

국내산 검복의 테트로도톡신 및 그 유사체 분석

박봉기¹ · 이현준¹ · 박종협¹ · Nobuhisa Kajino² · 최광식² · 이완옥² · 최창순³ · 이지현^{4*}

¹중앙대학교 식품공학과, ²제주대학교 해양생명과학과,

³중앙대학교 식품영양학과, ⁴서울대학교 식품영양학과

Determination of Tetrodotoxin and its Analog Composition in Korean *Takifugu porphyreus* Pufferfish

Bong Ki Park¹, Hyunjun Lee¹, Jonghyub Park¹, Nobuhisa Kajino², Kwang-Sik Choi²,
Wan-Ok Lee², Changsun Choi³, Jihyun Lee^{4*}

¹Department of Food Science and Technology, Chung-Ang University, Anseong, Korea

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

³Department of Food and Nutrition, Chung-Ang University, Anseong, Korea

⁴Department of Food and Nutrition, College of Human Ecology, Seoul National University, Seoul, Korea

(Received September 24, 2024/Revised October 8, 2024/Accepted October 8, 2024)

ABSTRACT - Tetrodotoxin (TTX) is a potent neurotoxin responsible for pufferfish poisoning. The tissue distribution of TTX and its analogs in *Takifugu porphyreus* pufferfish sold in the Korean market was determined using ultra-high-performance liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry in multiple reaction monitoring mode. The method detection limit for TTX was 0.006-0.009 mg/kg in high-fat and low-fat matrices. The intra-day (n = 5) and inter-day (3 days, n = 15) accuracy and precision results met the Codex guidelines. The ovaries of *T. porphyreus* pufferfish showed higher levels of TTX (up to 67.7 mg/kg) and its analogs compared to other tissues. Lower levels of TTX (non-detectable to 1.10 mg/kg) were found in the muscle and testis tissues, usually the edible parts of the pufferfish, than in other tissues. TrideoxyTTX was the major TTX analog across all tissues. This study contributes to the database of marine toxicity information on *T. porphyreus* species sold in Korea.

Key words: *Takifugu* species, Tetrodotoxin, DideoxyTTX, TrideoxyTTX

테트로도톡신(tetrodotoxin)은 신경독소로서 섭취 시 근육과 신경 세포의 나트륨 통로가 차단되어 나트륨 이온의 세포 내 투과성이 감소되고 활동 전위가 차단되어 매우 낮은 용량으로도 인체에 치명적인 증상을 유발할 수 있다⁽²⁾. 테트로도톡신에 중독될 경우 입술 및 혀끝의 가벼운 마비 증상을 시작으로 지각 마비, 혈압 저하, 전신 마비, 호흡 곤란 등의 증상이 발생되며 심할 경우 사망에 이를 수 있다⁽³⁾. 테트로도톡신은 해독제가 따로 없을 뿐 아니라 열에

도 안정적이며 섭취 시에도 특별한 맛이 없어 잦은 해양 독소 사고의 원인이 되고 있다^(4,5). 복어 섭취는 테트로도톡신 중독 사고의 가장 대표적인 원인으로 한국, 중국 및 일본과 같이 복어를 식용으로 섭취하는 지역에서 중독 사고가 빈번하게 발생하고 있다^(6,7). 국내의 경우 1991년부터 2002년까지 조사한 결과 총 32건의 복어독 중독 사고가 발생하여 111명이 중독되었고 27.0%의 치사율을 나타냈으며 2006년부터 2015년까지 복어 섭취로 인한 사망 사고가 17건 발생하였다^(3,8). 테트로도톡신은 복어뿐 아니라 문어, 육식성 복족류 등의 해양 생물에서 검출되었다고 보고된바 있다⁽⁹⁻¹³⁾. 현재까지 테트로도톡신과 유사한 화학적인 구조를 가진 최소 30종 이상의 테트로도톡신 유사체(analogues)가 보고된바 있으며 그 구조에 따라 독성이 다른데 대부분의 테트로도톡신 유사체의 경우 테트로도톡신의 독가(toxic equivalency factor, TEF)와 비교 시 대부분

*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 address: 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.

그 독가가 낮다고 알려져 있으나 oxo형과 같이 테트로도톡신과 독가가 유사한 유사체도 존재한다^{6,14}).

