

LC-MS/MS를 이용한 넙치(*Paralichthys olivaceus*)시료의 톨트라주릴 및 톨트라주릴 설펜 분석

홍도희 · 김아현 · 이가정 · 윤민철 · 손광태 · 김명석¹ · 김나영¹ · 정승희¹ · 조미라*

국립수산물연구원 식품위생가공과, ¹국립수산물연구원 병리연구과

Determinations of Toltrazuril and Toltrazuril Sulfone Levels in Olive Flounder *Paralichthys olivaceus* Samples Using Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry

Do Hee Hong, Ah Hyun Kim, Ka Jeong Lee, Minchul Yoon, Kwang Tae Son, Myoung Sug Kim¹, Na Young Kim¹, Sung Hee Jung¹ and Mi Ra Jo*

Food Safety and Processing Research Division, National Institute of Fisheries Science, Busan 46083, Korea

¹Pathology Research Division, National Institute of Fisheries Science, Busan 46083, Korea

Several studies investigating the prevention and treatment of external parasites in farmed olive flounder *Paralichthys olivaceus* have found that the anticoccidial agent toltrazuril sulfone is an effective antiparasitic. Prior to undertaking a full-scale study, we developed analytical methods to detect the levels of toltrazuril and toltrazuril sulfone in farmed flounder samples using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). This analysis showed that LC-MS/MS changed the mobile phase and collision energy of toltrazuril and toltrazuril sulfone. This was validated using established conditions. Sample pre-treatment for this process involved extraction with dichloromethane and purification by liquid-liquid extraction in formic acid, acetonitrile, and n-hexane, followed by determination of all compounds by LC-MS/MS. Separation was achieved within 10 min by gradient elution using a Capcell Pak C18 (3.0 μ m, 100 $\times$ 2.0 mm) analytical column (Shiseido UG 120V) with a mixture of 0.1% (v/v) formic acid and acetonitrile. Multiple reaction monitoring was used for selective detection of toltrazuril and toltrazuril sulfone. This method yields satisfactory results for linearity, precision, and limits of quantification. Therefore, the method established in our study will serve as a basis for further research on parasite control by toltrazuril and toltrazuril sulfone.

Key words: Liquid-liquid extraction (LLE), LC-MS/MS, Olive flounder, Toltrazuril, Toltrazuril sulfone

서 론

톨트라주릴(toltrazuril)은 소, 돼지, 가금류 및 양 등 가축의 기생충 질병의 치료, 차단 및 예방의 목적으로써 1980년대에 처음 개발되어 오늘날까지 동물용의약품으로 승인되어 축산분야에서는 광범위하게 사용하고 있는 의약품이다(EMEA, 1998; Maes et al., 2007; Kim et al., 2010; Olsen et al., 2012). 특히 톨트라주릴 설펜(toltrazuril sulfone, ponazuril)은 다른 톨트라주릴보다 적은 양으로도 효과가 있는 것으로 보고되기도 하였다

(Lindsay et al., 2000; Furr et al., 2001; Franklin et al., 2003). 그러나 톨트라주릴은 독성이 강한 제제로서, 식품으로서 사람에게 이행될 경우 부작용을 일으킬 수도 있어서(Ai et al., 2011) 이를 관리하기 위하여 EU (European union)는 동물에 대하여 최대허용기준(maximum residue limits, MRLs)이 설정되어 있다[Regulation (EC) No. 1831/2003, 2003]. 즉, 가금류에 대한 최대허용기준치는 근육 0.1 mg/kg, 지방(껍질포함) 0.2 mg/kg, 간 0.6 mg/kg 및 신장 0.4 mg/kg로 되어 있고, 사람의 섭취목적인 난류에 대해서는 사용을 금지하고 있다. 우리나라의 경우

*Corresponding author: Tel: +82. 51. 720. 2620 Fax: +82. 51. 720. 2619

E-mail address: mirajo@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.

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2019.0461>

Korean J Fish Aquat Sci 52(5), 461-467, October 2019

Received 28 August 2019; Revised 10 September 2019; Accepted 18 October 2019

저자 직위: 홍도희(연구원), 김아현(연구원), 이가정(연구사), 윤민철(연구사), 손광태(연구관), 김명석(연구관), 김나영(연구사), 정승희(연구관), 조미라(연구관)

소, 돼지 및 가금류(육)에 0.1 mg/kg, 소 및 돼지의 간에 0.5 mg/kg, 지방은 0.15 mg/kg 및 신장은 0.25 mg/kg이며, 가금류의 간 0.6 mg/kg, 지방 0.2 mg/kg, 신장은 0.4 mg/kg으로 관리되고 있으나, 수산물에 대한 잔류허용기준은 현재 설정되어 있지 않다.

