

Development of simultaneous analytical method for investigation of ketamine and dexmedetomidine in feed

Hyun-young Chae[†], Hyejin Park[†], Hyung-Ju Seo, Su-nyeong Jang, Seung Hwa Lee, Min-Hee Jeong, Hyunjeong Cho, Seong-Hee Hong, and Tae Woong Na[★]

Experiment Research Institute, National Agricultural Products Quality Management Service, 141, Yongjeon-ro, Gimcheon-si, Gyeongsangbuk-do 39660, Korea

(Received August 26, 2021; Revised February 18, 2022; Accepted March 16, 2022)

사료 내 케타민과 덱스메데토미딘의 잔류조사를 위한 동시분석법 개발

채현영[†] · 박혜진[†] · 서형주 · 장수녕 · 이승화 · 정민희 · 조현정 · 홍성희 · 나태웅[★]

국립농산물관리원 시험연구소

(2021. 8. 26. 접수, 2022. 2. 18. 수정, 2022. 3. 16. 승인)

Abstract: According to media reports, the carcasses of euthanized abandoned dogs were processed at high temperature and pressure to make powder, and then used as feed materials (meat and bone meal), raising the possibility of residuals in the feed of the anesthetic ketamine and dexmedetomidine used for euthanasia. Therefore, a simultaneous analysis method using QuEChERS combined with high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry was developed for rapid residue analysis. The method developed in this study exhibited linearity of 0.999 and higher. Selectivity was evaluated by analyzing blank and spiked samples at the limit of quantification. The MRM chromatograms of blank samples were compared with those of spiked samples with the analyte, and there were no interferences at the respective retention times of ketamine and dexmedetomidine. The detection and quantitation limits of the instrument were 0.6 µg/L and 2 µg/L, respectively. The limit of quantitation for the method was 10 µg/kg. The results of the recovery test on meat and bone meal, meat meal, and pet food showed ketamine in the range of 80.48-98.63 % with less than 5.00 % RSD, and dexmedetomidine in the range of 72.75-93.00 % with less than 4.83 % RSD. As a result of collecting and analyzing six feeds, such as meat and bone meal, prepared at the time the raw material was distributed, 10.8 µg/kg of ketamine was detected in one sample of meat and bone meal, while dexmedetomidine was found to have a concentration below the limit of quantitation. It was confirmed that the detected sample was distributed before the safety issue was known, and thereafter, all the meat and bone meal made with the carcasses of euthanized abandoned dogs was recalled and completely discarded. To ensure

[†]These authors contributed equally to this article

[★] Corresponding author

Phone : +82-(0)54-429-7813 Fax : +82-(0)54-429-7829

E-mail : naratw@korea.kr

This is an open access article 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.

the safety of the meat and bone meal, 32 samples of the meat and bone meal as well as compound feed were collected, and additional residue investigations were conducted for ketamine and dexmedetomidine. As a result of the analysis, no component was detected. However, through this investigation, it was confirmed that some animal drugs, such as anesthetics, can remain without decomposition even at high temperature and pressure; therefore, there is a need for further investigation of other potentially hazardous substances not controlled in the feed.

