pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 33, No. 3, pp. 176~184 (2018)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2018.33.3.176

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

축수산물에서 LC-MS/MS를 이용한 카라졸롤 및 아자페론 분석

최수연 · 강희승* · 김주혜 · 천소영 · 정지윤 · 조병훈 · 이강봉
식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 식품위해평가부 잔류물질과

Determination of Carazolol and Azaperone in Livestock and Fishery Products Using Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry

Soo Yeon Choi, Hui-Seung Kang*, Joohye Kim, So-Young Cheon,
Jiyoon Jeong, Byung-Hoon Cho, and Kang-Bong Lee
Pesticide and Veterinary Drug Residues Division, National Institute of Food & Drug Safety Evaluation, Osong, Korea
(Received March 22, 2018/Revised April 8, 2018/Accepted May 17, 2018)

ABSTRACT - The aim of the present work was to develop simultaneous methods of quantification of carazolol, azaperone, and azaperol residues in livestock and fishery products using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Samples were extracted from beef, pork, chicken, egg, milk and shrimp using acetonitrile (ACN); while flat fish and eel were extracted using 80% ACN. For purification, ACN saturated n-hexane was used to remove fat composition. The standard calibration curves showed good linearity as correlation coefficients; r^2 was > 0.99. Average recoveries expressed were within the range of 67.9-105% for samples fortified at three different levels (0.5 × MRL, 1 × MRL and 2 × MRL). The correlation coefficient expressed as precision was within the range of 0.55-7.93%. The limit of quantification (LOQ) was 0.0002-0.002 mg/kg. The proposed analytical method showed high accuracy and acceptable sensitivity based on Codex guideline requirements (CAC/GL71-2009). This method can be used to analyze the residue of carazolol, azaperone, and azaperol in livestock and fishery products.

Key words : Carazolol, Azaperone, Livestocks, Fishery products, LC-MS/MS

지난 수년간 축수산업은 집약적인 양식과 수송으로 비용대비 높은 수준의 생산율을 나타내었다. 하지만 이러한 양식과 동물의 수송은 질병과 스트레스 발생을 높이게 되었다. 이로 인해 육즙의 손실과 중량 감소가 발생하여 색깔이 창백하고(pale), 흐물거리며(soft), 육즙이 삼출(exudative)되기 쉬운 물돼지고기(pale soft exudative; PSE)[1]의 생산과 높은 폐사율이 나타났다[2]. 이러한 손실을 방지하기 위하여 동물들이 스트레스가 많은 환경에 적응할 수 있도록 도와주며, 활동량을 감소시켜 사료 요구율(feed conversation ratio)을 높이는 면에서도 용이한 베타-수용체 차단제(β-adrenergic receptor blockers)와 진정제(sedative)들이 1970년대 이후 사용되기 시작하였다[3]. 하지만 이러한 베타-수용체 차단제와 진정제가 축수산물의 주사부위나 근육에 잔류되어 소비자에게 잠재적 위험을 나타낼 수 있다고 밝혀지면서 JECFA (FAO/WHO Expert Committee on Food Additives)에서는 일부 물질의 사용을 금지시키거나 잔류허용기준(maximum residue limit; MRL)을 설정하고 있다[4].

카라졸롤(carazolol)은 catecholamin과 구조적으로 유사한 비 특이적인 베타-수용체 차단제로서 동물을 도살장으로 운반하는 동안 스트레스로 인한 심박급속증(tachycardia) 및 폐사를 막기 위해 사용되며 높은 수준으로 잔류되어 있을 경우 소비자의 건강에 유해한 영향을 끼칠 수 있는 것으로 알려져 돼지 신장에서 25 μg/kg, 근육에서 5 μg/kg으로 잔류허용기준을 설정하여 잔류량에 대해 엄격히 관리하고있다[3]. 아자페론(azaperone)은 항염효과가 있는 부티로페논(butyrophenone)류의 신경안정제로서 주로 돼지에 사용되며 공격성을 줄여 진정시키는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 또한 체내에서 빠르게 흡수, 분포되어 아자페롤로 대사되므로 식품의약품안전처에서는 잔류허용기준을 아자페론과 아자페롤의 합으로 하여 신장과 근육조직에서 100 μg/kg으로 설정하고 있다[5]. 동물약품편람에 따르면 아자페론은 4개 제품이 국내에서 허가되어 사용되고 있으며[6], 카라졸롤은 해외에서 수입을 통해 사용되고 있

*Correspondence to: Hui-Seung Kang, Pesticide and Veterinary Drug Residues Division, National Institute of Food & Drug Safety Evaluation, Osong, Chungcheongbuk-do 28159, Korea
Tel: 82-43-719-4208, Fax: 82-43-719-4200
E-mail: hskang1235@Korea.kr

는 것으로 확인되었다. 카라졸롤과 아자페론의 사용량에 대한 정확한 통계 데이터는 집계되지 않으나 한국동물약품협회의 통계[7]에서 카라졸롤, 아자페론과 같은 신경계열 동물용의약품 사용량이 지속적으로 증가하는 추세인 것을 확인 할 수 있었다. 따라서 축수산물 안전관리를 위해 카라졸롤, 아자페론 및 아자페롤의 잔류량을 분석하기 위한 시험법 확립이 필요할 것으로 사료된다.

