

## 추출방법들에 의한 Malachite Green과 Leucomalachite Green 회수율

배진한\* · 윤영수<sup>1</sup> · 윤성호 · 최광진<sup>1</sup> · 이정선<sup>1</sup> · 임치원<sup>2</sup> · 김연계<sup>2</sup> · 박희연<sup>2</sup>  
경상대학교 해양생물이용학부, <sup>1</sup>국립수산물품질검사원  
<sup>2</sup>국립수산과학원 생명공학연구소

### Extraction Methods for Recovering Malachite Green and Leucomalachite Green

Jin Han BAE\*, Young Soo YUN<sup>1</sup>, Sung Ho YOON, Kwang Jin CHOI<sup>1</sup>,  
Jeong Seon LEE<sup>1</sup>, Chi Won LIM<sup>2</sup>, Yeon Kye KIM<sup>2</sup> and Hee Yeon PARK<sup>2</sup>  
Division of Marine Bioscience/Institute of Marine Industry, Gyeongsang National University,  
Tongyeong 650-160, Korea  
<sup>1</sup>National Fisheries Products Quality Inspection Service, Busan 600-016, Korea  
<sup>2</sup>Biotechnology Research Institute, National Fisheries Research and  
Development Institute, Busan 619-902, Korea

Malachite green (MG), a triphenylmethane dye, is carcinogenic, mutagenic, teratogenic, a respiratory toxin, and causes chromosomal fractures. It is not permitted for use as an aquaculture veterinary drug in a number of countries. Sensitive extraction methods for MG and leucomalachite green (LMG), which have long residence times in fish tissues, were developed. For LMG, the average recovery of liquid extraction (LE) ranged from 41.71 (yellowtail) to 71.60% (snakehead); the recovery of liquid-liquid extraction (LLE) was between 67.68 (yellowtail) and 83.68% (snakehead); and the average recovery of solid-phase extraction (SPE) ranged from 84.16 (yellowtail) to 92.92% (shrimp). The recovery of MG was less than 30% with SPE. However, the dye is found primarily as the colorless reduced leuco form in fish tissues.

Key words: Malachite green, Leucomalachite green, Extraction, Recovery

#### 서 론

오늘날 전 세계의 수산물 생산량은 14,000만 톤에 달하고 그중 양식산 수산물은 약 32%를 점유하고 있으며 양식기술의 발달 등으로 지속적인 증가세를 보이고 있다 (FAO, 2006). 한편, 수산양식업의 경제성을 높이기 위해서는 제한된 공간 내에서 가능한 다량의 수산생물을 양식해야 한다. 그러나 이러한 고밀도 양식은 양식생물에게 다양한 질병을 유발시키며 이를 해결하기 위한 방법으로 각종 의약품이 사용되고 있다. Malachite green (MG)은 트리페닐메탄계열 염료로서, 그간 실크, 종이 및 가죽의 염색 원료로 사용되어 왔다. 그러나 이러한 MG가 어류의 알에 감염되는 Saprolegnia 및 담수산 백점충 (Ichthyophthirius)의 방제에 큰 효과가 있는 것으로 알려지면서 과거 일부 수산양식업계에서 제한적으로 사용된 바 있다 (Alderman, 1985). 특히, Proliferative kidney disease에 감염된 송어에서 항 진균 및 항 기생충 효과가 알려지면서 일부 국내 양식업계에서도 MG를 사용한 사례가 알려진 바 있다. 그러나 MG는 가격이 저렴하고 수산양식에 뛰어난 효과와 가지고 있지만 발암성, 유전자독성, 돌연변이성 및 기형 유발성 등이 많은 동물과 세포계에서 입증되어 왔다

(Clemmensen et al., 1984; Srivastava et al., 2004). 따라서 현재 우리나라를 비롯한 미국, EU 등 여러 국가에서 수산동물 양식에 MG의 사용을 금지하고 있다. 한편, MG를 어류에 사용하게 되면 생체 내 효소에 의하여 환원되어 무색의 leucomalachite green (LMG)이 되어 어체에 잔류하는 것으로 보고되었으며 어류의 LMG 잔존율은 지질함량에 영향을 받는 것으로 보고되었다 (Plakas et al., 1996). MG의 이온강도 (pK)는 6.9이며 pH 4.0에서는 100% 이온화되고 pH 6.9에서 50%가 이온화된 다 (Goldacre and Philips, 1949). MG 및 LMG는 각각 620 nm, 265 nm에서 최대흡수파장을 가지며 두 물질을 동시에 분석하기 위하여 산화납 반응기를 사용하여 LMG를 MG로 산화시켜 분석을 한다. Bergwerff and Scherpenisse (2003)는 송어, 연어 등에 대하여 LMG를 산화시켜서 HPLC로 분석하였고 Scherpenisse and Bergwerff (2005)는 메기, 송어, 틸라피아, 무지개 송어에서 MS detector를 사용하여 MG 및 LMG 분석을 하였다. 또한 메기, 송어 등에서 대하여 GC-MS 및 LC-APCI-MS를 사용한 분석도 시도되었다 (Turnipseed et al., 1995; Valle et al., 2005). 그리고 Andersen et al. (2006)은 산화납 반응기의 수명이 짧고 peak broadening으로 인하여 감도가 낮아지는 것을 보완하기 위하여 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone (DDQ)를 이용하여 산화납 반응기 없이 LMG를

