

LC-MS/MS와 Ion Chromatography를 이용한 테트라민 분석

송기철·이가정·김지희·윤호동·유홍식·목종수*

국립수산과학원 식품안전과

Tetramine Analysis using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry and Ion Chromatography

Ki Cheol Song, Ka Jeong Lee, Ji Hoe Kim, Ho Dong Yoon,
Hongsik Yu and Jong Soo Mok*

Food Safety Research Division, National Fisheries Research and
Development Institute, Busan 619-705, Korea

As a first step toward identifying a new method for testing sea snail tissue for toxins, and thus prevent food poisoning due to the ingestion of contaminated snails, we measured the tetramine $[(\text{CH}_3)_4\text{N}^+]$ contents of sea snails from the Korean coast using both liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and ion chromatography. For tetramine tested, good linearity ($r^2 = 0.9996$) was observed between the amounts in the injected samples and the peak areas of standard toxins, which ranged from 0.1 to 100 ng. The recovery (%) of tetramine from spiked tissue and mid-gut gland samples ranged from 84.0 to 95.3%. The quantitative results for tetramine using this method were in good agreement with the theoretical values. LC-MS/MS has both high sensitivity and selectivity, which makes it possible to measure trace quantities of tetramine in samples.

Key words: Tetramine, LC-MS/MS, Ion chromatography, Sea snail

서 론

최근 우리나라 연안해역의 권패류 섭취로 인한 식중독 사고가 산발적으로 발생하고 있는데, 그 원인물질은 tetramine으로 추정되고 있다. 식중독 원인 권패류로는 갈색띠매물고둥 (*Neptunea arthritica cumingii*), 조각매물고둥 (*Neptunea intersculpta*) 등이며, 이들 권패류에 함유된 4급 아민의 일종인 tetramine $[(\text{CH}_3)_4\text{N}^+]$ 은 운동신경마비 및 부교감 신경을 자극하여 두통, 어지러움, 멀미감, 구토, 시각장애 등을 유발시킨다 (Kawashima et al., 2002; Tazawa et al., 2004). Tetramine은 주로 권패류의 타액선에 분포하고, 사람에게 대한 중독량은 수십 mg으로 알려져 있다.

우리나라에서는 아직 공식적인 tetramine에 의한 식중독 사례는 없으나, 2002년 4월 2일에 강원도 춘천 가정집에서 소라, 굴 등을 먹고 소라독으로 추정되는 식중독에 의하여 19명의 환자가 발생한 예가 있다 (KFDA, 2003). 또한 2005년 3월 경, 조각매물고둥을 섭취하고 17명의 환자가 발생하여 조각매물고둥의 tetramine으로 추정하여 실험한 결과가 보고된 바 있다 (Kim et al., 2009). 또한, 인터넷상에서는 tetramine으로 추정되는 다수의 중독 사례를 검색할 수 있다. 일본에서는 1972년부터 1995년까지 권패류 섭취에 의한 tetramine 중독자 총 60명이 발생하였으나 사망자는 없었다 (Noguchi et al., 1997). 이 같은 중독사고의 대부분이 늦가을에서 초봄까지 빈번하게 발생하는 것으로 판단되며, 이것은 권패류가 이 시

기에 많이 생산되며 소비 또한 많기 때문인 것으로 사료된다.

일본이나 유럽 등의 외국에서는 권패류 종류별 tetramine 함량을 조사하여 식중독 예방을 위한 자료로 활용하고 있다 (Kawashima et al., 2002; Tazawa et al., 2004). 우리나라에서는 물레고둥과 권패류에 대한 tetramine 함량이 조사된 바 있고 (Jeon, 1990), 국립수산과학원에서는 2005년부터 ion chromatography에 의한 기기분석법을 확립하여 우리나라 연안에서 채취하여 유통되고 있는 권패류에 대하여 시기별, 지역별로 모니터링 하고, tetramine의 저장 안정성에 대한 연구를 하였다 (Mok et al., 2007).