한편, 톨트라주릴 설폰은 톨트라주릴의 대사산물인 잔류마크(residue maker)로서 이용되며 이 대사산물은 친유성으로 pK_a 가 약 7.4로 산성의 성질을 지니고 있으나, 물에는 거의 용해되지 않는 특성을 가지고 있다(Table 1). 이러한 톨트라주릴의 특징으로 인해 이전의 시험법들은 친유성 및 pK_a 값 등을 이용한 방법으로 이루어져 있을 뿐 아니라 대부분이 축산물에 한정되어 보고되어 있는 실정이다(Li et al., 2006; Moloney et al., 2012; Clarke et al., 2014). 또한 우리나라 식품공전에 등재되어 있는 시험법도 축산물을 중심으로 하여 수산물은 잔류허용기준이 없이 동물용의약품 다중동시분석법으로 등재되어 있는 상황이다. 수산물은 축산물과 다르게 저분자 단백질 또는 지방들이 분포되어 있어서 톨트라주릴 설폰 분석에 방해되는 요소로 작용하기 때문에 수산물에 대한 시험법은 따로 개발할 필요가 있다고 판단되었다. 현재 톨트라주릴 설폰이 가축에서는 효과 및 효능이 뛰어난 기생충 구제제로 사용되고 있다. 톨트라주릴의 시험법 개발은 양식 넙치에 발생하는 기생충 구제제로서 평가 연구를 시도하기에 앞서 성분들을 검출하기 위해 연구가 필요하다고 판단되었다. 따라서 본 연구에서는 식품공전의 시험법 뿐만 아니라 여러 보고들을 참고하여 톨트라주릴 검출을 위한 적합한 분석법을 개발 및 확립하여 이를 토대로 기생충 구제제로서 효능 및 안전성 평가의 기초자료로 활용하고자 한다.

재료 및 방법

시약 및 시료

항생제의 표준품으로 톨트라주릴은 Sigma사(St. Louis MO, USA)의 제품을, 톨트라주릴 설폰은 Toronto Research Chemi-

cals사(North York, ON, Canada) 제품을 사용하였다. 항생제 추출시약으로 water, acetonitrile, methanol, dichloromethane (DCM), formic acid, n-hexane 등은 Merck (Darmstadt, Germany)의 제품을 사용하였으며, 기타 시약은 HPLC급이나 특급을 사용하였다. 실험에 사용한 넙치(*Paralichthys olivaceus*) 시료는 비늘과 내장을 제거한 후 육(껍질 포함)만을 사용하여 잘게 다진 후 실험에 사용하였고, 실험 전까지 -20°C 에 보관하였다.

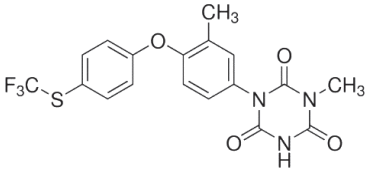
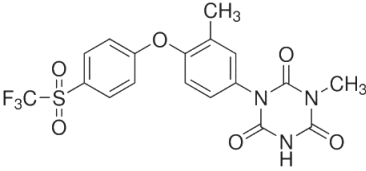
표준용액 조제

각 2종의 표준품 10 mg씩을 100 mL 용량 플라스크에 취하고 methanol에 녹여 100 mg/L 농도의 항생제 표준원액(standard stock solution)을 조제하였다. 표준희석용액(working standard solution)은 standard stock solution 10 mL을 정확히 취하여 100 mL 용량 플라스크에 옮기고 이동상으로 표시선까지 채운 표준용액을 20, 50, 100, 200, 500 $\mu\text{g/L}$ 로 희석하여 사용하였다. Standard stock solution은 4°C 에서 3개월간 안정하였고, working standard solution은 시험 때마다 조제하여 사용하였다.

시료전처리

시료 5 g에 DCM 25 mL을 첨가하여 균질화(10,000 rpm, 10 분)한 후 5,000 rpm에서 15분간 원심분리하고, 상층액은 폐기하였으며 이 과정을 두 번 반복하였다. 하층액은 45°C 에서 질소농축시켜 건조한 잔사는 0.2% formic acid 및 acetonitrile 혼합용액(1:1, v/v) 20 mL과 n-hexane 20 mL을 첨가하여 2분간 강하게 흔든 다음 5,000 rpm에서 2분간 원심분리하고 다시 상층액은 폐기하였다. 하층액에 DCM 25 mL을 첨가하여 5분간 흔든 후, 5,000 rpm에서 2분간 원심분리하고 상층액인 수용액을 제거하여 45°C 에서 질소농축을 통해 완전 건조시켰다. 건조시킨 잔사는 water 및 acetonitrile 혼합용액(1:1, v/v) 2 mL

Table 1. Chemical structures and physicochemical properties [molar mass (M_w), acidity constant (pK_a), and intrinsic solubility (S_w)] for toltrazuril and toltrazuril sulfone*

Name	Structure	M_w (g mol ⁻¹)	pK_a	S_w (mg mL ⁻¹)
Toltrazuril		425.38	7.42	0.000102
Toltrazuril sulfone		457.38	7.42	0.000741

*, <http://www.chemicalize.org>.