요약: 안락사 시킨 유기견의 사체를 고온 및 고압 처리하여 가루로 만들고 사료 원료(육골분)로 사용했다는 언론보도에 따라 안락사에 사용된 마취제 케타민과 텍스메데토미딘의 사료 내 잔류가능성이 제기되었다. 이에 신속한 잔류 조사를 위해 QuEChERS 전처리와 질량분석기를 이용한 동시분석법을 개발하였다. 개발된 동시분석법의 직선성은 0.999 이상을 보였다. 선택성은 무처리 시료와 케타민과 텍스메데토미딘이 정량한계수준으로 처리된 시료의 비교를 통해 평가하였고, MRM 크로마토그램을 확인한 결과 각각의 머무름 시간에서 매질의 간섭은 없었다. 검출한계는 0.6 µg/L, 정량한계는 2 µg/L로 설정하였으며, 분석법의 최종 정량한계는 10 µg/kg로 설정하였다. 육골분, 육분, 애완용 배합사료 중 케타민의 회수율 실험 결과, 80.48-98.63 %, 상대표준편차 5.00 % 이하의 결과를 보였으며, 텍스메데토미딘은 회수율 72.75-93.00 %, 상대표준편차 4.83 % 이하의 결과를 보였다. 개발된 분석법을 활용하여 케타민과 텍스메데토미딘의 잔류실태조사를 실시하였다. 해당 원료가 배포된 시기에 제조된 육골분 등의 사료 6 점을 수거하여 분석한 결과, 육골분 시료 한점에서 케타민이 10.8 µg/kg이 검출되었고, 텍스메데토미딘은 정량한계 미만의 농도로 확인되었다. 이에 해당 원료를 사용한 제품은 전량 회수, 폐기되었다. 이후에도 육골분 사료의 안전성 확보를 위해 육골분 및 배합사료 등의 시료 32점을 추가로 수거하여 케타민과 텍스메데토미딘에 대한 잔류 조사를 실시 하였고, 분석결과 두 성분 모두 검출되지 않았다. 하지만 이번 조사를 통해 마취제 같은 의약품들이 고온 및 고압에도 분해되지 않고 잔류할 수 있다는 사실을 확인하였고, 이에 따라 육골분 사료에서 관리하고 있지 않은 다른 잠재적 유해물질들에 대한 조사의 필요성이 제기되었다.

Key words: ketamine, dexmedetomidine, anesthetic, LC-MS/MS, monitoring

1. 서 론

사료는 원료, 제조, 유통단계에 이르기까지 동물용 의약품, 농약, 곰팡이독소, 유해 미생물 등 다양한 유해물질에 노출되어 있다. 이는 사료 제조 시 원료로 사용 가능한 물질이 곡류부터 축산물에 이르기까지 다양한 범위로 구성되어 있기 때문이다. 하지만 최근에는 마취성분으로 알려져 있는 케타민, 텍스메데토미딘에 대한 노출 가능성이 제기되었다. 관련 보도에 따르면 2019년 1월부터 9월까지 제주에서 안락사된 유기견 2,395마리, 자연사한 유기견 1,434마리를 포함한 총 3,829마리의 유기견 사체가 폐기물업체에서 130도 이상의 고온과 7기압 이상의 고압으로 태워 가루로 만드는 방식인 ‘렌더링’ 처리 후 사료 업체에 원료로 넘어간 것이 확인 되었다. 이에 따라 이를 원료로 사용하여 제조된 육골분 사료 25톤이 시중에 유통되었으나, 사료 안전성에 대한 문제가 제기되어 전량 회수

되었다. 이는 약물을 통해 안락사한 유기견 사체가 사료 원료(육골분)로 사용되었고, 질병을 지닌 유기견 사체가 사료화 되었을 가능성을 배제할 수 없기 때문이다. 실제로 유기동물 안락사 시 사용된 약물에 대해 조사한 결과 케타민 및 텍스메데토미딘 등이 사용된 것으로 확인되었다. 케타민은 강력한 마취 효과가 있는 NMDA 수용체 길항제로 이는 펜시클리딘(PCP)을 대체하기 위해 1963년에 개발되었다. 벨기에에서 수의학 목적으로 사용되기 시작했으며 1964년에 PCP와 비교하여 경미한 환각 효과와 짧은 정신분열 효과를 나타내는 것으로 입증되었다. 1970년에 FDA 승인을 받았으며, 이후 의료 및 수의학에서 수술을 위한 마취 유도, 통증 경감 작용을 위한 약품의 용도로 주로 이용되고 있다. 발암성에 관한 독성 연구는 수행되지 않았다.^{1,4} 텍스메데토미딘은 불안 완화제, 진정제 및 진통제로 사용되고 있다. 텍스메데토미딘은 진통, 불안 완화 및 진정 특성을 가진 이미다졸 유도체이자