지금까지 알려져 있는 tetramine의 정량방법으로는 마우스를 사용하는 mouse bioassay (Jeon et al., 1990; Kungswan et al., 1986), spectrophotometer를 이용한 비색법 (Kawashima et al., 2002; Fujii et al., 1992), mass spectrometry법 (Zhao et al., 1997; Kawashima et al., 2004) 및 ion chromatography법 (Shindo et al., 2000a; Shindo et al., 2000b) 등이 있다. 이 방법들은 간단하지만, 감도가 낮고 선택성이 없다는 단점이 있다. 그러나 LC-MS/MS에 의한 방법은 높은 선택성과 감도 때문에 적은 양의 시료로도 분석이 가능하다 (Kawashima et al., 2004).

수산물의 소비증가 및 종류의 다양화에 의한 식중독사고의 발생가능성은 점점 높아질 것이므로 해양생물독소에 대한 분석기술 확보를 통한 지속적인 관리가 절실히 필요하다. 따라서 최근 새로운 식품위생안전위해로 대두되고 있는 권패류 독소에 대한 위생안전 확보를 위하여 지금까지의 분석법 보다

*Corresponding author: mjs0620@nfrdi.go.kr

정밀하고 신속한 LC-MS/MS를 사용한 tetramine의 분석법을 확립하고, 기존에 확립되어 있던 ion chromatography법과 비교 검토하였다. 또한, 우리나라 연안에서 채취하여 유통되고 있는 갈색띠매물고등 중의 tetramine 함량 및 반복된 동결-해동 과정을 통한 tetramine 함량 변화를 확인하였다.

재료 및 방법

시료 및 시약

LC-MS/MS와 ion chromatography를 이용한 분석법 비교 및 동결해동에 따른 tetramine 함량 변화를 조사하기 위한 갈색띠매물고등 시료는 통영 시장에서 직접 구입하여 사용하였다. 그리고 구입한 시료는 폐각을 제거한 다음 시료의 내장부위를 제거하고, 타액선 (salivary gland)을 근육으로부터 분리하였으며, 이 때 개체 시료의 크기 및 각 부위별 중량 등을 측정하였다.

Tetramine 표준물질은 tetramethyl ammonium chloride (Merck, Darmstadt, Germany)를 사용하였고, 추출에 사용한 n-hexane (analytical grade), methanol (HPLC grade)은 Merck (Darmstadt, Germany)에서 구입하여 사용하였다. 이동상 제조에는 methanesulfonic acid (Sigma, St. Louis, MO, USA), pyridine (Sigma, St. Louis, MO, USA), formic acid (Fluka, Buchs, Germany) 및 acetonitrile (Merck, Darmstadt, Germany)을 사용하였으며, 탈이온수는 Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA)에서 정제하여 사용하였다.

Tetramine 추출

갈색띠매물고등 시료에 함유된 tetramine의 추출은 Mok et al. (2007)의 방법에 준하여 부위별로 각각 달리하여 추출하였다. 즉, 타액선의 경우 전체 시료에 10배의 methanol을 가하여 균질화하였으며, 근육과 내장은 균질화하여 10 g을 취하고 5배의 methanol을 가하여 5분간 균질화시켰다. 이것을 3,800 rpm에서 10분간 원심분리하여 여액은 따로 모으고, 침전물은 동량의 methanol을 가하여 반복 추출한 다음, 여액을 합하여 evaporator (Büchi R-200, Flawil, Switzerland)로 감압농축하였다. 고형물은 20 mL의 탈이온수에 완전히 용해시키고, 동량의 n-hexane을 가하여 3회 탈지시켰다. 분리된 hexane층을 제거하고 수층만 모아 evaporator로 농축한 후 타액선은 50 mL로, 근육과 내장은 10 mL로 각각 정용하여 0.2 µm filter (MFS-25; Advantec, Dublin, CA, USA)로 여과한 다음 기기분석용 시료로 사용하였다.