카라졸롤, 아자페론 및 아자페롤의 식품 잔류에 대한 연구는 돼지의 소변과 혈액을 이용한 카라졸롤의 스크리닝 방사면역측정법(radioimmunoassay)[8], 신장 조직을 이용한 박층크로마토크래피(thin-layer chromatography) 검출법[9,10], 근육, 신장 및 간에서의 fluorescence detection과 high-performance liquid chromatography-ultra violet (HPLC-UV) 검출법[11,12,13], 신장과 조직에서의 GC-MS (Gas chromatography-mass spectrometry)를 이용한 검출법[14,15]과 신장과 조직에서의 LC-MS (liquid chromatography-mass spectrometry), LC-MS/MS (liquid chromatography-tandem mass spectrometry) 분석법[16] 등이 보고되어 있다. 이처럼 카라졸롤, 아자페론 및 아자페롤의 실험들은 주로 돼지를 이용한 분석법만이 진행되어 있으며 돼지 이외의 다른 축수산물에 대한 연구는 부족한 실정이다. Kay 등[4]은 카라졸롤 아자페론 및 아자페롤에 대한 쥐와 말 등에 독성 실험 결과 독성이 낮으나, Kamila 등[5]에 따르면 카라졸롤, 아자페론 및 아자페롤과 같은 진정제인 페노티아진(phenothiazine)계 물질이 돼지, 염소, 양 등에 사용되고 있음을 보고 하였다. 또한 돼지의 진정제로 사용되는 벤조디아핀계물질[17] 중 디아제팜은 중국 수산물에서 사용가능성 및 검출[18]이 보고되면서 향후 카라졸롤 및 아자페론이 축수산물에 사용될 가능성이 제기되었으며 이에 따른 실험법 확립이 필요한 시점이라 생각된다.

본 연구에서는 베타-수용체 차단제와 진정제의 잔류에 대해 보고된 기존 실험들을 개선하여 폭넓은 축수산물에서의 카라졸롤, 아자페론 및 아자페롤의 잔류 여부를 판정 할 수 있는 고감도 분석법을 개발하고자 하였으며 향후 축수산물에 대한 카라졸롤, 아자페론 및 아자페롤의 불법 사용 및 허용물질목록 관리제도 시행에 대비하여 활용할 수 있을 것으로 보인다.

Materials and Methods

시약 및 재료

본 실험에 사용된 표준품 카라졸롤(carazolol, 99.0%)과 아자페론(azaperone, 98.5%)은 Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Bayern, Germany)로부터 구입하였으며, 아자페롤(Azaperol, 99.7%)은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다(Table 1). 표준품 전처리 시약으로 사용된 아세토니트릴(acetonitrile), 메탄올(methanol), 헥산(n-hexane)은 Merck (Darmstadt, Hesse, Germany)에서 HPLC 등급으로 구입하여 사용하였고, 개미산(formic acid, ≥ 95%), 포름산암모늄(ammonium formate, ≥ 99%), 수산화암모늄(ammonium hydroxide, 28-30%), octadecysilane (C_{18}) 등 그 이외의 분석용 시약 및 용매는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), Waters (Milford, MA, USA) 및 Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)에서 구입하여 특급 또는 분석용을 사용하였다. 시험용액을 여과하기 위해 여과용 막여과지(membrane filter)는 0.2 μm PTFE (polytetrafluoroethylene, Sant Cugat Del Valles, Barcelona, Spain)를 사용하였다. 시험용 시료는 무항생제 제품으로 시중에 판매되고 있는 소고기, 돼지고기, 닭고기, 계란, 우유, 넙치, 장어 및 새우 등을 구입하여 껍질과, 내장을 제거한 가식부위(근육)만을 분쇄하고 균질화하여 분석 전까지 냉동고(–20°C)에 보관하였다. 균질화한 시료는 공시료(blank)의 특이성 확인 검증을 통하여 카라졸롤, 아자페론 및 아자페롤이 검출되지 않음을 확인한 후 시료로 사용하였다.

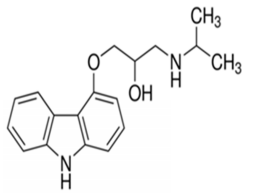
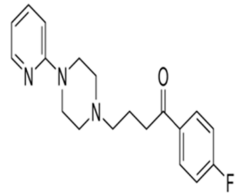
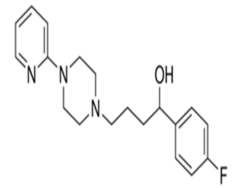
표준원액 및 표준용액의 조제

카라졸롤, 아자페론 및 아자페롤 표준품을 각각 10.8 mg, 10.47 mg 및 10.53 mg으로 정밀히 달아 100 mL 볼륨플라스크에 메탄올로 정용하여 100 mg/L로 표준원액을 조제하였다. 조제한 표준원액은 메탄올:물(50/50:v/v) 용매로 희석하여 카라졸론은 0.62, 1.25, 2.5, 5, 10 μg/L, 아자페론과 아자페롤은 7.5, 15, 30, 60, 120 μg/L의 농도의 표준용액으로 각각 준비하였다. 표준원액과 표준용액은 갈색 유리병에 담아 4°C 냉장실에 보관하고 실험 직전에 희석하여 사용하였다.