로 정용하여 정용액은 0.2 µm PTFE (polytetrafluoroethylene; Sartorius, Hannover, Germany) syringe filter로 여과한 후 LC-MS/MS로 분석하였다.

기기분석 조건

HPLC 기기는 finnigan surveyor (ThermoFisher, San Jose, CA, USA)를 사용하여 C18 column (Shiseido UG 120V, 2 mm ID×100 mm, 3 µm)에 0.1% formic acid/water 용액과 0.1% formic acid/acetonitrile 용액을 50:50의 비율로 하여 흘리다가 6분까지 5:95 비율로 gradient시킨 후 다시 초기 이동상(50:50)으로 하여 총 10분간 분석하였다. 이때 column 온도는 40°C를 유지하였으며, 유속은 0.25 mL/min으로 하였다. MS 시스템은 triple-quadrupole mass spectrometer (Finnigan TSQ Quantum, ThermoFisher, San Jose, CA, USA)로서 LC시스템과 electrospray ionization (ESI) interface로 구성되어 있다. 이 톨트라주릴 및 톨트라주릴 설펜 분석에 있어서는 negative mode로 하였고, spray voltage는 3,000 V, nebulizer 및 collision gas는 질소와 아르곤으로 분사 및 이온화시켰으며 capillary 온도는 350°C로 하여 고정하였다. 또한 정확한 분석을 위하여 SRM (selected reaction monitoring) mode로 최적의 fragment ion들을 산출하여 정량 및 정성분석 하였으며, 여기서 산출되는 data 값들은 Xcalibur software (Version 2.0.7, ThermoFisher, San Jose, CA, USA)를 사용하였다(Table 2).

표준곡선의 작성 및 계산

각 농도의 톨트라주릴 및 톨트라주릴 설펜 표준용액(20, 50, 100, 200, 500 ng/mL)을 10 µL씩 주입하여 3회 반복 분석한 chromatography로부터 각각의 항생제에 대한 농도별 평균면적을 구하여 X축을 농도, Y축을 면적으로 하여 검량선을 작성하였다. 시험용액 분석에서 얻은 chromatogram으로부터 각 성분에 대하여 머무름 시간이 일치되는 각각의 peak에 대한 평균면적을 구한 다음 검량선 좌표의 Y축에 동일한 값을 표시하고 이 값과 검량선상 만나는 점에서 수직으로 X축과 만나는 점을 시험용액의 농도로 하였다. 이 농도에 시험용액의 회석배수(잔류물에 가한 이동상의 부피)를 곱하고 시료무게로 나누어 최종 시료 중 각 성분의 농도를 산출하였다.

회수율, 검출한계 및 정량한계

시험방법의 회수율을 조사하기 위하여 Causon (1997)의 방법에 따라서 넘치에 톨트라주릴 및 톨트라주릴 설펜 표준용액 50, 100 및 200 µg/kg을 가하여 분석하고 얻어진 chromatogram의 peak 면적비를 이용하여 구하였다. Sensitivity에 대한 LODs (limits of detection)와 LOQs (limits of quantitation)의 계산은 다음과 같다. 즉, LODs는 spiked 시료로부터 signal-to-noise 비가 3:1이 되는 level을 구하였고, LOQs는 signal-to-noise 비가 10:1이 되는 level로 하였다. 정밀성 및 정확성에 대한 시험은 spiked 시료들을 반복하여 실험했을 때 나온 값을 통해 신뢰성

이나 재현성이 있는지 확인할 수 있다. 따라서 이들의 계산은 다음의 수식으로 나타낼 수 있다.

$$\text{Precision, C.V. (coefficient of variation, \%)} = \frac{\text{standard deviation/mean}}{\text{mean}} \times 100$$

$$\text{Accuracy, Bias (\%)} = \frac{[(\text{measured value} - \text{true value})/\text{true value}] \times 100}{1}$$

결과 및 고찰

기기분석 조건 확립

톨트라주릴 및 톨트라주릴 설펜은 benzene ring 구조를 지니고 있어서 기기분석조건을 확립하고자 할 때 정확한 분리를 위해서는 여러 특징들을 알아야 한다. 본 연구에서는 톨트라주

Table 2. LC-MS/MS analytical conditions for the separations of toltrazuril and toltrazuril sulfone

Condition	Content
Instrument	Finnigan TSQ Quantum Discovery MAX (ThermoFisher, San Jose, USA)
LC parameter	
Column	Shiseido C18 (2.0 mm ID×100 mm, 3 µm)
Mobile phase	A: 0.2% Formic acid/Water B: 0.2% Formic acid/Acetonitrile Gradient system
	Time (min) A% B%
	0.0 50 50
	6.0 5 95
	6.1 50 50
	10.0 50 50
Flow rate	0.25 mL/min
Oven temp.	40°C
Injection volume	10 µL
Run time	10 min
MS/MS parameter	
Ionization	ESI, Negative
Nebulization and collision gas	N ₂ , Ar
Spray voltage	3000 V
Capillary temp.	300°C
Sheath gas and Aux gas pressure	20, 10 (Arbitrary units)
Tube lens	45 V (Toltrazuril) 72 V (Toltrazuril sulfone)

LC, liquid chromatography; MS/MS, liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry.

