분석

GTXs/STXs 그룹의 분석을 위하여 column의 오븐 온도를 40°C로 설정하고 100% 용액 A를 0.8 mL/min 유속으로 20분간 흘려 시스템을 안정화한 후 Table 3과 같은 gradient 조건으로 독소의 분리를 유도하였다. 또한, C toxins의 경우 column 오븐 온도를 15°C로 설정하고 100% 용액 C를 0.8 mL/min 유속으로 20분간 흘려 시스템을 안정화한 후 Table 3과 같은 gradient 조건으로 독소의 분리를 유도하였다.

분리된 독소의 반응을 위한 post-column reaction module은 오븐 온도 85°C에서 반응 코일(5 m×0.5 mm, I.D.)를 사용하여 Table

3과 같은 유속으로 반응을 실시하였다. 시스템 안정화 여부는 희석된 working solution을 GTXs/STXs 그룹 10 µL, C toxins 5 µL로 주입하고, gradient condition에서 성분의 분리를 확인하였다. 시료 추출물 또한 GTXs/STXs 분석에는 10 µL를 그리고 C toxins 분석에는 5 µL를 주입하고 가장 최근 실시한 표준품 분석에서 얻은 retention time과 비교하여 peak를 판별하고 구분하였다. 정량 및 독소의 계산은 single point calibration을 사용하여 peak 면적을 측정하였으며 Table 4에 제시된 독소 성분 별 saxitoxin 상대 독성을 고려하여 개별 독소성분의 기여도를 합하여 시료 중 총 독소농도를 계산하고 mg STX eq/kg으로 표시하였다.

Sample toxicity (mg STXeq/kg)

$= \sum [\mu\text{m}(372.2/1000) \times (\text{Fvol}/\text{Ext.vol}) \times (10/\text{Wt}) \times \text{ReTx}]$

$= \sum (\mu\text{m} \times \text{ReTx} \times 8.33)$

µm=추출물 중의 농도

Fvol=탈탄백 추출물 최종부피(560 µL)

Ext.vol=사용된 조 추출물 부피(500 µL)

Wt=사용된 시료무게

ReTx=분석대상 독소의 Saxitoxin 상대독성

## 동물시험법

AOAC Method 959.08(2)에 따라 1 mL HCl 추출액을 체중 17-23 g의 마우스 복강에 주사하였다. 그리고 시료 중에 존재하는 마비성 패류독소량은 Sommer Table을 이용하여 계산하였다.

## 결과 및 고찰

### 정확도

정확도(Accuracy) 평가는 IUPAC Harmonized Guidelines for Single-laboratory Validation of Analytical Methods(18)의 Section A4.3.4를 근거로 반복성(repeatability)과 재현성(Intermediate Precision) 조사를 통하여 실시하였다. Reference method와의 비교 역시 상기한 IUPAC guideline에서 권고되고 있는 사항이다. 그래서 이 시험법에서 얻어진 분석결과와 동물시험법의 비교시험을 진행하였다.

반복성과 재현성을 평가하기 위해 blank 패육(진주담치 및 굴)과 표준독소를 첨가한 평가시료를 사용하였다. 앞서 기술한 바와 같은 절차에 따라 평가시료를 대상으로 추출과 분석을 실시하였다. 3일간 5회 반복 분석을 실시하여 각 매트릭스 별로 총 15회의 측정으로 반복성을 평가하였다. 재현성 평가도 반복성 평가에 사용된 동일 평가시료를 사용하여 실시되었다. 두 명의 시험원이 각각 3일간 매트릭스와 농도 별로 5회 반복 분석을 실시하여 매트릭스와 시험원 별로 총 15회의 측정이 이루어졌다. 결과는 Table 5 및 Table 6과 같다.

반복 시험에서 나타난 상대표준편차는 모두 7% 이하로 AOAC international 기준에 부합되어 모든 매트릭스에서 모든 독소의 반복성은 상대적으로 일정한 것을 알 수 있었다.

시험소 내에서 시험원 간 재현성을 확인하기 위해 두 시험원이 동일한 평가시료에 대하여 독립적으로 분석을 실시한 결과를 취합하여 진주담치 매트릭스에서 시험 농도별로 Horwitz ratio (HorRat)를 구하였다. 그 결과는 Table 6에 나타내었다. AOAC international에서 제시하는 이상적인 HorRat는 0.3에서 1.2 범위로 모든 분석결과가 이 범위를 벗어나지 않았다.

