

## HPLC에 의한 Domoic acid 분석법 검증

목종수·이가정\*·송기철·김지회<sup>1</sup>국립수산과학원 식품안전과, <sup>1</sup>국립수산과학원 남동해수산연구소

## Validation of the Analysis of Domoic Acid using High Performance Liquid Chromatography

Jong-Soo Mok, Ka-Jeong Lee\*, Ki-Cheol Song and Ji-Hoe Kim<sup>1</sup>

Food &amp; Safety Research Division, National Fisheries Research &amp; Development Institute, Busan 619-705, Korea

<sup>1</sup>Southeast Sea Fisheries Research Institute, National Fisheries Research & Development Institute, Tongyeong 650-943, Korea

To prevent amnesic shellfish poisoning (ASP) resulting from the consumption of shellfish contaminated with domoic acid, the quantitative analysis of domoic acid is very important. We validated a high performance liquid chromatography (HPLC) method for accurate and precise quantification of domoic acid. A clear peak and the isolation of domoic acid resulted on injecting a 50% methanol extract of CRM-ASP-Mus-c mussel reference material using HPLC. The limit of detection of domoic acid under the established HPLC conditions was 0.10  $\mu\text{g/g}$ , and the limit of quantification of the toxin under the same conditions was 0.25  $\mu\text{g/g}$ . The intra-accuracy and precision for domoic acid in CRM-ASP-Mus-c were 90.7–95.7% and 0.28–2.25%, respectively. The inter-accuracy and precision for domoic acid were 89.1–97.1% and 1.7–4.1%, respectively. The mean recovery of domoic acid in methanol extracts from ten species of marine invertebrates was 88.6–105.1%.

Key words: Domoic acid, Amnesic shellfish poisoning, Shellfish, Validation, HPLC

## 서 론

패류에서 식품위생상 문제시 되는 위생안전 위해인자로는 장염비브리오균, 패혈증비브리오균, 이질균, 노로바이러스(norovirus), A형 간염바이러스 등 생물학적 위해요소뿐만 아니라 자연독 또한 문제가 되고 있다. ‘자연독’이란 보통의 자연 환경에서 정상적인 생리상태로 생육하고 있는 생물이 보유하는 독으로, 이때패류에서 검출되는 자연독에는 중독시 마비를 유발하는 마비성 패류독소(paralytic shellfish poison, PSP), 설사를 유발하는 설사성 패류독소(diarrhetic shellfish poison, DSP) 및 아자스피르산(azaspiric acid), 신경계 장애를 유발하는 기억상실성 패류독소(amnesic shellfish poison, ASP) 및 신경성 패류독소(neurotoxic shellfish poison, NSP) 등이 대표적이며, 이 외에도 다수의 유독성분이 알려지고 있다(Noguchi, 2003; Toyofuku, 2006). 이들 패류독소는 대부분 독을 생성하는 원인 플랑크톤을 패류가 섭이함으로써 그 플랑크톤에 함유된 유독성분이 패류에 이행되고, 사람이 독이 축적된 패류를 섭취하면 식중독을 일으키게 된다(Silvert and Rao, 1992; Toyofuku, 2006).

기억상실성 패류독소에 의한 최초의 식중독 사고로는 1987년 11월 캐나다의 동부에 위치한 Prince Edward 섬에서 생산된 진주담치로 인하여 약 150명의 식중독 환자가 발생하여 이 중 4명이 사망하였다(Addison and Stewart, 1989). 이 식중독 사건의 일부 환자에서 나타난 ‘기억상실’ 증상에 기초하여

‘amnesic shellfish poisoning’이라 하였으며, 중독 원인물질은 신경흥분성 아미노산의 일종인 domoic acid로 확인되었다. Domoic acid는 규조류에 속하는 *Pseudo-nitzschia* sp. 등이 생산하는 것으로 밝혀져 있고(Jeffery et al., 2004; Trainer and Bill, 2004), 캐나다에서 domoic acid가 처음 검출된 이후 미국, 뉴질랜드, 유럽 등지에서도 확인되고 있다(Bill et al., 2006; Schnetzer et al., 2007; Vale and Sampayo, 2001). 또한, domoic acid는 최초 진주담치에서 검출된 이후 맛조개, 바지락, 굴, 대합, 가리비 등 이때패류(James et al., 2005; Smith et al., 2006; Vale and Sampayo, 2002)는 물론 낙지 등의 두족류(Costa et al., 2004), 갑각류(Powell et al., 2002) 및 어류(Busse et al., 2006) 등에서도 검출되는 것으로 보고되었다.