또한, 회수를 측정을 위하여 독이 없는 것으로 확인된 갈색띠매물고등의 근육 및 내장 시료에 tetramine 표준물질을 최종 0.1 µg/mL 농도가 되도록 첨가하여 위의 방법과 동일한 방법으로 추출한 뒤 기기분석에 사용하였다.

Ion chromatography 분석 조건

Ion chromatography에 의한 권패류 중의 tetramine 정량은 Mok et al. (2007)의 방법에 준하였으며, 분석조건은 table 1에 나타내었다. 분석에 사용한 column은 IonPac CS12 (250×4 mm; Dionex, Sunnyvale, CA, USA)였으며, 이동상으로는 20

mM methanesulfonic acid를 첨가한 10% acetonitrile 용액을 여과하여 사용하였다. 분석시 유속은 1.0 mL/min, 시료 주입량은 20 µL였다.

Table 1. Analysis conditions of Ion chromatography for tetramine

IC system	Dionex ICS-90
Column	Analysis column : IonPac CS12 (250×4 mm, Dionex) Guard column : IonPac CG12 (50×4 mm, Dionex)
Eluent	20 mM Methanesulfonic acid with 10% acetonitrile
Flow rate	1 mL/min
Detector	ES5 Detection stabilizer
Suppresser system	CSRS Ultra II (4 mm)
Injection volume	20 µL

Table 2. Analysis conditions of LC-MS/MS for tetramine

Instruments		Conditions	
Pump	Thermo Finnigan MS Pump plus	Injection volume	10 µL
Auto sampler & Column oven	Thermo Finnigan Surveyor Autosampler plus	Tray temperature	7°C
		Oven temperature	35°C
Column	cation-exchange Nucleosil 100-10SA		
Mass Spectrometer	Thermo Finnigan TSQ Quantum discovery Quadrupole type LC-MS/MS	Polarity	positive

Table 3. Optimized parameters of LC-MS/MS

Toxin	Q1 Mass (m/z)	Q3 Mass (m/z)	Parameters	
Tetramine	74 (RT 10.3)	58	Collision Energy	35 V
			Spray voltage	4,000 kV
			Capillary temp	340°C
			Aux gas	12 AU
			Sheath gas	60 AU

LC-MS/MS 분석 조건

LC-MS/MS를 이용한 tetramine 분석법 확립을 위하여 TSQ Quantum discovery triple-quadrupole mass spectrometer와 Surveyor MS Pump plus (Thermo electron, Finnigan, San Jose, CA, USA)를 사용하였고, column은 cation-exchange Nucleosil 100-10SA column (0.46×25 cm; Macherey Nagel, Düren, Germany)을 사용하였다. 본 시험에 사용된 분석기기 및 운전 조건은 Table 2에 나타내었다.

LC분리를 위한 이동상은 0.03 M pyridine-formic acid buffer (pH 3.1)가 포함된 20% Methanol을 사용하였다. 총 분석시간은 30분으로 flow rate를 1 mL/min으로 조정하였으며, 질량분석은 electrospray ionization (ESI)법으로 하였다.

Tetramine 검출을 위한 최적 운전 조건은 Table 3에 나타내

었다. Quadrupole type의 mass에서 SRM (Selected Reaction Monitoring) mode로 분석 시, Q1 mass에서 m/z 74로 고정하고, Q3 mass에서 m/z 58로 고정하였다. 또한 tetramine의 고유한 fragment ion들을 확인하기 위하여 m/z 30~100로 full scan하였다.

결과 및 고찰

LC-MS/MS를 이용한 tetramine 분석

LC-MS/MS법을 이용한 분석에서 HPLC column을 통과하여 나온 용리액은 ESI를 통해 MS/MS system으로 들어갈 때 7 : 3 (waste volume/introduced volume)의 split ratio를 주어야 한다 (Kawashima et al., 2007). 이것은 tetramine을 분리하는 column이 길기 때문에 유속을 1 mL/min로 설정해야 하고, MS/MS system에서 이온화시킬 때 유속이 0.3 mL/min 이하여야 하므로 분리되어 나온 용리액을 적절하게 split 시키는 것이 필요하다.