메데토미딘의 주요 활성 이성질체이다. 메데토미딘은 외과용 마취제 및 진통제로 사용되는 합성 화합물이며 일반적으로 메데토미딘 염산염으로 발견된다. 메데토미딘은 정맥 주사로 사용할 수 있는 알파-2 아드레날린 작용제이며, 주로 개에 대한 수의학적 사용이 승인되어 있다. 케타민과 동일하게 발암성에 관한 독성 연구는 수행되지 않았다.⁵⁻⁹ 케타민과 메데토미딘을 병용투여 할 경우 각 약물의 부작용을 최소화 할 수 있고, 각각의 약물로는 균형 마취에 적합하지 않아 주로 동시에 사용한다.¹⁰ 우리나라는 사료 내 사용 가능한 동물용의약품의 종류 및 사용기준을 사료관리법으로 정하여 관리하고 있다. 사료관리법에서는 인체 또는 동물 등에 해로운 유해물질이 허용기준 이상으로 잔류 될 경우, 동물용의약품이 허용기준 이상으로 잔류하는 것 등의 해당되는 경우에 사료를 제조, 수입 또는 판매하거나 사료의 원료로 사용할 수 없게 규정하고 있다.

이에 본 연구에서는 케타민과 텍스메데토미딘의 신속하고 정확한 모니터링을 위해 LC-MS/MS를 이용한 동시분석법을 확립하였고 해당 시기에 제조되어 유통 중인 육골분 사료와 이후 제조된 육골분 등의 사료를 수거하여 잔류실태조사를 실시하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 화학물질 및 시약

케타민(Ketamine)과 텍스메데토미딘(Dexmedetomidine)은 항정신성의약품으로 분류되어 표준물질의 직접 구매가 불가능하였다. 이에 케타민은 식품의약품안전처 마약류 표준품 분양 가이드라인에 따라 분양받

았고, 텍스메데토미딘은 농림축산검역본부 연구용 표준물질을 분양 받았다(Table 1). 아세토니트릴(acetonitrile)과 메탄올(methanol)은 HPLC 등급으로 Merck (Darmstadt, Germany) 사 제품을 사용하였고, 포름산(formic acid, 98%)는 Fluka (Honeywell International Inc. New Jersey, USA) 사 제품을 사용하였다. 추출에 사용된 황산마그네슘(MgSO₄) 4 g, 염화나트륨(NaCl) 1 g 혼합시약은 BEKOLut GmbH & Co. KG (Hauptstuhl, Germany) 사 제품을 사용하였고, 정제에 사용된 C18 분말은 Biotage (Uppsala, Sweden) 사의 제품을 사용하였다. 시료를 여과하기 위한 syringe filter (Whatman, Maidstone, UK)는 PTFE (polytetrafluoroethylene)재질의 13 mm, 0.2 µm규격을 사용하였다. 유효성 검증을 위한 무처리시료는 미국사료검사관협회(Association of Animal Feed Control Official, AAFCO)의 시료를 이용하였다.

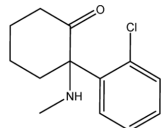
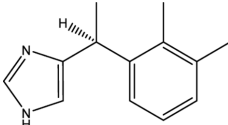
2.2. 표준물질 조제

표준물질인 케타민과 텍스메데토미딘을 각각 메탄올에 녹여 1,000 µg/L의 농도로 표준원액을 조제하였다. 혼합표준용액은 각각의 표준원액을 혼합 후 메탄올에 녹여 200 µg/L의 농도가 되도록 제조하였다. 정성 및 정량을 위한 검량선 작성을 위해 혼합표준용액을 메탄올로 희석하여 2, 5, 10, 20, 50, 100 µg/L의 농도가 되도록 제조하였다.