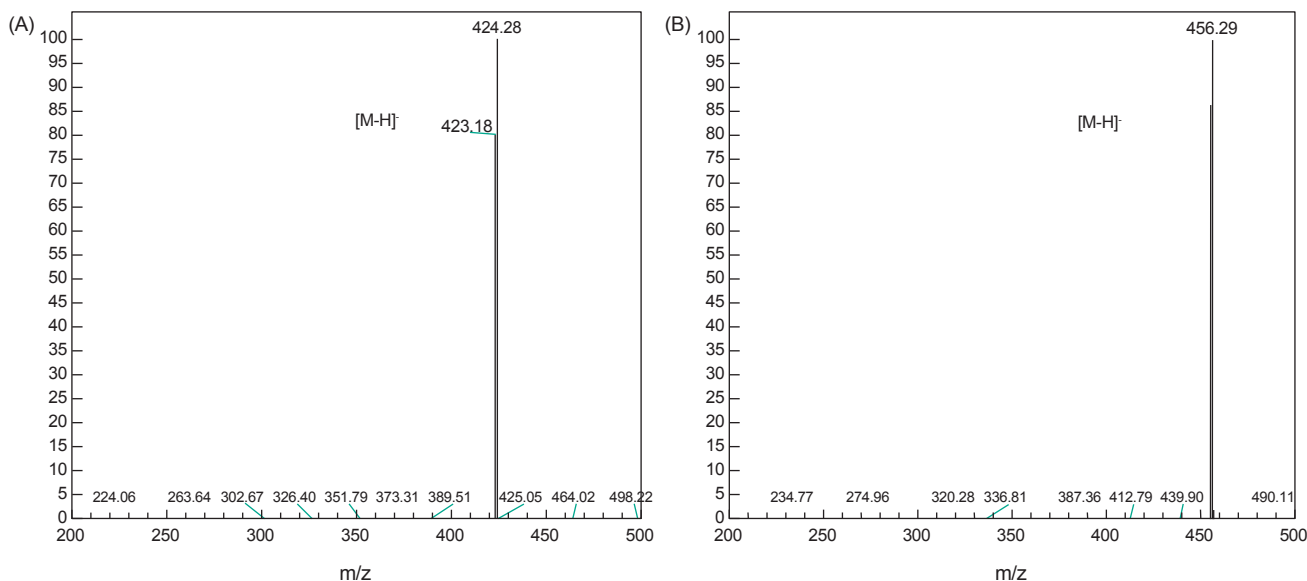


Fig. 1. Mass spectrums of toltrazuril (A) and toltrazuril sulfone (B) (as scan mode from m/z 300 to 500).

릴 및 톨트라주릴 설폰 모두 ESI (-) mode로서 양성자가 떨어져 나가면서 $[M-H]^-$ 만 나타내었다. 이 물질들은 질량 스펙트럼에서 특징적인 fragment ion들을 거의 발견할 수 없기 때문에 모분자로 정량분석하는 보고들이 많았다(Ai et al., 2011; Moloney et al., 2012; Buarelli et al., 2017). 이를 참고하여 본 연구에서도 톨트라주릴은 precursor/production ion (m/z) 값으로 424.0/423.9, 41.8로서 collision energy가 각각 0 V 및 18 V이었으며, 톨트라주릴 설폰은 precursor/production ion 424.2 (m/z)으로 456.0/445.9, 41.8로서 0 V와 22 V로 나타내었다(Fig. 1). 이는 Moloney et al. (2012)의 보고에서도 톨트라주릴 및 톨트라주릴 설폰의 precursor/production ion에 대한 424.2/423.9 및 456.2/455.2의 collision energy는 모두 0 V이었으며, Ai et al. (2011)도 precursor/production ion에 대하여 424/424 및 456/456으로 collision energy는 모두 0 V로 이온화하였다.

기기분석조건을 최적화하기 위해서는 표준물질을 가지고 이동상 조건을 검토한 결과, formic acid를 base로 하여 acetonitrile 및 methanol을 각각 가하여 분리하였으나, methanol은 acetonitrile에 비하여 peak이 height value가 상대적으로 좋지 않은 결과를 나타내어 이동상은 formic acid와 acetonitrile를 사용하여 분석하였다. Ai et al. (2011)은 이동상으로 acetic acid를 사용하여 분리하였으나, 본 연구에서는 acetic acid보다는 formic acid의 height value가 더 높게 나타나 formic acid를 선택하였으며, 식품공전(KMFDA, 2019) 및 Li et al. (2006) 방법도 본 연구와 마찬가지로 formic acid를 사용하여 분석하였다(data not shown).