시험방법의 검증을 위하여 0.1~100 ng 범위의 표준물질을 사용하여 구한 검량선의 직선성은 $r^2=0.9996$ 이었으며, tetramine의 검출한계 (detection limit)는 S/N (signal to noise)비가 3 : 1인 표준물질의 peak를 기준으로 0.01 ng (1 ng/mL 표준물질을 HPLC에 10 μ L 주입한 절대량)이었다. 독이 없는 것으로 확인된 갈색띠매물고등의 근육 및 내장 시료에 표준물질을 0.1 μ g/mL 첨가하여 회수율을 측정 한 결과, 84.0~95.3% 이었다(Table 4). Codex (2008)에서는 회수율 측정시, 첨가한 표준물질의 농도가 0.1~10 μ g/g 범위에서는 80~110%, 0.01 μ g/g에서는 60~115% 및 0.001 μ g/g에서는 40~120%의 정확성을 요구하고 있으므로 본 시험 방법은 이에 부합되는

것으로 확인되었다.

Table 4. Recoveries (%) of tetramine standard from *Neptunea arthritica cumingii* by LC-MS/MS (n=3)

Tetramine(%)	
Meat 84.0±1.0	Mid-gut gland 95.3±1.5

위의 조건대로 표준물질 1 μ g/mL를 full scan 하였을 때, 각각의 fragment ion 42, 58, 74 등을 모두 확인할 수 있었다. 또한, 정량을 위하여 SRM mode에서 표준물질을 분석하였을 때 retention time이 10.3분대에 tetramine의 peak를 확인할 수 있었다. 한편, 고등시료에서 tetramine의 확인을 위하여 통영 지역의 시장에서 구입한 갈색띠매물고등 시료를 위 방법으로 전처리하고, 그것을 LC-MS/MS로 확인하였다. 이때, 추출액은 탈이온수를 이용하여 500배 희석시켜 분석하였다. 표준물질과 마찬가지로 scan이나 SRM mode를 사용하였을 때 모두 동일한 spectra를 얻을 수 있었다 (Fig. 1).

IC법과 LC-MS/MS법의 비교

권패류인 갈색띠매물고등의 tetramine 함량을 IC법으로 분석한 결과와 LC-MS/MS로 분석한 결과를 비교하여 Table 5에 나타내었다. 전체 시료는 물론 부위별 시료 분석결과도 LC-MS/MS법으로 분석하였을 때 더 높은 농도로 검출되었으며, 두 방법에는 약 9%의 차이가 있었다. 이것은 물질의 고유한 이온을 선택하여 정량하는 LC-MS/MS법의 특성상 보다 정확한 정량이 가능하기 때문이라고 사료된다. IC법은 수