2.3. 분석대상 시료

2019년 10월 제주도에서 안락사 시킨 유기동물을 사료 원료(육골분)로 사용했다는 언론보도에 따라 케타민과 텍스메데토미딘의 신속한 잔류실태 조사를 위

Table 1. Physicochemical properties of ketamine and dexmedetomidine

Compound	Chemical structure	Molecular Formula (g/mol)	Molecular weight	Melting Point (°C)	Log Kow ^{a)}	Pka	Class
Ketamine		C ₁₃ H ₁₆ ClNO	237.73	92.5	2.69	7.5	Anesthetic
Dexmedetomidine		C ₁₃ H ₁₆ N ₂	200.28	146-149	2.8	7.1	Anesthetic

TOXNET, Toxicology data network (U.S. National Library of Medicine).

^{a)}n-octanol/water partition coefficients.

하여 2019년 12월에 제주도 내 제조업체 및 마트에서 사료 6점(육골분3점, 애완동물 사료 3점)을 수집하였다. 이후 지속적인 잔류 실태조사를 위하여 2020년 8월부터 10월까지 온라인 및 대형매장 등에서 육골분을 포함하거나 습식 제품인 배합사료 20점과 동물성 단백질류(육골분, 육골포) 12점을 수집하여 케타민과 텍스메데토미딘에 대한 조사를 실시 하였다.

2.4. 추출 및 정제

균질화한 시료 5 g을 정밀히 달아 50 mL 원심분리관에 넣고, 0.1% 개미산이 포함된 아세토니트릴 : 메탄올(50/50, V/V) 10 mL 가한 뒤 1분간 진탕 추출하였다.²⁴ 황산마그네슘 4 g과 염화나트륨 1 g을 추가하여 1분간 진탕한 후 4 °C, 3000 g에서 5분간 원심분리하여 상층액 4 mL를 취하였다. C₁₈ 50 mg 이 담겨 있는 15 mL 원심분리관에 상층액 4 mL을 가하고 1분간 충분히 혼합한 후 이를 4 °C, 3000 g에서 5분간 원심분리 하였다. 정제된 상층액을 0.2 μm (PTFE, Whatman Inc., Maidstone, UK) 실린지 필터로 필터한 용액을 시험용액으로 사용하였다(Fig. 1).

2.5. LC-MS/MS 분석조건

분석기기는 Shimadzu (Tokyo, Japan) 사의 LC-MS/MS 8060을 사용하였고, 분석용 컬럼은 Imtakt Unison UK-C18 (3.0 μm, 2.0 × 150 mm, Kyoto, Japan)을 사용하였으며, 유속은 0.3 mL/min, 주입량은 2 μL, 온도는 40 °C를 유지하였다. 이동상은 0.1% 개미산, 5 mM 암모늄포메이트를 함유한 물을 이동상 A로, 0.1% 개미산, 5 mM 암모늄포메이트를 함유한 메탄올을 이동상 B로 1 분: 95% (A) 5% (B), 18 분 5% (A) 95% (B), 22 분 5% (A) 95% (B), 22.1 분 95% (A) 5% (B), 30 분 95% (A) 5% (B)로 기울기 용리방식을 최적화 하였다. 질량분석기 세부조건은 전기분무이온화(electro-spray

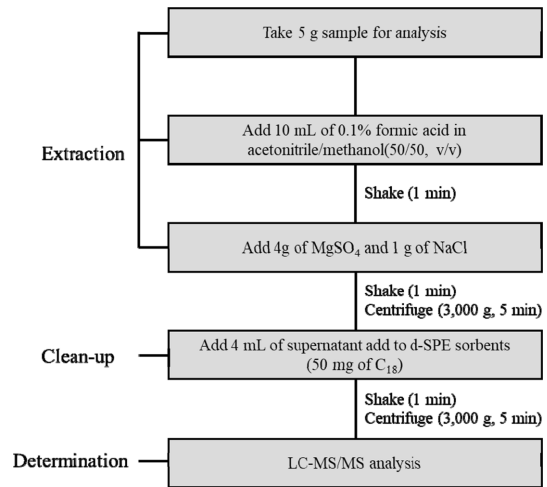


Fig. 1. Flowchart of the sample preparation for analysis of ketamine and dexmedetomidine in feed.

