

## 국내산 양식 자주복의 테트로도톡신 및 그 유사체 분석

박봉기<sup>1</sup> · 이현준<sup>1</sup> · 박종협<sup>1</sup> · Nobuhisa Kajino<sup>2</sup> · 최광식<sup>2</sup> · 이완옥<sup>2</sup> · 최창순<sup>3</sup> · 이지현<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>중앙대학교 식품공학과, <sup>2</sup>제주대학교 해양생명과학과,

<sup>3</sup>중앙대학교 식품영양학과, <sup>4</sup>서울대학교 식품영양학과

### Determination of Tetrodotoxin and its Analog Composition in Korean Farmed *Takifugu rubripes* Pufferfish

Bong Ki Park<sup>1</sup>, Hyunjun Lee<sup>1</sup>, Jonghyub Park<sup>1</sup>, Nobuhisa Kajino<sup>2</sup>, Kwang-Sik Choi<sup>2</sup>,  
Wan-Ok Lee<sup>2</sup>, Changsun Choi<sup>3</sup>, Jihyun Lee<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science and Technology, Chung-Ang University, Anseong, Korea

<sup>2</sup>Department of Marine Life Science (BK21 FOUR) and Marine Science Institute, Jeju National University, Jeju, Korea

<sup>3</sup>Department of Food and Nutrition, Chung-Ang University, Anseong, Korea

<sup>4</sup>Department of Food and Nutrition, College of Human Ecology, Seoul National University, Seoul, Korea

(Received September 21, 2024/Revised October 8, 2024/Accepted October 8, 2024)

**ABSTRACT** - The tissue distribution of tetrodotoxin (TTX) and its analogs in farmed *Takifugu rubripes* pufferfish sold in Korean markets was determined using ultra-high performance liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry in the multiple reaction monitoring mode. The method detection limit for TTX ranged from 0.019 to 0.022 mg/kg in high-fat and low-fat matrices. The intra-day (n = 5) and inter-day (3 d, n = 15) accuracy and precision results met the Codex guidelines. Tetrodotoxin was not detected in most of the analyzed tissue samples. In the farmed *T. rubripes* tissues, TTX levels reached a maximum of 0.07 mg/kg in the liver. Among the TTX analogs, dideoxyTTX, trideoxyTTX, and norTTX were detected in all samples. This study contributes to the database of marine toxicity information for farmed *Takifugu* species sold in Korean markets.

**Key words:** Farmed pufferfish, DideoxyTTX, TrideoxyTTX, NorTTX

복어는 한국, 중국 및 일본에서 식용으로 활용되는 어종으로, 국내의 경우 자주복, 참복, 검복 등을 포함하여 복어 21종을 수입 및 식용 가능한 복어로 정하여 관리하고 있다<sup>1-3</sup>. 복어는 참복과(tetraodontidae)의 이름을 토대로한 테트로도톡신(tetrodotoxin)이라는 신경독소를 함유하고 있어 이를 사람이 섭취함으로써 중독될 가능성이 있다<sup>4</sup>. 복어독에 중독되면 신경, 골격근 및 심근막의 전압 개폐 나트륨 통로의 활동 전위가 차단되어 입술 주위, 혀 끝의 마비 증세가 나타날 수 있고, 심각할 경우 호흡기 마비에 의

한 사망에까지 이른다<sup>4,5</sup>. 테트로도톡신의 해독제는 현재까지 존재하지 않으며, 복어 등을 냉장·냉동하거나 가열 조리시에도 독성이 안정하다고 알려져 조리한 복어를 섭취하더라도 주의가 필요하다<sup>6,7</sup>. 최근에는 복어 뿐 아니라 과란고리 문어, 육식성 복족류 등의 해양생물에서 테트로도톡신이 검출되었다고 보고되고 있다<sup>3,8,9</sup>. 이런 해양 생물에서는 테트로도톡신 뿐 아니라 작용기에 따라 30종 이상의 테트로도톡신 유사체(analogues)가 보고된 바 있으며 유사체 마다 독성이 다른 것으로 보고되고 있다. 테트로도톡신의 독가(toxic equivalency factor, TEF)와 비교시 대부분의 테트로도톡신 유사체의 독가가 낮다고 알려져 있으나 oxo형의 경우 독가가 테트로도톡신과 유사하다고 알려져 있다<sup>4,10</sup>.

테트로도톡신 독소를 분석하기 위해서 전통적으로 mouse를 사용하여 반수치사시간을 측정하여 독성을 산출하는 mouse bioassay (MBA)법이 사용되었다<sup>11</sup>. MBA법의 경우

\*Correspondence to: Jihyun Lee, Department of Food and Nutrition, College of Human Ecology, Seoul National University, Seoul 08826, Korea  
Tel: +82-2-880-2531, Fax: +82-2-873-1213  
E-mail: jihlee@snu.ac.kr

Copyright © The Korean Society of Food Hygiene and Safety. All rights reserved. The Journal of Food Hygiene and Safety is an Open-Access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

복잡한 기기를 사용하지 않고 테트로도톡신과 그 유사체를 한 번에 분석할 수 있는 장점이 있으나 테트로도톡신과 그 유사체 각각의 독성을 확인할 수 없고, 동물복지 등의 윤리적인 문제가 있다<sup>12,13</sup>). 또한 MBA법으로는 삭시톡신(saxitoxin)과 같은 해양 생물 독소와 테트로도톡신의 구별이 어렵다<sup>10</sup>). 이를 보완하고자 최근에는 높은 정확성, 낮은 검출한계, 테트로도톡신과 그 유사체도 동시 분석이 가능한 liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)와 같은 기기를 사용한 분석법에 대한 연구가 활발히 수행되고 있다<sup>10,13</sup>).