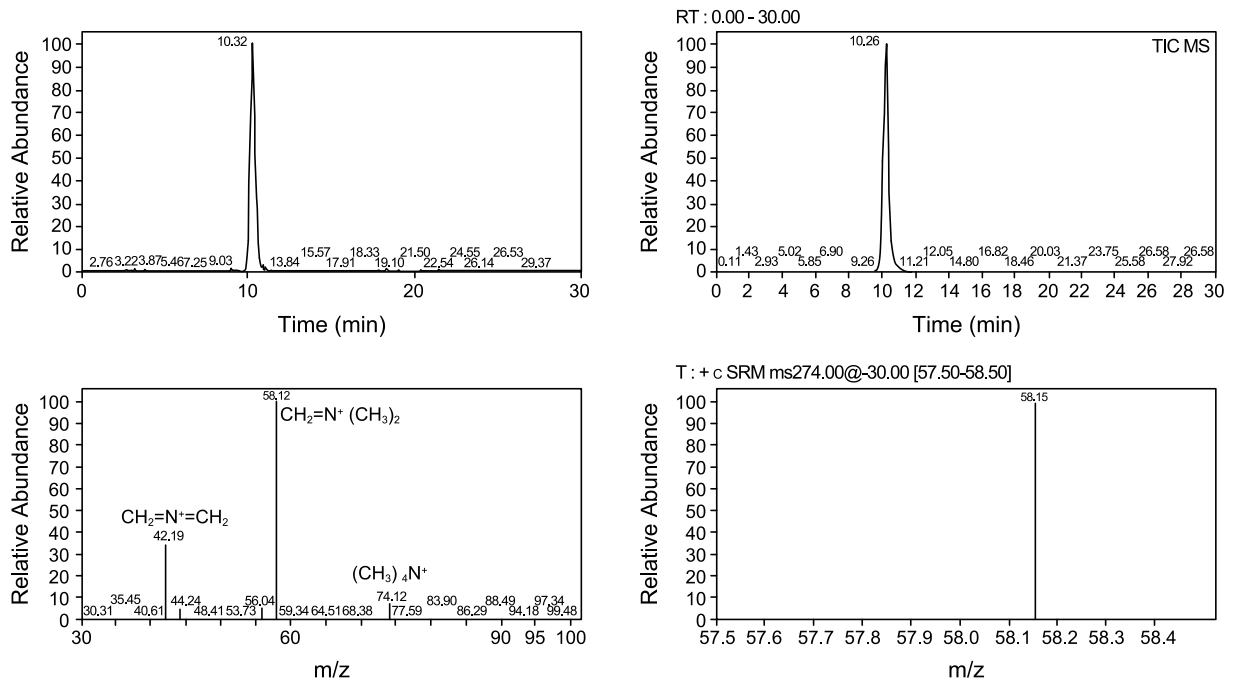


Fig. 1. Fragment ion spectra obtained from a full scan chromatogram and selected reaction monitoring (SRM) chromatogram of *Neptunea arthritica cumingii* sample.

Table 5. Comparison of tetramine concentrations in dissected tissues of *Neptunea arthritica cumingii* by IC and LC-MS/MS

Parts	Sample (n)	Tetramine ($\mu\text{g/g}$)	
		IC	LC-MS/MS
Salivary gland	5	25,207.7 \pm 360.7	26,791.0 \pm 222.7
Meat	5	568.0 \pm 26.8	580.2 \pm 28.8
Mid-gut gland	5	140.4 \pm 33.4	165.8 \pm 16.6
Total	5	5,001.4 \pm 184.4	5,735.0 \pm 161.5

용액 중에서 양이온이나 음이온으로 해리하는 화합물 (아민류, 핵산염기, 아미노산, 단백질, 유기산 등)을 분리하는 방법으로서 같은 전하를 가지는 이온들을 미세하고 작은 수지로 충전된 column을 통해 용리시켜 분리하게 된다 (Skoog et al., 1996). 그러나, 분석하고자 하는 물질이 아닌 같은 전하의 이온을 가진 다른 물질을 검출할 수 있다는 단점이 있다. 따라서 권패류 시료에서 tetramine 함량을 분석할 경우 정확한 물질의 이온을 타겟으로 하는 LC-MS/MS에 의한 분석이 보다 정확한 것으로 판단되었다. 또한 LC-MS/MS로 분석한 다른 보고 (Kawashima et al., 2004)에 의하면 갈색띠매물고등의 타액선 중에는 850~4,900 $\mu\text{g/g}$, 복방매물고등 (*Neptunea polycostata*)의 타액선 중에는 8,400~12,000 $\mu\text{g/g}$ 이 함유 되어 있으며, 육과 내장에는 낮은 농도가 존재하고 있다고 하였고, *Buccinum Schantarcicum*에는 10 $\mu\text{g/g}$ 이하의 적은량이 존재한다고 보고하였다. 이것은 LC-MS/MS로 분석하였을 때 타액선에 약 26.791 $\mu\text{g/g}$ 의 테트라민이 검출된 우리의 결과와 다소 상이하였는데, 이 차이는 우리나라와 일본의 기후조건 등 서식 환경은 물론 조사된 권패류의 종류 및 조사시기가 달라서 절대적인 비교는 하기 힘들기 때문이라고 판단되었다 (Mok et al., 2007).