ionization, ESI)법의 양이온모드(positive ion mode)를 사용하였고, Interface temperature 150 °C, DL temperature 250 °C, Nebulizing gas 3 L/min, Heating gas 10 L/min, Drying gas 10 L/min이었다. Multiple monitoring mode (MRM)조건은 Table 2와 같이 확립하였다.¹¹⁻¹⁴

2.6. 유효성 확인

확립된 시험법은 식품의약품안전평가원의 가이드라인에 따라 선택성(Selectivity), 직선성(Linearity), 검출한계(Limit of Detection), 정량한계(Limit of Quantification), 정확도 (Accuracy), 정밀도(Precision)를 확인하였다.^{15,23} 직선성을 확인하기 위해 2-100 μg/L가 되도록 혼합표준용액을 조제하였고, 분석기기에 주입하여 peak의 면적을 기준으로 표준검량선을 작성하여 검량선의 결정계수(coefficient of correlation, r²)를 구하였다. 시험법의 정확도 및 정밀도를 확인하기 위하여 무

Table 2. Multiple reaction monitoring (MRM) conditions for ketamine and dexmedetomidine

Compound	Precursor ion		Product ion					
	m/z	Q1 pre bias (V) ^{a)}	Quantitative ion			Qualitative ion		
			m/z	CE (V)	Q3 pre bias (V) ^{b)}	m/z	CE (V) ^{c)}	Q3 pre bias (V)
Ketamine	238	-26	125	-25	-27	220	-14	-26
Dexmedetomidine	201	-22	95	-18	-22	68	-33	-28

^{a)}Voltage promotes the ionization of the precursor ion.

^{b)}Voltage promotes the ionization of the product ion.

^{c)}Collision energy.

처리 시료에 혼합표준용액을 첨가하여 회수율 실험을 진행하였다. 회수율 실험은 정량한계, 정량한계 2 배, 10 배의 농도로 5반복 수행하였고 평균 회수율과 상대 표준편차(RSD, %, relative standard deviation)를 산출하였다. 기기상 검출한계 및 정량한계는 이미 알고 있는 저농도 분석대상 물질을 포함한 검체의 신호와 공시험 검체의 신호를 비교하여 구하였고, 검출한계는 3:1의 신호 대 노이즈 비가 산출되는 농도, 정량한계는 10:1의 신호 대 노이즈 비가 산출되는 농도로 선정하였다. 시료의 무게 및 회석배수가 반영된 분석법 정량한계는 회수율 기준을 충족하는 가장 낮은 주가 농도로 선정하였다.

3. 결과 및 토의

3.1. LC-MS/MS 분석조건 확립

케타민과 텍스메데토미딘은 신속하고 정확한 분석을 위하여 LC-MS/MS로 분석하였으며, 전기분무이온화법(ESI)의 positive ion mode, multiple reaction monitoring (MRM)mode 조건으로 분석되었다. 선구이온

(precursor ion)은 full scan mode에서 질량 스펙트럼을 확인하여 케타민과 텍스메데토미딘의 질량 값(exact mass, M)에 양성자(H⁺)가 결합된 [M+H]⁺ 형태인 m/z 238, 201의 선구이온을 확인하였다. MS/MS분석 시 collision energy를 조절하여 product ion의 감도와 S/N ratio가 최적이 되도록 조정했으며, 모든 조건을 만족하는 precursor/product ion pair를 선정하였다. 그 중 감도가 가장 좋은 product ion을 케타민은 m/z 125를 텍스메데토미딘은 m/z 95를 정량이온(Quantitation ion)으로 그 다음으로 높은 감도를 나타내는 이온인 케타민은 m/z 220과 텍스메데토미딘은 m/z 68을 정성이온(confirmation ion)으로 선택하였다.