시료 전처리 방법 확립

일반적으로 항생제 추출법은 크게 LLE (liquid-liquid extraction)법과 SPE (solid phase extraction)법으로 나눌 수 있는데 본 연구에서는 liquid-liquid 방법을 톨트라주릴 추출에 적용하였다. 이는 liquid-liquid 방법 중에 공신력이 있는 식품공전(KMFDA, 2019) 방법이 있으며, 이는 톨트라주릴 외에도 다성분을 간편하면서도 신속하게 분석이 되는 장점을 지니고 있기 때문이다. 이에 본 연구는 식품공전(KMFDA, 2019) 방법을 어류에 적용하여 톨트라주릴 성분 분석을 한 결과, 어류에 대하여 chromatogram에서 noise가 높게 나타나서 톨트라주릴 성분들이 낮은 농도에서는 검출되지 않을 것으로 판단되었다. 한편, Li et al. (2006) 및 Buarelli et al. (2017)의 방법은 SPE 방법으로 cartridge를 이용하여 톨트라주릴 성분들을 분석한 보고로서 전처리 단계에 다양한 용매를 사용함으로써 매우 복잡하고 시간이 많이 소요될 것으로 예상된다. 또한 많은 양의 시료를 신속하게 분석해야 하는 본 연구 목적에는 맞지 않을 것으로 판단되어 liquid-liquid 방법을 선택하였다.

따라서 본 연구에서는 liquid-liquid 방법인 식품공전(KMFDA, 2019)의 noise 부분은 보완하여 간편하면서도 기기에 무리가 없는(noise가 낮은) 방법을 검토하였다(Fig. 2). 그 결과, liquid-liquid 방법으로 톨트라주릴 성분이 친유성인 점을 고려하여 먼저 넙치시료에 DCM으로 톨트라주릴 및 톨트라주릴 설폰 성분 추출 및 농축단계를 거친 후, formic acid를 가하여 산성쪽으로 옮겨 성분을 안정화시켰다. 이 액상추출액은 acetonitrile 및 n-hexane을 이용하여 지질과 단백질 성분을 변성시켜 제거, 정제과정을 거친 후, 정제액(수용액층)은 다시 DCM층으

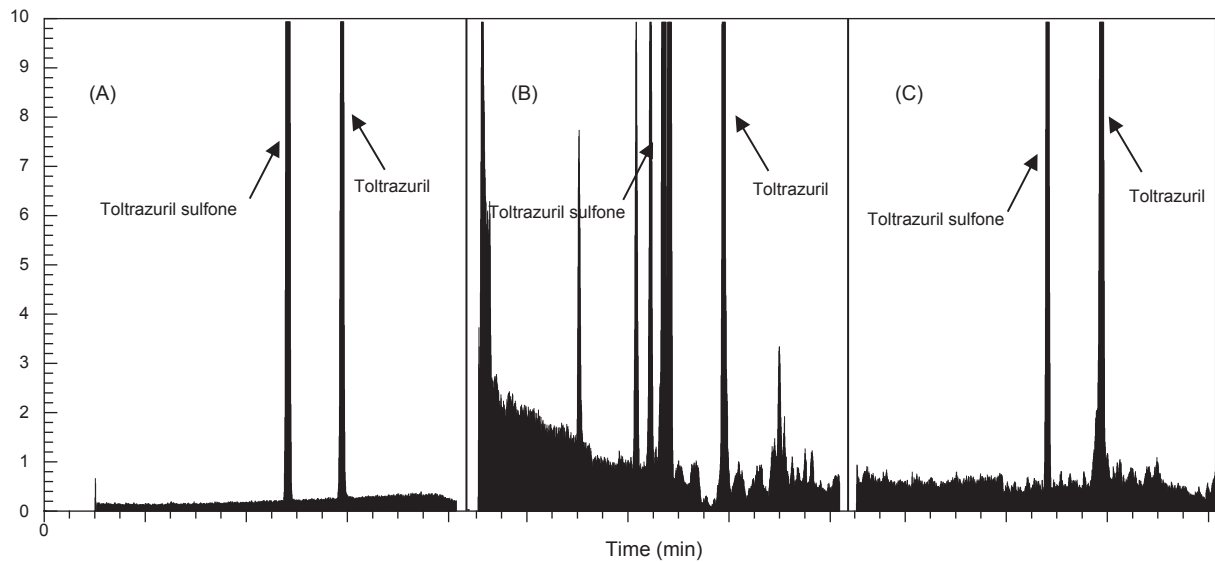


Fig. 2. Chromatograms of standard solution (A, 100 µg/L), Korea Food Code method (B, fortified sample 100 µg/kg) and modified method (C, fortified sample 100 µg/kg) as comparison of noise to LC-MS/MS. LC-MS/MS, liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry.