자주복은 참복과 참복속(*Takifugu*)의 복어로 참복, 황복과 더불어 최고급 복어 어종에 속하며 국내 뿐 아니라 일본과 중국에서 양식하는 대표적인 복어종이다<sup>14</sup>). 일본 후생노동성에서는 자주복의 정소, 껍질, 그리고 근육 부위가 가식 부위로 지정되어 있다<sup>15</sup>). 자주복은 그 크기가 비교적 크고 등쪽에 흰 태가 둘러져 있으며 검은색의 무늬, 흑색 등지느러미 및 흰색 뒷지느러미의 외형적 특성을 갖고 있으며 등과 배 부위에는 피부극이 있다<sup>1</sup>). Matsui 등<sup>16</sup>)과 Yasumoto 등<sup>17</sup>)은 1982년에 양식 복섬(*Fugu niphobles*)에서는 테트로도톡신이 검출되지 않았다고 보고하였고 그 이후 양식 복어에는 독성이 없다고 널리 알려졌다. 그러나 Matsumura<sup>18</sup>)의 연구 결과와 Ji 등<sup>19</sup>)의 연구 결과에 따르면 양식 복어에도 소량의 테트로도톡신이 검출된다고 보고되었으며, 이는 분석 기술의 발달에 기인한 것으로 사료된다. 우리나라의 경우 유통 중인 양식 자주복에 관한 테트로도톡신 안정성은 MBA 분석 결과만 있을 뿐 LC-MS/MS를 이용한 테트로도톡신 및 그 유사체가 확인된 바 없다. 따라서, 본 연구를 통해 국내 유통 중인 양식 자주복의 부위별 테트로도톡신 및 그 유사체를 조사하여 유통되는 복어의 안전성에 대해 소비자의 이해를 돕고, 수산물 안전성 확보와 더불어 복어독에 대한 기준치 마련을 위한 기초 자료를 제공하고자 한다.

## Materials and Methods

### 표준품 및 시약

테트로도톡신과 그 유사체인 4,9-anhydroTTX와 4-*epi*TTX가 모두 있는 TTX certified reference (CRM) 표준품을 National Research Council Canada (Halifax, Canada)에서 구매하여 테트로도톡신과 그 유사체 2종을 정성 분석하는데 사용하였다. 테트로도톡신 정량 분석을 위한 표준 곡선 작성 및 유효성 검증을 위해서는 TTX citrate standard (>99%)를 Alomone Laboratories (Jerusalem, Israel)에서 구입하여 사용하였다. 초산(acetic acid), HPLC 등급의 아세토니트릴(acetonitrile, ACN), HPLC 등급의 메탄올(methanol, MeOH)은 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA), J.T. Baker Co. (Phillipsburg, NJ, USA), Honeywell

Co. (Charlotte, NC, USA)에서 각각 구입하여 사용하였다. ammonium acetate는 Fisher Scientific Co. (Loughborough, UK)에서 구입하여 사용하였으며, 실험에 사용된 물은 초순수 제조 시스템(Milli-Q Direct 8, Merck Millipore, Billerica, MA, USA)으로 제조하여 사용하였다.

### 양식 자주복 시료

제주도 성산의 탐라수산에서 생산된 양식 자주복 8개체를 2022년도 2월에 구매하여 사용하였다. 구매한 국내산 양식 자주복 시료의 생물학적 정보는 Table 1과 같다. 자주복 시료는 구매 후 실험실에 도착하는 즉시 급속 냉동한 뒤 영하 20°C 이하에서 냉동 보관하였다. 냉동된 복어 시료는 해부하기 전 냉장고(약 4°C)에서 24시간 동안 해동하였으며 해동 후 간, 생식소(난소 또는 정소), 껍질, 근육 부위로 해체하였다. 껍질과 근육 부위의 경우 내장으로 부터의 교차 오염을 방지하기 위해 내장과 닿아 있지 않은 꼬리 지느러미 부분의 조직을 분석에 사용하였다.

### 추출 및 정제

추출 및 정제 방법은 Park 등<sup>13</sup>)의 연구를 참고하였으며, 자주복 부위별 시료를 균질화한 뒤 1 g을 15 mL conical tube에 넣고, 1% 초산을 함유한 메탄올 용액 3 mL를 첨가한 다음, 5분간 볼텍스 믹서 (Vortex Mixer GENIE II, Scientific Industries, Bohemia, NY, USA)로 혼합해 준 뒤 초음파세척기(CPX3800H-E, Branson Ultrasonics, Danbury, CT, USA)로 5분간 초음파 처리하였다. 이 때 복어의 간, 생식소, 껍질은 고지방 부위로 분류하였으며 근육은 저지방 부위로 분류하였고 고지방 부위의 경우 freezing lipid precipitation 방법으로 정제하였다<sup>13,20</sup>). 그 후 추출물은 4°C에서 4,495 ×g의 속도로 15분간 원심분리기(2236 R, Labogene, Seoul, Korea)로 분리시킨 후, 상층액을 취한 뒤 위의 추출 과정을 한 번 더 반복하였다. 상층액을 모아 1% 초산을 함유한 메탄올을 가하여 10 mL가 되도록 정용하였다.

**Table 1.** Biometric parameters of the farmed *Takifugu rubripes* samples

Species	Sample ID (sex)	Length (cm)	Weight (g)
<i>T. rubripes</i> (collected in February 2022)	Tr1 (F)	29.7	591.3
	Tr2 (F)	30.2	592.5
	Tr3 (F)	32.5	637.2
	Tr4 (F)	31.8	564.4
	Tr5 (F)	32.5	698.6
	Tr6 (M)	31.4	607.0
	Tr7 (M)	30.5	507.8
	Tr8 (M)	30.8	550.7

이 후 5 mL의 메탄올과 물로 전처리된 Sep-Pak C18 solid-phase extraction (SPE) 카트리지가 (6 cc/1 g; Waters, Milford, MA, USA)에 추출액 1 mL을 넣고 메탄올 4 mL로 용출하였다. 용출액은 질소 농축기(MG-2200, EYELA, Tokyo, Japan)를 이용하여 1 mL로 농축한 뒤 polyvinylidene fluoride (PVDF) 0.22 µm 멤브레인 필터로 여과하여 유리 초자병에 담아 시험용액으로 사용하였다.

