pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 33, No. 2, pp. 110~117 (2018)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2018.33.2.110

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

LC-MS/MS 및 GC-MS/MS를 활용한 수산물 중 디아제팜의 정량분석법 개발

신다솜 · 강희승*· 김주혜 · 정지윤 · 이규식
식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 식품위해평가부 잔류물질과

Development of the Analytical Method for Diazepam in Fishery Products using Liquid and Gas Chromatography-tandem Mass Spectrometry

Dasom Shin, Hui-Seung Kang*, Joohye Kim, Jiyoon Jeong, and Gyu-Seek Rhee
Pesticide and Veterinary Drug Residues Division, National Institute of Food & Drug Safety Evaluation, Cheongju, Korea
(Received October 16, 2017/Revised November 10, 2017/Accepted February 20, 2018)

ABSTRACT - The aim of this study was to develop an analytical method for the quantification of diazepam residues in fishery products, using liquid and gas chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS and GC-MS/MS). The sample utilized in the study was extracted from the fish sample (crucian carp) using 0.1% formic acid in acetonitrile. For the utilization of the purification process, the dispersive solid phase extraction (dSPE) was used for LC-MS/MS, dSPE and SPE was used for GC-MS/MS, respectively. To be sure, the standard calibration curves showed a good linearity as the noted correlation coefficients, r^2 was > 0.99. The average recoveries for accuracy ranged in 99.8~124% for the samples which were fortified at three different levels (0.001, 0.002 and 0.010 mg/kg). The correlation coefficient for the precision effect was measured at a range of 4.01~11.8%. The limit of detection (LOD) for the diazepam analysis was 0.0004 mg/kg, and the limit of the quantification (LOQ) was 0.001 mg/kg. The proposed analytical method was characterized with a high accuracy and acceptable sensitivity to meet the established Codex Alimentarius Commission (CAC/GL71-2009) guideline requirements. We therefore established the optimal analysis method for the determination of diazepam in the fishery products using LC-MS/MS and GC-MS/MS. It would be applicable to analyze the diazepam residues in fishery products in further studies on this subject.

Key words : Diazepam, Analytical method, Fishery products, LC-MS/MS, GC-MS/MS

디아제팜(Diazepam)은 벤조디아제핀(Benzodiazepine)계 향정신성의약품으로 신경전달물질인 GABA의 효과를 향상시켜 진정작용, 수면작용, 항불안작용, 항경련작용, 근육이완과 기억상실을 일으키는 것으로 알려져 있으며[1], 알코올 중독이나 근육경련 치료에 사용되기도 한다. 미국에서는 항불안, 항경련, 진정, 최면유도, 스트레스성 질환의 보조치료제로 사용되고 있으며, 중국에서는 향정신성 약물인 디아제팜의 사용이 합법적이나 진통제, 다이어트약 등에서 오남용 되어 검출되는 것으로 보고되고 있다[2]. 반면, 우리나라에서는 내성, 중독 등 안전관리를 위하여 법적으로 금지하고 있으며, 각국의 규제기관에서도 약물의 잔류로 인한 인체, 환경 등에 대한 위해성을 지속적으로 제기하고 있다[3].

축수산 식품 중 디아제팜 분석법으로는 LC-MS/MS 및 GC-MS/MS가 이용되고 있으며[4-8] 고체상 추출(solid phase extraction, SPE) 등의 정제법이 많이 활용 되어 왔다. 그러나 카트리지를 사용하는 정제법은 유기용매의 사용이 많고 소요시간이 길어 단시간에 분석해 낼 수 없는 어려움이 있기 때문에 신속하고 간단한 QuEChERS법을 기반으로 한 dSPE (dispersive solid phase extraction)를 사용하는 시험법에 적용하는 추세이다[9-11]. Li 등[12] 연구에서는 수산물 중 디아제팜 및 그 대사체(nordiazepam, temazpam, and oxazepam)의 분석이 가능한 연구를 진행하였지만, Baron 등[13] 연구에 따르면 송어(trout)에 대한 디아제팜 원물질의 분석법을 보고하였다.

Mottaleb 등[8]에 따르면 유통되는 생선필렛에서 디아제팜이 1.96~16.6 ng/g 수준으로 검출 되고 있음을 보여주었다. 또한 중국산 붕어에서 디아제팜 1.5 μg/kg이 검출되었

*Correspondence to: Hui-Seung Kang, Pesticide and Veterinary Drug Residues Division, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation#187 Osongsaengmyeong 2ro, Osong-eup, Heungdeok-gu, Cheongju-si, Chungcheongbuk-do 28159, Korea
Tel: 82-43-719-4208, Fax: 82-43-719-4200
E-mail: hskang1235@korea.kr

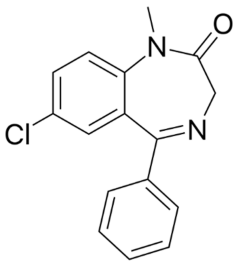
음을 식약처 위해정보 시스템을 통해 통보되었다. 축수산물 중 디아제팜에 대한 시험법이 여러 선행 연구에서 보고되고 있으나, 우리나라 수산물에 대한 디아제팜 분석 및 모니터링은 보고된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 국내 양식 및 수입 수산물에서의 디아제팜의 잔류여부를 판정할 수 있는 고감도(정량한계 0.001 mg/kg 이하)의 공인된 분석법을 개발하고자 하였으며, 향후 수입식품 및 국내 수산물에 대한 디아제팜 안전관리를 위한 정량시험법으로 활용에 기여하고자 하였다.