Mouse bioassay (MBA)법은 mouse를 사용하여 반수치 사시간으로부터 독성을 구하는 방법으로, 복어에서 테트로도톡신을 검출하기 위해 개발되었고 현재까지도 국내외에서 복어독 분석방법으로 사용되고 있다^{14,15}). MBA법의 경우 복잡한 기기 없이 테트로도톡신 및 테트로톡신 유사체 혹은 삭시톡신(saxitoxin)과 같은 다른 독소의 종합적인 독성을 평가할 수 있으나 테트로도톡신과 다른 독소의 각각의 독성을 확인할 수 없고, 특정 독소의 프로파일 제공이 어렵다는 단점과 동물복지 등의 윤리적인 문제가 있다¹⁴). 이를 대신하여 최근에는 높은 정확성, 정밀성을 가지며 우수한 동시 분석 능력으로 테트로도톡신과 그 유사체의 식별 및 정량 분석이 가능한 liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS)와 같은 질량분석기를 사용한 분석법에 대한 연구가 진행되고 있다¹⁶).

검복(*Takifugu porphyreus*)은 참복과 참복속(*Takifugu*)의 복어로 우리나라의 동해와 남해에 서식하는 중형종으로 특히 동해안 지방에서 많이 식용으로 사용되고 있는 복어 종이다^{7,17}). 일본 후생노동성에서는 검복의 정소 및 근육 부위를 가식 부위로 지정하였다¹⁸). 검복의 등쪽은 검은 갈색 바탕이며 어릴 때에는 흰색 반점이 있으나, 성어가 되며 차츰 사라지고 몸의 옆쪽 가운데에는 황색의 세로띠가 있으나 마찬가지로 성장함에 따라 희미해지고 가슴지느러미 뒤쪽에 큰 검은색 반점과 흑색 등지느러미 및 황색 뒷지느러미의 외형적 특성을 갖고 있으며 몸 전체에 피부극이 없다⁷). 국내 유통 중인 검복의 안전성 연구는 MBA법에 국한되어 있고 LC-MS/MS를 사용한 테트로도톡신 및 그 유사체 연구는 이루어진 바가 없다. 따라서, 본 연구에서는 국내 유통 중인 검복의 부위별 테트로도톡신 및 그 유사체를 조사하였다. 본 연구는 국내 유통되는 검복의 안전성에 대한 소비자의 이해를 돕고, 복어독에 대한 안전관리의 기반을 마련하기 위한 기초 자료를 제공할 수 있겠다.

Materials and Methods

표준품 및 시약

테트로도톡신 표준품은 TTX citrate standard (>99%)를 Alomone Laboratories (Jerusalem, Israel)로부터 구매하여 사용하였고, 테트로도톡신 유사체인 4,9-anhydroTTX 표준품(>98%)을 Cayman chemical (AnnArbor, MI, USA)사에서 구매하여 사용하였다. 아세토니트릴(acetonitrile, ACN)과 메탄올(methanol, MeOH)은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) 각각 J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA)사, Honeywell (Charlotte, NC, USA)사의 HPLC 등급의 제품을 사용하였다. 그 외 초산(acetic acid)은 Sigma-Aldrich에서 구입하여 사용하였으며, ammonium acetate는 Fisher

Scientific (Loughborough, UK)사에서 구입하여 사용하였다. 증류수는 초순수 제조기(Milli-Q Direct 8, Merck Millipore, Billerica, MA, USA)로 제조된 정제된 증류수를 사용하였다. 또한 solid phase extraction (SPE) 카트리지는 Sep-Pak C18 SPE 카트리지(6 cc/1 g; Waters, Milford, MA, USA)를 활성화 과정을 거쳐 시료 정제에 사용하였다.

실험 재료

본 연구에 사용된 시료는 2021년 3월에 강원도 동해의 수산시장에서 유통되고 있는 검복 10개체를 구매하여 사용하였다. 구매한 국내산 검복 시료는 수산시장에서 사진을 찍어 제주대학교 최광식 교수와 이완옥 박사로부터 종동정을 확인한 뒤 분석용 시료로 사용하였으며 생물학적 정보는 Table 1과 같다. 구매한 복어는 실험실에 도착하는 즉시 급속 냉동하여 영하 20°C 이하에서 냉동 보관하였으며 해체 전에 냉장고(약 4°C)에서 24시간 동안 해동하였다. 해동된 복어 시료는 간, 난소, 정소, 껍질, 근육 부위로 해체하였으며 껍질과 근육 부위의 경우 내장과 접촉하지 않은 꼬리 지느러미 부위의 조직을 분석에 사용하여 내장으로부터의 교차 오염을 방지하였다.