\*Corresponding author: jina404@empal.com

MG로 산화시켜서 LC-VIS 및 ND-APCI LC-MS<sup>n</sup>으로 분석을 시도하였다. 현재 HPLC/VIS, HPLC/MS, GC/MS 등 다양한 분석기계를 이용하여 MG 및 LMG의 분석을 시도하고 있으나 각 어종에 알맞은 추출용 matrix 및 추출방법에 따른 MG 및 LMG의 회수율을 비교한 연구는 찾아볼 수 없다.

따라서 본 연구에서는 MG와 LMG의 저장조건에 따른 시간 별 안정성을 살펴보고자 어종에 따른 liquid extraction (LE), liquid-liquid extraction (LLE) 및 solid phase extraction (SPE) 방법으로 MG 및 LMG를 추출하여 HPLC를 이용하여 회수율을 비교 분석함으로써 신속정확한 MG 및 LMG 분석방법을 검토하고자 하였다.

## 재료 및 실험방법

### 시약 및 재료

Malachite green oxalate salt (FW: 929.00) 및 leucomalachite green (FW: 330.48)은 Sigma Chemicals (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였으며 각각의 표준용액 표준물질을 HPLC급 methanol에 녹여 100 mg/L의 농도로 조제하여 -20℃에 보관하면서 사용하였다. 검량선 작성은 각각의 MG 및 LMG 표준용액을 혼합하여 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 mg/L의 농도로 제조하여 사용하였다. SPE cartridge (60 mg, 3 mL)는 Waters Corporation (Milford, MA, USA)사의 Oasis MCX모형을 구입하여 사용하였다. N,N,N',N'-tetramethyl-1,4-phenylenediamine dihydrochloride (TMPD) 및 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB)이 1 mg/mL가 되도록 methanol로 제조하였고 McIlvain solution (pH 3.0)은 0.2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 18.9 mL과 0.1 M citric acid 81.1 mL을 혼합하여 제조하였으며 McIlvain solution (pH 6.0)은 0.2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 62.5 mL과 0.1 M citric acid 37.5 mL을 혼합하여 제조하였다. 실험에 사용된 모든 유기용매는 Burdick & Jackson (Muskegon, MI)사의 HPLC 등급을 사용하였으며 그 이외에 사용한 시약은 특급 또는 HPLC 등급을 사용하였다.

### 분석기기

HPLC 장비는 quat pumps (G1311A), degasser (G1379A), auto sampler (G1329A), column oven (G1316A), UV detector (G1315B)가 장착되어 있는 Agilent 1100 series (Palo Alto, CA, USA)를 사용하였다. Column oven은 35℃로 유지시켰으며 검출파장은 620 nm이었다. 분석용 column은 shiseido C<sub>18</sub> (4.6 mm I.D.×150 mm, 5 μm)를 사용하였으며 산화반응기는 주문제작한 PbO<sub>2</sub> column을 분석 column 뒤에 연결하여 분석하였다. 이동상은 0.1% hexanesulfonic acid를 함유하는 0.05 M citric acid 및 0.05 M sodium acetate의 혼합용액 (A)과 acetonitrile (B)을 사용하였다. 이동상 기술기는 A:B가 초기에 60:40에서 18분간 유지 후 15분 동안에 25:75으로 유지시켰으며 컬럼의 재평형을 위해 B를 40%로 7분간 흘려주었다.

### MG 및 LMG의 안정성

0.1% ascorbic acid을 첨가한 methanol을 사용하여 100 mg/L

의 농도로 각각 조제한 MG 및 LMG 표준용액을 혼합하여 0.1, 0.2, 0.5 mg/L의 혼합 용액을 만든 후, 갈색 vial에 담고 4℃에 보관하면서 MG 및 LMG의 안정성을 살펴보았다.

### 시료 및 회수율 측정

본 실험에 사용된 시료는 양식으로 생산되어 수입되는 새우, 가물치, 털라피야, 연어, 송어, 방어를 구입하여 근육부위만 취하여 homogenizer (HMF-985, Hanil, Korea)로 균질화하였다. 조제된 시료는 polyethylene tube에 넣어 -20℃에서 보관하였고 실험 당일 상온에서 녹인 후, MG 및 LMG 혼합용액 (10 mg/L)을 시료에 100 μL으로 spiking하여 회수율 측정용 시료로 사용하였다.