시료 전처리 방법

실험은 Zhang 등[16]과 식품공전 방법을 기반으로 시료의 무게를 감소시키고 시료의 기름을 제거하기 위해 아세토니트릴 포화 헥산 추출과정을 추가하였으며 C_{18}을 이용한 정제과정을 생략하여 진행하였다. 각각의 시료를 균질화하여 1 g을 정밀히 달아 50 mL 폴리프로필렌 원심분리관에 취하고 아세토니트릴(넙치, 장어는 80% 아세토니트릴) 10 mL를 가하여 1분간 진탕한 후 상온에서 4,800 × *g*로 10분간 원심분리하여 원심분리관에 상층액을 취하였다. 상층액이 들어있는 원심분리관에 아세토니트릴 포화 헥산 10 mL를 가하여 10분간 진탕하고 상온에서 4,800 × *g*로 10분간 원심분리하였다. 원심분리한 용액에서 하층액을 취하여 40°C 수용상에서 질소농축기한 후 50% 메탄올 2 mL에 용해시키고 10분간 초음파 처리한 후 4°C에서 20,000 × *g*로 15분간 원심분리하였다. 상층액을 분리하여 0.2 μm 막여과지(PTFE)로 여과 후 시험용액으로 사용하였다(Fig. 1).

Table 1. Molecular structure and physico-chemical properties of carazolol, azaperone and azaperol

	IUPAC Name	CAS No.	Molecular formula	Molecular Weight (g/mol)	Log P_{ow}	pKa	Structure
Carazolol	1-(9H-carbazol-4-yloxy)-3-(propan-2-ylamino)propan-2-ol	57775-29-8	$C_{18}H_{22}N_2O_2$	298.38	3.63 (pH 7.0)	9.54 (22°C)	
Azaperone	1-(4-fluorophenyl)-4-(4-pyridin-2-ylpiperazin-1-yl)butan-1-one	1649-18-9	$C_{19}H_{22}FN_3O$	329.39	3.21 (pH 7.0)	8.43 (22°C)	
Azaperol	1-(4-fluorophenyl)-4-(4-pyridin-2-ylpiperazin-1-yl)butan-1-ol	2804-05-9	$C_{18}H_{22}N_2O_2$	329.41	-	-	

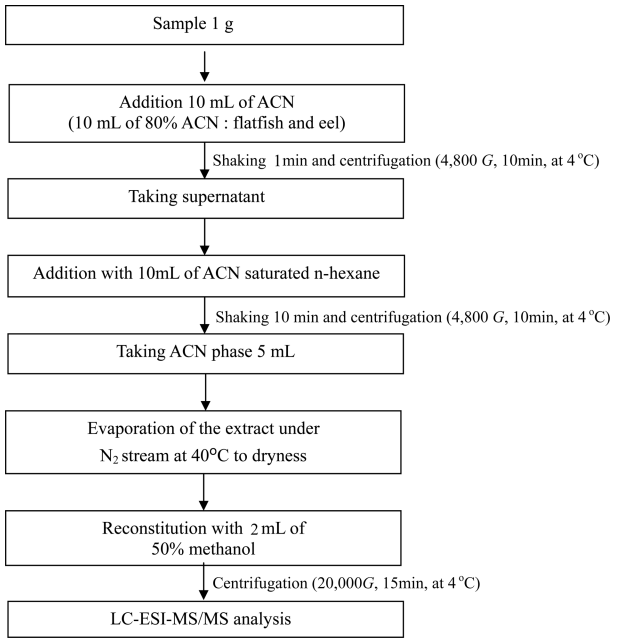


Fig. 1. Flow chart of analysis procedure for carazolol, azaperone and azaperol.

Table 2. LC-MS/MS parameter for the analysis of carazolol, azaperone and azaperol

LC system	Waters, UPLC		
Column	X-select C_{18} (2.1 mm × 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 = Acetonitrile		
Gradient	Time (min)	Mobile phase	
		A (%)	B (%)
	0	95	5
	2	95	5
	5	30	70
	5.5	0	100
	7	0	100
	10	95	5
Mass spectrometry	Waters, TQ-X		
Ionization mode	ESI positive		
Capillary temp.	350°C		
Spray voltage	0.8 kV		
Collision gas	Ar		

시료분석 기기조건

수산물 시료 중 카라졸롤, 아자페론 및 아자페롤 분석을 위하여 액체크로마토그래프-질량분석기는(LC-MS/MS, liquid chromatography-tandem mass spectrometer) Waters US/Xevo TQ-X (Milford, MA, USA)를 사용하였다. 분석용 컬럼은 역상 컬럼인 X-Bridge C_{18} (2.1 × 150 mm, 3.5 μm, Waters, Dublin, Ireland)를 사용하였고, 컬럼 온도는 40°C를 유지하였으며, 이동상 A는 0.1% 개미산을 함유한 물로, 이동상 B는 아세토니트릴을 사용하였다. 유속은 0.3 mL/min, 주입량은 5 μL로 하였다. 각 표준물질은 전기분무이온화(electro-spray ionization, ESI)법의 positive ion mode를 사용하여 선구이온(precursor ion) 및 생성이온(product ion)을 선택한 후 정량이온(quantification ion) 및 정성이온(qualification ion)을 결정하는 다중반응검지법(multiple reaction monitoring, MRM) 조건을 확립하였다. LC-MS/MS 분석 기기조건은 Table 2와 같다.