### 기기분석조건

LC-MS/MS로 복어 시료 중 테트로도톡신 및 그 유사체 분석을 하였고 기기분석조건은 Park 등<sup>13)</sup>의 연구를 참고하였다. LC system은 Agilent 1290 Infinity II 2D ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC), 질량분석기는 6470B triple-quadrupole (QqQ) mass spectrometer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)를 사용하였으며 분석 조건은 Table 2와 같다. Electrospray ionization

**Table 2.** LC-MS/MS method for tetrodotoxin and its analogue analysis

Instrument	Agilent 1290 UHPLC/6470TQ Triple Quadrupole LC-MS/MS		
Stationary phase	ACQUITY UPLC Glycan BEH Amide Column (2.1×100 mm, 1.7 µm)		
Mobile phase	A : ammonium acetate (5 mM) and acetic acid (0.01%) in water B: ammonium acetate (5 mM) and acetic acid (0.01%) in 90 : 10 acetonitrile : water (v/v)		
Running time	12 min		
Flow rate	0.3 mL/min		
	Time (min.)	Mobile phase A (%)	Mobile phase B (%)
Gradient mode	0	3	97
	5	36.6	63.4
	6	50	50
	6.01	3	97
	12	3	97
Ionization mode	Electrospray ionization (ESI) positive mode		
Fragmentor voltage	161 V		
MS operation mode	Multiple Reaction Monitoring (MRM)		
Gas temperature	275°C		
Gas flow	11 L/min		
Nebulizer pressure	35 psi		
Capillary voltage	2500 V		
Sheath gas temperature	350°C		
Sheath gas flow	11 L/min		

(ESI)법의 positive ion mode를 사용하여 테트로도톡신 및 그 유사체의 선구 이온(precursor ion) 및 생성 이온(product ion)을 선택한 후 가장 높은 감도를 보이는 이온을 정량 이온(quantifier ion)에, 나머지 두 개 혹은 한 개의 이온을 정성 이온(qualifier ions)으로 선택하여 multiple reaction monitoring (MRM) mode 조건을 확립하였다 (Table 3). 테트로도톡신 분석을 위해 선정된 정량 이온과 정성 이온은 기존의 연구들과 일치하였으며, 상업용 표준품이 존재하지 않는 테트로도톡신 유사체의 경우 그 MS scan을 통해 본 연구와 비슷한 분석 조건으로 분석한 기존 논문에서 보고된 유사체의 fragmentation pattern 및 머무름 시간 (retention time, RT)을 비교하여 정성하였다<sup>13,21)</sup>. 테트로도톡신 유사체는 테트로도톡신의 표준 곡선을 사용하여 상대 정량하였으며 그 결과는 mg tetrodotoxin analogue/kg tissue로 나타내었다.

### 분석법 검증

테트로도톡신 분석법 검증은 International Conference on Harmonization (ICH) 가이드라인<sup>22)</sup>에 따라 실시했다. 검량선의 직선성(linearity)을 확인하기 위해 테트로도톡신이 함유되어 있지 않은 자주복 고지방 및 저지방 부위 시료 (공시료)에 테트로도톡신 표준용액을 첨가한 뒤 ‘추출 및 정제’ 방법에 따라 처리하여 최종 농도가 0.1, 0.2, 0.5, 0.7, 1.0, 2.0 µg/g가 되도록 한 다음 5 반복 실험하여 검량선의 결정계수(coefficient of determination)를 구하였다. Park 등<sup>13)</sup>의 연구결과에 따르면 복어는 모든 부위에서 높은 매트릭스 효과(matrix effect)를 보이기에 검량선은 matrix-matched

**Table 3.** Multiple reaction monitoring (MRM) transitions and collision energy for tetrodotoxin and its analogues using ultra-high performance liquid chromatography triple quadrupole mass spectrometry

Compound	MRM transition	Collision energy (eV)
TTX		26
4- <i>epi</i> TTX	320.1 > 162.0	34
<b>320.1 &gt; 302.0*</b>	320.1 > 284.0	30
deoxyTTX 1	304.1 > 286.0	20
deoxyTTX 2	304.1 > 162.0	40
4,9-anhydroTTX	302.1 > 162.0	26
	302.1 > 256.0	40
norTTX 1	290.0 > 272.0	20
norTTX 2	290.0 > 162.0	20
dideoxyTTX 1	288.1 > 270.0	22
dideoxyTTX 2	288.1 > 224.0	40
trideoxyTTX 1	272.1 > 254.0	20
trideoxyTTX 2	272.1 > 162.0	40

\*Quantifier ion transition was in bold.

calibration curve를 사용하였다. 검출한계 (limit of detection, LOD) 및 정량한계 (limit of quantification, LOQ) 는 ICH 가이드라인<sup>22)</sup>에서 제시한 반응의 표준편차와 검량선 기울기에 근거하는 아래의 산출 방법에 따라 구하였다.

$$LOD = 3.3 \times \sigma/S$$

$$LOQ = 10 \times \sigma/S$$

( $\sigma$ : 반응의 표준편차, S: 검량선의 기울기)

정확성(accuracy)은 테트로도톡신이 검출되지 않은 자주복 시료에 테트로도톡신 표준용액을 첨가한 뒤 ‘추출 및 정제’ 방법에 따라 처리하여 최종 농도가 0.1, 0.2, 0.5 µg/g 가 되도록 한 다음 5 반복 실험하여 일내(intra-day) 및 일간(inter-day, 3일) 회수율(%recovery)을 구하였다. 또한, 회수율의 정밀성(precision)을 검증하기 위해 5반복 회수율로부터 상대표준편차(%relative standard deviation, %RSD)를 구하였다.

**통계분석**

본 실험에서 테트로도톡신 및 그 유사체 함량 분석 결과는 범위 및 평균과 표준편차로 나타내었고, 통계적 유의성은 IBM SPSS Statistics Software v.23.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) 프로그램을 사용하여 일원배치 분산분석(one-way analysis of variance)을 통해 검정하였으며, 사후 검정으로 Duncan’s multiple range test를 사용하여  $P < 0.05$ 의 유의 수준에서 그 결과를 검정하였다.