**Table 5. Repeatability of STXs, GTXs and C-toxins**

Conc ( $\mu\text{g/g}$ )	Sample	Average concentration for 3 days (n=15, $\mu\text{g/g}\pm\%\text{RSD}$ )											
		STX	NEO	GTX1	GTX2	GTX3	GTX4	GTX5	dcSTX	dcGTX2	dcGTX3	C1	C2
0.3	Mussel	0.3 $\pm$ 1.1	0.3 $\pm$ 0.8	0.3 $\pm$ 2.5	0.6 $\pm$ 1.1	0.2 $\pm$ 0.5	0.1 $\pm$ 1.0	0.3 $\pm$ 0.9	0.2 $\pm$ 0.5	0.5 $\pm$ 2.6	0.1 $\pm$ 1.7	0.6 $\pm$ 5.0	0.2 $\pm$ 0.5
	Oyster	2.9 $\pm$ 1.2	0.3 $\pm$ 1.3	0.3 $\pm$ 2.0	0.6 $\pm$ 1.3	0.2 $\pm$ 0.7	0.1 $\pm$ 1.2	0.3 $\pm$ 0.5	0.2 $\pm$ 0.6	0.5 $\pm$ 3.0	0.1 $\pm$ 2.3	0.6 $\pm$ 5.0	0.2 $\pm$ 1.5
1.5	Mussel	1.3 $\pm$ 1.1	1.4 $\pm$ 0.8	1.6 $\pm$ 1.9	2.9 $\pm$ 0.6	1.1 $\pm$ 1.0	0.5 $\pm$ 1.6	1.5 $\pm$ 1.6	1.0 $\pm$ 0.2	2.6 $\pm$ 0.5	0.5 $\pm$ 1.6	3.3 $\pm$ 2.9	1.0 $\pm$ 0.4
	Oyster	1.2 $\pm$ 1.5	1.3 $\pm$ 0.7	1.5 $\pm$ 1.0	2.7 $\pm$ 0.5	1.0 $\pm$ 1.5	0.5 $\pm$ 2.6	1.5 $\pm$ 0.8	1.0 $\pm$ 0.5	2.5 $\pm$ 0.8	0.5 $\pm$ 1.0	3.2 $\pm$ 2.5	1.0 $\pm$ 0.5
3.0	Mussel	2.7 $\pm$ 2.0	2.5 $\pm$ 0.9	3.1 $\pm$ 2.4	5.5 $\pm$ 0.7	2.3 $\pm$ 0.7	0.9 $\pm$ 2.2	3.1 $\pm$ 0.8	2.3 $\pm$ 0.6	4.9 $\pm$ 1.2	1.0 $\pm$ 1.6	6.4 $\pm$ 1.5	2.1 $\pm$ 1.4
	Oyster	2.5 $\pm$ 1.0	2.4 $\pm$ 2.4	3.0 $\pm$ 1.5	5.4 $\pm$ 0.8	2.0 $\pm$ 1.0	0.9 $\pm$ 1.2	3.0 $\pm$ 0.9	2.2 $\pm$ 0.5	4.9 $\pm$ 3.0	1.0 $\pm$ 2.3	6.3 $\pm$ 2.5	2.0 $\pm$ 1.5