세계 여러 나라에서는 domoic acid로 인한 식중독 예방을 위하여 연안 패류 중의 domoic acid 농도 및 해수 중의 원인 플랑크톤을 주기적으로 모니터링 하고 있으며(Bill et al., 2006; Jeffery et al., 2004; Noguchi, 2003; Wekell et al., 2004), 식품 중 domoic acid의 허용기준치를 20  $\mu\text{g/g}$ 으로 설정하여 관리하고 있다(James et al., 2005; Jeffery et al., 2004; Toyofuku, 2006; Trainer and Bill, 2004). 우리나라에서는 아직 domoic acid 중독증이 보고된 바 없으나, 근년 각종 패류독소가 세계 여러 지역으로 확산되는 사례들을 볼 때 우리나라 연안에서도 지속적으로 관리되어야 할 위해로 판단된다.

패류 중 domoic acid 정량을 위하여 thin layer chromatography, enzyme-linked immunosorbent assay, high performance liquid

\*Corresponding author: kjlee@nfrdi.go.kr

chromatography (HPLC), liquid chromatography/mass spectrometry (Quilliam, 2003; Yu et al., 2004) 등 여러 가지 분석법이 보고되어 있다. 이러한 분석법에 있어서 정량을 위해서는 표준독소 domoic acid를 사용해야하며, 전보 (Mok et al. 2009)에서는 표준 domoic acid를 사용하여 온도, pH 및 빛 등 조건별 안정성을 시험하였다. 본 연구에서는 HPLC에 의한 패류 중에 존재하는 domoic acid의 정확한 정량을 위한 분석법의 유효성 검정을 실시하였다.

### 재료 및 방법

#### 시약 및 표준용액 조제

Domoic acid 표준물질은 인증표준물질 (CRM, certified reference material)인 CRM-ASP-f 및 CRM-ASP-Mus-c를 Canada의 National Research Council (Halifax, Canada)에서 구입하여 사용하였고, L-tryptophan은 Sigma사 (USA) 제품을 사용하였다. 추출용 및 이동상 용매로 methanol, acetonitrile 및 trifluoroacetic acid 등은 Merck사 (Germany) 제품을 각각 사용하였다. 표준 stock solution은 domoic acid 표준물질을 10% acetonitrile에 녹여 100 µg/mL으로 조제하고, 이 용액을 적절히 희석하여 시험에 사용하였다.

#### 시료 전처리

시험에 사용된 굴 (*Crassostrea gigas*), 진주담치 (*Mytilus edulis*), 바지락 (*Ruditapes philippinarum*), 피조개 (*Scapharca broughtonii*), 비단가리비 (*Chlamys farreri*), 소라 (*Batillus cornutus*), 전복 (*Nordotis discus*), 꽃게 (*Portunus trituberculatus*), 멧게 (*Halocynthia roretzi*) 및 미더덕 (*Styela clava*) 등의 해산무척추동물 시료는 2009년 4월~9월에 시중 유통 중인 것을 구입하여 사용하였다. 각 시료 12개체 이상을 사용하여 껍질을 제거한 육 100 g을 blender (Waring 사)로 3분간 균질화 하였다. 균질화된 시료 10 g에 domoic acid 표준물질을 일정농도 첨가한 다음 50% 메탄올 40 mL을 가하여 다시 2분간 균질화하였다. 시료용액을 6,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 잔사를 제거하고 상층액을 0.2µm filter로 여과 한 후 갈색 vial에 담아 HPLC 분석용 시료로 사용하였다.