**Results and Discussion**

**분석법 검증 결과**

테트로도톡신 검량선의 직선성을 확인한 결과 고지방 부위와 저지방부위 검량선에서 결정계수( $r^2$ )가 각각 0.9999, 0.9998로 양호한 직선성을 보였다(Table 4). 일내 및 일간

정확성과 정밀성은 각각 회수율(%recovery)과 상대표준편차(%relative standard deviation, %RSD)로 평가를 하였으며 그 결과는 Table 4와 같다. 일내 및 일간 정확성을 평가한 결과 회수율의 범위가 부위 및 농도에 따라 고지방 부위의 일내 및 일간 정확성은 각각 100.0-109.7%, 99.1-108.4% 이었으며, 정밀성의 경우 상대표준편차의 범위가 각각 3.5-5.7%, 2.5-5.3%로 나타났다. 저지방 부위의 일내 및 일간 정확성은 각각 98.9-104.4%, 100.6-104.2% 이었으며, 정밀성의 경우 상대표준편차의 범위가 각각 2.9-8.0%, 2.6-5.2%로 나타났다. 따라서 정확도 및 정밀도는 CODEX 가이드라인(Codex Alimentarius guideline)<sup>23)</sup>에서 제시된 >0.1-≤1.0 mg/kg 농도에서 회수율 70-110%, 상대표준편차 18% 이하, >1.0 mg/kg 농도에서의 회수율 70-110%, 상대표준편차 14% 이하의 검증 기준을 만족하는 것으로 확인되었다. 분석법의 검출한계는 고지방 부위와 저지방부위에서 각각 0.022 mg/kg, 0.019 mg/kg이었으며, 정량한계는 고지방부위와 저지방부위에서 각각 0.067 mg/kg, 0.058 mg/kg이었다. 검출한계와 정량한계의 경우 기존 문헌에서 보고된 수치와 비슷하거나 더 낮은 수치였다<sup>24)</sup>.

**국내산 양식 자주복의 부위별 테트로도톡신 함량 분석 결과**

테트로도톡신 표준품과 테트로도톡신이 검출된 국내산 양식 자주복의 간 시료 추출물의 대표 MRM 크로마토그램을 Fig. 1와 같다. 국내산 양식 자주복 추출물을 UHPLC-QqQ MS의 MRM mode로 분석 시 TTX-CRM 표준품과 시료 추출물에서 동일한 머무름 시간을 가지는 피크가 확인되었으며 머무름 시간에서 정량이온과 정성이온의 상대적 비율 또한 일치하였다. 양식 자주복의 부위별 테트로도톡신 함량은 Table 5와 같다. 본 연구에서는 테트로도톡신 함량이 정량한계 미만인 경우 불검출(not detected, ND)로 표기하였다. 테트로도톡신은 부위와 관계없이 분석한 대부분의 국내산 양식 자주복 시료에서 검출되지 않았으나 Tr1 시료의 근육 부위와 Tr2 시료의 간 부위에서 각각

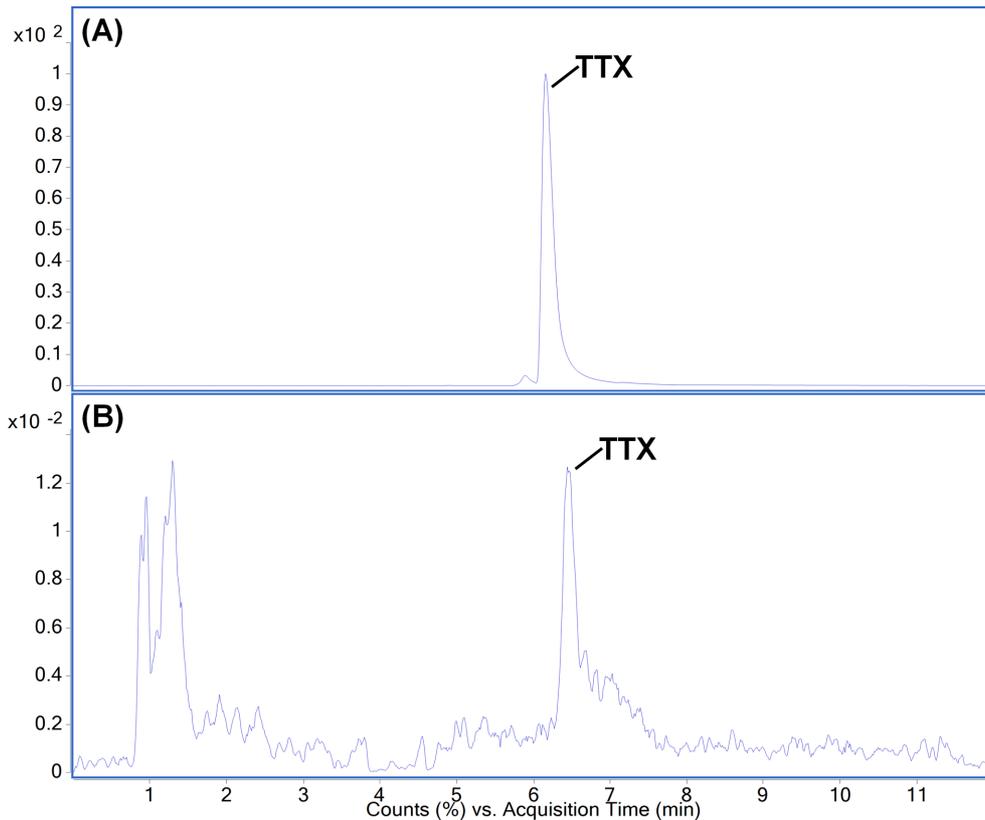
**Table 4.** Method validation results obtained for tetrodotoxin analysis in high-fat and low-fat matrices of pufferfish: intra- and inter-day accuracy (% recovery) and precision (%relative standard deviation, %RSD)

Matrix	Standard curve	Linearity ( $r^2$ )	MDL <sup>1)</sup> (mg/kg)	MQL <sup>2)</sup> (mg/kg)	Concentration (mg/kg)	Intra-day %recovery	Inter-day %recovery	Intra-day %RSD <sup>3)</sup>	Inter-day %RSD
High-fat matrix (liver)	$y = 5892.4x + 244.97$	0.9999	0.022	0.067	0.1	109.7	108.4	5.7	5.3
					1.0	100.8	99.1	3.5	4.2
					2.0	100.0	100.4	4.9	2.5
Low-fat matrix (muscle)	$y = 4344.4x - 54.912$	0.9998	0.019	0.058	0.1	104.4	104.2	8.0	5.2
					1.0	98.9	100.6	2.9	3.2
					2.0	104.4	101.4	5.2	2.6

<sup>1)</sup>MDL: method detection limit.