로 옮겨 톨트라주릴 및 톨트라주릴 설폰 성분만을 분리해 내었다. 높은 검출감도를 얻기 위하여 견고한 잔사는 water와 acetonitrile 혼합액에 용해시켜 LC-MS/MS로 분석하였다.

회수율, 검출한계 및 정량한계

표준 검량선 작성은 표준물질 10 mg을 정확히 달아 100 mL 용량 플라스크에 취하고 methanol에 녹여 100 mg/L 농도로 조제하였다. 이 표준용액을 50% acetonitrile로 20, 50, 100, 200, 500 µg/L 농도로 희석하여 분석한 결과, 톨트라주릴 및 톨트라주릴 설폰의 직선성(R^2 값)은 각각 0.9954 및 0.9990을 나타내

어 아주 양호한 것으로 확인되었다(Fig. 3).

본 연구의 유효성 검증은 Causon (1997) 저자의 보고서에 따라서 계산하였으며, 연구목적이 톨트라주릴 분석에 대한 새로운 개발이 아니라, 넙치에 대한 기생충 구제제의 적용여부를 파악하기 위한 분석으로 유효성 검증은 간략하게 나타내었다. 따라서 톨트라주릴 및 톨트라주릴 설폰의 검출한계(limits of detection, LOD)는 각각 1.0, 0.5 µg/L이며, 정량한계(limits of quantitation, LOQ)는 각각 10, 5 µg/kg로 대상물질의 분리도 (S/N 비) 등이 뛰어났으며, 낮은 parts per billion (ppb) 범위의 극미량 존재 시에도 정량분석이 가능함을 알 수 있었다(Fig.

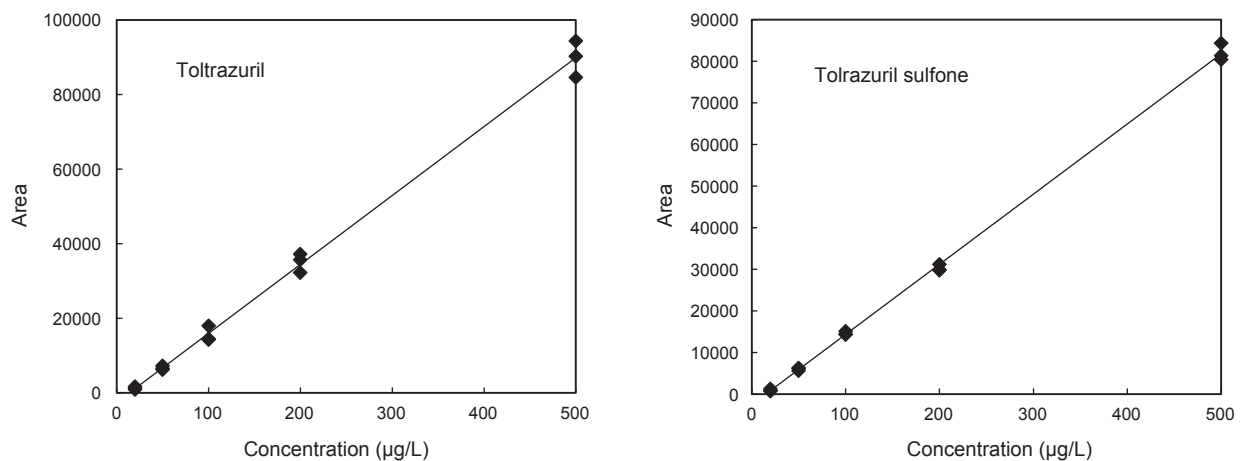


Fig. 3. Calibration curves of toltrazuril ($R^2=0.9954$) and toltrazuril sulfone ($R^2=0.9990$).