### 추출방법

#### Liquid extraction (LE)

Sanders et al. (2005)의 방법에 따라 시료 2 g을 50 mL 원심관에 넣고 증류수 0.8 mL, 0.5% hydroxylamine HCl 2 mL, acetonitrile 8 mL을 첨가하여 10분 동안 교반한 다음, 3,400×g에서 5분간 원심분리를 하였다. 원심분리를 실시한 액을 0.2 μm syringe filter로 여과한 후 HPLC의 분석에 사용하였다.

#### Liquid-liquid extraction (LLE)

Choi et al. (2006)의 방법을 변형하여 시료 10 g에 McIlvain solution (pH 3.0) 10 mL, 1-hexanesulfonic acid (1 M) 400 μL, TMB (0.1%) 200 μL, acetonitrile 30 mL을 첨가하여 10분 동안 교반한 다음 3,400×g에서 5분간 원심분리를 하여 상층액은 분액여두에 취하고 잔여물에 McIlvain solution (pH 6.0) 10 mL, acetonitrile 30 mL를 첨가하여 교반 및 원심분리를 하여 상층액을 분액여두에 합한 후, 포화 식염수 40 mL, dichloromethane 60 mL, 증류수 100 mL을 가하여 dichloromethane 층을 추출하였다. 이 추출액을 회전증발 농축기로 농축하고 methanol 2 mL로 녹여, 0.2 μm syringe filter로 여과한 후 HPLC의 분석에 사용하였다.

#### Solid phase extraction (SPE)

Bergwerff and Scherpenisse (2003)의 방법을 변형하여 시료 2 g에 McIlvain solution (pH 3.0) 1.5 mL, 1-hexanesulfonic acid (1 M) 100 μL, TMPD (0.1%) 50 μL, acetonitrile 9 mL을 첨가하여 10분 동안 교반한 다음, 3,400×g에서 5분간 원심분리를 하여 상층액은 새로운 polyethylene tube에 담았다. 잔여물에 McIlvain solution (pH 6.0) 1.5 mL, acetonitrile 9 mL를 첨가하여 교반 및 원심분리를 하여 상층액을 합한 후, dichloromethane 4.5 mL을 첨가하여 교반 및 원심분리를 하였다. 원심분리가 끝난 상층의 acetonitrile-dichloromethane층을 3 mL의 acetonitrile/dichloromethane 혼합액 (80/20, v/v)으로 활성화시킨 MCX SPE cartridge에 통과시켰다. 상층액이 완전히 통과한 후, cartridge를 acetonitrile 3 mL로 세척하고 10분간 건조시킨 다음 4 mL의 acetonitrile/ammonium hydroxide (25%) 혼합액 (90/10, v/v)을 이용하여 cartridge로부터 시료를 용출시켰다. 용출액을 40℃에서 질소 농축시킨 다음, 1 mL methanol에 녹

여, 0.2  $\mu\text{m}$  syringe filter로 여과한 후 HPLC의 분석에 사용하였다.

### 통계처리

어종에 따른 MG 및 LMG의 회수율결과 통계처리는 SPSS 통계 프로그램을 이용하여 측정치에 대한 평균 및 표준편차를 구하였으며 차이검정은 Duncan의 다중비교로  $p < 0.05$ 에서 결과간의 유의성을 검정하였다.

## 결과 및 고찰

### 표준곡선

MG 및 LMG의 혼합 용액을 각각 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 그리고 2.0 mg/L의 농도로 희석하여 HPLC로 분석한 다음 농도에 따른 peak 면적비를 이용하여 표준곡선을 작성한 결과 MG의  $R^2$ 값은 0.9993, LMG은 0.9997로 매우 양호한 직선성을 나타내었다 (Fig. 1).