분석법 검정 실험

본 시험법은 CODEX 가이드라인 CAC/GL-71[7]에 따라 직선성(linearity), 정확성(accuracy), 정밀성(precision), 검출한계(limit of detection, LOD), 정량한계(limit of quantitation, LOQ), 회수율(recovery)에 대해 유효성을 검증하였다. 검출한계는 각 신호 대 잡음비(signal to noise ratio, S/N ratio)의 3배 이상인 농도로 계산하였으며, 정량한계는 각각 S/N ratio가 10배 농도로 계산하여 카라졸롤, 아자페론 및 아자페롤의 정량한계를 설정하였다. 각 표준품의 실험 농도는 잔류허용기준을 기반으로 0.0025 mg/kg, 0.03 mg/kg 및 0.03 mg/kg으로 정하여 기준 농도의 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4배가 되도록 설정하였다. 시료혼합표준용액(calibration standard solution)은 전처리 과정과 동일한 과정을 거친 시료용액을 만들어 LC-MS/MS로 측정하였다. 분석을 통해 얻어진 정량이온의 피크면적으로 검량곡선을 작성하여 각 검량선의 상관 계수(coefficient of correlation, r^2)를 구하였다. 정확성과 정밀성은 0.5 × MRL, 1 × MRL and 2 × MRL의 농도로 표준용액을 첨가한 후 회수율과 변동계수(coefficient variation, CV)를 측정하였다. 각 실험은 5반복을 통해 평가하였다.

Results and Discussion

LC-MS/MS를 이용한 분석법 및 최적조건확립

본 시험법은 LC-MS/MS를 이용하였으며 이온화법으로는 ESI-positive mode로 분석하였다. 비극성에 가까운 성질을 가지는 카라졸롤, 아자페론 및 아자페롤을 분석하기 위하여 C_{18} (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm)의 분석용 컬럼을 선택하였다. 최적의 크로마토그램을 얻기 위하여 이동상 A를 5 mM 포름산암모늄과 0.1% 개미산을 함유한 물로 비교한 결과, 5 mM 포름산 암모늄을 사용하였을 때 감도가 가장 높았으나 피크가 갈라지거나 tailing 현상이 발생하여 이동상 A로는 0.1% 개미산을 함유한 물, 이동상B는 아세토니트릴로 조건을 설정하였다. 카라졸롤, 아자페론

Table 3. Selected-ion of LC-MS/MS for carazolol, azaperone and azaperol

Compound	Retention time (min)	Exact mass (m/z)	Precursor ion (m/z)	Confirmation ion (m/z)	Collision Energy (eV)
Carazolol	3.9	298.3	299.1	**116.0***	**18**
				193.9	26
				222.0	18
Azaperone	3.6	327.3	328.1	94.9	52
				122.9*	**34**
				165.0	20
Azaperol	3.4	329.4	330.1	108.9	48
				120.9*	**20**
				149.0	28

*The bold text expressed as quantification ion

및 아자페롤의 각각 표준용액(5 μL/min)을 질량검출기에 직접 주입하여 cone voltage (10-60 V) 조절을 통해 18, 34 및 20 V 에서 최대 강도를 나타내는 것을 확인하였다. 선구이온은 full scan mode에서 질량 스펙트럼을 확인하여 카라졸롤, 아자페론 및 아자페롤의 각각의 질량 값(298.3, 327.3 및 329.4, exact mass)에 양성자(H^+)가 결합되어 [M+H]+ 형태인 m/z 299.1, 328.1 및 330.1으로 확인하였다. 또한, collision energy 조절을 통한 피크의 강도를 확인하여 최적화된 3개 이상의 생성이온을 선택하였다. 가장 좋은 감도를 보이는 생성이온을 정량이온으로 설정하였고, 다음으로 크게 검출되는 2개의 생성이온을 정성이온으로 설정하였다. 선정된 이온과 머무름 시간은 Table 3에 나타내었다.

추출 및 정제조건의 최적화

추출을 위한 용매로 식품공전 시험법에서 사용된 80% 아세토니트릴을 사용하여 추출한 결과, 일부 검체에서 CODEX 가이드라인을 만족하지 못하여 추출용매를 아세토니트릴(100%)로 변경하여 사용하였다. 그 결과, 넙치와 장어를 제외한 나머지 검체에서는 CODEX 가이드라인을 만족하는 결과를 나타내어 소, 돼지, 닭고기, 계란, 우유 및 새우의 추출용매는 100% 아세토니트릴, 넙치와 장어의 추출용매는 80% 아세토니트릴으로 추출용매조건을 최적화하였다. 축산물 및 수산물 중 지방성분이 많은 검체로 인한 분석장비의 오염을 방지하기 위하여 2차 추출과정은 Zhang 등[16]에서 사용된 아세토니트릴과 아세토니트릴 포화 헥산 및 100% 헥산을 비교 실험하여 진행하였다. 그 결과, 아세토니트릴 포화 헥산을 사용한 시험법이 가장 높은 회수율을 나타내어 기름제거 및 정제과정으로 사용하였다. 정제과정은 C_{18} 1 g을 첨가한 시험법과 정제과정을 생략한 시험법을 비교한 결과, C_{18}을 사용하였을 때 더 낮은 회수율을 보여 정제과정을 생략하여 진행하였다. 각 시료 별 회수율을 높이기 위하여 재용해 용매의 특성과 막여과지(membrane filter)에 따른 영향을 알아보기 위해 재용해 용매는 메탄올과 50% 메탄올을 이용하여 비교하였으며, 막여과지는 PVDF (polyvinylidene difluoride)와 PTFE를 비교하였다. 그 결과, 50% 메탄올로 재용해하고 PTFE를 사용하였을때 카라졸롤, 아자페론 및 아자페롤 회수율이 CODEX가이드라인에 적합한 수준으로 나타났다.