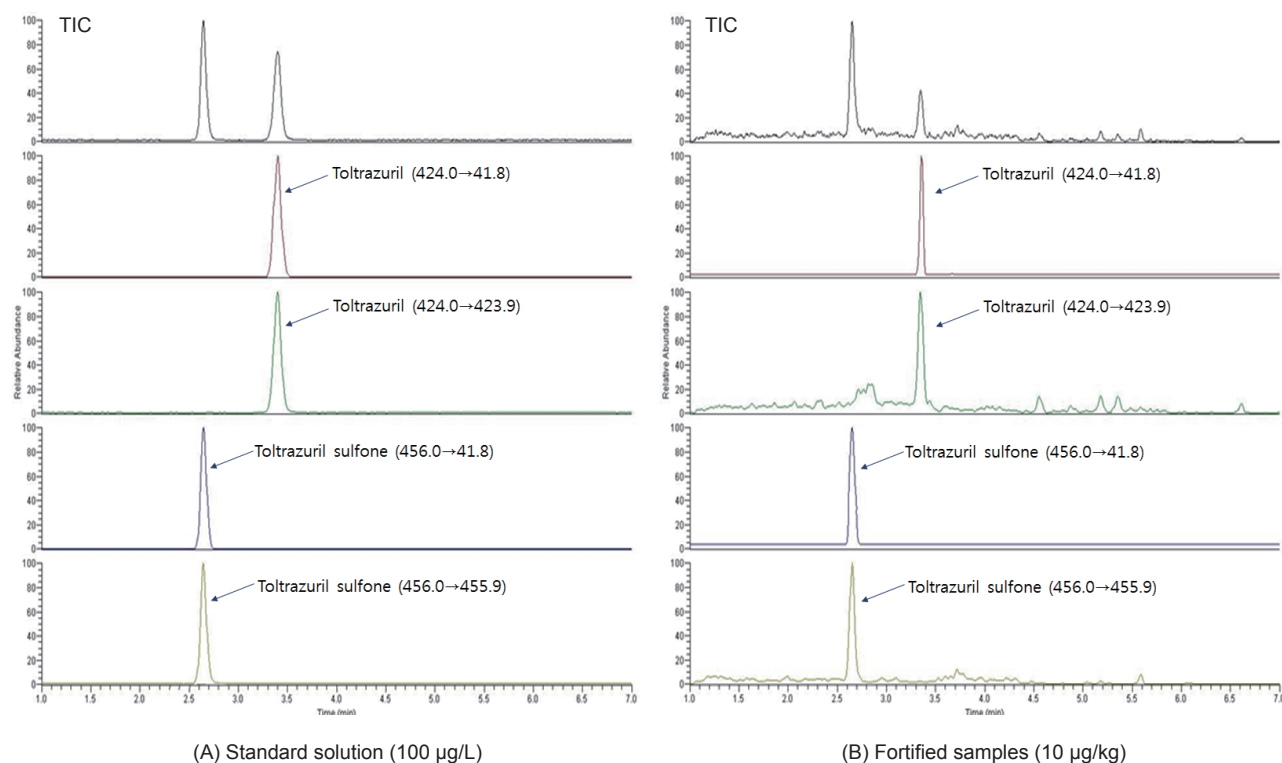


Fig. 4. Chromatograms of standard and fortified samples.

4). 넙치 시료에 표준물질을 각각 50, 100 및 200 µg/L 농도가 되도록 첨가하여 회수율을 본 결과, 넙치시료의 회수율은 50 µg/kg 시험구에서는 톨트라주릴 및 톨트라주릴 설폰이 각각 평균 90.5% 및 94.1%이고 100 µg/kg 시험구에서는 각각 평균 110.7% 및 92.6%이며, 200 µg/kg 시험구에서는 각각 평균 98.6% 및 96.4%로 나타내었다. 또한 정밀성 및 정확성은 톨트라주릴이 1.3-11.7% 및 -0.09~0.11%이고, 톨트라주릴 설폰은 3.1-6.7% 및 -0.04~-0.07%로서 모두 $\pm 15\%$ 범위(Causon, 1997)에 속하여 안정적인 분석법으로 나타내었다(Table 3). 반면 SPE 추출법을 이용한 Ai et al. (2011)은 가금류 근육의 회수

율이 2-500 µg/kg 농도에서 95.8-99.7%의 높게 나타난 점과 비교해 볼 때 본 연구와 회수율이 비교적 비슷하였으나, 전처리 과정에서 시간이 많이 소모되는 단점이 있었다. Buiarelli et al. (2017)도 SPE 추출법으로 난류에 대하여 분석법을 개발하여 유효성을 검증한 결과, 회수율 및 재현성이 5-15 µg/kg 농도에서 각각 톨트라주릴이 85-95% 및 6.4-14.1%, 톨트라주릴 설폰은 81-88% 및 8.6-11.6%로 본 연구결과보다는 다소 낮은 회수율과 재현성을 나타내었다. 이는 SPE 추출 중에 washing 과정에서 톨트라주릴 성분들이 소실되어 회수율이 다소 낮아진 것으로 판단되었다. 또한 Kim et al. (2010) 토끼에 대하여 톨트라

Table 3. Results of recovery, precision and accuracy of the method

Analyte	Fortified samples (µg/kg) ^a	Experimental concentration $\pm$ RSD (µg/kg)	Recovery (%)	Precision (%)	Accuracy (%)	Linearity (R^2)	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)
Toltrazuril	50	45.27 $\pm$ 2.87	90.5	6.4	-0.09	$y=181.51x-747.5$ (0.9942)	1.0	5.0
	100	110.7 $\pm$ 12.9	110.7	11.7	0.11	$y=184.71x-2459.9$ (0.9954)		
	200	197.2 $\pm$ 2.55	98.6	1.3	-0.01			
Toltrazuril sulfone	50	47.0 $\pm$ 3.15	94.1	6.7	-0.06	$y=157.66x-794.31$ (0.9949)	0.5	2.5
	100	92.6 $\pm$ 5.3	92.6	5.7	-0.07	$y=168.68x-2565$ (0.9990)		
	200	192.9 $\pm$ 6	96.2	3.1	-0.04			

^a n=7 replicate samples. RSD, related standard deviation; LOD, limits of detection; LOQ, limits of quantitation.