### MG 및 LMG의 안정성

Fig. 2는 ascorbic acid 첨가 유무에 따른 MG 및 LMG 표준용액의 안정성을 나타내었다. Ascorbic acid가 첨가되지 않은 MG의 경우, 농도가 높을수록 시간에 따른 안정성이 높았으며 ascorbic acid가 첨가된 MG의 경우, 농도에 상관없이 대체로 안정하였다. LMG는 ascorbic acid 첨가 유무 및 농도에 관계없이 16시간 이내에서는 대체로 안정한 것으로 나타났다. Mitrowska et al. (2005)은 ascorbic acid를 첨가하지 않은 MG 및 LMG의 working solution은 시간이 경과함에 따라 감소한다고 하였는데 이는 빛 산화에 의한 염료의 de-methylation에 의하여 발생하는 것으로 보았으며 이러한 감소를 방지하기 위하여 TMPD 및 ascorbic acid를 첨가하여 분석을 하였다. 또한 Working solution에 ascorbic acid가 첨가된 경우, LMG보다 MG가 더 안정하며 MG 및 LMG를 4 $^{\circ}\text{C}$ , 암실에 보관하였을 때 4주 동안 안정하다고 하였다. 또한 ascorbic acid가 첨가된 MG 및 LMG를 잉어에 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 로 spiking하여 -20 $^{\circ}\text{C}$ , 암실에서 12개월 동안 보관하면 각각의 농도가 10% 미만으로 감소하는 것으로 보고하였다. Berwerff and Scherpenisse (2003)은

MG 및 LMG를 무지개 송어에 50, 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  농도로 spiking하여 보관온도 (-20 $^{\circ}\text{C}$ , 4 $^{\circ}\text{C}$ )에 따른 안정성을 살펴보았다. MG를 -20 $^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하면 6개월 안에 20%의 감소를 보였으며 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 보다는 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 가 더 안정하였으며 LMG는 -20 $^{\circ}\text{C}$ 에서 6개월 동안 큰 변화가 없었지만 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 보관한 MG 및 LMG는 4일 안에 60%의 감소를 보인다고 하였다. 따라서 빛에 의해 쉽게 산화되는 MG의 경우, ascorbic acid를 첨가하면 안정성을 높일 수 있을 것으로 생각된다.

### 추출방법

Table 1은 LE에 의한 어종별 MG 및 LMG의 회수율을 나타낸 것이다. MG는 49.87(송어)에서 72.53%(새우), LMG는 41.71(방어)에서 71.60%(가물치)로 나타났는데, 대체로 LMG보다 MG의 회수율이 높게 나타났다. 또한 어종별 회수율을 살펴보면, 지질 함량이 낮은 어종일수록 회수율이 높게 나타났다. Sanders et al. (2005)은 LE에 의하여 송어, 틸라피아, 메기의 회수율을 살펴본 결과, MG는 44%, LMG는 100%로 보고하였다.

Table 2은 LLE에 의한 어종별 MG 및 LMG의 회수율을 나타낸 것이다. MG는 68.65(방어)에서 87.96%(가물치), LMG는 67.68(방어)에서 83.68%(가물치)로 나타났다. LLE의 경우 대체로, LE보다 회수율이 높게 나타났으며 MG 및 LMG의 회수율이 양호하였다. Choi et al. (2006)은 LLE에 의하여 붕어, 잉어, 장어의 회수율을 살펴본 결과, MG는 84-98%, LMG는 88-98%로 보고하였다. Andersen et al. (2006)은 산화납 반응기를 이용하지 않고 DDQ를 이용하여 LMG을 MG로 산화시켜 회수율을 확인 한 결과, 메기 85.9%, 무지개송어 87.8%, 틸라피아 93.9%, 연어 92.7%, 새우 89.9%로 보고하였으며 실험과정 중에 지질을 제거하기 위하여 사용되는 alumina의 양과 LLE에서 층 분리 시간이 회수율에 영향을 미치는 것으로 보고하였다.

Table 3은 SPE에 의한 어종별 MG 및 LMG의 회수율을 나타내었다. MG의 회수율은 9.68(방어)에서 18.52%(새우), LMG는 84.16(방어)에서 94.92%(새우)로 나타났다. LMG는 회수율이 전반적으로 양호하였지만 MG는 회수율이 30% 이

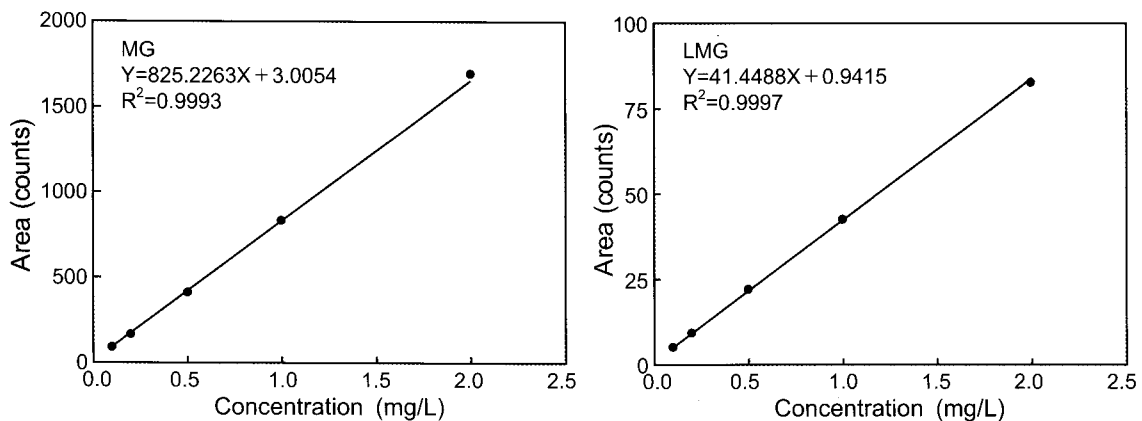


Fig. 1. Standard calibration curve of MG and LMG.