분석방법의 유효성평가

카라졸롤, 아자페론 및 아자페롤 분석법을 검증하기 위해 선택성(selectivity), 특이성(specificity), 정확성, 직선성, 및 정량한계를 평가하였다. 선택성과 특이성 평가는 소고기, 돼지고기, 닭고기, 계란, 우유, 넙치, 장어 및 새우의 무처리 시료, 표준용액, 표준용액의 크로마토그램을 서로 비교하여 분리 정도를 확인하였다. 그 결과 무처리 검체에서는 카라졸롤, 아자페론 및 아자페롤과 같은 머무름 시간을 갖는 어떤 방해물질도 검출되지 않았다. 따라서, 카라졸롤, 아자페론 및 아자페롤을 분석하기 위한 본 시험법이 높은 분리능, 선택성과 특이성을 가짐을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 정량한계는 크로마토그램 상에서 S/N ratio를 고려하여 카라졸롤, 아자페론 및 아자페롤 각각 0.0002 mg/kg, 0.002 mg/kg 및 0.0002 mg/kg으로 설정하였으며, Fluchard 등[19]의 연구와 비교하였을 때, 아자페론과 아자페롤이 우수한 감도와 정량성을 나타내는 것을 확인 할 수 있었다. 카라졸롤, 아자페론 및 아자페롤의 실험농도는 기존에 정해져 있는 잔류허용기준보다 낮은 0.0025 mg/kg, 0.03 mg/kg, 0.03 mg/kg을 기준으로 각각 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4배 농도로 시료혼합표준용액에 희석하여 검량곡선을 작성하여 직선성을 검토한 결과, r^2값이 0.99 이상으로 나타나 CODEX에서 권장하는 $r^2 > 0.98$을 높은 수준을 만족하여 각 농도와 기기반응 간의 상관계수에 있어서 우수한 결과를 보였다. 표준용액을 각 시료에 첨가하여 회수율 실험을 5회 반복 수행하여 정확성과 정밀성을 평가하였다(Table 4) 시험법 검증결과, 축산물과 수산물 모두에서 정확성(회수율), 정밀성(변동계수)은 각각 67.9~105%와 0.55~7.93%로 모두 CODEX 가이드라인에서 요구하는 수