**Table 6. Intermediate Precision (within-lab productivity) (STXs, GTXs and C-toxins in mussel)**

Conc. (µg/g)	Analyst	Average concentration for 3 days (n=15, µg/g±%RSD)											
		0.3	NEO	GTX1	GTX2	GTX3	GTX4	GTX5	dcSTX	dcGTX2	dcGTX3	C1	C2
0.3	1	0.3±1.1	0.3±0.8	0.3±2.5	0.6±1.1	0.2±0.5	0.1±1.0	0.3±0.9	0.2±0.5	0.5±2.6	0.1±1.7	0.6±5.0	0.2±0.5
	2	0.3±3.0	0.3±0.4	0.3±1.3	0.6±0.7	0.2±0.6	0.1±1.7	0.3±1.3	0.2±0.6	0.5±1.5	0.1±2.0	0.7±4.0	0.2±2.6
	AVE	0.3±2.6	0.3±0.6	0.3±2.7	0.6±0.9	0.2±2.4	0.1±1.5	0.3±1.0	0.2±2.1	0.5±2.2	0.1±1.8	0.7±7.0	0.2±2.0
	HorRat	1.07	0.6	1.1	0.42	0.96	0.53	0.42	0.84	1.01	0.64	0.3	0.78
1.5	1	1.3±1.1	1.4±0.8	1.6±1.9	2.9±0.6	1.1±1.0	0.5±1.6	1.5±1.6	1.0±0.2	2.6±0.5	0.5±1.6	3.3±2.9	1.0±0.4
	2	1.4±0.7	1.4±1.1	1.5±0.2	2.9±1.0	1.1±1.4	0.4±0.1	1.5±0.4	1.1±1.1	2.5±1.6	0.5±0.4	3.5±7.0	1.2±0.3
	AVE	1.3±1.5	1.4±1.0	1.6±2.2	2.9±1.6	1.1±1.7	0.4±1.2	1.5±1.2	1.1±2.1	2.6±1.3	0.5±1.1	3.4±6.1	1.1±1.4
	HorRat	0.78	1.12	1.17	0.95	0.87	0.54	0.63	1.04	0.75	0.5	0.27	0.7
3.0	1	2.7±2.0	2.5±0.9	3.1±2.4	5.5±0.7	2.3±0.7	0.9±2.2	3.1±0.8	2.3±0.6	4.9±1.2	1.0±1.6	6.4±1.5	2.1±1.4
	2	2.7±0.6	2.5±0.2	3.1±1.1	5.5±0.4	2.2±0.2	0.9±1.3	3.1±1.0	2.2±0.8	4.9±1.1	1.0±2.1	6.4±1.2	2.0±1.6
	AVE	2.7±1.3	2.5±0.6	3.1±1.9	5.5±0.6	2.2±1.3	0.9±2.1	3.1±1.2	2.2±0.7	4.9±1.1	1.0±1.7	6.4±1.3	2.0±1.5
	HorRat	0.76	0.76	1.14	0.41	0.72	1.03	0.69	0.37	0.68	0.84	1.2	0.83

**회수율**

진주담치와 굴에서 회수율을 평가하기 위해 독소 성분별로 각각 0.1  $\mu\text{g/g}$ 의 농도가 되도록 각 매트릭스에 첨가하여 평가시료를 조제하였다. 회수율 시험은 각 매트릭스 중 3가지 농도에 대하여 5회 반복측정을 실시하였다. 제조된 평가시료에 대하여 전술한 방법에 따라 분석을 실시하고, 각 독소성분 별로 회수율을 계산하였다. 그 결과는 Table 7과 같다. 이 시험에서 얻어진 회수율의 범위는 83.5-112.2%로 IAEA/FAO/IUPAC/AOAC expert consultation report on single laboratory validation (19)의 시험소 내 유효성 확인시험 권장 회수율 범위인 75-120%에 포함되었다.

**Table 7. Recoveries of individual PSP toxins (%)**  
(n=5; concentration, 0.1  $\mu\text{g/g}$ )

Toxin	Oyster	Mussel
STX	103.9 $\pm$ 3.4	106.2 $\pm$ 2.5
NEO	107.0 $\pm$ 3.8	109.4 $\pm$ 4.1
GTX1	108.8 $\pm$ 5.0	112.2 $\pm$ 5.5
GTX2	96.5 $\pm$ 3.7	105.6 $\pm$ 6.3
GTX3	96.5 $\pm$ 5.2	83.5 $\pm$ 2.0
GTX4	105.3 $\pm$ 3.2	105.4 $\pm$ 4.8
GTX5	93.5 $\pm$ 3.7	94.0 $\pm$ 3.8
dcSTX	98.1 $\pm$ 3.0	91.7 $\pm$ 6.0
dcGTX2	100.2 $\pm$ 0.9	98.4 $\pm$ 0.2
dcGTX3	87.3 $\pm$ 0.6	87.4 $\pm$ 0.1
C1	101.8 $\pm$ 5.0	100.7 $\pm$ 2.5
C2	105.3 $\pm$ 3.2	92.6 $\pm$ 2.0

**검출한계 및 정량한계**

검출한계(LOD; limit of detection)와 정량한계(LOQ; limit of quantification)의 측정을 위해 각 매트릭스 별로 5개의 반복구를 사용하여 분석을 실시하였다. 각 독소의 retention time에서 S/N비는 working standard의 noise response (height unit)에 3을 곱하여 독소의  $\mu\text{M}$ 로 변환하여 구하였다. 독소량은 회석비율과 비독성을 고려하여 보정하고 검출한계 결과치는 mg STX eq/kg으로 표기하였다. 정량한계는 검출한계에 3을 곱하여 구하였다. 그 결과는 Table 8과 같다.