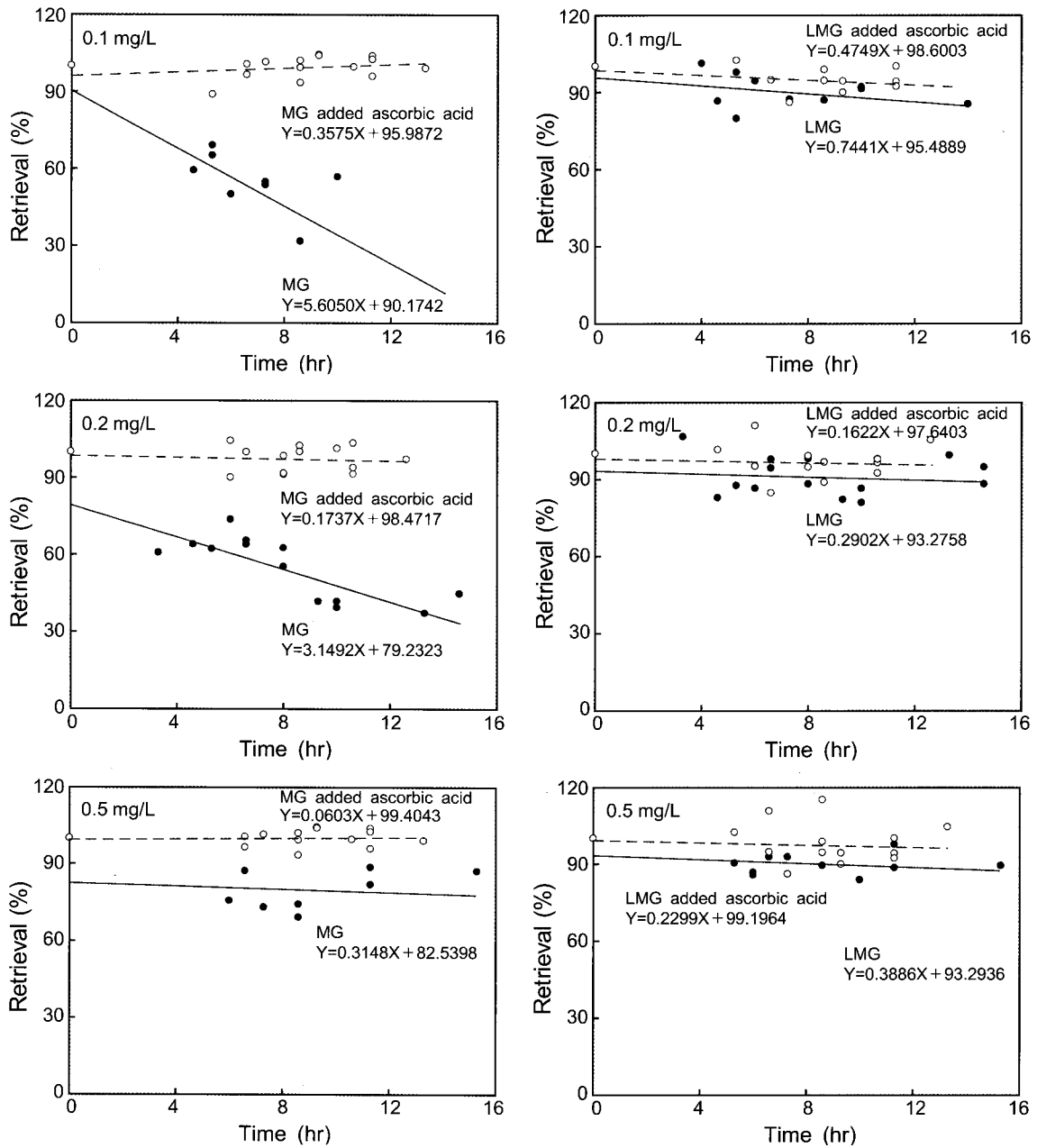


Fig. 2. Retrieval of MG and LMG whether added or not added ascorbic acid stored at 4°C.