시료추출 및 정제

복어 시료 중 테트로도톡신 및 그 유사체의 추출 및 정제 방법은 Park 등¹⁹의 연구를 참고하여 분석하였다. 균질화된 검복 부위별 시료 1 g에 1% 초산을 함유한 메탄올 용액 3 mL를 넣고, 5분간 볼텍스 믹서(Vortex Mixer GENIE II, Scientific Industries, Bohemia, NY, USA)로 진탕한 후 초음파세척기(CPX3800H-E, Branson Ultrasonics, Danbury, CT, USA)로 5분간 초음파 처리하였다. 이때 식품의약품안전처 영양표시 가이드라인²⁰에 의하면 식품 100 g 당 3 g 미만일 시 저지방으로 표시하며, Park 등¹⁹의 연구에서 복어의 간, 난소, 정소, 껍질은 지방 함량이 3%을 초과하였

Table 1. Biometric parameters of the *Takifugu porphyreus* samples

Sample ID (sex)	Length (cm)	Weight (g)
Tp1 (F)	38	804
Tp2 (F)	30	486
Tp3 (F)	32	508
Tp4 (F)	31	432
Tp5 (F)	25	282
Tp6 (M)	31	473
Tp7 (M)	30	465
Tp8 (M)	30	438
Tp9 (M)	29	458
Tp10 (M)	30	590

으므로 고지방 부위로 분류하였고, 근육은 지방 함량이 3% 미만이었기에 저지방 부위로 각각 분류하였으며 고지방 부위의 경우 지방 제거를 위해 freezing lipid precipitation 방법으로 정제하였다. 그 후 4°C에서 4495 ×g의 속도로 15분간 원심 분리한 후, 상층액을 취하였다. 위의 추출 과정을 한번 더 반복하였으며 상층액을 모아 1% 초산을 함유한 메탄올을 가하여 10 mL가 되도록 정용하였다. Sep-Pak C18 SPE 카트리지가(6 cc/1 g; Waters)는 미리 메탄올 5 mL, 물 5 mL를 순차적으로 넣어 활성화시킨 뒤 활성화된 카트리지에 추출액 1 mL를 가한 후, 메탄올 4 mL로 용출하였다. 용출액은 질소 농축기(MG-2200, EYELA, Tokyo, Japan)를 이용하여 1 mL로 농축한 뒤 멤브레인 필터로 여과하여 LC-MS/MS를 이용하여 분석하였다.

기기분석조건

복어 시료 중 테트로도톡신 및 그 유사체는 LC-MS/MS로 분석하였으며 Park 등¹⁹⁾이 제시한 기기분석조건을 참고하였다. LC system은 Agilent (Santa Clara, CA, USA)사의 1290 Infinity II 2D ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC)장비를 사용하였으며, 질량분석기는 Agilent사의 6470B triple-quadrupole (QqQ) mass spectrometer를 사용하였다. 분석용 컬럼은 Waters사의 VanGuard pre-column (2.1 mm×5 mm, 1.7 μm)이 장착된 ACQUITY UPLC Glycan BEH Amide (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm) 제품을 사용하였다. 이동상 A는 5 mM ammonium acetate와 0.01% 초산을 함유한 물을, 이동상 B는 5 mM ammonium acetate와 0.01% 초산을 함유한 9:1 부피비의 아세트니트릴과 물을 사용하였으며 이동상 B를 97%로 시작하여 5.0분까지 63.4%로 감소시켜 6.0분에 50%까지 감소시켰다. 그 후 12.0분까지 97%까지 올려주는 용매구배(gradient) 조건을 사용하였으며, 총 분석시간은 12분이었다. 이동상은 0.3 mL/min의 유속으로 흘러주었다. 질량 분석기의 분석 조건은 electrospray ionization (ESI)법의 positive ion mode에서 fragmentor voltage, gas temperature, gas flow는 각각 161 V, 275°C, 11 L/min로 설정하였으며 capillary voltage는 2500 V로 설정하였다. 질량분석기 분석 시 테트로도톡신 및 그 유사체의 선구 이온(precursor ion)을 선택한 한 뒤, 생성 이온(product ion)을 생성하여 가장 좋은 감도를 보이는 이온을 정량 이온(quantifier ion)으로, 다음으로 크게 검출되는 두 개 혹은 한 개의 이온을 정성 이온(qualifier ions)으로 설정하여 multiple reaction monitoring (MRM) mode 조건을 확립하였다. MRM 분석에서 TTX와 4-*epi*TTX의 선구 이온으로부터 정량 이온 전이는 m/z 320.1>302.0로 설정하였으며, 정성 이온 전이는 m/z 320.1>162.0와 m/z 320.1>284.0로 설정하여 확인하였다. deoxyTTX이성질체의 정량 이온 전이는 m/z 304.1>286.0, 정성 이온 전이는 m/z 304.1>162.0로 설정하였다. 4,9-anhydroTTX의 정량 이온 전이는 m/z 302.1>162.0,