<sup>2)</sup>MQL: method quantitation limit.

<sup>3)</sup>RSD: relative standard deviation.



**Fig. 1.** The multiple reaction monitoring chromatograms of (A) tetrodotoxin (TTX) certified reference material, (B) non-spiked liver extract of a farmed *T. rubripes* Tr2 sample.

**Table 5.** Tetrodotoxin levels in various tissues of farmed *Takifugu rubripes* samples

Species	Sample ID (sex)	Liver (mg/kg)	Ovary (mg/kg)	Testis (mg/kg)	Skin (mg/kg)	Muscle (mg/kg)
<i>T. rubripes</i>	Tr1 (F)	N.D.	N.D.	-	N.D.	0.06±0.00
	Tr2 (F)	0.07±0.00	N.D.	-	N.D.	N.D.
	Tr3 (F)	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.
	Tr4 (F)	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.
	Tr5 (F)	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.
	Tr6 (M)	N.D.	-	N.D.	N.D.	N.D.
	Tr7 (M)	N.D.	-	N.D.	N.D.	N.D.
	Tr8 (M)	N.D.	-	N.D.	N.D.	N.D.

The values are mean±standard deviation; -: not applicable; N.D. : not detected (below method quantitation limit, MQL).

0.06, 0.07 mg/kg의 농도로 검출되었다. Table 6는 기존 연구에서 보고된 국내산 혹은 일본산 양식 자주복 부위별 테트로도톡신 분석 연구 결과이다. Kim 등<sup>25)</sup>의 연구결과에서는 MBA법을 이용하여 양식 자주복을 분석 시 독성이 검출되지 않았다. 그러나 Matsumura<sup>18)</sup>의 연구 결과 enzyme immunoassay로 분석 시, 일본산 양식 자주복에서 부위별로 소량의 테트로도톡신(간: <0.0001-0.006 mg/kg, 껍질: 0.002-0.13 mg/kg, 근육: 0.001-0.055 mg/kg)이 검출

되었으며 이는 본 연구 결과와도 일치한다. 기존 MBA 연구에서 복어독이 검출되지 않은 이유는 MBA법의 낮은 감도 등으로 설명될 수 있다. Magarlamov 등<sup>26)</sup>과 Ito 등<sup>27)</sup>에 따르면, 테트로도톡신은 박테리아에 의하여 생산되며, 먹이사슬을 통해 복어의 생체에 축적된다. Park 등<sup>13)</sup>의 연구에서는 양식인지 자연산인지 확인되지는 않았지만 국내 시장에서 구입한 자주복의 간, 난소, 정소에서 각각 N.D.-1.02×10<sup>4</sup> mg/kg, 0.35-1.32×10<sup>4</sup> mg/kg, N.D.-0.16 mg/kg의

테트로도톡신이 검출되었고, 가식부인 껍질과 근육 부위에서도 각각 0.10-215 mg/kg, N.D.-123 mg/kg의 테트로도톡신이 검출되었다. 본 연구에서 분석한 양식 자주복의 모든 부위에서는 테트로도톡신이 낮은 함량으로 검출되었거나 검출이 되지 않았는데, 그 이유는 양식 자주복의 경우 먹이로 제공되는 배합사료에 자연에서 유래할 수 있는 테트로도톡신이 포함되지 않는 것으로 추측된다. Park 등<sup>13)</sup>의 연구에서 분석에 사용된 자주복 일부 시료에서 고농도의 테트로도톡신이 검출된 것은 먹이로부터 유래한 것으로 보이며 자연산 자주복으로 사료된다. 국내의 경우 복어독에 대하여 근육과 껍질 부위에서 10 mouse unit (MU)/g으로 기준치를 설정하여 관리하고 있다<sup>11)</sup>. Biessy 등<sup>28)</sup>은 테트로도톡신 0.2 µg을 1 MU값으로 환산하여 표기하였으며 본 연구의 기기분석 결과를 해당 연구의 환산식에 대입하여 MU값으로 환산 시 국내산 양식 자주복의 모든 부위에서 0.5 MU/g 이하의 테트로도톡신이 검출되어 국내산 양식 자주복의 경우 안전한 것으로 확인되었다<sup>28)</sup>.

**국내산 양식 자주복의 부위별 테트로도톡신 유사체 분석 결과**

국내산 양식 자주복에서 테트로도톡신 유사체 중 norTTX 이성질체 2종, dideoxyTTX 2종, trideoxyTTX 이성질체 1종을 포함하여 총 5종의 테트로도톡신 유사체가 확인되었다<sup>13,21)</sup>. 모든 시료에서 4-*epi*TTX, 4,9-anhydroTTX, deoxyTTXs는 검출되지 않았다. 테트로도톡신이 검출된 시료뿐만 아니라 검출되지 않은 시료에서도 테트로도톡신 유사체가 검출되었다. 양식 자주복의 부위별 테트로도톡신 유사체는 테트로도톡신의 표준곡선(matrix-matched calibration curve)을 이용하여 상대 정량하여 이성질체의 경우 그 함량을 합산하여 mg TTX analogue/kg tissue로 나타내었다(Table 7). 국내산 양식 자주복의 모든 부위에서 dideoxyTTX가 주요 테트로도톡신 유사체로 검출되었다. DideoxyTTX의 부위별 분포를 확인 시 난소에서 0.80±0.20 mg TTX analogue/kg tissue로 가장 높은 함량을 보였고, 정소(0.68±0.31 mg TTX analogue/kg tissue), 간(0.40±0.21 mg TTX analogue/kg tissue), 껍질(0.14±0.13 mg TTX analogue/kg tissue), 근