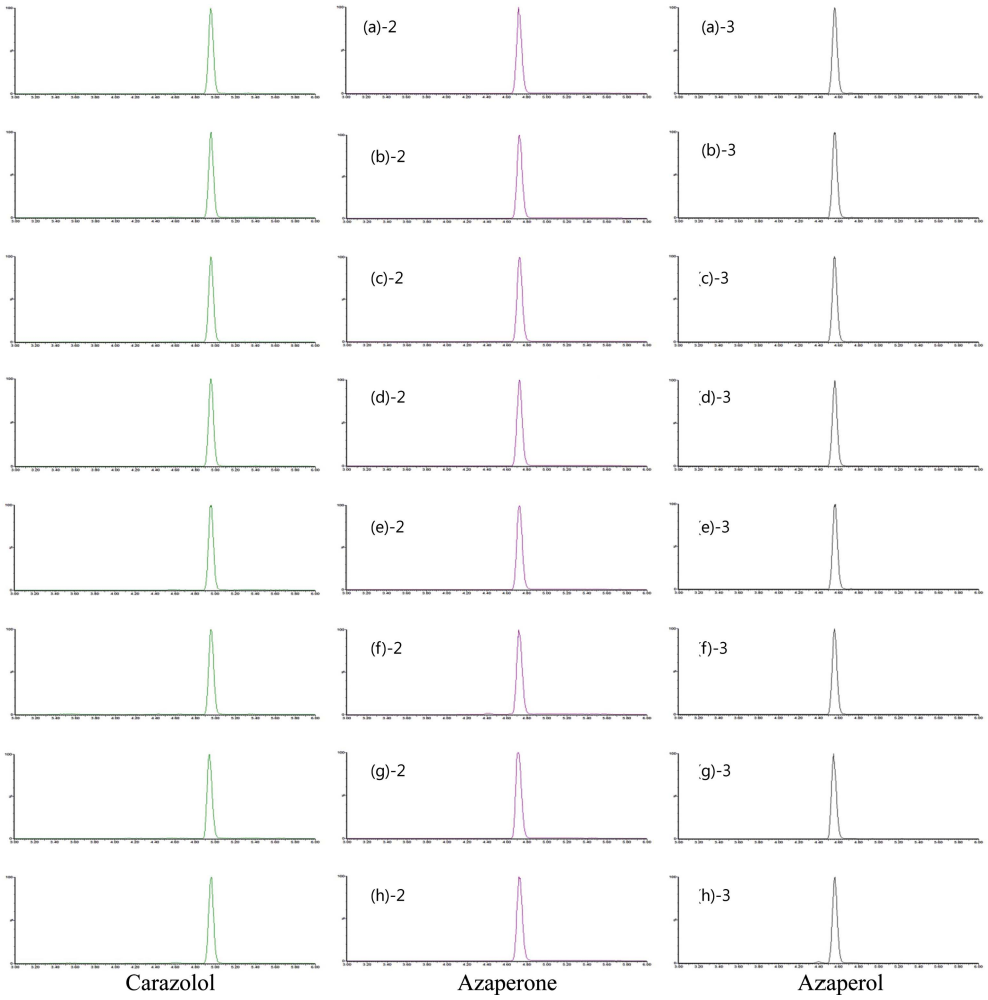


Fig. 2. LC-MS/MS chromatogram of carazolol : 1, azaperone : 2 and azaperol : 3 in beef : (a), pork : (b), chicken : (c), egg : (d), milk : (e) flat fish : (f), eel (g) and shrimp: (h) samples: carazolol (0.03 mg/kg), azaperone (0.03 mg/kg) and azaperol (0.03 mg/kg).

준을 만족하였다. 따라서 본 연구에 적용한 시료 전처리 과정 및 분석방법은 축수산물 중 카라졸롤, 아자페론 및 아자페롤의 잔류 검사에 있어 적합한 방법이라 판단된다.

카라졸롤은 동물의 취급, 검사 및 수송에 의해 발생하는 스트레스를 줄여 근육 내 글리코겐 대사 촉진으로 인한 물돼지고기(PSE)의 생산을 줄이기 위해 널리 사용되고 있다[20]. 카라졸롤과 함께 사용되는 진정제 아자페론은 항염 효과가 뛰어난 신경안정제로 운송 시 공격성과 운동성을 감소시키는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 또한 체내에서 대사되어 아자페롤을 생성하므로 두 물질의 합으로 잔류물을 정의하고 있으며 아자페론의 활성은 아자페롤과 상호관계가 있는 것으로 알려져 있다[19,22]. 카라졸롤, 아자페론 및 아자페롤과 같은 항 스트레스성 물질들은 축산물 중 돼지와 소에 주로 사용되고 있으며 도살 몇 시간 전 사료와 함께 섭취되거나 주사하여 이용되고 있다[23]. 이러한 항 스트레스성 물질들이 식품에 잔류하여 소비자들이 섭취 시 현기증, 만성기관지염 환자의 증상 악화[4] 등의 건강 문제가 나타나면서 2009년 12월 22일 Commission Regulation (EU) 37/2010에서 돼지 조직에서의 아자페론과 돼지와 소 조직에서 카라졸롤에 대한 잔류허용기준(MRL)을 확립하였다[23]. 그 결과 돼지와 소의 신장, 간[2,5,16]등에 대한 카라졸롤, 아자페론 및 아자페롤의 잔류량 분석연구가 많이 진행되어 있다. 하지만 주 식용부위인 돼지, 소, 닭고기, 계란, 우유 등 축산물의 근육에 대한 분석법은 부족한 실정이다. 카라졸롤, 아자페론 및 아자페롤은 여러 기능으로 보았을 때 앞으로 돼지와 소뿐 아니라 다른 축산물에도 사용이 될 것으로 우려되어 향후 추가연구가 필요할 것으로 판단된다.

수산물의 국제적인 수요와 유통이 늘어나 일반적으로 취급, 수송, 양식에 민감한 수산물에 대한 진정제 사용에 관심이 높아지고 있다[4]. 수산물에 주로 사용되고 있는 진정제로는 가지과의 여러해살이풀 식물 *Nicotiana tabacum*와 carbon dioxide 등이 있으나 일시적인 진정제로 지속력이 짧다는 단점이 있다[2]. 사용이 허용된 진정제 tricaine

Table 4. Validation results for the analytical method of carazolol, azaperone and azaperol in livestock and fishery products (n = 5)

Compound	Concentration (mg/kg)	Beef		Pork		Chicken		Egg		Milk		Flat fish		Eel		Shrimp	
		Rec. (%)	CV (%)	Rec. (%)	CV (%)	Rec. (%)	CV (%)	Rec. (%)	CV (%)	Rec. (%)	CV (%)	Rec. (%)	CV (%)	Rec. (%)	CV (%)	Rec. (%)	CV (%)
Carazolol	0.00125 (0.5 × MRL)	78.2	4.43	78.8	3.73	97.0	3.39	77.57	2.94	84.48	2.65	85.69	4.71	72.54	5.24	88.97	1.38
	0.0025 (1 × MRL)	76.7	5.30	76.6	3.09	87.1	1.79	78.14	5.27	79.41	2.09	74.92	2.94	68.38	1.21	86.98	0.79
	0.005 (2 × MRL)	74.1	0.86	70.2	1.72	78.5	2.23	70.31	3.71	76.00	2.62	72.89	0.74	67.85	4.06	86.16	1.38
Azaperone	0.015 (0.5 × MRL)	94.6	2.55	94.1	1.18	104.7	1.06	89.71	1.44	96.85	4.69	100.60	1.80	96.62	1.33	104.87	0.82
	0.03 (1 × MRL)	87.2	1.31	83.2	2.51	93.4	0.69	74.66	3.63	83.82	2.08	88.43	2.98	83.19	1.08	98.13	0.81
	0.06 (2 × MRL)	79.5	0.57	76.1	2.69	82.8	1.44	71.85	2.15	76.59	7.93	80.19	0.57	73.86	3.31	96.51	1.77
Azaperol	0.015 (0.5 × MRL)	86.5	1.80	85.0	1.55	95.8	1.18	90.07	2.51	94.92	2.29	100.76	2.50	92.37	1.68	100.74	0.90
	0.03 (1 × MRL)	84.4	2.13	81.5	1.70	92.2	1.47	80.05	1.37	85.52	2.04	88.00	2.65	85.61	0.55	98.17	0.60
	0.06 (2 × MRL)	79.2	1.60	76.9	3.15	86.0	2.54	75.49	3.49	78.46	4.22	84.20	1.13	81.18	1.97	96.68	1.65