정성 이온 전이는 m/z 302.1>256.0로 설정하였으며 norTTX 이성질체의 정량 이온 전이는 m/z 290.0>272.0, 정성 이온 전이는 m/z 290.0>162.0로 설정하였다. dideoxyTTX이성질체의 정량 이온 전이는 m/z 288.1>270.0, 정성 이온 전이는 m/z 288.1>224.0로 설정하였으며 trideoxyTTX 이성질체는 정량 이온 전이는 m/z 272.1>254.0, 정성 이온 전이는 m/z 272.1>162.0로 설정하였다. 테트로도톡신 분석을 위해 선정된 정량 이온과 정성 이온은 기존의 연구들과 일치하였으며, 4,9-anhydroTTX를 제외한 상업용 표준품이 존재하지 않는 테트로도톡신 유사체의 경우 MS scan을 통해 본 연구와 유사한 분석 조건으로 수행된 기존 문헌의 fragmentation pattern 및 머무름 시간(retention time, Rt)을 비교하여 정성하였다^{19,21)}. 테트로도톡신 유사체는 mg tetrodotoxin analogue/kg tissue로 나타내었으며 테트로도톡신의 검량선을 사용하여 상대 정량하였다.

분석법 검증

본 연구에서 테트로도톡신 분석법 검증은 international conference on harmonization (ICH) 가이드라인²²⁾에 따라 직선성(linearity), 검출한계(limit of detection, LOD), 정량한계(limit of quantification, LOQ), 정확성(accuracy) 및 정밀성(precision)을 확인하였다. 직선성은 테트로도톡신이 들어있지 않음을 확인한 자주복의 고지방 부위 시료와 저지방 부위 시료(공시료)에 각각 테트로도톡신 표준용액을 첨가한 뒤 ‘시료추출 및 정제’ 방법에 따라 최종 농도를 0.1, 0.2, 0.5, 0.7, 1.0 mg/kg 수준으로 처리하여 수행하였으며, 농도 별로 5회 분석하여 검량선의 결정계수(coefficient of determination)를 구하였다. Park 등¹⁹⁾의 연구결과에 따르면 높은 매질 효과(matrix effect)가 복어의 모든 부위에서 확인되었기에 검량선은 매질 보정 검량선(matrix-matched calibration curve)을 사용하여 결과를 산출하였다. 검출한계 (LOD) 및 정량한계 (LOQ)는 ICH 가이드라인²²⁾에서 제시한 기기반응의 표준편차와 검량선의 기울기 평균에 근거하는 아래 산출 방법에 대입하여 구하였다.

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

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

(σ : 반응의 표준편차, S: 검량선의 기울기)

정확성(accuracy)은 회수율(%recovery)로 나타내었으며 테트로도톡신이 들어있지 않은 자주복의 부위별 공시료에 테트로도톡신 표준용액을 주입한 뒤 ‘시료추출 및 정제’ 방법에 따라 처리하여 최종 농도가 0.1, 0.7, 1.0 mg/kg이 되도록 한 다음 5 반복 실험하여 일내(intra-day) 회수율 및 일간(inter-day, 3일) 회수율을 산출하였다. 또한, 회수율의 정밀성(precision)은 상대표준편차(%relative standard deviation, %RSD)로 나타내었으며 검증하기 위해 5반복 회수율로부터 일내(intra-day) 상대표준편차 및 일간(inter-

day, 3일) 상대표준편차를 구하였다.

통계분석

본 실험에서 통계적 유의성은 IBM SPSS Statistics Software v.23.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) 프로그램을 사용하여 검복 내 부위별 테트로도톡신 함량 분석 결과를 일원배치 분산분석(one-way analysis of variance)를 통해 분석 후 통계 처리하였으며, 사후 검정으로 Duncan's multiple range test를 사용하여 $P<0.05$ 의 유의 수준에서 통계적 유의성을 검정하였다.

Results and Discussion

분석법 검증 결과

복어의 부위별 시료에서 테트로도톡신 검량선의 직선성, 정확성, 정밀성, 검출한계, 정량한계 등 유효성 검증에 대한 결과는 Table 2와 같다. 고지방 부위와 저지방부위 검량선의 결정계수(r^2)가 각각 0.9999, 0.9996으로 양호한 직선성을 보였으며 정확성은 일내 및 일간 회수율(%recovery)로 산출하였으며 정밀성은 일내 및 일간 상대표준편차(%relative standard deviation, %RSD)로 나타내었다. 일내 및 일간 정확성은 범위가 복어의 부위 및 테트로도톡신 농도에 따라 회수율이 각각 93.3-112.7%, 98.7-109.3%의 범위였으며, 일내 및 일간 정밀성은 상대표준편차의 범위가 각각 1.3-7.8%, 3.0-7.9%의 범위로 모두 CODEX 가이드라인(Codex Alimentarius guideline)²³에서 제안하는 검증 기준을 만족하였다. 고지방부위의 검출한계와 정량한계는 각각 0.009 mg/kg, 0.028 mg/kg이었으며, 저지방부위의 검출한계와 정량한계는 각각 0.006 mg/kg, 0.019 mg/kg수준으로 검출한계와 정량한계 모두 기존 문헌에서 보고된 수치와 비교하여 비슷하거나 우수한 수치를 나타내었다²⁴.