**Table 6.** Tetrodotoxin content of *Takifugu rubripes* reported in previous studies

Species	Analysis method	Location	Liver (mg/kg)	Ovary (mg/kg)	Testis (mg/kg)	Skin (mg/kg)	Muscle (mg/kg)	Reference
Farmed <i>T. rubripes</i> (n = 10)	EIA	Japan	<0.0001-0.006	-	-	0.002-0.13	0.001-0.055	(18)
<i>T. rubripes</i> (n = 10)	UHPLC-QqQ	South Korea	N.D.-1.02×10 <sup>4</sup>	0.35 -1.32×10 <sup>4</sup>	N.D.-0.16	0.10-215	N.D.-123	(13)
Farmed <i>T. rubripes</i> (n = 5)	MBA	South Korea	<0.4* (<2 MU/g)	<0.4* (<2 MU/g)	<0.4* (<2 MU/g)	<0.4* (<2 MU/g)	<0.4* (<2 MU/g)	(25)

\*Values recalculated from MU/g assuming 1 MU = 0.2 µg TTX according to Biessy et al. (2019); -, not reported; N.D., not detected; EIA, enzyme immunoassay; UHPLC-QqQ, ultra-high-performance liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry; MBA, mouse bioassay.

**Table 7.** Tetrodotoxin (TTX) analogue contents in various tissues of farmed *Takifugu rubripes*

Species	Tissue	Tetrodotoxin analogue content (mg TTX analogue/kg tissue)						Sum
		4- <i>epi</i> TTX	4,9-anhydro TTX	deoxy TTX	dideoxy TTX	trideoxy TTX	norTTX	
<i>T. rubripes</i>	Liver	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.-0.62 (0.40±0.21 <sup>b</sup> )	0.10-0.11 (0.03±0.05 <sup>b</sup> )	N.D.	0.11-0.62 (0.43±0.16 <sup>c</sup> )
	Ovary	N.D.	N.D.	N.D.	0.44-0.93 (0.80±0.20 <sup>a</sup> )	N.D.-0.21 (0.10±0.10 <sup>a</sup> )	N.D.-0.18 (0.06±0.08 <sup>a</sup> )	0.55-1.14 (0.96±0.25 <sup>a</sup> )
	Testis	N.D.	N.D.	N.D.	0.32-0.88 (0.68±0.31 <sup>a</sup> )	N.D.	N.D.-0.12 (0.04±0.0 <sup>a</sup> )	0.32-0.96 (0.72±0.35 <sup>b</sup> )
	Skin	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.-0.34 (0.14±0.13 <sup>c</sup> )	N.D.	N.D.	N.D.-0.34 (0.14±0.11 <sup>d</sup> )
	Muscle	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.-0.21 (0.09±0.10 <sup>c</sup> )	N.D.	N.D.-0.10 (0.02±0.04 <sup>a</sup> )	N.D.-0.25 (0.12±0.11 <sup>d</sup> )

The values are presented as range(mean±standard deviation). Mean values followed by different superscript letters indicate significant differences in tetrodotoxin analogue content in the same column (P<0.05). N.D. stands for not detected.

육(0.09 ± 0.10 mg TTX analogue/kg tissue) 순으로 높은 함량을 보였다( $P < 0.05$ ). 또한, 국내산 양식 자주복의 간과 난소에서는 각각 0.03 ± 0.05 mg TTX analogue/kg tissue, 0.10 ± 0.10 mg TTX analogue/kg tissue의 trideoxyTTX가 검출되었으며 난소, 정소 및 근육에서는 각각 0.06 ± 0.08 mg TTX analogue/kg tissue, 0.04 ± 0.07 mg TTX analogue/kg tissue, 0.02 ± 0.04 mg TTX analogue/kg tissue의 norTTX가 검출되었다. Park 등<sup>13)</sup>의 연구에서도 국내산 자주복 및 자주복과 같은 참복속인 복섬과 줄복의 대부분의 부위에서 주요 테트로도톡신 유사체로 trideoxyTTXs와 deoxyTTXs가 보고되었으며 유사체의 함량 또한 높았다. 본 연구 결과와 Park 등<sup>13)</sup>의 연구 결과의 차이는 시장에서 구매한 자주복과 양식 자주복 간의 차이에서 기인할 수도 있다고 사료된다. Jang 등<sup>29)</sup>은 국내산 복섬의 거의 모든 부위에서 6,11-dideoxyTTX 유사체가 출현한다고 보고하였으며, 5,6,11-trideoxyTTX는 일본산 줄복의 모든 부위에서 출현하는 대표적인 테트로도톡신 유사체로 알려지고 있다<sup>30)</sup>. 기존 연구에서 테트로도톡신 유사체는 11-oxoTTX를 제외하면 테트로도톡신에 비해 적게는 5배에서 많게는 100배까지 상대적으로 낮은 독성을 가지고 있다고 보고된 바 있다<sup>10)</sup>. 특히 dideoxyTTX 중 6,11-dideoxyTTX는 테트로도톡신에 비해 약 400배 낮은 전압 개폐 나트륨 통로 차단 활성이 보고되었다<sup>31)</sup>. 따라서 국내산 양식 자주복의 테트로도톡신 유사체는 주로 그 함량도 낮고, dideoxyTTX 혹은 trideoxyTTX로 확인된 만큼 그 독성도 낮을 것으로 예상된다.