Materials and Methods

시약 및 재료

디아제팜(diazepam)은 향정신성 의약품에 해당되어 마약류 관리에 관한 법률 제 4조에 따라 사용을 승인받았으며, 식품의약품안전처 의약품연구과 표준품(200 mg/vial, 98%)을 분양 받아 사용하였다(Table 1). 추출 및 분석에 사용되는 아세토니트릴(acetonitrile), 메탄올(methanol) 등은 Merck (Darmstadt, Hesse, Germany)에서 HPLC 등급으로 사용하였고, 무수황산마그네슘(magenssium sulfate anhydrous, ≥ 98%), 염화나트륨(sodium chloride), primary secondary amine (PSA)등 그 이외의 분석용 시약 및 용매는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)와 Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)에서 구입하여 특급 또는 분석용을 사용하였다. 또한, 고상추출(SPE, solid phase extraction) 카트리지(cartridge)는 C_{18} (6 mL, 500 mg)로 Waters (Milford, MA, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 활성화 과정을 거쳐 추출물을 흡착시킨 후 용출하는 과정에 사용하였다. 시료를 여과하기 위해 여과용 필터 polytetrafluoroethylene (PTFE) syringe filter는 Teknokroma (Sant Cugat Del Valles, Barcelona, Spain)제품을 사용하였다. 시험용 시료는 시중에서 유통되고 있는 붕어를 대상으로 껍질, 내장을 제거한 부위(근육)만을 분쇄하여 균질화하였다. 균질화한 시료는 분석 전까지 냉동고(–20°C)에 보관하였다. 공시료(blank) 시험을 거쳐 디아제팜이 잔류되지 않음을 확인한 후 시험용 시료로 사용하였다.

Table 1. Molecular structure and physico-chemical properties of diazepam

Property	Content
IUPAC Name	7-chloro-1-methyl-5-phenyl-3H-1,4-benzodiazepin-2-one
CAS No.	439-14-5
Classification	benzodiazepines
Molecular formula	$C_{16}H_{13}ClN_2O$
Molecular weight	284.743 g/mol
Melting point	257-259°F
Log P_{ow}	2.82
pKa	3.40
Vapor pressure	2.80×10^{-8} mm Hg (25°C)
Solubility in water	50 mg/L (at 25°C)
Solubility in solvent	ether: 1 g/ 39 mL, chloroform: 1 g/ 2 mL soluble in DMF benzene, acetone
Structure	

표준원액 및 표준용액의 조제

디아제팜 표준품 50 mg을 저울로 정밀히 달아 50 mL 볼륨플라스크에 메탄올로 정용하여, 1000 mg/L (1000 ppm)이 되도록 표준원액을 조제하였다. LC-MS/MS의 경우 이를 아세토니트릴로 단계적으로 적당한 농도로 희석하여 표준용액으로 각각 준비하였다. GC-MS/MS의 경우 시험법에 적용되는 matrix matched calibration을 위해 표준원액을 아세토니트릴로 희석하여 시료 각각에 해당하는 표준용액 200 μL 첨가하여 시료 전처리 과정과 동일하게 처리한 것을 matrix matched standard로 준비하였다. 표준원액과 표준용액은 갈색 유리병에 담아 4°C 냉장실에 보관하면서 실험 직전에 희석하여 사용하였다.

추출 및 정제

LC-MS/MS의 경우 균질화한 검체 2 g을 50 mL 원심 분리관에 취하여 0.1% 개미산을 함유한 아세토니트릴 10 mL를 첨가한 후 강하게 균질화한 후, 무수황산마그네슘 1.2 g과 염화나트륨 1 g을 차례로 가하고 3분간 진탕하였다. 완전히 혼합한 후 4°C, 4,500 g에서 10분간 원심분리하고 상등액을 취하였다. PSA (primary secondary amine) 250 mg이 담긴 50 mL 원심 분리관에 추출하여 얻은 용액을 넣고 1분간 강하게 흔들고 이를 4°C, 4,500 g에서 10분간 원심분리하여 상층액 중 절반을 취하여 전량 질소농축한 후 아세토니트릴 1 mL를 가하여 잔여물을 용해시켰다. 0.2 μm PTFE 멤브레인 필터로 여과하여 시험액을 바이알에 담아 시험용액으로 하였다(Fig. 1).

GC-MS/MS의 경우 균질화한 검체 2 g을 50 mL 원심 분리관에 취하여 0.1% 개미산을 함유한 아세토니트릴 20 mL를 첨가한 후 초음파세척기에서 5 min 간 진동을 가하였다. 완전히 혼합한 후 4°C, 4,500 g에서 10분간 원심분리하고 상등액을 취하였다. 50°C의 조건에서 약 1 mL가 되도록 질소 농축한 뒤, 물 4 mL를 첨가하여 균일하게 혼합