Table 1. Recovery of MG and LMG of aquatic animals by liquid extraction (LE)

Aquatic animal species	No. of samples	MG (%)	LMG (%)
Snake head	3	69.20 ± 2.29 <sup>b</sup>	71.60 ± 2.68 <sup>a</sup>
Shrimp	3	72.53 ± 0.81 <sup>a</sup>	63.89 ± 1.51 <sup>b</sup>
Tilapia	5	63.12 ± 2.71 <sup>c</sup>	54.37 ± 1.38 <sup>c</sup>
Yellowtail	3	56.04 ± 0.93 <sup>d</sup>	41.71 ± 1.05 <sup>e</sup>
Salmon	3	64.33 ± 0.55 <sup>c</sup>	45.92 ± 0.39 <sup>d</sup>
Trout	3	49.87 ± 0.86 <sup>e</sup>	43.58 ± 1.04 <sup>de</sup>

Superscripts with different alphabet's in commons are significant different at the  $p < 0.05$ .

Table 2. Recovery of MG and LMG of aquatic animals by liquid-liquid extraction (LLE)

Aquatic animal species	No. of samples	MG (%)	LMG (%)
Snake head	11	87.96 ± 17.53 <sup>a</sup>	83.68 ± 11.13 <sup>a</sup>
Shrimp	8	83.80 ± 7.15 <sup>ab</sup>	81.41 ± 7.23 <sup>ab</sup>
Tilapia	9	72.21 ± 14.55 <sup>bc</sup>	75.86 ± 7.17 <sup>abc</sup>
Yellowtail	6	68.65 ± 8.42 <sup>c</sup>	67.68 ± 9.06 <sup>c</sup>
Salmon	10	73.36 ± 9.02 <sup>bc</sup>	71.35 ± 11.89 <sup>bc</sup>
Trout	9	70.66 ± 7.67 <sup>c</sup>	69.13 ± 13.41 <sup>c</sup>

Superscripts with different alphabet's in commons are significant different at the  $p < 0.05$ .

Table 3. Recovery of MG and LMG of aquatic animals by solid phase extraction (SPE)

Aquatic animal species	No. of samples	MG (%)	LMG (%)
Snake head	10	17.97 ± 7.80 <sup>a</sup>	88.76 ± 7.83 <sup>a</sup>
Shrimp	8	18.52 ± 9.76 <sup>a</sup>	94.92 ± 11.04 <sup>a</sup>
Tilapia	8	15.19 ± 5.37 <sup>ab</sup>	87.19 ± 8.18 <sup>a</sup>
Yellowtail	10	9.68 ± 4.42 <sup>b</sup>	84.16 ± 13.79 <sup>a</sup>
Salmon	8	17.10 ± 5.66 <sup>a</sup>	93.28 ± 12.09 <sup>a</sup>
Trout	8	17.06 ± 6.56 <sup>a</sup>	84.81 ± 8.48 <sup>a</sup>

Superscripts with different alphabet's in commons are significant different at the  $p < 0.05$ .

하로 낮게 나타났다. MCX SPE cartridge는 흡착제 표면의 양이온 교환기에 의해 염기성 물질을 선택적으로 머물게 하는데 머무름 시간은 pH에 의하여 영향을 받는다. MG의 회수율이 낮게 나타난 것은 추출액의 pH에 따른 cartridge의 머무름 시간과 MG의 불안정성에 의한 것으로 사료된다. Bergwerff and Scherpenisse (2003)은 다양한 수산동물에서 SPE를 이용하여 MG 및 LMG의 회수율을 살펴보았다. MG는 43.8 (무지개송어) - 67.7% (뱀장어)로 나타났으며 LMG의 경우, 86 (새우)에서 105% (뱀장어)로 나타났으며 spiking한 후, 샘플 전처리 시간에 따라서 MG의 회수율은 감소하고 (1분, 15분, 30분,