### Acknowledgments

본 연구는 2024년도 식품의약품안전처의 연구개발비(20163MFDS641)로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

### 국문요약

본 연구에서는 국내산 양식 자주복의 테트로도톡신 및 그 유사체를 UHPLC-Qq MS를 이용하여 분석하였다. 테트로도톡신 분석법의 직선성과 일내 및 일간 정확도와 정밀성, 검출 한계, 정량 한계를 구한 결과 CODEX 가이드라인 기준에 적합하였다. 국내산 양식 자주복의 부위별 테트로도톡신 함량을 분석한 결과 일부 시료의 간과 근육 부위를 제외한 대부분의 시료에서 테트로도톡신이 검출되지 않았으며, 검출된 시료도 간과 근육 부위에서는 각각 0.07 mg/kg, 0.06 mg/kg의 낮은 농도로 테트로도톡신이 검출되었다. 테트로도톡신 유사체의 경우 국내산 양식 자주복에서 dideoxyTTX, trideoxyTTX, norTTX가 검출되었다. 이 중 dideoxyTTX는 국내산 양식 자주복의 모든 부위에서 주요 테트로도톡신 유사체로 확인되었다. 본 연구를 통해 국내

산 양식 자주복의 테트로도톡신 및 그 유사체 분포를 이해하는데 도움을 줄 수 있으며 국내 해양생물 독소 데이터베이스 구축에 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

### Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

### ORCID

Bong Ki Park	<a href="https://orcid.org/0000-0003-4830-4778">https://orcid.org/0000-0003-4830-4778</a>
Hyunjun Lee	<a href="https://orcid.org/0009-0009-5889-6501">https://orcid.org/0009-0009-5889-6501</a>
Jonghyub Park	<a href="https://orcid.org/0009-0003-0294-0004">https://orcid.org/0009-0003-0294-0004</a>
Nobuhisa Kajino	<a href="https://orcid.org/0000-0003-3512-6765">https://orcid.org/0000-0003-3512-6765</a>
Kwang-Sik Choi	<a href="https://orcid.org/0000-0002-6868-9460">https://orcid.org/0000-0002-6868-9460</a>
Wan-Ok Lee	<a href="https://orcid.org/0000-0001-5063-3357">https://orcid.org/0000-0001-5063-3357</a>
Changsun Choi	<a href="https://orcid.org/0000-0001-7730-8538">https://orcid.org/0000-0001-7730-8538</a>
Jihyun Lee	<a href="https://orcid.org/0000-0001-5693-0109">https://orcid.org/0000-0001-5693-0109</a>

### References

- Han, K.H., Baek, J.I., Lee, S.H., Hwang, J.H., Shin, L.S., Kim, H.J., Youn, B.I., 2017. Genus Takifugu (in Korean). In an illustrated guidebook to the detailed puffer fishes, MFDS, Cheongju, Korea, pp. 20-53.
- Kang, Y.W., Lee, Y.S., Park, S.K., Seo, J.H., Kim, M.H., The study on the analysis method of tetrodotoxin in puffer fish. *Food Hyg. Saf.*, **27**, 37-41 (2012).
- Park, B.K., Jang, W.J., Park, K.H., Lee, H.S., Lee, W.O., Choi, K.S., Lee, J., Tetrodotoxin and its analogs: a review of analysis methods and levels in pufferfish. *J. Food Hyg. Saf.*, **36**, 105-117 (2021).
- Katikou, P., Gokbulut, C., Kosker, A.R., Campàs, M., Ozogul, F., An updated review of tetrodotoxin and its peculiarities. *Mar. Drugs*, **20**, 47 (2022).
- Isbister, G.K., Kiernan, M.C., Neurotoxic marine poisoning. *Lancet Neurol.*, **4**, 219-228 (2005).
- Bane, V., Lehane, M., Dikshit, M., O'Riordan, A., Furey, A., Tetrodotoxin: chemistry, toxicity, source, distribution and detection. *Toxins*, **6**, 693-755 (2014).
- Saoudi, M., Rabeh, F.B., Jammoussi, K., Abdelmouleh, A., Belbahri, L., Feki, A.E., Biochemical and physiological responses in Wistar rat after administration of puffer fish (*Lagocephalus lagocephalus*) flesh. *J. Food Agric. Environ.*, **5**, 107-111 (2007).
- Asakawa, M., Matsumoto, T., Umezaki, K., Kaneko, K., Yu, X., Gomez-Delan, G., Tomano, S., Noguchi, T., Ohtsuka, S., Toxicity and toxin composition of the greater blue-ringed octopus *Hapalochlaena lunulata* from Ishigaki Island, Okinawa Prefecture, Japan. *Toxins*, **11**, 245 (2019).
- Hong, H.K., Kajino, N., Park, B.K., Shin, J.S., Lee, J., Choi, K.S., Detection of tetrodotoxin (TTX) and its analogues in