**Table 8. Estimated LOD and LOQ for individual toxin in the validated matrix**  
(n=5, mg STXeq/kg)

Toxin	Oyster		Mussel	
	LOD <sup>1)</sup>	LOQ <sup>2)</sup>	LOD	LOQ
STX	0.0200	0.0600	0.0210	0.0630
NEO	0.0259	0.0776	0.0277	0.0832
GTX1	0.0258	0.0775	0.0249	0.0746
GTX2	0.0287	0.0862	0.0251	0.0754
GTX3	0.0115	0.0344	0.0179	0.0536
GTX4	0.0240	0.0719	0.0232	0.0697
GTX5	0.0003	0.0009	0.0003	0.0009
dcSTX	0.0200	0.0600	0.0185	0.0554
dcGTX2	0.0062	0.0185	0.0138	0.0415
dcGTX3	0.0038	0.0113	0.0162	0.0486
C1	0.0005	0.0016	0.0005	0.0014
C2	0.0048	0.0144	0.0039	0.0116

<sup>1)</sup>LOD=3 $\times$ S/N; <sup>2)</sup>LOQ=3 $\times$ LOD.

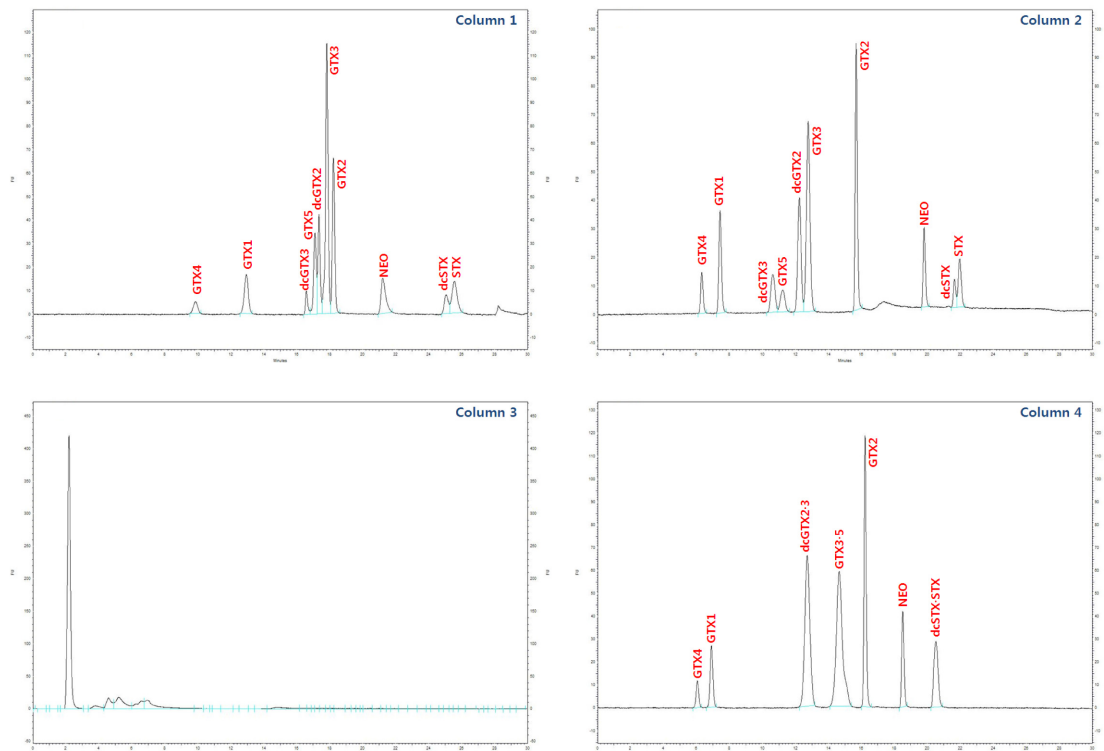


Fig. 1. Chromatograms of GTXs & STXs mixed working solution (10  $\mu$ L) with 4 type of  $C_{18}$  columns

각 독소성분에 대한 검출한계 및 정량한계를 합산하여 총 독소에 대한 검출한계와 정량한계를 추정하는 것은 모든 독소성분이 각각의 한계치 농도로 존재한다는 가정을 전제로 하고 있다. 실제 마비성 패류독소가 발생하는 시기에 채취된 현장시료에서는 한 두 가지 독소성분이 저 농도로 검출되다가 독성이 증가하면 처음 검출되었던 독소성분의 검출량이 증가하고 검출되지 않았던 독소성분이 나타나기 시작하기 때문에 독소 구성성분 중 가장 높은 정량한계치가 총독소량 검출에 있어서 정량한계가 된다. 굴을 매트릭스로 이용한 시험에서 나타난 정량한계 최고치는 GTX2의 0.0862 mg STX eq/kg이며 진주담치를 매트릭스로 이용한 시험에서 나타난 정량한계 최고치는 NEO STX의 0.0832 mg STX eq/kg이다. 즉 정량한계가 더 낮은 다른 독소성분이 검출되더라도 이 두가지 독소가 정량한계 이하로 존재하는 경우 검출되지 않아 총 독소량이 과소평가될 수 있다. 이를 감안하여 이 시험에서 얻어진 실제 검출한계와 정량한계는 각각 약 0.0862 및 0.0832 mg STX eq/kg이라고 할 수 있다. 이는 동물시험법의 분석능력을 기준으로 정량한계를 4.6배 정도 향상시킨 것에 해당된다.