주릴 및 톨트라주릴 설폰의 회수율 및 정밀성을 비교해 본 결과, 89.5-98.8% 및 3.3-11.5%으로 비교적 양호한 편이나, 전처리 과정이 단순하여 시료양이 많을 경우 기기에 무리를 줄 뿐만 아니라 반복적으로 분석할 경우 noise가 높아질 개연성이 커서 안정적인 분석법으로는 보이지 않은 것으로 판단되었다. 따라서 본 연구에서 개선된 분석법은 높은 회수율, 감도, 정확성 등을 고려한 최적화된 분석법으로 기생충 구제제로서 넙치시료의 분석에 대한 기초자료로 제공될 것이다.

사 사

이 논문은 국립수산물과학원 수산과학시험연구사업인 수출패류생산해역 및 수산물위생조사(R2019050) 및 해양수산부 정책사업인 안전한 수산물 공급관리 넙치 쿠도아충 저감화 사업의 지원으로 수행된 연구이며 연구비 지원에 감사드립니다.

References

- Ai L, Sun H, Wang F, Chen R and Guo C. 2011. Determination of diclazuril, toltrazuril and its two metabolites in poultry tissues and eggs by gel permeation chromatography-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromato B* 879, 1757-1763. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.201104.021>.
- Buiarelli F, Filippo PD, Riccardi C, Pomata D, Giannetti L, Neri B and Rago D. 2017. Liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of synthetic coccidiostat in eggs. *Separations* 4, 1-12. <https://doi.org/10.3390/separations4020015>.
- Causon R. 1997. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis viewpoint and discussion. *J Chromatogr B* 689, 175-180. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(96\)00297-6](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(96)00297-6).
- Clarke L, Fodey TL, Crooks SRH, Moloney M, O'Mahony J, Delahaut P, O'Kennedy R and Danaher M. 2014. A review of coccidiostats and the analysis of their residues in meat and other food. *Meat Sci* 97, 358-374. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.01.004>.
- EMA (The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Veterinary Medicines Evaluation Unit). 1998. Committee for veterinary medicinal products, toltrazuril, Summary report (1). EMA/MRL/314/97-FINAL. EMA, London, U.K.
- Frank RP, Mackay RJ, Gillis KD, Tanhauser SM, Ginn PE and Kennedy TH. 2003. Effect of a single dose of ponazuril on neural infection and clinical disease in *Sarcocystis neurona*-challenged interferon-gamma knock-out mice. *Vet Parasitol* 114, 23-130. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(03\)00127-4](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(03)00127-4).
- Furr M, Kennedy T, MacKay R, Reed S, Andrews F, Bernard B, Bain F and Byars D. Efficacy of ponazuril 15% oral paste as a treatment for equine protozoal *Myeloencephalitis*. *Vet Therapeut* 2, 215-222.
- Kim MS, Lim JH, Hwang YH, Park BK, Song IB and Yun HI. 2010. Plasma disposition of toltrazuril and its metabolites, toltrazuril sulfoxide and toltrazuril sulfone, in rabbits after oral administration. *Vet Parasitol* 169, 51-56. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.12.011>.
- KMFDA (Korea Ministry of Food and Drug Safety). 2019. Korea food code. Chart 8. General methods 8.3.3 Nicarbazine, decoquinate, dicyclanil, diaveridine, diclazuril, robenidine, roxarsone, amprolium, ethopabate, imidocarb, zoalene, clodipol, halofuginone, toltrazuril. Retrieved from https://www.foodsafetykorea.go.kr/portal/safefoodlife/food/foodRvIv.do?menu_grp=MENU_NEW04&meau_no=3101 on Apr 8, 2019.
- Moloney M, Clarke L, O'Mahony J, Gadaj A, O'Kennedy R and Danaher M. 2012. Determination of 20 coccidiostats in egg and avian muscle tissue using ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromato A* 1253, 94-104. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.07.001>.
- Li H, Kijak PJ, Turnipseed SB and Cui W. 2006. Analysis of veterinary drug residues in shrimp: A multi-class method by liquid chromatography-quadrupole ion trap mass spectrometry. *J Chromato B* 836, 22-38. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.03.025>.
- Lindsay DS, Dubey JP and Kennedy TJ. 2000. Determination of the activity of ponazuril against *Sarcocystis neurona* in cell cultures. *Vet Parasitol* 92, 165-169. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(00\)00280-6](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(00)00280-6).
- Maes D, Vyt P, Rabaey P and Gevaert D. 2007. Effects of toltrazuril on the growth of piglets in herds without clinical isosporosis. *Vet J* 173, 197-199. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2005.07.002>.
- Olsen J, Björklund E, Krogh KA and Hansen M. 2012. Development of an analytical methodology for the determination of the antiparasitic drug toltrazuril and its two metabolites in surface water, soil and animal manure. *Analytica Chimica Acta* 755, 69-76. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.10.015>.