3.2. 선택성 및 직선성

혼합표준용액을 2, 5, 10, 20, 50, 100 µg/L 농도로 제조한 후 2 µL를 LC-MS/MS에 주입하여 분석한 결과 표준용액에서 결정계수(r^2) 0.999이상으로 높은 직선성(linearity)을 확인하였다(Table 3). 또한 케타민과 텍스메데토미딘의 최적의 MRM조건을 확립하였고, 단시료 및 배합시료의 무처리 시료를 분석하여 높

Table 3. The retention time, linearity and LOQ of ketamine and dexmedetomidine in feed by LC-MS/MS

Compound	Retention time (min)	Linear range (µg/L)	Regression equation ^{a)} $y = ax + b$	r^2 b)	LOQ ^{c)} (µg/kg)
Ketamine	11.1	2-100	$y = 327,250x + 100,705$	0.9992	10
Dexmedetomidine	13.8	2-100	$y = 504,936x + 81,019$	0.9994	10

^{a)}y is the peak area, x is the concentration of coumarins (µg/L).

^{b)}Coefficient of determination.

^{c)}Limit of quantitation.

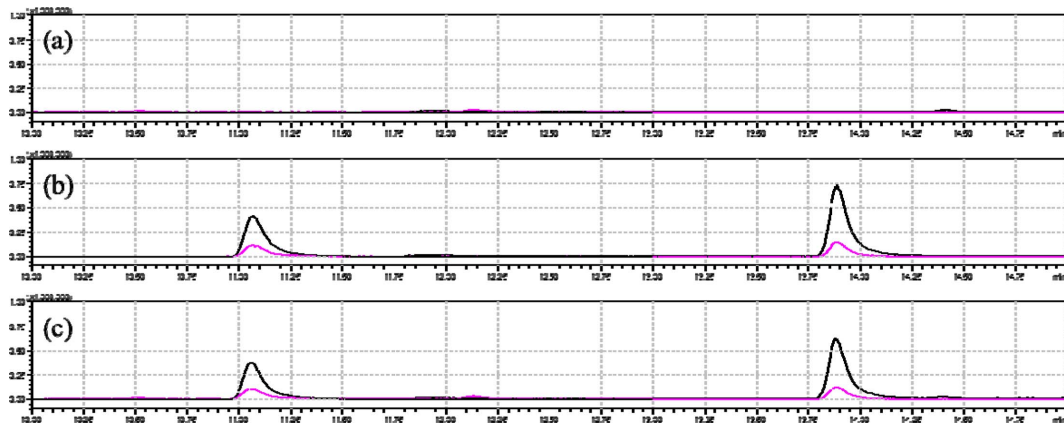


Fig. 2. Mass spectra of blank, standard, and sample that contains the ketamine (11.1 min) and dexmedetomidine (13.8 min). (a) blank sample, (b) ketamine and dexmedetomidine standard, (c) ketamine and dexmedetomidine in sample.

은 선택성과 분리능을 확인하였다(Fig. 2).

3.3. 검출한계, 정량한계, 정확도 및 정밀도

기기상 검출한계는 0.6 µg/L, 정량한계는 2 µg/L로 설정하였고,¹⁵ 분석법의 최종 정량한계는 SANTE/12682/2019 가이드라인에 따라 개발된 분석법의 회수율 결과가 유효성 확인 지침의 기준을 충족하는 가장 낮은 주가 농도인 10 µg/kg으로 선정하였다.²³ 시험법의 정확도 및 정밀도를 평가하기 위하여 육골분, 육분, 배합사료를 사용하였으며, 회수율 실험은 정량한계, 정량한계의 2 배, 10 배의 농도가 되도록 표준용액을 첨가하여 각각 5반복 실시하였다. 그 결과 평균 회수율과 상대표준편차는 케타민은 80.48-98.63%, 0.65-5.00%, 텍스메데토미딘은 72.75-93.00%, 0.96-4.83%로 나타나 권장 기준을 만족한 것을 확인할 수 있었다(Table 4).^{15,23}

3.4. 사료 내 케타민과 텍스메데토미딘의 잔류조사

케타민과 텍스메데토미딘의 잔류조사를 위하여 유기견 사체가 원료로 제조되고 유통되었던 시기의 육골분 사료 3 점과 애완동물용 배합사료 3점을 수거하여 분석하였다. 6 점의 시료 중 육골분 사료 한점에서 케타민 10.8 µg/kg과 텍스메데토미딘이 정량한계 수준인 10 µg/kg 이하로 미량 확인되었다(Table 5). 또한

안전성 조사를 위해 관련 사료가 전량 회수 처리된 이후에 제조된 사료 32점을 추가로 수거하여 분석한 결과, 시료 32점 모두 케타민과 텍스메데토미딘이 검출되지 않았다.