#### HPLC에 의한 domoic acid 정량

시료 중의 domoic acid 함량은 HPLC (high performance liquid chromatography)를 사용하여 분석하였다. 즉, adsorbosphere C18 (150 mm × 4.6 mm, Alltech, USA) 칼럼을 부착한 HPLC (Surveyor, Thermo, USA) 사용하여 UV 검출기 (Surveyor PDA

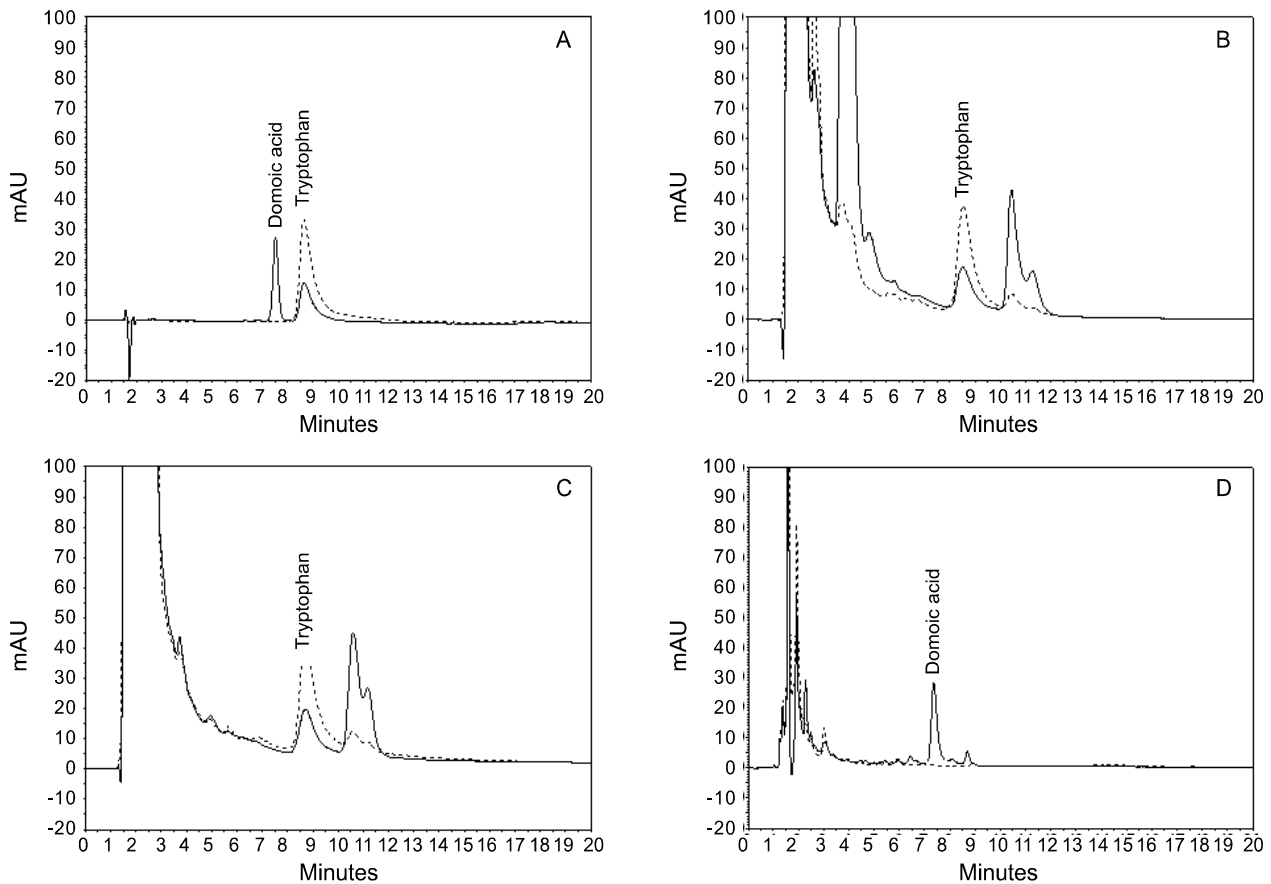


Fig. 1. HPLC chromatogram of domoic acid in standard solution (A, 1 µg/mL), the extract of oyster (B, blank), the extract of mussel (C, blank) and CRM-ASP-Mus-c mussel reference material (D, 5 µg/g). —, 242 nm; ---, 280 nm.