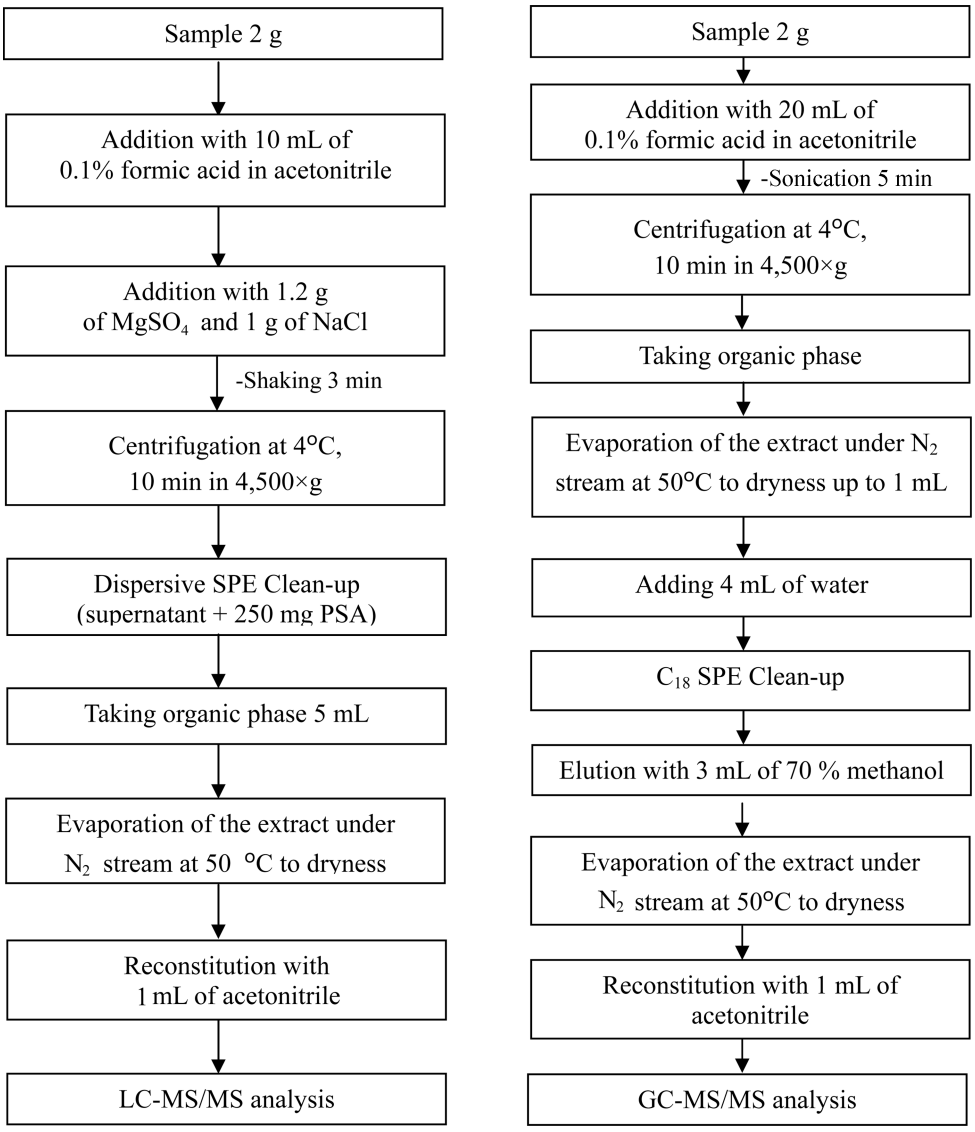


Fig. 1. Analytical procedure for diazepam in sample.

하였다. C_{18} 카트리지에 메탄올 3 mL, 물 3 mL를 순서대로 넣고 활성화시켰다. 추출액을 카트리지에 통과시키고 50% 메탄올 수용액 3 mL로 세척하고, 70% 메탄올 3 mL를 이용하여 용출하였다. 용출액을 50°C의 조건에서 전량 질소 농축한 후, 아세토니트릴 1 mL를 이용하여 잔여물을 용해시켰다. 0.2 μm PTFE 멤브레인 필터로 여과하여 시험액을 바이알에 담아 시험용액으로 하였다(Fig. 1).

기기분석조건

LC-MS/MS의 경우 수산물 시료 중 디아제팜 분석을 위하여 액체크로마토그래프-질량분석기(liquid chromatography-tandem mass spectrometer, LC-MS/MS, US/Xevo TQ-S, Waters, Milford, MA, USA)를 사용하였고, 분석용 컬럼은 역상컬럼인 X-SELECT C_{18} (2.1 × 150 mm, 3.5 μm, Dublin, Ireland)를 사용하였으며, 컬럼 온도는 40°C를 유지하였다. 이동상 A는 0.1% 개미산, 이동상 B는 5 mM 암모늄포메이트, 0.1% 개미산을 함유한 아세토니트릴을 선택하여 최적화된 기울기 용리 방식을 적용하였다. 유속은 0.3 mL/min, 주입량은 5 μL로 하였다. 질량분석기 조건 확립을 위해서 디아제팜 표준용액(100 ng/mL)을 사용하여 컬럼을 통과하지 않고 질량분석기로 직접 주입하여 분석하였다. 이온화법은 전기분무이온화(electro-spray ionization, ESI)법의 양이온모드(positive-ion mode)를 사용하여 물질의 전구이온(precursor ion)을 선택하였고, 충돌에너지(collision energy)를 조절하여 토막이온(product ion)을 생성한 후 정량 및 정성이온을 결정하는 multiple reaction monitoring (MRM)조건을 확립하였다(Table 2). LC-MS/MS의 기기분석 조건은 Table 3에 제시하였다.