4. 결 론

사료 중 케타민과 텍스메데토미딘의 잔류조사 결과, 실제로 이 두 성분이 130 °C 이상의 고온과 7기압 이상의 고압에도 분해되지 않고 사료에까지 잔류하는 것이 확인 되었다. Foertsch 등의 연구에서도 케타민을 다양한 열 환경에 6 개월 간 보관한 결과, 온도에 대한 농도의 변화가 없음을 확인하였고, 반감기 역시 다른 화합물에 비해 6 개월까지 느리게 분해됨을 확인 하였다.¹⁶ 사료 중 마취제의 잔류에 대한 선행연구는 없지만 말이나 개의 혈청, 골격근 등에서의 잔류에 대한 연구결과는 보고되고 있다. 그리고 케타민과 같은 마취제는 처리된 후 다양한 조직에 널리 분포되지만 그 농도는 사용된 농도보다 낮고 독성 효과도 훨씬 적다는 사전연구결과들이 있었다.¹⁷⁻²² 이번 연구에서도 이와 유사하게 케타민과 텍스메데토미딘이 육골분에서 낮은 농도로 잔류하고 있음을 확인하였다. 이후 조사한 국내 유통 사료에서는 두 성분들의 잔류가

Table 4. The recovery of ketamine and dexmedetomidine in feed (three types) by LC-MS/MS

Compound	Spiked concentration (µg/kg)	Recovery ^{a)} (RSD ^{b)} , %		
		Feed sample		
		Meat and bone meal	Meat meal	Pet food
Ketamine	10	98.63 (1.58)	92.08 (1.59)	83.22 (5.00)
	20	96.56 (2.35)	87.64 (2.04)	81.03 (4.50)
	100	89.83 (2.21)	80.73 (2.24)	80.48 (0.65)
Dexmedetomidine	10	93.00 (1.14)	86.27 (2.68)	76.18 (4.83)
	20	91.02 (0.96)	85.14 (1.19)	72.75 (3.73)
	100	85.89 (2.40)	81.53 (1.88)	72.84 (1.08)

^{a)}Mean values of 5 times repetition.

^{b)}Relative standard deviation.

Table 5. Mean concentration (µg/kg) of ketamine and dexmedetomidine in 6 feed ingredients and compound feeds (n=6)

Compound	Feed ingredients			Compound feeds		
	MAB1 ^{a)}	MAB 2	MAB 3	Pet food 1	Pet food 2	Pet food 3
Ketamine	10.8	-	-	-	-	-
Dexmedetomidine	ND ^{b)}	-	-	-	-	-

^{a)}MAB, Meat and bone meal.

^{b)}Not detected (below the LOQ).

확인되지 않았지만 본 연구의 결과로, 화학적으로 안정한 구조를 갖고 있는 유해물질들에 대한 조사의 필요성이 대두되었다. 이에 유통되는 육골분 사료는 관리성분 이외의 잠재적 유해물질에 대한 조사가 필요할 것으로 보여지며, 마취제와 같은 물질의 잔류 특성, 처리 방법 등에 대한 연구도 지속적으로 필요할 것으로 보인다. 그리고 이러한 결과들을 마취제 등 다양한 약물에 대한 사료 안전관리의 기초자료로 활용하고자 한다.