#### 시판 column에 대한 둔감도

제안 시험법의 column에 대한 둔감도(ruggedness) 평가를 위해 시판  $C_{18}$  column (column No. 1-4, GTXs/STXs 분석용) 4종과  $C_8$  column (column No. 5-7, C toxins 분석용) 3종을 구입하여 독소성분별로 적용하여 column별로 3회 반복분석을 실시하였다. 표준독소 농도는 1.0 mg STX eq/kg이 되도록 조제하였다. STXs 및 GTXs 분석을 위해 사용한  $C_{18}$  column의 경우  $C_{18}$  polar embedded 및  $C_{18}$  endcapped phase로 대별되었다. 4종의 column을 사용하여 도출한 GTXs 및 STXs 분석 크로마토그램은 Fig. 1과 같다.

분석결과 표준 column으로 사용한 Zorbax Bonus-RP (Column

No. 2)와 비교하여 hydrophobicity는 유사하나 polar surface activity가 높고 surface area가 2배 이상(475  $m^2/g$ )되는 column No. 1의 경우에는 retention time이 길어지고 분리능이 낮게 나타났으며 shape selectivity가 높은 column No. 3의 경우에는 분석피크가 관찰되지 않았다. 또한 pore diameter가 다른 3종의 column보다 약 4배(320 Å)정도 큰 column No. 4의 경우에는 유도체 분리에 불리하여 피크가 중첩되었다.

C toxins 분석을 위해 사용한  $C_8$  column의 경우 모두  $C_8$  end-capped phase이었으며 surface area ( $m^2/g$ ), total carbon (%), particle size ( $\mu m$ )와 같은 particle 특성과 bonded phase 특성이 유사하였다. 다만 pore diameter에 다소의 차이가 있었다 (150-100 Å). 유사한 column의 특성과 같이 도출 크로마토그램도 유사하게 나타났으나 Column No. 7의 경우에는 분리능이 낮았다(Fig. 2).

#### 직선성

직선성(linearity) 확인을 위해 working solution을 검출한계에서 stock solution의 1/2 농도까지 단계희석한 후 분석을 실시하였다. 그 결과 Table 9에 나타난 바와 같이 전 범위에서 직선성이 확보되었으며 이때 상관계수는 모두 0.99 이상이었다.

#### 특이성

동물시험법을 묶은 산으로 추출한 독소를 마우스의 복강에 주사한 후 사망에 소요되는 시간을 측정하여 독량을 역산하는 것으로 시험동물의 반응은 마비성 패류독 성분 특이적인 것이 아니라 신경독소에 특이적인 것이다. 즉 carbamate와 같은 신경독소 유기기체 살충제와 염과 고농도의 중금속과 같은 방해물질에 영향을 받는다(3). 반면 PCOX 법은 액체 크로마토그래피가 가지는 고유의 특이성(specificity)으로 인하여 마비성 패류독 성분을 특이적으로 검출할 수 있으며 blank 시료에 의한 양성반응이 유