Table 2. Mass spectrometry parameters for quantification and confirmation for diazepam

Instrument	Retention time (min)	Exact mass (*m/z*)	Precursor ion (*m/z*)	Product ion (*m/z*)	Collision energy (eV)
LC-MS/MS	6.62	284	286	224	23
				194*	25
				155	25
GC-MS/MS	13.1		256	221*	20
				206	40
				165	40

*Quantification ion

Table 3. LC-MS/MS parameter for diazepam analysis

LC system	Waters, UPLC		
Column	Waters X-SELECT ® C_{18} (2.1 mm i.d. × 150 mm, 3.5 μm)		
Column temp.	40°C		
Injection vol.	5 μL		
Flow rate	0.3 mL/min.		
Mobile phase	A = 0.1% formic acid in water B = 0.1% formic acid, 5 mM ammonium formate in acetonitrile		
Gradient	Time (min)	Mobile phase	
		A(%)	B(%)
	0	10	90
	6	10	90
	8	90	10
	8.1	90	10
	11	90	10
Mass spectrometry	Waters, Xevo TQ-S		
Ionization mode	ESI positive		
Capillary temp.	350°C		
Spray voltage	3.8 kV		
Collision gas	Ar		

GC-MS/MS의 경우 디아제팜 분석을 위해 수산물 시료 추출을 통해 얻어진 시험용액을 DB-5 (30 m × 0.25 mm, i.d. 0.25 μm)를 장착하여 디아제팜의 머무름시간을 확보하였으며, 분석을 위하여 Agilent 사의 7890 GC system 이 장착된 질량분석기(Agilent 7010 GC/MS Triple Quad, Santa Clara, KA, USA)를 사용하여 기기에 1 μL를 주입하였다. 또한, 운반가스는 질소(N_2)를 0.9 mL/min의 유속으로 흘려주었다. 컬럼 온도는 150°C에서 시료를 주입하고, 1분간 유지한 후에, 10°C/min으로 승온하여 290°C까지 올려 4분간 머물게 한 다음, 10°C/min으로 승온시켜 300°C까지 올려 10분간 머물게 하였다. 주입구의 온도는 290°C로 설정하였으며, dwell time은 133 msec이었다. GC-MS/MS 기기분석 조건은 Table 4에 나타내었다.

Table 4. GC-MS/MS parameter for diazepam analysis

GC MS/MS	Agilent 7890 GC system, 7010 GC/MS Triple Quad
Column	DB-5MS (30 m × 0.25 mm, i.d. 0.25 μm)
Oven temperature	150°C (1 min)→10°C /min→290°C (4 min)→10°C /min→300°C(10 min)
Injector temperature	290°C
Interphase temperature	275°C
Ion source	230°C
Injection volume	1 μL
Carrier gas flow	0.9 mL/min (N_2)

분석법 검증

확립된 시험법은 CODEX 가이드라인(Codex Alimentarius Commission, CAC/GL-71)[15]에 따라서 정확성(accuracy), 정밀성(precision), 직선성(linearity), 검출한계(limit of detection, LOD), 정량한계(limit of quantification LOQ), 회수율(recovery)에 대해 유효성을 검증하였다. LC-MS/MS를 이용한 디아제팜 분석법 검증의 직선성은 LOQ농도의 1, 2, 4, 8, 10, 12, 20배가 되도록 표준원액을 아세토니트릴로 희석한 표준용액을 이용하여 LC-MS/MS에 주입하여 얻어진 피크면적으로 검량곡선을 작성하고 직선성을 구하였다. GC-MS/MS의 경우 디아제팜의 분석 시 수산물 시료의 매트릭스의 영향을 최소화 하기 위해 matrix matched 검량선을 사용하였다. 이를 위해 LOQ 농도의 1, 2, 4, 8, 10, 12배가 되도록 공시료에 표준용액을 농도별로 첨가하여 동일한 분석법이 적용된 시험액을 이용하였다. 두 기기 모두 정확성과 정밀성은 공시료에 LOQ를 기준으로 1, 2 및 10배 농도로 표준용액을 첨가 한 후, 회수율과 상대표준편차(relative standard deviation, RSD, %)를 측정하였으며, 각 5반복 실험을 통하여 평가하였다. LOD는 각 신호 대 잡음비(signal to noise ratio, S/N ratio) 3배 이상인 농도로 계산하였으며, LOQ는 S/N ratio가 10배 이상인 농도로 계산하였다.

Results and Discussion

LC-MS/MS를 이용한 분석법 선정 및 조건확립

LC-MS/MS는 고감도의 선택성으로 인해 축수산물 중 동물용의약품 분석에 가장 일반적으로 사용되는 분석법 중 하나이다[16]. 따라서 디아제팜 정량을 위한 방법으로 고감도 및 빠르고 정확한 정량분석이 가능한 LC-MS/MS를 이용하였다. 본 분석법에서는 QuEChERS법을 기반으로하여 카트리지를 사용하지 않아 전처리법이 매우 간단하며, 전처리에 소요되는 시간이 2시 이상에서 1시간 내로 단축되어 매우 효율적인 방법이라 할 수 있다. 유기용매도 상대적으로 매우 적게 사용되었다. 이온화법으로는 전기분무이온화법(ESI)의 positive ion mode 및 multiple reaction monitoring (MRM) mode 조건으로 분석되었다. 표준용액(10 μL/min)을 질량검출기에 직접 주입하여 cone voltage (20-50 V)조절을 통해 30 V에서 최대 강도를 나타내는 것을 확인하였다. 또한, 선구이온(precursor ion)은 full scan mode 에서 질량 스펙트럼을 확인하여 디아제팜의 질량 값(exact mass, M)에 양성자(H+)가 결합된 [M+H]+ 형태인 *m/z* 286의 선구이온을 확인하였다. MS/MS 분석 시 collision energy를 조절하여 product ion의 감도와 S/N ratio가 최적이 되도록 조정하였으며, 그 결과 모든 조건을 만족하는 precursor/product ion pair를 선정하였다. 그 중 가장 좋은 감도를 나타내는 product ion을 정량이온인 *m/z* 194와 다음으로 높은 감도를 나타내는 *m/z* 224, 155를 정성이온(confirmation ion)으로 선택하였다. 3개 이상의 생성이온을 확인하여 최적의 MRM 조건을 확립하였으며, 선정된 이온과 머무름 시간은 Table 3에 나타내었다.