국내산 검복의 부위별 테트로도톡신 함량 분석 결과

본 연구에서는 검복 10개체의 부위별 테트로도톡신 함량 분석을 진행하였으며 결과는 Table 3과 같다. 테트로도톡신 함량이 정량한계 미만인 경우 불검출(not detected, ND)로 표기하였다. 테트로도톡신은 정소를 제외한 모든 부위에서 검출되었으며 특히 Tp2 간 시료와 정소를 제외한 모든 시료에서 테트로도톡신이 검출되었다. 정소를 제외한 부위별 테트로도톡신 함량은 난소에서 0.27-67.7 mg/kg으로 가장 높은 함량을 보였고, 껍질(0.12-25.2 mg/kg), 간(N.D.-11.5 mg/kg), 근육(0.03-1.10 mg/kg) 순이었다($P<0.05$). Table 4는 본 연구 결과와 기존 연구에서 보고된 국내산 혹은 일본산 검복의 부위별 테트로도톡신 분석 연구 결과이다. Jeong 등²⁵의 연구결과에서는 국내에서 시판되는 검복의 모든 부위에서 테트로도톡신이 검출되지 않았다. Kim 등¹⁷의 연구에 따르면 MBA법을 이용하여 분석한 결과 국내 연안산 검복의 간, 난소, 정소, 껍질, 근육에서 각각 <5-531, <5-116, <5, <5-118, <5-5 mouse unit (MU)/g이 검출되었으며 국내 연안에서 채집한 검복의 평균 독성은 난소가 가장 높고 근육과 정소가 낮은 독성을 보였는데 이는 본 연구 결과와도 일치한다. Honda 등²⁶의 연구에 따르면 MBA법을 이용하여 분석한 일본산 검복의 껍질에서도 <10-12 MU/g의 독성이 검출되었다. 국내산 검복의 MBA법 분석 결과 비교 시 1994년에는 모든 부위에서 독성이 검출되지 않았으나 2006년 Kim 등¹⁷의 연구결과와 본 연구결과에서는 정소와 근육을 제외한 부위에서 테트로도톡신이 검출되었다. Magarlamov 등²⁷에 따르면, 테트로도톡신은 박테리아에 의하여 생산되며 먹이사슬을 통해 복어 내에 생체 축적될 수 있다. 테트로도톡신 함량은 같은 복어 종이라도 먹이의 종류와 양, 채집 시기 및 지역 등에 따라 차이가 날 수 있으며, 해양 온난화로 인한 수온 상승과 같은 환경적인 요인도 함량에 영향을 미칠 수 있다¹⁹. 국내의 경우 복어독에 대한 규격 및 기준은 육질에서 10 MU/g

Table 2. 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 ¹⁾ (mg/kg)	MQL ²⁾ (mg/kg)	Concentration (mg/kg)	Intra-day Recovery (%)	Inter-day Recovery (%)	Intra-day RSD ³⁾ (%)	Inter-day RSD (%)
High-fat matrix: Liver	$y = 10500x + 15.37$	0.9999	0.009	0.028	0.1	96.9	109.3	7.7	7.5
					0.7	93.6	102.6	5.2	4.0
					1.0	100.6	101.9	3.4	6.2
Low-fat matrix: Muscle	$y = 7414.4x - 26.023$	0.9996	0.006	0.019	0.1	112.7	100.7	7.8	7.9
					0.7	93.3	99.2	6.3	3.0
					1.0	96.1	98.7	1.3	4.8

¹⁾MDL: method detection limit.
²⁾MQL: method quantitation limit.
³⁾RSD: relative standard deviation.