*Rec, recovery; CV, coefficient variation

methanesulfonate (MS-222)는 사용은 용이하나 21일이라는 긴 휴약기간이 필요한 단점이 있어 즉시 방출 가능하며 지속력이 높은 항 스트레스성 진정제의 연구가 더욱 필요한 실정이다[24,25]. 카라졸롤과 아자페론은 32시간과 7일이라는 비교적 짧은 휴약기간을 가지므로 수산물에 사용될 가능성이 제기된다. 본 시험법은 축수산물의 안전관리를 위해 식품공전의 카라졸롤과 아자페론 및 아자페롤의 분석법에서 회수율이 낮았던 시료들에 대한 시험법을 개선하여 높은 회수율과 정확성 그리고 정량성을 확보하였고, Mitrwska 등[5]과 Zhang 등[16]에 의해 보고된 소와 돼지 이외의 다양한 축산물과 수산물에도 적용 할 수 있는 시험법을 확립하였다. 개발된 시험법의 검증과정에서 실제 축수산물의 모니터링 또는 잔류성소실시험(residue depletion study)을 통한 카라졸롤, 아자페론 및 아자페롤 시험법의 적용성을 검토하는 것이 가장 좋은 검증 방법이지만 현실적으로 적용이 어려운 경우가 많다. 따라서 본 시험법의 검증은 대표 공시료(돼지, 소, 닭, 계란, 우유, 넙치, 장어, 새우)에 분석물질을 주입하여 잔류량을 측정하는 방법으로 검증하였다. 그 결과, CODEX 가이드라인에 만족하는 것을 확인 할 수 있었다. 본 시험법을 활용하여 다양한 종류의 축수산물에서 카라졸롤, 아자페론 및 아자페롤의 잔류량분석 및 안전관리 연구에 활용 될 수 있을 것으로 사료되는 바이다.

Acknowledgement

본 연구는 식품의약품안전처 2015년 연구개발과제 15161MFDS663 및 2018년 연구개발과제 18161MFDS541에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

국문요약

축수산물의 집약적인 양식과 수송으로 인한 스트레스로 품질이 떨어진 물돼지고기(PSE)가 생성되면서 이를 방지하기 위하여 베타-수용체 차단제인 카라졸롤과 진정제인 아자페론이 사용되어왔다. 무분별한 사용으로 주사부위나 근육에 잔류한 카라졸롤과 아자페론이 소비자에게 현기증과 같은 부작용을 일으키는 것으로 밝혀지면서 JECFA (FAO/WHO)에서 근육 및 신장부위에 대한 잔류허용기준을 설정하였으며 우리나라를 비롯한 여러 나라에서 잔류허용기준에 따라 안전 관리를 수행하고 있다. 본 연구는 축수산물에서 기존의 규제 대상인 돼지와 소를 비롯한 닭고기, 계란, 우유, 넙치, 장어, 새우 등 다양한 검체에서 분석법을 개발하고 시험법 검증과정을 통하여 축수산물에 동시에 적용 가능한 시험법을 확립하였다. 시험법을 간편화 하기 위하여 시료의 무게를 줄이고 전처리 과정을 단순화하였으며 LC-MS/MS를 이용하여 최적조건으로 검증하였다. 실제 분석법을 활용하기 위하여 CODEX 기준에

따라 특이성, 정확성, 직선성, 정밀성, 검출한계, 정량한계 등을 검증하였다. 카라졸롤, 아자페론과 아자페론의 대사체인 아자페롤의 표준용액을 잔류허용기준의 농도에 따라 검량선을 작성한 결과, 0.99 이상의 직선성을 확인 할 수 있었다. 또한 평균 회수율은 67.9-105%, 변동계수는 0.55-7.93%로 CODEX 가이드라인에 만족함으로써 정확성 및 재현성이 우수함을 확인 할 수 있었다. 본 연구에서 확립된 분석법은 소와 돼지 뿐만 아니라 닭고기, 계란, 우유, 넙치, 장어, 새우에도 적용 가능한 시험법을 확립하였으며 이는 향후 축수산물에서 카라졸롤, 아자페론에 대한 안전관리를 위한 기초자료로 활용 될 수 있을 것으로 판단된다.