plus, Thermo, USA)로 242 nm와 280 nm에서 동시에 검출하였다. 그리고 분석시 유속은 1.0 mL/min, 칼럼 온도는 35°C 및 시료주입량은 20 µL이었다. 이때, 이동상으로 0.1% trifluoroacetic acid를 포함한 acetonitrile와 0.1% trifluoroacetic acid를 13:87 (V/V)로 혼합한 후 여과 (0.2 µm, Nylon, Millipore, USA)하여 gradient 없이 사용하였다. 이때, 분석의 정확성을 위하여 대조구로서 domoic acid 2 ppm과 L-tryptophan 20 ppm을 1:1로 혼합한 용액을 사용하여 확인한다.

### 분석법 검증 시험

Domoic acid 분석조건에 대한 검증 시험은 domoic acid 인증표준물질 (CRM)을 사용하여 최적 분석조건에서 농도가 0.1~5.0 µg/mL 농도가 되도록 용액을 조제하고 HPLC로 분석하였다. 분석기기의 검출한계는 (LOD, limit of detection)는 신호대 잡음비 (S/N)가 > 3으로 하였으며, 정량한계 (LOQ, limit of quantification)는 LOD × 3일 때의 농도로 구하였다.

시험방법의 정확성과 정밀성은 진주담치 시료에 기지의 농도가 첨가되어 있는 domoic acid 인증표준물질 (CRM)을 동일한 전처리법으로 처리하여 분석하였다. 또한 일내 및 일간 정밀성을 확인하기 위하여 하루에 5반복 측정하여 일내 정밀성 (CV)을 구하였고, 3일 동안 반복 측정을 시행하여 일간 정밀성 (CV)를 구하여 평가하였다.

Table 1. Analytical features of domoic acid using CRM-ASP-Mus-c reference material (n=5)

Concentration (µg/mL)	Accuracy (%)	CV (%)	Linearity (r <sup>2</sup> )	LOD (µg/g)	LOQ (µg/g)
0.05125	92.2	1.76			
0.1025	91.4	1.04			
0.205	93.7	0.29			
0.5125	96.4	0.71	0.999911	0.10	0.25
1.025	96.6	0.42			
2.05	97.8	0.34			
8.2	98.8	0.39			

Table 2. Intra- and inter-accuracy and precision for domoic acid in CRM-ASP-Mus-c reference material

Concentration (µg/g)	Intra-day (n=5)		Inter-day (n=5)	
	Accuracy (%)	CV (%)	Accuracy (%)	CV (%)
0.26	91.1	2.25	89.1	3.2
0.51	90.7	0.98	89.3	2.4
1.03	94.5	0.28	91.0	4.1
2.56	93.5	0.70	94.9	1.9
5.13	92.3	0.35	94.4	2.6
10.25	95.7	0.34	96.7	1.7
41.00	95.5	0.35	97.1	1.9

## 결과 및 고찰

### 분석법 검증시험 결과

진주담치에 일정농도 domoic acid가 함유된 인증표준물질

인 CRM-ASP-Mus-c를 메탄올 50%로 추출한 용액 (0.05~8.20 µg/mL)을 HPLC 최적분석 조건에서 분석한 크로마토그램은 Fig. 1에 나타내었다. 시료 중의 domoic acid는 용이하게 검출할 수 있었고, 상관관계 (r<sup>2</sup>)이 0.9999이상으로 각 농도 범위에서 매우 양호한 직선성을 나타내었다 (Table 1). 즉, 시료 중에서 domoic acid는 약 7.4분경에 용출되었으며, 주변에 정량을 방해할 만한 peak는 검출되지 않았다. 분석기기의 검출한계 (LOD)를 확인한 시험결과, 신호대 잡음비 (S/N)를 >3으로 보았을 때 domoic acid의 검출한계는 0.10 µg/g이었으며, 정량한계 (LOQ)는 0.25 µg/g이었다 (Table 1). 또한 분석법의 정확성과 정밀성을 측정된 결과 정확성은 91.4~98.8%이었으며, 정밀성은 0.34~1.76%이었다 (Table 1). Codex (2008)에서는 0.1~10 µg/g 범위에서는 80~110%의 정확성을, 0.01 µg/g 및 0.001 µg/g에서는 각각 60~115% 및 40~120%의 정확성을 요구하고 있으므로 우리의 결과는 이에 부합되는 것으로 확인되었다.