- mud snails *Nassarius livescens* occurring on a sandy beach in Jeju Island, Korea, using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Fish. Sci.*, **89**, 863-873 (2023).
10. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), Knutsen, H. K., Alexander, J., Barregård, L., Bignami, M., Brüschweiler, B., Ceccatelli, S., Cottrill, B., Dinovi, M., Edler, L., Grasl-Kraupp, B., Hogstrand, C., Hoogenboom, L., Nebbia, C. S., Oswald, I. P., Rose, M., Roudot, A.-C., Schwerdtle, T., Vleminckx, C., Vollmer, G., Wallace, H., Arnich, N., Benford, D., Botana, L., Viviani, B., Arcella, D., Binaglia, M., Horvath, Z., Steinkellner, H., van Manen, M., Petersen, A., Risks for public health related to the presence of tetrodotoxin (TTX) and TTX analogues in marine bivalves and gastropods. *EFSA J.*, **15**, e04752 (2017).
  11. Ministry of Food and Drug Safety of the Republic of Korea (MFDS). (2024, August 22). Food code. Retrieved from <https://various.foodsafetykorea.go.kr/fsd/#/ext/Document/FC>
  12. Lee, K.A., Kim, N.H., Kim, J.K., Kim, Y.J., Lee, J.S., Han, Y.S., Okadaic acid group toxins: toxicity, exposure routes, and global safety management. *J. Food Hyg. Saf.*, **38**, 409-419 (2023).
  13. Park, B.K., Lee, H., Kim, I., Choi, K.S., Lee, W.O., Kajino, N., Hong, H.K., Lee, H.S., Choi, C., Lee, J., Development and validation of an LC-MS/MS method for determination of tetrodotoxin and its analogues in various pufferfish tissues and its application in Korean pufferfish. *J. Food Compos. Anal.*, **125**, 105816 (2024).
  14. Gang, H.U., J.H., Lee, J.Y., 2006. Cultured *Takifugu obscurus* manual. West sea fisheries research institute, National Fisheries Research and Development Institute, Incheon, Korea, pp. 1-49.
  15. Ministry of Health, Labour and Welfare of Japanese Government (MHLW). (2024, August 22). New rules for measures to secure sanitation regarding pufferfish. Retrieved from <https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000094363.html>
  16. Matsui T., Sato H., Hamada S., Shimizu C., Comparison of toxicity of the cultured and wild puffer fish *Fugu niphobles*. *Jpn. Soc. Fish. Sci.*, **48**, 253 (1982).
  17. Yasumoto, T., Nagai, H., Yasumura, D., Michishita, T., Endo, A., Yotsu, M., Kotaki, Y., Interspecies distribution and possible origin of tetrodotoxin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **479**, 44-51 (1986).
  18. Matsumura, K., Tetrodotoxin concentrations in cultured puffer fish, *Fugu rubripes*. *J. Agric. Food. Chem.*, **44**, 1-2 (1996).
  19. Ji, Y., Liu, Y., Gong, Q. L., Zhou, L., Wang, Z. P., Toxicity of cultured puffer fish and seasonal variations in China. *Aquacult. Res.*, **42**, 1186-1195 (2011).
  20. Ministry of Food and Drug Safety of the Republic of Korea (MFDS). (2024, August 22). Nutrition labeling guidelines. Retrieved from [https://www.mfds.go.kr/brd/m\\_1060/view.do?seq=15190&srchFr=&srchTo=&srchWord=&srchTp=&itm\\_seq\\_1=0&itm\\_seq\\_2=0&multi\\_itm\\_seq=0&company\\_cd=&company\\_nm=&page=1](https://www.mfds.go.kr/brd/m_1060/view.do?seq=15190&srchFr=&srchTo=&srchWord=&srchTp=&itm_seq_1=0&itm_seq_2=0&multi_itm_seq=0&company_cd=&company_nm=&page=1).
  21. Silva, M., Rodríguez, I., Barreiro, A., Kaufmann, M., Neto, A.I., Hassouani, M., Sabour, B., Alfonso, A., Botana, L.M., Vasconcelos, V., Tetrodotoxins occurrence in non-traditional vectors of the North Atlantic waters (Portuguese maritime territory, and Morocco Coast). *Toxins*, **11**, 306 (2019).
  22. International Conference on Harmonization (ICH), 2005. Q2(R1) Validation of analytical procedures: text and methodology. ICH Harmonised Tripartite Guideline, ICH, San Diego, CA, USA.
  23. Codex Alimentarius Commission (CAC), 2003. Codex alimentarius commission guidelines on good laboratory practice in pesticide residue analysis. CAC/GL 40-1993, CAC, Rome, Italy.
  24. Rambla-Alegre, M., Reverté, L., del Río, V., de la Iglesia, P., Palacios, O., Flores, C., Caixach, J., Campbell, K., Elliott, C.T., Izquierdo-Muñoz, A., Campàs, M., Diogène, J., Evaluation of tetrodotoxins in puffer fish caught along the Mediterranean coast of Spain. Toxin profile of *Lagocephalus sceleratus*. *Environ. Res.* **158**, 1-6 (2017).
  25. Kim, J.H., Son, K.T., Mok, J.S., Oh, E.G., Kim, J.K., Lee, T. S., Toxicity of the puffer fish *Takifugu porphyreus* and *Takifugu rubripes* from coastal areas of Korea. *Korean J. Fish. Aquat. Sci.*, **39**, 447-453 (2006).
  26. Magarlamov, T.Y., Melnikova, D.I., Chernyshev, A.V., Tetrodotoxin-producing bacteria: Detection, distribution and migration of the toxin in aquatic systems. *Toxins*, **9**, 166 (2017).
  27. Ito, M., Shirai, K., Oyama, H., Yasukawa, S., Asano, M., Kihara, M., Suo, R., Sugita, H., Nakahigashi, R., Adachi, M., Nishikawa, T., Itoi, S., Geographical differences in the composition of tetrodotoxin and 5, 6, 11-trideoxytetrodotoxin in Japanese pufferfishes and their origins. *Chemosphere*, **336**, 139214 (2023).
  28. Biessy, L., Boundy, M.J., Smith, K.F., Harwood, D.T., Hawes, I., Wood, S.A., Tetrodotoxin in marine bivalves and edible gastropods: A mini-review. *Chemosphere*, **236**, 124404 (2019).
  29. Jang, J.H., Lee, J.S., Yotsu-Yamashita, M., LC/MS analysis of tetrodotoxin and its deoxy analogs in the marine puffer fish *Fugu niphobles* from the southern coast of Korea, and in the brackishwater puffer fishes *Tetraodon nigroviridis* and *Tetraodon biocellatus* from Southeast Asia. *Mar. Drugs*, **8**, 1049-1058 (2010).
  30. Jang, J., Yotsu-Yamashita, M., Distribution of tetrodotoxin, saxitoxin, and their analogs among tissues of the puffer fish *Fugu pardalis*. *Toxicon*, **48**, 980-987 (2006).
  31. Kudo, Y., Finn, J., Fukushima, K., Sakugawa, S., Cho, Y., Konoki, K., Yotsu-Yamashita, M., Isolation of 6-deoxytetrodotoxin from the pufferfish, *Takifugu pardalis*, and a comparison of the effects of the C-6 and C-11 hydroxy groups of tetrodotoxin on its activity. *J. Nat. Prod.*, **77**, 1000-1004 (2014).