LC-MS/MS를 이용한 추출 및 정제조건 확립

디아제팜은 Log P_{ow} 값이 3.40로 비극성 물질이며, pKa가 2.82 (in water)로 수용액 상태에서 약산성에 가까운 중성 물질이라 할 수 있다. 주로 단백질로 이루어진 수산물 시료를 추출할 때 아세토니트릴은 추출에 있어서 효율적인 용매이며, 산성화 된 아세토니트릴은 단백질을 침전시키는데 도움을 준다. 전처리에서의 단백질 침전과정은 매트릭스 효과를 줄여 줄 뿐만 아니라 지질을 제거하는데 용이하다[14]. 따라서 추출 용매로 0.1% 개미산을 함유한 아세토니트릴을 이용하여 1회 추출하였다. 이때, 비극성 물질 류와 함께 아세토니트릴 층으로 분배된다. 추출용매와 함께 황산마그네슘과 염화나트륨을 함께 넣어 유기층과 수분층을 분리하여 분석 중 극성 불순물 및 수분을 황산마그네슘과 염화나트륨 층으로 분배시켜 매트릭스 간섭을 최소화 하였다. QuEChERS를 기반으로 한 정제과정에서는 PSA 흡착제(sorbent)를 선택하였다. PSA의 표면은 지방산을 선택적으로 흡수 할 수 있는 많은 1차, 2차 아미노기를 포함하고 있기 때문에[12], 수산물 시료 중 추출물의 주된 간섭물인 지방산을 제거 할 것이라 판단하였다. 시료로부터 디아제팜을 아세토니트릴로 추출하여 불순물을 제거 후 PSA를 이용하여 정제하고 전량 농축 후 재용해하는 분석법을 확립하였다.

GC-MS/MS를 이용한 분석법 선정 및 조건확립

분석 시험법은 중국인민공화국 국가 표준 시험법(GB 29697-2013)을 기반으로 하여 추출용매 및 정제 등 전처리 방법을 개선하였다. 디아제팜은 휘발성이 낮은 편이나, GC 사용 온도 범위 내에서 기화 되고, 분자 내에 할로겐족 원소를 보유하고 있는 비극성 화합물이기 때문에 GC를 이용하여 큰 문제없이 분석 가능하다. 기기조건은 GB 29697-2013 시험법과 동일하게 적용하였다.

GC-MS/MS를 이용한 추출 및 정제조건 확립

수산물 샘플은 지질, 지방 등을 포함하는 매트릭스가 복잡하기 때문에 기기분석 전 추출, 정제 및 농축배수 등 분석을 위한 정확한 전처리가 필요하다. 0.1% 개미산을 함유한 아세토니트릴을 이용해 추출하였고, 정제를 위해 대상물질의 특성을 파악한 뒤, 분배하여 선택적으로 포집한 후 특성물질만 추출 해낼 수 있는 특성을 가진 역상 카트리지인 C_{18}을 사용하였다. 지질 등의 비극성이 더 강한 불순물을 제거하여 SPE를 통해 전체적인 시료 전처리의 효율을 증대시켰다. 중국인민공화국 국가 표준 시험법에 있는 n-hexane을 이용한 지방제거 과정은 축산물에 비하여 지질 함량이 적은 수산물의 경우 생략을 통해 분석대상의 손실을 줄일 수 있었다. 기존의 분석법은 질소하에서 농축 후 아세토니트릴 200 μL로 재용해하나, 앞의 추출 용매의 양보다 적어 질소 농축 시 튜브 내벽의 디아제팜을 충분히 재용해 할 수 없었다. 따라서 재용해 용매인 아세토니트릴의 최종 용량을 1 mL로 개선하여 회수율을 30% 이상 높일 수 있었다.

분석법 검증

디아제팜 분석법의 선택성(selectivity), 특이성(specificity), 직선성(linearity)을 검증하기 위해 수산물의 무처리 시료, 표준용액, 표준용액을 첨가한 회수율 시료의 크로마토그램을 서로 비교하였다(Fig. 2 and 3). 그 결과, 무처리 검체 중 디아제팜과 같은 머무름 시간을 갖는 어떤 방해물질도 검출되지 않았다. 따라서, 디아제팜을 분석하기 위한 본 시험법이 높은 분리능과 선택성을 가짐을 확인할 수 있었다. 정량한계는 크로마토그램 상에서 S/N ratio를 10 이상으로 하여 0.001 mg/kg으로 나타났고, 정량한계를 포함한 1, 2, 4, 8, 10, 20, 40배가 되도록 검량곡선을 작성하였다(Fig. 4). 상관계수가 0.99 이상으로 CODEX에서 권장하는 $r^2 > 0.98$와 비교해도 매우 만족할 만한 수준이었다. 본 시험법의 정확성을 평가하기 위하여 수산물의 처리농