Table 3. Tetrodotoxin levels in various tissues of *Takifugu porphyreus*

Species	Sample ID (sex)	Liver (mg/kg)	Ovary (mg/kg)	Testis (mg/kg)	Skin (mg/kg)	Muscle (mg/kg)
<i>T. porphyreus</i>	Tp1 (F)	0.56±0.03	26.6±2.5	–	0.90±0.09	0.55±0.04
	Tp2 (F)	N.D.	2.64±0.09	–	0.12±0.01	0.03±0.00
	Tp3 (F)	0.30±0.02	38.6±3.8	–	7.95±0.70	0.49±0.04
	Tp4 (F)	1.43±0.12	67.7±5.8	–	17.7±1.3	0.54±0.04
	Tp5 (F)	11.5±0.9	0.27±0.02	–	25.2±1.9	1.10±0.08
	Tp6 (M)	0.47±0.03	–	N.D.	8.32±0.18	0.09±0.01
	Tp7 (M)	0.10±0.01	–	N.D.	1.89±0.16	0.11±0.01
	Tp8 (M)	0.03±0.00	–	N.D.	1.10±0.04	0.09±0.01
	Tp9 (M)	0.09±0.01	–	N.D.	2.10±0.17	0.13±0.01
	Tp10 (M)	1.58±0.02	–	N.D.	20.9±0.5	0.39±0.04
	Average (Range)	1.61±3.52 ^b (N.D.-11.5)	27.2±27.8 ^a (0.27-67.7)	N.D.	8.62±9.34 ^b (0.12-25.2)	0.35±0.33 ^b (0.03-1.10)

The values are mean±standard deviation; - : not applicable; N.D. : not detected (below method quantitation limit, MQL). Mean values followed by different superscript letters indicate significant differences in contents of tetrodotoxin in various tissues ($P < 0.05$).

Table 4. Tetrodotoxin content in the tissues of *Takifugu porphyreus* reported in previous and present studies

Species	Analysis method	Location	Liver (mg/kg)	Ovary (mg/kg)	Testis (mg/kg)	Skin (mg/kg)	Muscle (mg/kg)	Reference
<i>T. porphyreus</i> (n = 10)	UHPLC-QqQ	South Korea	N.D.-11.5	0.27-67.7	N.D.	0.12-25.2	0.03-1.10	This study
<i>T. porphyreus</i> (n = 43)	MBA	South Korea	<1-106* (<5-531 MU/g)	<1-23.2* (<5-116 MU/g)	<1* (<5 MU/g)	<1-23.6* (<5-118 MU/g)	<1* (<5 MU/g)	(17)
<i>T. porphyreus</i> (n = 5)	MBA	South Korea	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	(25)
<i>T. porphyreus</i> (n = 5)	MBA	Japan	–	–	–	<2-2.4* (<10-12 MU/g)	–	(26)

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

이하로 기준치를 설정하여 관리하고 있으며, 식품위생학적 관점에서도 10 MU/g 미만은 무해한 것으로 간주하고 있다^{15,28}. Biessy 등²⁾은 테트로도톡신 0.2 µg을 1 MU값으로 환산하여 표기하였으며 본 연구의 검복 내 부위별 테트로도톡신 함량 분석 결과를 해당 연구의 환산식에 대입하여 MU값으로 환산 시 일본에서 가식부로 지정된 국내산 검복의 정소와 근육 부위에서 6 MU/g 이하의 테트로도톡신이 검출되어 안전한 것으로 확인되었다¹⁸⁾.

국내산 검복의 부위별 테트로도톡신 유사체 분석 결과

국내산 검복에서 테트로도톡신 유사체 중 4,9-anhydroTTX, deoxyTTX 이성질체 2종, dideoxyTTX 2종, trideoxyTTX 이성질체 1종, norTTX 이성질체 1 종을 포함하여 총 7종의 테트로도톡신 유사체가 확인되었으며, 4,9-anhydroTTX는 표준품을 사용하여 확인되었다^{19,21)}. 모든 시료에서

epiTTX는 검출되지 않았다. 검복의 부위별 테트로도톡신 유사체의 함량 및 조성(%)은 Fig. 1에 나타내었다. 테트로도톡신 유사체는 테트로도톡신의 매질 보정 검량선(matrix-matched calibration curve)을 이용하여 상대 정량하였으며, 데이터 표현을 간소화하기 위해 이성질체의 경우 그 함량을 합산하여 총 6개의 그룹으로 범주화하였고 mg TTX analogue/kg tissue로 나타내었다. 검복의 부위별 총 테트로도톡신 유사체 함량은 난소에서 가장 높고 꺾질, 간 순으로 나타났으며, 이는 국내산 검복의 테트로도톡신 함량 분석 결과와 일치하는 결과로 테트로도톡신 함량이 높은 부위가 총 테트로도톡신 유사체 함량도 높은 경향을 보였다. Christidis 등²⁹⁾은 참복과 밀복속 복어인 은미복 (*Lagocephalus sceleratus*)에서 테트로도톡신 농도와 여러 테트로도톡신 유사체 간의 유의미한 양의 상관관계를 보고하였다. Jang 등³⁰⁾은 검복과 같은 참복속인 복섭(*Takifugu niphobles*)의

