pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 31, No. 1, pp. 15~20 (2016)
http://dx.doi.org/10.13103/JFHS.2016.31.1.15

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

LC-MS/MS를 이용한 담수 어류 중 말라카이트 그린 분석

최희진* · 육동현 · 박영애 · 정보경 · 홍미선 · 윤용태 · 이혜진 · 김연천 · 박성규 · 김무상 · 정권
서울시보건환경연구원 강남농수산물검사소

Monitoring of Malachite Green in Freshwater Fish using LC-MS/MS

Hee-jin Choi*, Dong-Hyun Yuk, Young-Ae Park, Bo-Kyeng Jung, Mi-Sun Hong, Yong-Tae Yoon, Hye-Jin Yi, Youn-Cheon Kim, Sung-Kyu Park, Moo-Sang Kim, and Kweon Jung
Gangnam Agro-marine Products Inspection Center, Seoul Metropolitan Government Research Institute of Public Health and Environment
(Received October 20, 2015/Revised December 9, 2015/Accepted February 2, 2016)

ABSTRACT - Malachite green was measured in 200 freshwater fish collected from local markets in Seoul using HPLC-DAD and LC-MS/MS. LC-MS/MS method was validated by linearity, accuracy, precision and limits of detection and quantification according to the CODEX's recommendation and HPLC-DAD method was applied according to the Food Code. Malachite green levels above the quantification limit of the LC-MS/MS were determined 18.5% (37) but just 1 fish was shown to contain malachite green by HPLC-DAD. Of 83 domestic fish, 21 fish were detected malachite green (25.3%). Of 117 fish from China, just 16 fish were detected malachite green (13.4%). In detection rate by species carp (35.0%), Crucian carp (30.4%), cat fish (28.0%), Korean bull head (23.8%), snake head (20.0%), eel (10.5%) and loach (7.8%) were in order. Especially, fish collected at summer were shown to contain malachite green frequently; the detection rate was 54.8%.

Key words : malachite green, LC-MS/MS, freshwater fish, monitoring

트리페닐메탄계 염료인 말라카이트 그린은 광택이 나는 녹색 결정으로 빅토리아그린 B, 아닐린그린, 벤즈알데히드그린, 패스트그린 등으로 알려져 있다. 가죽, 실크나 면, 기타 섬유 등을 염색하는데 사용된 말라카이트 그린은 물곰팡이 및 백점충 등 어류 외부기생충 예방 및 치료에 탁월한 효과가 있는 것으로 알려지면서 1930년대부터 미국, 유럽, 일본 등의 양식장에서 동물용 의약품으로 사용되었다[1-4]. 특히 어류의 알에 감염되는 *Saprolegnia*와 백점충에 뛰어난 효과가 있으며, 가격도 저렴하여 획기적인 어병 치료제로 자리매김하였으며, 현재도 관상용 어류 치료에 널리 사용되고 있다[1,5,6].

말라카이트 그린이 동물에서 발암성, 돌연변이 유발, 염색체 이상, 최기형성, 호흡기 독성 등을 유발하는 것으로 알려지면서 1983년 미국에서 식용어류에 사용이 금지되었다[6-8]. 이후 유럽과 일본에서도 사용이 금지되었고, 전세계적으로 사용이 금지되고 있다. 우리나라도 2004년 중국산 어류에서 말라카이트 그린이 검출되면서 식용어류 양식에 사용되고 있다는 사실이 확인되어 대대적인 단속이 있었으며, 2006년 식품에서 검출되어서는 안 되는 물질로 등재되고, 2007년 12월 분석법이 식품공전에 등재되었다[9].