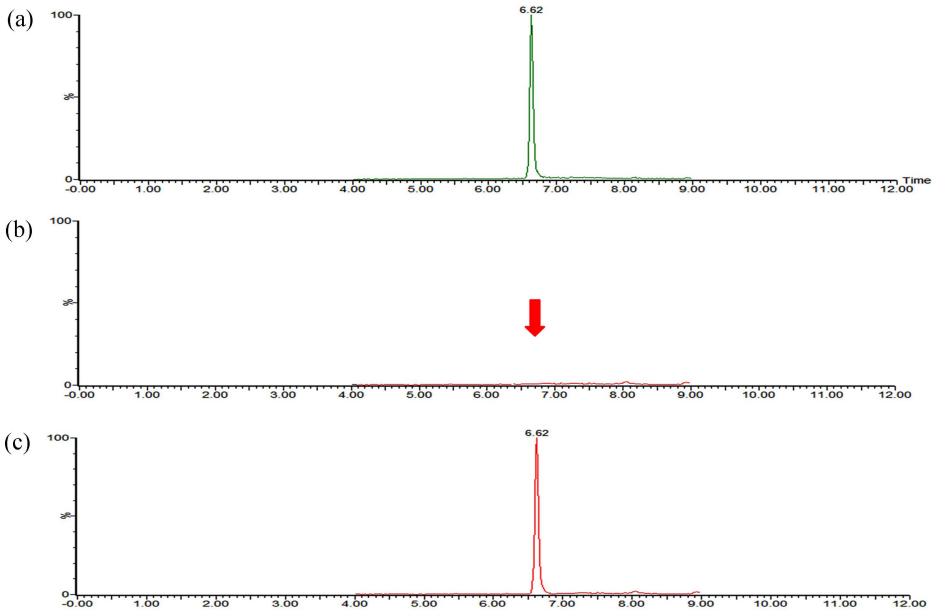


Fig. 2. LC-MS/MS chromatogram of diazepam (*m/z* 286 → *m/z* 194) in fishery products sample, chromatogram of diazepam in standard at 0.001 mg/kg (a), blank fishery products sample (b) and fortified sample at 0.001 mg/kg (c).

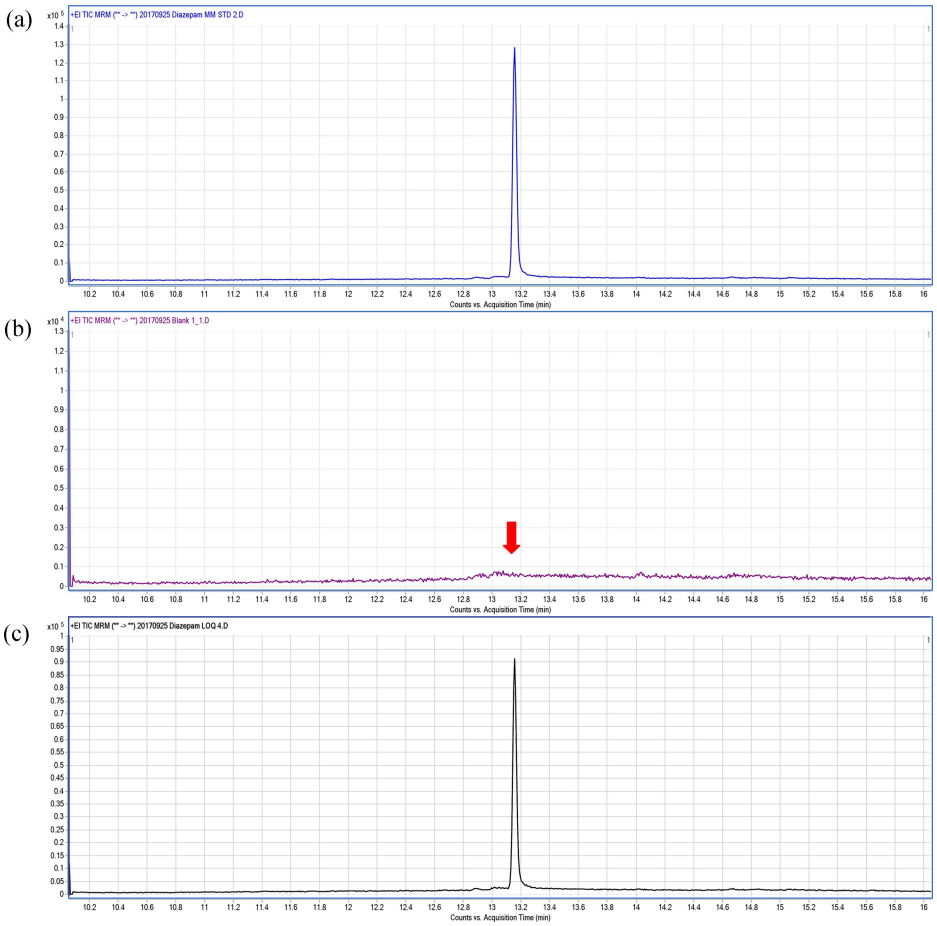
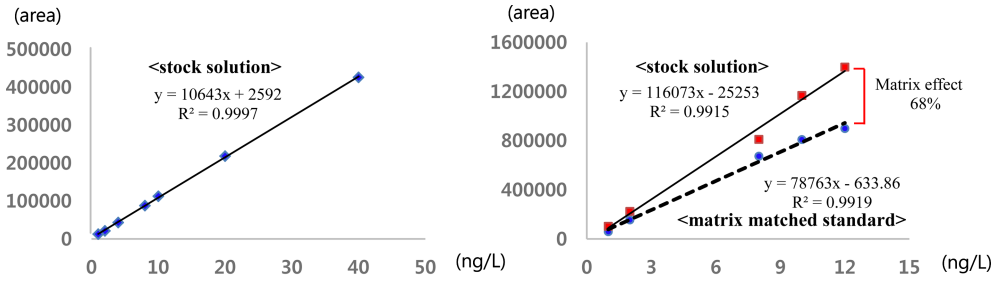