동결 및 해동에 따른 갈색띠매물고등 중 tetramine의 변화

이전의 연구 (Mok et al., 2007)에서는 tetramine 표준물질 및 갈색띠매물고등으로부터 추출한 용액중의 냉동 (-18 $^{\circ}\text{C}$) 안정성을 시험한 결과 저장 1개월까지 95% 이상 tetramine이 잔존하여 냉동에서도 매우 안정한 것으로 확인되었다. 그러나 실제 권패류 시료 자체를 냉동 및 해동하였을 때 시험한 결과는 아직까지 보고된 바 없다.

일반적으로 시중에 유통되는 권패류 등은 판매과정에서 신선도 유지를 위하여 냉동보관 하였다가 해동하는 과정을 반복하는 경우가 많다. 이 경우 해동과정에서 식품내부의 빙 결정은 녹아 물이 되나, 그 일부는 원상태 대로 식품조직에 흡수되지 못하고 액즙 (drip)의 형태로 밖으로 유출되는데, drip이 유출되면 그만큼 식품의 무게가 줄어들 뿐만 아니라 단백질, 엑스분, 비타민, 염류 등의 여러 가지 가용성 성분이 함께 용출된다. 급속 동결 후 해동할 경우에는 해동경직 (thaw rigor)에 의해 많은 drip이 발생되어 (Park et al., 1994) 권패류의 내장에 포함되어 있던 tetramine이 가식부인 근육 쪽으로 이행될 가능성이 높다.

Table 6. Variation of tetramine concentrations by freezing and thawing in *Neptunea arthritica cumingii*

Prepared condition	Sample (n)	Tetramine ($\mu\text{g/individual}$)			
		Salivary gland	Meat	Mid-gut gland	Total
Not treated	5	8,027.5 \pm 253.7	8.2 \pm 1.7	22.8 \pm 2.2	8,059
Freezing (9 days)	5	2,318.5 \pm 127.8	64.6 \pm 7.8	2.5 \pm 0.2	2,385
Freezing and thawing (3 repeated)	5	1,693.4 \pm 76.9	196.0 \pm 15.6	59.8 \pm 4.3	1,949

따라서 동결 및 해동처리가 권패류의 타액선에 분포하는 tetramine에 미치는 영향을 알아보기 위하여 개체크기 73.3 \pm 7.2 g의 갈색띠매물고등을 사용하여 해동없이 9일간 동결한 것과, 3차례에 걸쳐 동결 및 해동을 반복한 것의 부위별 tetramine 함량 변화를 측정하였다.

갈색띠매물고등의 동결전 시료에서는 tetramine이 대부분 (99.6%) 타액선에 분포하였으나, 9일간 동결한 시료에서는 tetramine 함량이 낮아졌고, 동결과 해동을 반복함에 따라 타액선의 함량은 급격히 감소하였다. 그러나 동결전 0.1%의 검출율을 보였던 근육에서는 동결과 해동을 반복함에 따라 tetramine 함량이 증가하여 검출되었고, 내장에서도 동결과 해동을 반복함에 따라 tetramine이 점차 높게 검출되었다. 또한, 동결과 해동을 반복함에 따라 타액선의 tetramine은 최초 개체 당 8,028 μg 이던 것이 점점 감소하였으나, 근육과 내장에서의 함량은 오히려 증가하는 것을 알 수 있었다. 그리고 동결과 해동을 반복한 시료의 전체 독량은 무처리구의 독량에 비해 24% 정도 감소하였고, 동결과 해동을 반복한 시료는 일부 탈수가 일어나 시료는 약간 건조한 상태였다 (Table 6). 이상의 결과 타액선에서 tetramine 함량이 감소하고, 근육과 내장에서 증가하는 것은 동결과 해동의 반복에 의한 tetramine의 이행 때문인 것으로 여겨지며, 전체적인 tetramine 함량이 감소하는 것은 동결과 해동을 반복하면서 drip에 의하여 고등 내부에서 외부로 tetramine이 유출되었기 때문으로 판단된다.