그리고 본 분석법의 일내 및 일간 정확성과 정밀성을 확인하기 위하여 진주담치 시료에 함유 되어있는 CRM을 시료 (0.26~41.00 µg/g)로 사용하여 얻어진 추출액으로 측정된 결과, 분석법의 일내 정확성 및 정밀성은 각각 90.7~95.7%의 정확성과 0.28~2.25%의 정밀성을 나타내었다 (Table 2). 일간 정확성 및 정밀성의 경우는 3일간 반복하여 구하였으며, 각각 89.1~97.1%의 정확성과 1.7~4.1%의 정밀성을 나타내었다 (Table 2). 따라서 최적분석 조건에서 HPLC를 이용하여 패류 중의 domoic acid 분석법 검증을 위하여 실시한 선택성, 직선성, 정확성 및 정밀성은 모두 양호한 결과를 나타내었다.

한편, Mok et al. (2009)은 domoic acid의 표준용액 및 시료추출액의 저장 안정성을 조사한 결과, 표준용액은 저장 한달까지 상온, 저온 및 냉동에서 90% 이상 잔존하여 상당히 안정한 것으로 확인되었고, 시료 추출용액의 경우 상온과 냉장에서는 1일까지 그리고 냉동조건에서는 1주일까지 안정한 것으로 확인되었다. 또한, 각기 다른 pH 영역에서 가열하여도 domoic acid는 85% 이상 잔존률을 나타내어 열에는 매우 안정하였다. 반면, 광분해성을 확인한 결과 빛에 노출된 굴 추출액의 domoic acid는 급격히 감소하여 저장 5일째 50%이하로 감소하였으며, 1.0 µg/mL 첨가구는 저장 7일째 완전히 분해되어 검출되지 않았다 (Mok et al., 2009).

### 해산무척추동물 중의 domoic acid 회수율

굴, 진주담치, 바지락, 피조개, 비단가리비, 소라, 전복, 꽃게, 멍게 및 미더덕 등의 domoic acid 오염이 우려되는 해산무척추동물을 시료로 이용하였으며, 시료에 domoic acid 표준물질을 일정농도 첨가하여 50% 메탄올로 추출하였을 때 품종별 회수율은 Table 3에 나타내었다. 해산무척추동물 품종에 따른 회수율 (평균±CV%)은 굴 88.6±0.35%, 진주담치 103±1.20%, 바지락 96.2±0.87%, 피조개 102.8±0.84%, 비단가리비 102.5±0.10%, 소라 99.5±0.10%, 전복 94.5±0.37%, 꽃게 105.1±1.82, 멍게 104.3±0.64% 및 미더덕 101.9±0.52%로 품종에 따라 일부 차이는 있으나 전체적으로 회수율은 88.6~105.1%로 매우 양호한 수준으로 확인되었다.

Quilliam et al. (1995)은 패류 시료를 50% 메탄올로 추출하

Table 3. Recovery of domoic acid from different species of marine invertebrates (n=5)

Species	Recovery (%)	CV (%)
Oyster ( <i>Crassostrea gigas</i> )	85.6	0.35
Blue mussel ( <i>Mytilus edulis</i> )	103.2	1.20
Short neck clam ( <i>Ruditapes philippinarum</i> )	96.2	0.87
Ark shell ( <i>Scapharca broughtonii</i> )	102.8	0.84
Scallop ( <i>Chlamys farreri</i> )	102.5	0.10
Spiny top shell ( <i>Batillus cornutus</i> )	99.5	0.10
Abalone ( <i>Nordotis discus</i> )	94.5	0.37
Blue crab ( <i>Portunus trituberculatus</i> )	105.1	1.82
Sea squirt ( <i>Halocynthia roretzi</i> )	104.3	0.64
Warty sea squirt ( <i>Styela clava</i> )	101.9	0.52

여 SAX (Strong Anion Exchange) 카트리지로 정제과정을 거쳐 HPLC로 분석한 결과 회수율은 85~115%이었다고 보고하여 본 연구결과와 유사하였다. Powell et al. (2002)은 sand crab 시료를 50%메탄올로 추출할 경우 균질화한 후 초음파 추출하였을 때가 회수율이 우수하였으며, 이때 회수율은 97±2.9%였다. 그리고 SAX 카트리지로 정제 과정을 거치면 회수율이 92±4.3% 약간 저하하는 것으로 보고하였다.