References

1. Chae H.S., Yoo Y.M., Jeong S.G., Ham J.S., Ahn C.N., Jang A.R., Yoo H.S.: Effect of holding time of broiler at slaughter house on color, PSE, appearance of chicken meat. *Korean J. Poult. Sci*., **35**, 177-182 (2008).
2. Delahaut P., Levaux C., Eloy P., Dubois M.: Validation of a method for detecting and quantifying tranquillisers and a β-blocker in pig tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal .Chim. Acta*, **483**, 335-340 (2003).
3. Delahaut P., Brasseur P.Y., Dubois M.: Multiresidue method for the detection of tranquillisers, xylazine, and a β-blocker in animal production by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **1054**, 373-378 (2004).
4. Kay J.F., MacNeil J.D., Wang J.: Chemical analysis of non-antimicrobial veterinary drug residues in food. John Wiley & Sons, 1rd Ed. Wiley, Canada (2016).
5. Mitrowska K., Posyniak A., Zmudzki J.: Rapid method for the determination of tranquilizers and a beta-blocker in porcine and bovine kidney by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta,* **637**, 185-192 (2009).
6. Korea animal health product association: statutes. 2001. Available online at: http://www.kahpa.or.kr/.
7. Korea animal health product association: statistics.. 2018. Available online at: http://www.kahpa.or.kr/.
8. Meenagh S.A., McEvoy J.D.G., Elliott C.H.: Determination of carazolol residues in porcine tissue by radioreceptor assay. *Chim. Acta*, **462**, 149-156 (2002).
9. Van Ginkel L.A., Schwillens P.L.W.J., Olling M.: Liquid chromatographic method with on-line UV spectrum identification and off-line thin-layer chromatographic confirmation for the detection of tranquillizers and carazolol in pig kidneys. *Anal. Chim. Acta*, **225**, 137-146 (1989).
10. Haagsma N., Bathelt E.R., Engelsma J.W.: Thin-layer chromatographic screening method for the tranquillizers azaperone, propiopromazine and carazolol in pig tissues. *J. Chromatogr. A*., **436**, 73-79 (1988).
11. Quintana M.C., Blanco M.H., Lacal J., Hern-ndez L.: Analysis of pharmaceutical residues in bovine liver by HPLC. *J. Liq Chromatogr. R. T.*, **24**, 735-745 (2001).
12. Holland D.C., Munns R.K., Roybal J.E., Hurlbut J.A., Long A.R.: Simultaneous determination of xylazine and its major metabolite, 2, 6-dimethylaniline, in bovine and swine kidney by liquid chromatography. *J. AOAC Int.*, **76**, 720-724 (1993).
13. Cerkvenik-Flajs V.: Determination of residues of azaperone in the kidneys by liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal. Chim. Acta,* **586**, 374-382 (2007).
14. Tetsuo M., Zhang C., Matsumoto H., Matsumoto L.: Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of urinary sugar and sugar alcohols during pregnancy. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.,* **731**, 111-120 (1999).
15. Govaert Y., Batjoens P., Tsilikas K., Degroodt J.M., Srebrnik S.: Multi-residue analysis of tranquillizers in meat: confirmatory assays using mass spectrometry. *Analyst.,* **123**, 2507-2512 (1998).
16. Zhang J., Shao B., Yin B., Yin J., Wu Y., Duan H.: Simultaneous detection of residues of β-adrenergic receptor blockers and sedatives in animal tissues by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B,* **877**, 1915-1922 (2009).
17. Zhang L., Wu P., Jin Q., Ye H., Huang X., Liu S.: Simultaneous determination of eight tranquilizers in pork by ultra-performance liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry. *Food Anal. Methods,* **10**, 354-362 (2017).
18. 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 samples by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *J. Sci. Food Agric.,* **96**, 555-560 (2016).
19. CCRVDF Codex Committee on Residues of Veterinary Drugs in Foods, 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) Rome: Codex Alimentarius Commission. pp. 1-30 (2012).
20. Haagsma N., Bathelt E.R., Engelsma J.W.: Thin-layer chromatographic screening method for the tranquillizers azaperone, propiopromazine and carazolol in pig tissues. *J. Chromatogr. A.* **436**, 73-79 (1988).
21. Quintana M.C., Blanco M.H., Lacal J., Hern-ndez L.: Analysis of pharmaceutical residues in bovine liver by HPLC. J. Liq. *Chromatogr. Relat. Technol.,* **24**, 735-745 (2001).
22. Holland D.C., Munns R.K., Roybal J.E., Hurlbut J.A., Long A.R.: Simultaneous determination of xylazine and its major metabolite, 2, 6-dimethylaniline, in bovine and swine kidney by liquid chromatography. *J. AOAC Int.,* **76**, 720-724 (1993).
23. Sell B., Posyniak A., Gbylik M.: Screening procedure for simultaneous determination of azaperone, carazolol, and chlorpromazine in animal urine. *Bull Vet. Inst. Pulawy.*, **55**, 513-517 (2011).
24. Dinesh R., Prakash C., Poojary N., Kantharajan G., Abraham S.: Tobacco (*Nicotiana tabacum*)-A novel and futuristic sedative for fish transport in India. *Int. J. Fish. Aquat. Stud*., **5**,

369-371 (2017).
25. Trushenski J.T., Bowker J.D., Cooke S.J., Erdahl D., Bell T., MacMillan J.R., Yanong R.P., Hill J.E., Fabrizio M.C., Garvey J.E., Sharon S.: Issues regarding the use of sedatives in fisheries and the need for immediate-release options. *Trans. Am. Fish Soc*., **142**, 156-170 (2013).