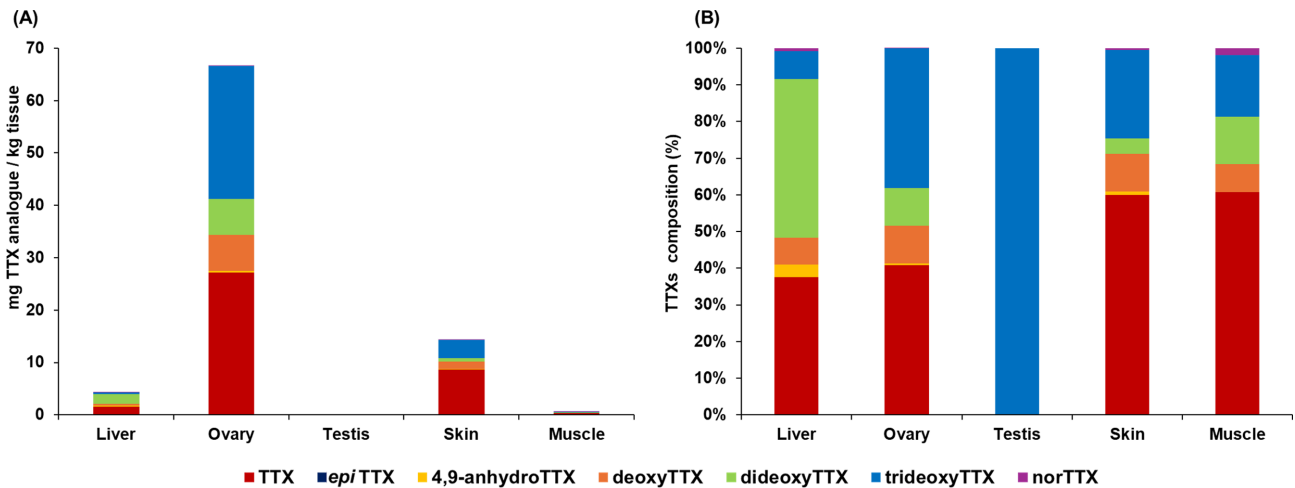


Fig. 1. Tetrodotoxin (TTX) and its analogue (A) contents and (B) composition in various tissues of *Takifugu porphyreus*.

난소, 간과 껍질에서 높은 수준의 테트로도톡신 유사체 함량을 보고하였으며 이는 본 연구 결과와도 유사한 경향을 보인다. 국내산 검복의 주요 테트로도톡신 유사체는 난소와 껍질 부위에서 trideoxyTTX였으며 간에서는 trideoxyTTX와 더불어 dideoxyTTX가 주요 테트로도톡신 유사체로 나타났다. Park 등¹⁹⁾의 연구에 따르면, 검복과 같은 참복속에 속하는 자주복(*Takifugu rubripes*), 참복(*Takifugu chinensis*)의 대부분의 부위에서 주요 테트로도톡신 유사체로 trideoxyTTX가 보고되었다. Jang 등³⁰⁾은 5,6,11-trideoxyTTX는 한국산 복섬의 주요 테트로도톡신 유사체로 5,6,11-trideoxyTTX와 6,11-dideoxyTTX가 검출되었다고 보고하였다. 기존 연구에서 11-oxoTTX를 제외한 테트로도톡신 유사체는 테트로도톡신에 비해 상대적으로 낮은 독성을 가지고 있다고 보고된 바 있으며, 특히 5,6,11-trideoxyTTX는 테트로도톡신의 독가와 비교할 때 약 100배 정도 낮은 독가를 가지고 있으며 6,11-dideoxyTTX는 테트로도톡신과 비교하여 약 400배 낮은 전압 개폐 나트륨 통로 차단 활성을 보였다고 보고되었다^{14,31)}. 따라서 국내산 검복의 주요 테트로도톡신 유사체는 dideoxyTTX 혹은 trideoxyTTX로 확인된 만큼 그 독성도 낮을 것으로 사료된다.