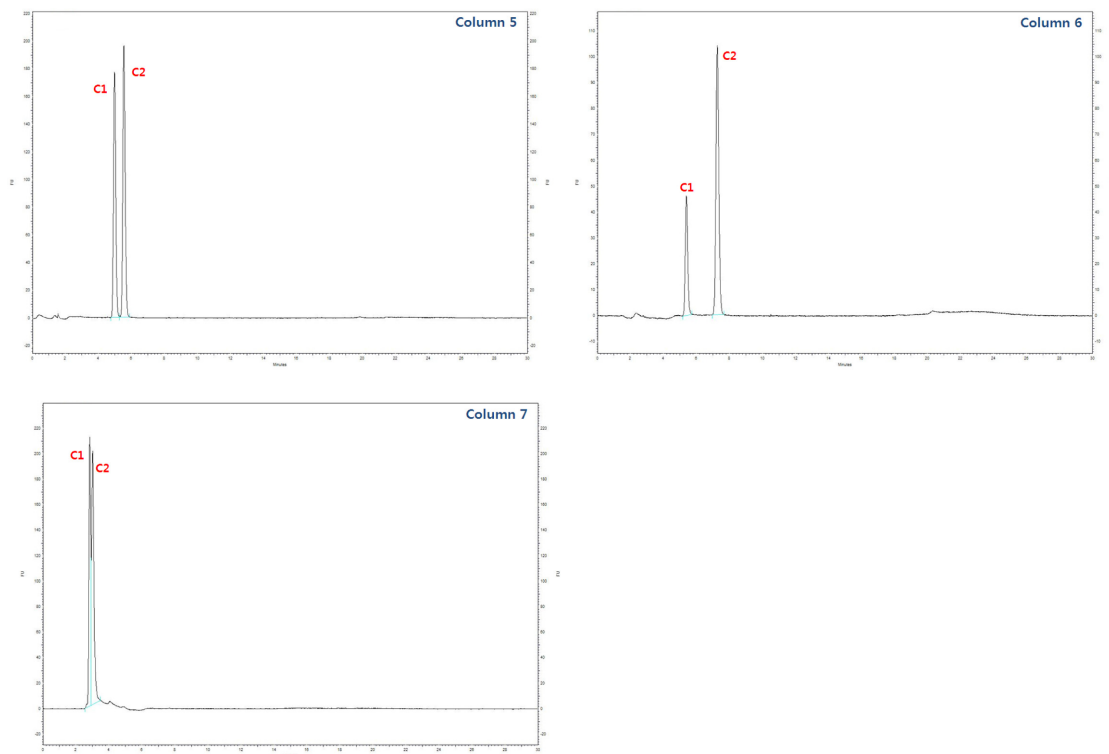


Fig. 2. Chromatograms of C-toxins mixed working solution (10 µL) with 3 types of 8 columns.

도되지 않는다. 또한 현재까지 보고된 사례를 볼 때 살충제 등의 방해물질에 영향을 받지 않아 높은 특이성을 확보할 수 있다 (1,3,15).

#### 동물시험법과 비교

이 연구에서 검토된 PCOX 법과 동물시험법의 동등성을 확인 하여 대체 시험법으로 활용 가능성을 확인하기 위해 두 시험법 간 비교시험을 진행하였다. 비교 시험에는 현장시료를 사용하였으나 특정 독소함량의 시료를 현장에서 구할 수 없는 경우에는 spiked sample를 조제하여 사용하였다. 그래서 현장시료와 spiked sample으로 조합된 굴 시료 100점과 진주담치 시료 100점으로 전체 시험구를 구성하였다. 총 200점의 시료를 두 방법으로 각각

Table 9. Linearity determined by serial dilution of the working standard

	Linearity ( $r^2$ )
STX	0.9938
NEO	0.9994
GTX1	0.9999
GTX2	0.9991
GTX3	0.9984
GTX4	0.9998
GTX5	0.9999
dcSTX	0.9993
dcGTX2	0.9969
dcGTX3	0.9973
C1	0.9993
C2	0.9980

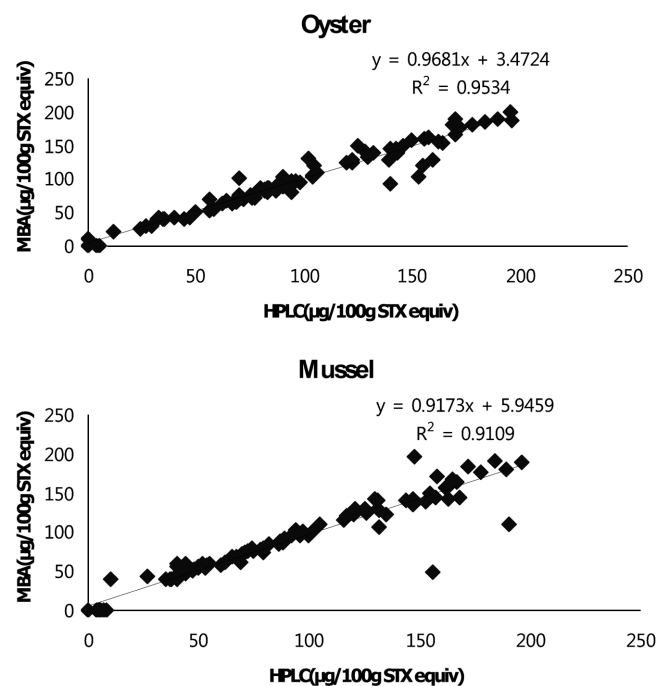


Fig. 3. Correlation between AOAC MBA and LC post-column oxidation method for analysis of PSP toxins in oyster (n=100) and mussel (n=100).