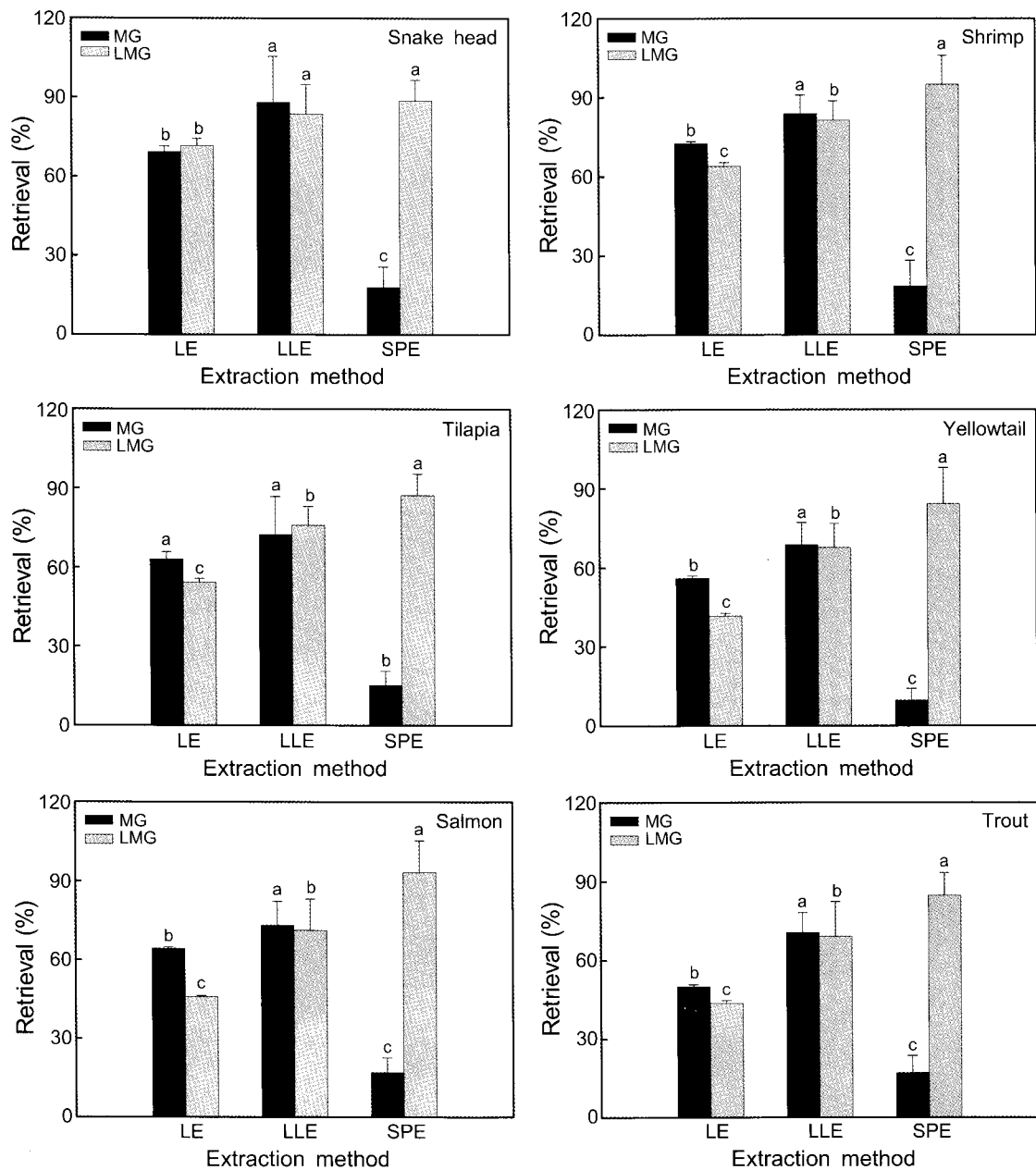


Fig. 3. Recovery of MG and LMG from aquatic animals by extraction methods. LE, liquid extraction; LLE, liquid-liquid extraction; SPE, solid phase extraction.

1시간 및 2시간 경과 후 회수율은 81, 63, 60, 54, 45%) LMG의 회수율은 큰 변화가 없는 것으로 보고하였다. Mitrowska et al. (2005)은 SCX SPE를 이용하여 visible/fluorescence detection으로 잉어의 MG 및 LMG 회수율을 살펴본 결과, MG는 62%, LMG는 90%로 보고하였다. 본 연구에서, SPE를 사용한 MG의 회수율은 낮게 나타났지만 LMG의 회수율은 높게 나타났다. MG는 수산 동물의 조직 내에서 LMG 형태로 존재하기 때문에 LMG를 MG의 불법 사용의 표지물질로 이용하고 있다. SPE를 이용하여 LMG를 추출하여 분석하는 것은 유용한 방법으로 생각된다.

Fig. 3은 추출방법에 따른 어종별 회수율을 살펴보았다. LE, LLE에서 가물치, 새우의 MG 및 LMG 회수율이 다른 어종보다 높게 나타났으며 방어, 송어는 낮게 나타났다. 이러한 차이는 어종이 가지고 있는 고유의 matrix 특성 및 추출방법에 따른 차이로 사료된다. 상업적 cartridge에 따른 MG 및 LMG의 회수율은 다양하게 보고되고 있으며 이는 cartridge를 구성하는 충전제의 특성과 전처리 과정의 차이로 인하여 회수율에 영향을 미치는 것으로 생각된다.