Domoic acid는 캐나다에서 처음 검출된 이후 국가차원에서 domoic acid에 의한 식중독 예방을 위하여 패류에서 domoic acid의 잔류허용기준치를 20 µg/g으로 설정하여 지속적으로 모니터링을 실시하여 관리하고 있다 (Jeffery et al., 2004). 이후 미국, 일본 및 유럽 등에서는 연안해역의 패류에서 domoic acid 검출에 따른 패류 및 원인플랑크톤에 대하여 주기적으로 모니터링을 실시하여 식중독 예방을 위한 자료로 활용하고 있다 (Bill et al., 2006; Toyofuku, 2006; Vale and Sampayo, 2001; Wekell et al., 2004). 아일랜드에서 서식하는 이매패류 4종에 대한 domoic acid 모니터링을 실시한 결과, 진주담치에서는 최고 1.0 µg/g이 검출되었고, 굴에서는 5.0 µg/g 그리고 가리맛조개에서는 0.3 µg/g이 검출되었다. 반면, 가리비 (king scallop)에서는 최고 240 µg/g이 검출되었으며, 분석된 시료 55%가 EU의 domoic acid 잔류허용기준치인 20 µg/g을 초과하여 검출되었다고 보고하였다 (James et al., 2005). 스코트랜드 연안에 서식하는 가리비에 대한 domoic acid 모니터링을 1998년 이후 실시하고 있으며, 주기적으로 잔류허용기준치를 초과하는 것으로 보고하고 있다 (Smith et al., 2006). 우리나라에서는 아직 domoic acid에 의한 식중독이 보고된 바 없고, 국립수산과학원에서 1991년부터 연안산 패류에 대한 모니터링을 지속하고 있으나 아직은 거의 독이 검출되지 않으며, 일부 검출되는 시료에 있어서도 외국의 기준치에 훨씬 미달하

는 미량으로 검출되고 있다. 또한, Koh and Kwon (2002)는 시중에 유통 중인 패류 68개 시료에 대하여 분석한 결과, 모든 시료에서 검출되지 않았다고 밝혔다. Shin (2007)은 시중 유통 중인 패류 시료에 대하여 분석한 결과, 2006년에는 409개 시료 중에 4개 시료에서 1.94~4.13 µg/g의 domoic acid가 검출되었으나, 2007년도에는 530개 모든 시료에서 검출되지 않았다고 하였다. 그러나 근년 각종 패류독이 세계 여러 지역으로 확산되는 사례들을 볼 때 우리나라 연안에서도 지속적으로 관리되어야 할 위해로 판단된다.

### 감사의 글

본 연구는 국립수산과학원 (수출용 패류 생산해역 및 수산물 위생조사, RP-2010-FS-04)의 지원에 의해 수행되었습니다.