Fig. 3. GC-MS/MS chromatogram of diazepam (*m/z* 256 → *m/z* 221) in fishery products sample, chromatogram of diazepam in standard at 0.001 mg/kg (a), blank fishery products sample (b) and fortified sample at 0.001 mg/kg (c).



LC-MS/MS GC-MS/MS

Fig. 4. Standard calibration curve ranges, linearities and correlation coefficients (r^2) of diazepam in fishery product.

Table 5. Validation results for the analytical method of diazepam in fishery product (n = 5)

Concentration (mg/kg)	LC-MS/MS		GC-MS/MS	
	Recovery (%)	CV (%)	Recovery (%)	CV (%)
0.01 (LOQ)	106 ± 11.1	10.4	109 ± 6.62	6.02
0.02 (2 × LOQ)	102 ± 5.91	5.79	124 ± 14.7	11.8
0.1 (10 × LOQ)	99.8 ± 7.70	7.72	123 ± 4.96	4.01

도를 정량한계의 1, 2, 10배 농도가 되도록 표준용액을 첨가하여 회수율 실험을 5회 반복으로 수행하여 정확성과 정밀성을 평가하였다. 그 결과 수산물 시료의 디아제팜 평균 회수율과 정밀성(coefficient variation, CV)는 LC-MS/MS의 경우 99.8~106%, 5.79~10.4%, GC-MS/MS의 경우 109~124%, 4.01~11.8%로 조사되어 정확성과 정밀성 모두 CODEX 가이드라인의 권장기준을 충족하여 잔류동물용의약품 시험법의 적합성을 확인할 수 있었다(Table 5). 두가지 분석법 모두 CODEX 가이드라인을 충족하는 수준이나 GC-MS/MS를 이용할 경우 matrix effect가 −68%가 발생하여 matrix-matched standard calibration이 필요할 것으로 사료된다. 따라서 LC-MS/MS를 이용한 분석법이 전처리 및 분석시간을 단축시키는데 더 용이한 것으로 보인다. Lopez-Garcia 등[17]에 따르면 우유 및 분유에서의 LC-MS/MS를 이용한 40종의 의약품을 분석한 결과, 디아제팜의 회수율은 41-62% 수준이었으나, 내부표준물질(internal standard)로 보정할 경우 97-105%의 회수율을 보였다. 뿐만 아니라 우유샘플에서 약 −50%의 matrix effect를 나타냄을 확인할 수 있었다. 또한 인체시료 중 혈액에서의 LC-MS/MS를 이용한 디아제팜 및 그 대사체의 분석결과 약 37-50% 수준에서의 matrix effect를 보여주었다[18]. 본 연구에서는 단성분을 분석하였기 때문에 LC-MS/MS분석에서 matrix effect가 나타나지 않았으나, 향후 축수산물에서 디아제팜 및 그 대사체 분석법 개발 시 matrix effect를 고려할 필요가 있을 것으로 사료된다.

Baron 등[13] 선행연구 에서는 송어(Trout)에 대한 디아제팜의 원물질 분석결과만 보고하였으나, 다른 선행연구에 따르면 디아제팜의 주요 대사물질인 옥사제팜(oxazepam), 테마제팜(temazepam), 노르디아제팜(nordiazepam)을 고려하여 분석법을 개발하였다[12,18]. 따라서, 디아제팜 원물질이 수산물 내에서 어떻게 대사되는지 고려하여 원물질과 대사체를 동시에 분석할 수 있도록 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

중국산 붕어는 매년 천톤 가량이 국내로 수입되고 있으며 동물용의약품, 중금속 등 국내 식품 기준에 따라 검사를 통해 적합 여부를 확인하고 있다. 2017년 8월 중국 산동성 식약국의 유통식품 검사결과 붕어에서 유해물질 검출 부적합 정보(1.5 ppb 검출)가 주칭다오총영사관을 통해 통보 됨에 따라서 적합한 검사 기준 적용 및 모니터링을 위하여 디아제팜 시험법을 개발하였다. 본 연구에서 확립한 시험법은 수산물에 적용되는 분석법으로 수입식품 및 국내 수산물 안전관리와 더불어 불법사용에 대해 긴급 대응할 수 있을 것으로 사료되는 바이다.

Acknowledgement

본 연구는 식품의약품안전처 연구개발과제(17161MFDS-651)에 의해 수행되었습니다.

국문요약

본 연구는 국내 생산 및 수입 양식 수산물에 대해 잔류할 수 있는 향정신성 의약품인 디아제팜 대한 안전관리 강화기반을 위해 마련되었다. 중국인민공화국 국가 표준 시험법(GB 29697-2013)을 기반으로 전처리 방법을 개선하여 GC-MS/MS 시험법을 확립하였으며, LC-MS/MS 방법과의 기기간 검증을 통해 확립된 시험법의 선택성, 정량한계 및 회수율에 대한 검증을 통해 디아제팜 시험법으로서의 유효성을 확인하였다.