사 사

본 연구는 국립수산물품질관리원 (수출 패류 생산해역 및 수산물 위생조사, RP-2011-FS-001)의 지원에 의해 수행되었습니다.

참고문헌

- Codex Alimentarius Commission. 2008. Report of the Thirty-first session, ALINORM 08/31/REP. Geneva, Switzerland.
- Fujii R, Moriwaki M, Tanaka K, Ogawa T, Mori E and Saito M. 1992. Spectrophotometric determination of tetramine in carnivorous gastropods with tetrabromophenolphthalein ethyl ester. J Food Hyg Soc Jap 33, 237-240.
- Jeon JK. 1990. Tetramine contents of buccinidae in the Korean waters. Bull Kor Fish Soc 23, 61-62.

- Kawashima Y, Nagashima Y and Shiomi K. 2002. Toxicity and tetramine contents of salivary glands from carnivorous gastropods. *J Food Hyg Soc Jap* 43, 385-388.
- Kawashima Y, Nagashima Y and Shiomi K. 2004. Determination of tetramine in marine gastropods by liquid chromatography/electrospray ionization-mass spectrometry. *Toxicon* 44, 185-191.
- KFDA. 2003. Occurrence of Food Poisoning (2002) Korea Food & Drug Administration, Seoul, Korea. 23.
- Kim JH, Lee KJ, Suzuki T, Kim CM, Lee JY, Mok JS and Lee TS. 2009. Identification of tetramine, a toxin in whelks, as the cause of a poisoning incident in Korea and the distribution of tetramine in fresh and boiled whelk (*Neptunea intersculpta*). *J Food Protec* 72, 1935-1940.
- Kungswan A, Noguchi T, Kanoh S and Hashimoto K. 1986. Assay method for tetramine in carnivorous gastropods. *Jap Soc Sci Fish* 52, 881-884.
- Mok JS, Son KT, Lee TS, Oh EG, Hwang HJ and Kim JH. 2007. Tetramine contents of sea snails from the Korean coast. *J Kor Fish Soc* 40, 63-67.
- Noguchi T, Abe T and Hashimoto K. 1997. A Pictorial Handbook of the Toxic Fisher Related to Food Hygiene. 191.
- Park YH, Jang DS, Kim SB. 1994. Fundamentals of Food Processing. HyungSeol Publish company, 679-680.
- Power AJ, Keegan BF and Nolan K. 2002. The seasonality and role of the neurotoxin tetramine in the salivary glands of the red whelk *Neptunea antigua* (L.). *Toxicon* 40, 419-425.
- Shindo T, Ushiyama H, Kan K, Saito H, Kuwahara Y, Uehara S and Yasuda K. 2000a. Study on contents of tetramine in salivary gland, meat and internal organs of buccinid gastropods (mollusca). *J Food Hyg Soc Jap*. 41, 17-22.
- Shindo T, Ushiyama H, Kan K, Saito H, Kuwahara Y, Uehara S and Yasuda K. 2000b. Determination of tetramine in gastropods (mollusca) by ion chromatography and the effect of cooking. *J Food Hyg Soc Jap* 41, 11-16.
- Skoog DA, West DM and Holler FJ. 1996. Fundamentals of Analytical Chemistry. 6th ed., Saunders College Publishing, PHL. U.S.A., 714.
- Tazawa T, Ishige M, Ueno K and Kuwahara Y. 2004. Study on tetramine content in salivary gland of sea snails(part II). *Rep Hokkaido Inst Pub Health* 54, 63-64.
- Zhao JY, Thibault P, Tazawa T and Quilliam MA. 1997. Analysis of tetramine in sea snails by capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr* 781, 555-564.

2011년 1월 11일 접수

2011년 1월 31일 수정

2011년 2월 10일 수리