MG는 염료로서 보건, 옷감 등 다양한 산업에서 다목적으로 사용되어 왔으며 균의 침투, 원충동물 감염, 기생충으로 야기되는 질병에 효과가 있는 것으로 알려지면서 수산동물의 양식에도 널리 사용되어져 왔다 (Schnick, 1988). 그러나 MG의 다양한 독성이 알려지면서 사용이 제한되었다. MG에 의한 독성은 노출 시간, 온도 및 농도에 의해서 증가하며 발암, 돌연변이, 염색체 변형, 호흡기 장애 등을 유발하는 것으로 알려져 있는데, MG에 노출시킨 어류의 혈액에서 생화학적 변형 (Srivadysvr et al., 2004) 및 생식력 감소, 발암 및 돌연변이 등 (Meyer and Jorgense, 1983)이 보고되었다. 본 연구에서는 양식과정에서 사용된 MG가 환원되어서 존재하는 LMG를 효과적으로 추출·정량하기 위하여 LE, LLE 및 SPE 방법을 어종별로 살펴보았다. LE는 간단하면서 빠른 시간에 전처리가 가능하지만 회수율이 낮게 나타났으며 LLE는 MG 및 LMG의 회수율이 좋게 나타났지만 어종에 따른 회수율 차이가 나타났다. SPE에서는 MG의 회수율이 30% 미만이지만 LMG는 80% 이상으로 나타났다. 따라서 SPE를 사용하여 LMG를 추출하는 것은 시간과 비용의 손실을 줄이면서 간단하면서 효과적으로 다양한 어종에서 전처리가 가능한 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

- Alderman, D.J. 1985. Malachite green: a review. *J. Fish Dis.*, 8, 289-298.
- Andersen, W.C., S.B. Turnipseed and J.E. Roybal. 2006. Quantitative and confirmatory analyses of malachite green and leucomalachite green residues in fish and shrimp. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 4517-4523.
- Bergwerff, A.A. and P. Scherpenisse. 2003. Determination of residues of malachite green in aquatic animals. *J. Chromatogr. B*, 788, 351-359.
- Choi, D.M., S.G. Hong, M.H. Im, J.Y. Jeong, M.I. Chang, K.S. Park, M.K. Hong and G.J. Woo. 2006. Analysis of malachite green and leuco-malachite green in sea food. *Anal. Sci. Technol.*, 19, 142-148.
- Clemmensen, S., J.C. Jensen, N.J. Jensen, O. Meyer, P. Olsen and G. Wurtzen. 1984. Toxicological studies of malachite green: a triphenyl methane dye. *Arch. Toxicol.*, 56, 43-45.
- FAO. 2006. The state of food and agriculture. *FAO Report*, 103-105.
- Goldacre, R.J. and J.N. Philips. 1949. The ionization of basic triphenylmethane dyes. *J. Chem. Soc.*, 3, 1724-1732.
- Meyer, F.P. and T.A. Jorgensen. 1983. Teratological and other effects of malachite green on the development of rainbow trout and rabbits. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 122, 818-824.
- Mitrowska, K., A. Posynak and J. Zmudzki. 2005. Determination of malachite green and leucomalachite green in carp muscle by liquid chromatography with visible and fluorescence detection. *J. Chromatogr. A.*, 1089, 187-192.
- Plakas, S.M., K.R. El Said, G.R. Stehly, W.H. Gingerich and J.L. Allen. 1996. Uptake, tissue distribution and metabolism of malachite green in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, 53, 1427-1433.
- Pointing, S.B. and L.L.P. Vrijmoed. 2000. Decolorisation of azo and triphenylmethane dyes by *Pycnoporus sanguineus* producing laccase as the sole phenol oxidase. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 16, 317-318.
- Sanders, P., B. Delepine and B. Roudaut. 2005. Malachite green and leucomalachite green residues in fish flesh by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MSMS). In: 3rd AOAC Europe-Eurachem Symposium. Brussels, Belgium.
- Scherpenisse, P. and A.A. Bergwerff. 2005. Determination of residues of malachite green in finfish by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta.*, 529, 173-177.
- Schnick, R.A. 1988. The impetus to register new therapeutants for aquaculture. *Prog. Fish Cult.*, 50, 190-196.
- Srivastava, S., R. Sinha and S. Roy. 2004. Toxicological effects of malachite green. *Aquat. Toxicol.*, 66, 319-329.
- Turnipseed, S.B., J.E. Roybal, J.A. Hurlbut and A.R. Long.

1995. Gas chromatographic/mass spectrometric confirmation of leucomalachite green in fish (*Ictalurus punctatus*) tissue. J. AOAC Int., 78, 971-977.

Valle, L., C. Diaz, A. L. Zanocco and P. Richter. 2005. Determination of the sum of malachite green and leucomalachite green in salmon muscle by liquid

chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation-mass spectrometry. J. Chromatogr. A, 1067, 101-105.

---

2007년 8월 21일 접수

2008년 1월 22 수리