LC-MS/MS의 경우 아세토니트릴로 추출 후 PSA를 이용해 정제하였고, GC-MS/MS의 경우 아세토니트릴로 추출후 C_{18}카트리지를 이용해 정제하였다. 디아제팜은 표준

용액을 정량한계를 포함한 농도에 따라 검량선을 작성한 결과 두 기기 모두 $r^2 > 0.99$ 이상의 직선성을 확인하였다. 본 실험에서의 검출한계와 정량한계는 LC-MS/MS 및 GC-MS/MS 모두 0.0004 mg/kg, 0.001 mg/kg 수준이었으며, 평균 회수율은 각각 99.8~106%, 109~124%이었다. 또한, 분석오차는 모두 15% 이하로 정확성 및 재현성이 우수하였으며, CODEX 가이드라인 규정에 만족하는 수준이었다. 따라서 개발된 시험법은 안전한 수산물의 국내 유통과 잔류실태조사를 위해 활용될 것으로 기대한다.

References

1. Page, C., Michael, C., Sutter, M., Walker, M., Hoffman, B.: Integrated Pharmacology. vol. **2**. C.V. Mosby (2002).
2. Mottaleb M.A., Stowe C., Johnson D. R., Meziani M.J., Mottaleb M. A.: Pharmaceuticals in grocery market fish fillets by gas chromatography-mass spectrometry. *Food Chem*., **190**, 529-536 (2016).
3. Abreu, M., Koakoski, G.: Diazepam and fluoxetine decrease the stress response in zebrafish. *PLoS One*, **9**: e 103232 (2014).
4. Chinese National Standard: Determination of Diazepam and Methaqualone residue in animal derived food by Gas chromatography-Mass Spectrometric method. GB 29697-2013 (2014).
5. Miller, T.H., McEneff, G.L., Brown, R.J., Bury, N.R., Barron, P.L.: Pharmaceuticals in the freshwater invertebrate, Gammarus pulex, determined using pulverized liquid extraction, solid phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Sci. Total Environ*., **511**, 153-160 (2015).
6. Jouvel, C., Maciejewski, P., Garcia, P., Bonnaire, Y., Horning, S., Popot, M.: Detection of diazepam in horse hair samples by mass spectrometric methods. *Analyst*, **125**, 1765-1769 (2000).
7. Liu, Z., Short, J., Rose, A., Ren, S., Contel, N., Grossaman, S.: The stimultaneous determination of diazepam and its three metabolites in dog plasma by high-performance liquid chromatography with mass spectroscopy detection. *J. Pharm. Biomed. Anal*., **26**, 321-330 (2001).
8. Mottaleb, M.A., Bellamy, M.K., Mottaleb, M.A., Islam, M.R.: Use of LC-MS and GC-MS Methods to measure emerging contaminants pharmaceutical and personal care products (PPCPs) in fish. *J. Chromatogr.*, **6**, 267 (2015).
9. Masiá, A., Suarez-Varela, M.M., Llopis-Gonzalez, A., Picó, Y.,: Determination of pesticides and veterinary drug residues in food by liquid chromatography-mass spectrometry. A Review. *Anal. Chim. Acta*, **936**, 40-61 (2016).
10. Petrović, M., Hernando, M.D., Díaz-Cruz, M.S., Barceló, D.: Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples. A Review. *J. Chromatogr. A*, **1067**, 1-14 (2005).
11. Díaz-Cruz, M., Barceló, S.D.: Determination of antimicrobial residues and metabolites in the aquatic environment by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem*., **386**, 973-985 (2006).
12. Li, J., Zhang, J., Liu, H., Wu, L.: A comparative study of primary secondary amino (PSA) and multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) as QuEChERS absorbents for the rapid determination of diazepam and its major metabolites in fish sample by high-performance liquid chromatography-electrospray ionisation-tandem mass spectrometry. *J. Sci. Food Agric*., **96**, 555-560 (2016).
13. Baron, M.G., Mintram, K.S., Owen, S.F., Hetheridge, M.J., Moody, A.J., Purcell, W.M., Jackson, S.K., Jha, A.N.: Pharmaceutical metabolism in fish: Using a 3-D hepatic in vitro model to assess clearance. *PLoS ONE*, **12**(1), (2017).
14. Zhao, L., Lucas, D.: Multi residue analysis of veterinary drugs in bovine liver by lc-ms/ms. Aglient Tech. Inc., (2015).
15. CODEX Alimentarius Commission. Guidelines for the design and implementation of national regulatory food safety assurance programme associated with the use of veterinary drugs in food producing animals, CAC/GL 71 (2009).
16. Kang H.S., Lee S.B., Shin D.S., Jeong J.Y., Hong J.H., Rhee G.S.: Occurrence of veterinary drug residues in farmed fishery products in South Korea. *Food Control*, **85**, 57-65 (2018).
17. López-García E., Mastroianni N., Postigo C., Valcárcel Y., González-Alonso S., Barceló D., López de Alda M.: Simultaneous LC-MS/MS determination of 40 legal and illegal psychoactive drugs in breast and bovine milk. *Food Chem*., **245**, 159-167 (2018).
18. Boeck M.D., Missotten S., Dehaen W., Tytgat J., Cuypers E.: Development and validation of a fast ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction procedure combined with LC-MS/MS analysis for the quantification of benzodiazepines and benzodiazepine-like hypnotics in whole blood. *Forensic Sci. Int*., **274**, 44-54 (2017).