### 참고문헌

- Addison RF and Stewart JE. 1989. Domoic acid and the eastern Canadian molluscan shellfish industry. *Aquaculture* 77, 263-269.
- Bill BD, Cox FH, Horner RA, Borchert JA and Trainer VL. 2006. The first closure of shellfish harvesting due to domoic acid in Puget Sound, Washington, USA. *African J Marine Sci* 28, 435-440.
- Busse LB, Venrick EL, Antrobus R, Miller PE, Vigilant V, Silver MW, Mengelt C, Mydlarz L and Prezelin BB. 2006. Domoic acid in phytoplankton and fish in San Diego, CA, USA. *Harmful Algae* 5, 91-101.
- Codex Alimentarius Commission. 2008. Report of the Thirty-first session, ALINORM 08/31/REP. Geneva, Switzerland.
- Costa PR, Rosa R and Sampayo MAM. 2004. Tissue distribution of the amnesic shellfish toxin, domoic acid, in *Octopus vulgaris* from the Portuguese coast. *Marine Biology* 144, 971-976.
- James KJ, Cillman M, Amandi MF, Lopez-Rivera A, Puente PF, Lehane M, Mitrovic S and Furey A. 2005. Amnesic shellfish poisoning toxins in bivalve molluscs in Ireland. *Toxicon* 46, 852-858.
- Jeffery B, Barlow T, Moizer K, Paul S and Boyle C. 2004. Amnesic shellfish poison. *Food and Chemical Toxicol* 42, 545-557.
- Koh EM and Kwon HJ. 2002. Screening of domoic acid, a marine neurotoxin, in Korean shellfishes. *J Food Sci Technol* 34, 1130-1133.
- Mok JS, Lee TS, Oh EG, Son KT, Hwang HJ and Kim JH. 2009. Stability of domoic acid at different temperature, pH and light. *J Kor Fish Soc* 42, 8-14.
- Noguchi T. 2003. Marine toxins. *Nippon Suisan Gakkaishi* 69, 895-909.

- Powell CL, Ferdin ME, Busman M, Kvitek RG and Doucette GJ. 2002. Development of a protocol for determination of domoic acid in the sand crab (*Emerita anaoga*): a possible new indicator species. *Toxicon* 40, 485-492.
- Quilliam MA, 2003. Chemical methods for domoic acid, the amnesic shellfish poisoning (ASP) toxin. In: Manual on Harmful Marine Microalgae, Monographs on Oceanographic Methodology, Vol 11, Chapter 9. Hallegraeff GM, Anderson DM & Cembella AD, eds. Intergovernmental Oceanographic Commission (UNESCO), Paris, France, 247-266.
- Quilliam MA, Xie M and Hardstaff WR. 1995. Rapid extraction and cleanup for liquid chromatographic determination of domoic acid in unsalted seafood. *J AOAC Int* 78, 543-554.
- Schnitzer A, Miller PE, Schaffner RA, Jones BH, Weisberg SB, Digiacomo PM, Berelson WM and Caron DA. 2007. Blooms of *Pseudo-nitzschia* and domoic acid in the San Pedro Channel and Los Angeles harbor areas of the Southern California Bight, 2003-2004. *Harmful Algae* 6, 372-387.
- Shin IS. 2007. Monitoring of diarrhoeic shellfish poison(DSP) and amnesic shellfish poison(ASP) in shellfish. The Annual Report of KFDA 11, 540-541.
- Silvert W and Rao DVS. 1992. Dynamic model of the flux of domoic acid, a neuro toxin, through a *Mytilus edulis* population. *Can J Fish Aquat Sci* 49, 400-405.
- Smith EA, Papapanagiotou EP, Brown NA, Stobo LA, Gallacher S and Shanks AM. 2006. Effect of storage on amnesic shellfish poisoning(ASP) toxins in king scallops(*Pecten maximus*). *Harmful Algae* 5, 9-19.
- Toyofuku H. 2006. Joint FAO/WHO/IOC activities to provide scientific advice on marine biotoxins (research report). *Marine Pollution Bull* 52, 1735-1745.
- Trainer VL and Bill BD. 2004. Characterization of a domoic acid binding site from Pacific razor clam. *Aquatic Toxicol* 69, 125-132.
- Vale P and Sampayo MAM. 2001. Domoic acid in Portuguese shellfish and fish. *Toxicon* 39, 893-904.
- Vale P and Sampayo MAM. 2002. Evaluation of extraction methods for analysis of domoic acid in naturally contaminated shellfish from Portugal. *Harmful Algae* 1, 127-135.
- Wekell JC, Hurst J and Lefebvre KA. 2004. The origin of the regulatory limits for PSP and ASP toxins in shellfish. *J Shellfish Res* 23, 927-930.
- Yu FY, Liu BH, Wu TS, Chi TF and Su MC. 2004. Development of a sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of domoic acid in shellfish. *J Agri Food Chem* 52, 5334-5339.

---

2010년 6월 25일 접수  
2010년 7월 27일 수정  
2010년 8월 12일 수리