분석하여 도출된 결과를 검토한 결과, 굴의 경우 두 시험법의 상관계수( $r^2$ )는 0.9534로 나타났으며, 진주담치의 경우에는 0.9109로 나타나 매우 좋은 상관관계를 얻을 수 있었다(Fig. 3).

## 요 약

동물시험법과 동일한 시료 전처리법을 이용하고 HPLC의 높은 감도와 선택성을 극대화하여 독소성분의 그룹분석이 가능한 PCOX 법을 우리나라 패류시료의 매트릭스 특성에 맞도록 최적화하였다. 이 분석법은 GTXs/STXs와 C toxins의 그룹별 동시 분석과 독소성분의 분리와 정량이 가능하였다. 회수율은 83.5% 이상이며 반복시험에서 나타난 표준편차는 7% 이하로 AOAC international의 기준에 부합되었다. 총 독소에 대한 정량한계는 최고 8.6 µg/100 g 수준으로 동물시험법에 비하여 약 4.6배 이상의 향상된 분석능력을 가진 것으로 확인되었다. 또한 AOAC guidelines에 근거한 시험소 내 시험법 유효성 검증결과 모든 항목에서 적합한 결과가 도출되었다. 동물시험법과의 동등성 비교에서는 굴과 진주담치 매트릭스에 대한 두 시험법은 상관계수가 각각 0.9534와 0.9109로 매우 좋은 상관관계를 나타내었다.

한편 분석에 사용된 column (C<sub>18</sub> 및 C<sub>8</sub>)의 특성차에 의한 시험 결과의 영향 정도를 파악하기 위해 시판 column 7종에 대하여 평가를 실시한 결과, 동일 계열의 column을 사용하더라도 column의 물리화학적 특성과 수지와 반응기의 결합특성과 수지 봉쇄특성에 따라 분리도와 분석시간에 영향을 받는 것으로 나타나 column 적용 가능범위는 다소 좁은 것으로 확인되었다.

동물시험법에 비하여 PCOX 법은 단백질 제거, 크로마토그래피 현상을 이용한 독소성분의 분리, 독소성분 산화를 통한 형광성 플린의 형성과 특이적 파장을 이용한 형광검출과 같은 단계를 가지고 있어 특이성이 더 높았다. PCOX 법은 이러한 시험 원리에 기인한 특이성과 더불어 동물시험법에서 방해물질로 작용하는 carbamate와 같은 신경독소와 유기인계 살충제에 영향을 받지 않는 점과 blank 시료에 대한 false positive 결과를 배제할 수 있는 점에서 기인한 특이성을 동시에 가지고 있다. 또한 국제적으로 제기되고 있는 실험동물 사용억제 노력에 부응할 수 있는 윤리적 측면의 이점뿐만 아니라 동물시험법으로는 알아낼 수 없는 시료 중 마비성 패류독소 성분을 밝힐 수 있는 과학적 측면의 이점도 가지고 있다. 독소성분 분석을 통해 마비성 패류독소 원인 플랑크톤과 패류 중 독소성분을 비교하고 패종 별 독소 축적 양상을 파악할 수 있어 마비성 패류독소 위해관리 대책수립에 필요한 정보를 제공할 수 있다.

한편, HPLC 기반 분석법의 사용확대를 위해서는 관련 표준독소의 상업적 생산과 유통이라는 제한점을 극복해야 한다. 최근 캐나다 NRCC와 일부 관련기관에서 독소성분별 표준품을 시판하고 있으나, 지속적인 독소성분의 동정과 표준물질의 개발에 관련 연구자의 지속적인 관심과 노력이 필요하다.

## 감사의 글

본 연구는 식품의약품안전청 식품안전관리선진화 과제(패류 중 마비성 패독 시험법 개선연구, 11162식품안전005)의 지원에 의해 수행된 결과의 일부이며, 이에 감사드립니다.