Acknowledgments

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

국문요약

본 연구에서는 국내산 검복의 테트로도톡신 및 그 유사체를 UHPLC-QqQ MS를 이용하여 분석하였다. 테트로도톡신 분석법의 직선성, 검출 한계, 정량 한계, 정확성 및 정밀성을

확인한 뒤 국내산 검복의 부위별 테트로도톡신 함량을 분석한 결과 대부분의 시료에서 테트로도톡신이 검출되었으며 정소를 제외한 모든 부위에서 테트로도톡신이 검출되었다. 검복의 테트로도톡신 함량은 난소에서 0.27-67.7 mg/kg으로 가장 높았으며 껍질과 간에서도 가시 부위인 정소와 근육에 비해 높은 농도의 테트로도톡신이 검출되었다. 테트로도톡신 유사체의 경우, 국내산 검복에서 4,9-anhydroTTX, deoxyTTX, dideoxyTTX, trideoxyTTX, norTTX가 검출되었으며 이 중 trideoxyTTX는 국내산 검복의 모든 부위에서 주요 테트로도톡신 유사체로 확인되었다. 본 연구를 통해 국내산 검복의 테트로도톡신 및 그 유사체 함량 및 조성을 이해하고, 국내 해양생물 독소 연구에 해당정보가 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

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

References

- Hwang, D.F., Noguchi, T., Tetrodotoxin poisoning. *Adv. in Food Nutr. Res.*, **52**, 141-236 (2007).

2. 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).
3. Jeong, I.N., Lee, H.J., Choi, S.W., Considerations & suggestions on the analysis of characteristics of domestic unnatural death by tetrodotoxin in the postmortem investigation. *J. Police Sci.*, **18**, 247-262 (2018).
4. Soong, T.W., Venkatesh, B., Adaptive evolution of tetrodotoxin resistance in animals. *Trends Genet.*, **22**, 621-626 (2006).
5. Turner, A.D., Powell, A., Schofield, A., Lees, D.N., Baker-Austin, C., Detection of the pufferfish toxin tetrodotoxin in European bivalves, England, 2013 to 2014. *Euro Surveill.*, **20**, 21009 (2015).
6. Katikou, P., Gokbulut, C., Kosker, A.R., Campàs, M., Ozogul, F., An updated review of tetrodotoxin and its peculiarities. *Mar. Drugs.*, **20**, 47 (2022).
7. 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.
8. Kim, J.H., Gong, Q.L., Mok, J.S., Min, J.G., Lee, T.S., Park, J.H., Characteristics of puffer fish poisoning outbreaks in Korea (1991-2002). *J. Food Hyg. Saf.*, **18**, 133-138 (2003).
9. Zhang, Y., Zou, S., Yin, S., Wang, T., Source, ecological function, toxicity and resistance of Tetrodotoxin (TTX) in TTX-bearing organisms: a comprehensive review. *Toxin Rev.*, **42**, 727-740 (2023).
10. 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).
11. 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).
12. 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).
13. Hanifin, C.T., Gilly, W.F., Evolutionary history of a complex adaptation: tetrodotoxin resistance in salamanders. *Evolution*, **69**, 232-244 (2015).
14. 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).
15. Ministry of Food and Drug Safety of the Republic of Korea (MFDS). (2024, September 19). Food code. Retrieved from <https://various.foodsafetykorea.go.kr/fsd/#/ext/Document/FC>
16. Hu, C., Zhang, Y., Zhou, Y., Xiang, Y.J.Y., Liu, Z.F., Wang, Z.H., Feng, X.S., Tetrodotoxin and its analogues in food: Recent updates on sample preparation and analytical methods since 2012. *J. Agric. Food. Chem.*, **70**, 12249-12269 (2022).
17. 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).
18. Ministry of Health, Labour and Welfare of Japanese government (MHLW). (2024, September 19). New rules for measures to secure sanitation regarding pufferfish. Retrieved from <https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000094363.html>
19. 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).
20. Ministry of Food and Drug Safety of the Republic of Korea (MFDS). (2024, September 19). 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.
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. Jeong, D.Y., Kim, D.S., Lee, M.J., Kim, S.R., Byun, D.S., Kim, H.D., Park, Y.H., Toxicity of several puffers collected at a fish market of Pusan, Korea. *Korean J. Fish. Aquat. Sci.*, **27**, 682-689 (1994).
26. Honda, S., Ichimaru, S., Arakawa, O., Takatani, T., Noguchi,

- T., Ishizaki, S., Nagashima, Y., Toxicity of puffer fish fins. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, **48**, 159-162 (2007).
27. 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).
 28. Kawabata, T., 1978. Tetrodotoxin. In: the manual for the methods of food sanitation tests, vol. II. bureau of environmental health ministry of health and welfare, food hygiene association, Tokyo, Japan, pp. 232.
 29. Christidis, G., Mandalakis, M., Anastasiou, T.I., Tserpes, G., Peristeraki, P., Somarakis, S., Keeping *Lagocephalus sceleratus* off the table: sources of variation in the quantity of TTX, TTX analogues, and risk of tetrodotoxication. *Toxins*, **13**, 896 (2021).
 30. 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).
 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).