References

1. N. A. Anis, S. C. Berry, N. R. Burton and D. Lodge, *Br. J. Pharmacol.*, **79**(2), 565-575 (1983).
2. D. A. Haas and D. G. Harper, *Anesth. Prog.*, **39**(3), 61-68 (1992).
3. G. Ivani, C. Vercellino and F. Tonetti, *Minerva Anesthesiol.*, **69**(5), 468-471 (2003).
4. G. Mion and T. Villeveille, *CNS Neuroscience Therapeutics*, **19**(6), 370-380 (2013).
5. J. Mantz, J. Josserrand and S. Hamada, *Eur. J. Anaesthesiol.*, **28**(1), 3-6 (2011).
6. J. S. Salonen, *Acta Vet. Scand.*, **85**, 49-54 (1989).
7. J. Verstegen, X. Fargetton and F. Ectors, *Acta Vet. Scand.*, **85**, 117-123 (1989).
8. F. K. Mohammad, I. K. Zangana and A. R. Abdul-Latif, *J. Vet. Med. Ser. A.*, **40**(1-10), 328-331 (1993).
9. The drug bank database, <https://www.drugbank.ca/drugs/DB08814/>, Assessed 1 Oct 2021.
10. J. D. Netto, G. C. Musk, G. L. Marker and R. D. Tren-gove, *Biomed. Chromatogr.*, **25**(12), 1374-1380 (2011).
11. I. R. Miksa, M. R. Cummings and R. H. Poppenga, *J. Anal. Toxicol.*, **29**(6), 544-551 (2005).
12. C. Y. Chen, M. R. Lee, F. C. Cheng and G. J. Wu, *Talanta*, **72**(3), 1217-1222 (2007).
13. W. Li, J. Ma, M. Zeng, X. Wang, X. Wang and L. Hu, *Lat. Am. J. Pharm.*, **30**(9), 1849-1853 (2011).
14. H. Toki, T. Ichikawa, A. Mizuno-Yasuhira and J. Yamaguchi, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **148**, 288-297 (2018).
15. SANTE. Guidance Document on Analytical Quality Control and Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed. Directorate General Health and Consumer Protection, European Commission. SANTE/12682/2019.
16. M. J. Foertsch, J. T. McMullan, N. J. Harger, D. Rodriguez Jr, A. Salvator, E. W. Mueller and C. A. Droege, *Pre-hospital Emerg. Care*, **26**(3), 422-427 (2022).
17. S. P. Nordt and R. F. Clark, *J. Emerg. Med.*, **15**(3), 357-365 (1997).
18. D. M. Grove and E. C. Ramsay, *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **216**(12), 1929-1932 (2000).
19. E. Rector, K. Otto, M. Kietzmann, I. Nolte and W. Leh-macher, *Berl. Munchener Tierarztliche Wochenschr.*, **109**(1), 18-22 (1996).
20. T. N. Storms, J. Schumacher, D. A. Osborn, K. V. Miller and E. C. Ramsay, *J. Zoo Wildl. Med.*, **37**(3), 347-353 (2006).
21. E. Bonafanti, F. Cosnier, L. Wathier and P. campo, *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, **77**, 6-9 (2016).
22. M. Aleman, E. Davis, H. Knych, A. Guedes, F. Smith and J. E. Madigan, *J. Vet. Intern. Med.*, **30**(4), 1322-1326 (2016).
23. MFDS. Guidelines on standard procedures for preparing analysis methods. Ministry of Food and Drug Safety Chungcheongbuk-do, 2016.
24. N. Montemurro, C. Postigo, A. Lonigro, S. Perez and D. Barceló, *Anal. Bioanal. Chem.*, **409**(23), 5375-5387 (2017).

Authors' Position

Hyun-young Chae	: Resercher
Hyejin Park	: Scientific officer
Hyung-Ju Seo	: Resercher
Su-nyeong Jang	: Resercher
Seung Hwa Lee	: Scientific officer
Min-Hee Jeong	: Scientific officer
Hyunjeong Cho	: Senior Scientific officer
Seong-Hee Hong	: Head of Experiment Research Institute
Tae Woong Nas	: Scientific officer