## 문 헌

1. Thomas K, Chung S, Ku J, Reeves K, Quilliam MA. Analysis of PSP toxins by liquid chromatography with post column oxidation and fluorescence detection. pp. 132-138. In: Molluscan Shellfish Safety. Henshilwood K, Deegan B, McMahon T, Cusack C,

- Keaveney S, Silke J, O'Kinneide M, Lyons D, Hess P (ed). The Marine Institute, Galway, Ireland (2006)
2. AOAC. Official Method of Analysis of AOAC Intl. 18<sup>th</sup> ed. Method 959.08. Association of Official Analytical Communities, Gaithersburg, MD, USA (2005)
3. Van de Riet JM, Gibbs RS, Chou FW, Muggah PM, Rourke WA, Burns G, Thomas K, Quilliam MA. Liquid chromatographic post-column oxidation method for analysis of paralytic shellfish toxins in mussels, clams, scallops, and oysters: single-laboratory validation. J. AOAC Int. 92: 1690-1704 (2009)
4. Jellett JF, Doucette LI, Belland ER. The MIST (TM) shipable cell bioassay kits for PSP: an alternative to the mouse bioassay. J. Shellfish Res. 17: 1653-1655 (1998)
5. Louzao MC, Rodriguez Vieytes M, Garcia Cabado A, Vieites Baptista de Sousa JM, Botana LM. A fluorimetric microplate assay for detection and quantitation of toxins causing paralytic shellfish poisoning. Chem. Res. Toxicol. 16: 433-438 (2003)
6. David LS, Nicholson RA. Quantitation of paralytic shellfish toxins using mouse brain synaptoneurosome. Chemosphere 55: 1315-1321 (2004)
7. Manger RL, Leja LS, Lee SY, Hungerford JM, Kirkpatrick MA, Yasumoto T, Wekell MM. Detection of paralytic shellfish poison by rapid cell bioassay: antagonism of voltage-gated sodium channel active toxins in vitro. J. AOAC Int. 86: 540-543 (2003)
8. Thielert G, Peters K, Kaiser I, Luckas B. HPLC methods for the determination of PSP toxins. pp. 121-125. In: Proceedings of the symposium on marine biotoxins. Freymy JM (ed). Centre National d'Etudes Veterinaires et Alimentaires, Paris, France (1991)
9. Gawley RE, Pinet S, Cardona CM, Datta PK, Ren T, Guida WC, Nydick J, Leblanc RM. Chemosensors for the marine toxin saxitoxins. J. Am. Chem. Soc. 124: 13448-13453 (2002)
10. Usleber E, Dietrich R, Bürk C, Schneider E, Märklbauer E. Immunoassay methods for paralytic shellfish poisoning toxins. J. AOAC Int. 84: 1649-1656 (2001)
11. Jellett JF, Roberts RL, Laycock MV, Quilliam MA, Barrett RE. Detection of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins in shellfish tissue using MIST Alert, a new rapid test, in parallel with the regulatory AOAC mouse bioassay. Toxicon 40: 1407-1425 (2002)
12. Lawrence JF, Niedzwiedek B. Quantitative determination of paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish using prechromatographic oxidation and liquid chromatography with fluorescence detection. J. AOAC Int. 84: 1099-1108 (2001)
13. Sullivan JJ, Wekell MM, Kentala LL. Application of HPLC for the determination of PSP toxins in shellfish. J. Food Sci. 50: 26-29 (1985)
14. Oshima Y. Post column derivatization liquid chromatographic method for paralytic shellfish toxins. J. AOAC Int. 78: 528-532 (1995)
15. Rourke WA, Murphy CJ, Pitcher G, van de Riet JM, Burns G, Thomas K, Quilliam MA. Rapid postcolumn methodology for determination of paralytic shellfish toxins in shellfish tissue. J. AOAC Int. 91: 589-597 (2008)
16. Lawrence JF, Ménard C, Charbonneau CF, Hall S. A study of ten toxins associated with paralytic shellfish poison using prechromatographic oxidation and liquid chromatography with fluorescence detection. J. AOAC. Int. 74: 404-409 (1991)
17. Ben-Gigirey B, Rodríguez-Velasco ML, Villar-González A, Botana LM. Influence of the sample toxic profile on the suitability of a high performance liquid chromatography method for official paralytic shellfish toxins control. J. Chromatogr. A 1140: 78-87 (2007)
18. Thompson M, Ellison SLR, Wood R. Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis (IUPAC Technical Report). Pure Appl. Chem. 74: 835-855 (2002)
19. Alder L, Hill A, Holland PT, Lantos J, Lee SM, MacNeil JD, O'Rangers J, van Zoonen P, Ambrus A. Guidelines for single-laboratory validation of analytical methods for trace-level concentrations of organic chemicals. pp. 179-248. In: Principles and practices of method validation. Fajgelj, Ambrus A (ed). The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK (2000)