그럼에도 불구하고 말라카이트 그린만큼 뛰어난 항균력과 가격경쟁력을 가지고 있으며 수산용 의약품으로 승인된 구충제와 항균제가 많지 않아 여전히 음성적으로 사용되고 있을 가능성이 있고, 사료나 기타 환경오염에 의한 노출우려가 있으므로 이에 대한 지속적인 모니터링이 필요하다[7,8,10-12]. 또한 기존의 말라카이트 그린에 관한 연구들은, 송어, 연어 등을 위주로 한 연구가 대다수이고, 우리나라에서 보양식으로 많이 소비되는 미꾸라지, 장어, 가물치, 메기, 잉어, 붕어, 동자개 등에서 말라카이트 그린을 분석한 연구는 많지 않다[13-19]. 따라서 본 연구는 첫째, 우리나라에서 유통되는 담수어류인 미꾸라지, 장어, 가물치, 메기, 잉어, 붕어, 동자개 등 200건에서 말라카이트 그린의 잔류량을 분석·모니터링하고 둘째, 식품공전과 미국 식품의약품안전청 등 여러 나라에서 말라카이트 그린 공인분석법으로 사용되고 있는 HPLC with diode array detector

*Correspondence to: Hee-Jin Choi, Gangnam Agro-marine Products Inspection Center, Seoul Metropolitan Government Research Institute of Public Health and Environment, Seoul 05699, Korea
Tel: 82-2-3401-6294, Fax: 82-2-3435-0389
E-mail: merryyear@seoul.go.kr

(HPLC-DAD)와 보다 검출능력이 좋은 LC-tandem quadrupole mass spectrometer (LC-MS/MS)를 이용하여 같은 시료를 분석·비교하였다. 마지막으로 LC-MS/MS를 이용한 말라카이트 그린 분석법의 유효성을 국제식품규격위원회(CODEX) 가이드라인을 따라 검증하였다.

Materials and Methods

재료

2013년 4월에서 2014년 2월까지 가락농수산물도매시장, 노량진수산시장, 대형마트 등 서울에서 유통되고 있는 민물고기 총 200 건을 수거하여 말라카이트 그린을 분석하였다. 수거된 시료는 미꾸라지, 메기, 장어, 붕어, 잉어, 동자개, 가물치로 시료의 원산지와 개수는 Table 1에 나타내었다. 시료는 가식부만 분쇄하여 시료 봉투(Nasco, USA)에 담아 밀봉하여 분석 전까지 냉동보관(−20ºC)하였다.

시약 및 장비

표준품으로 Malachite green oxalate salt (Sigma-Aldrich, USA)를 사용하였으며, 분자량은 463.50, 화학식은 $C_{23}H_{25}N_2 \cdot C_2HO_4 \cdot 0.5C_2H_2O_4$, CAS번호 2437-29-8이었다. 메탄올에 용해하여 100 μg/mL로 제조하여 갈색유리병에 담아 −20ºC에 보관하며 사용하였다. 실험에 사용한 아세토니트릴, 디클로로메탄, 메탄올은 HPLC 등급 용매를 사용하였으며(J.T.Baker, USA), 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone (Acros, USA), *p*-toluene sulfonic acid (Acros, USA), ammonium acetate (Sigma, USA) 등 시약은 ACS grade로 사용하였다. 알루미나 카트리지는 Phenomenex 1993431 (Phenomenex, USA), 프로필설폰산 카트리지는 VARIAN 12113038 (VARIAN, USA)을 사용하였다. 감압농축기(EYELA NVC-2100, Eyela Co., Japan)를 사용하여 용매를 농축하였으며, 0.2 nylon syringe filter는 Whatman사 (UK) 제품을 사용하였다.

Table 1. The number of samples of freshwater fish species collected from local markets in Seoul, Korea from April 2013 to February 2014 for monitoring of malachite green

Fish species	Origin		
	Korean	China	Total
Loach	8	69	75
Catfish	25		25
Crucian carp	5	18	23
Carp	10	10	20
Korean bullhead	3	18	21
Eel	18	1	19
Snake head	14	1	15
Total	83	117	200

추출 및 정제

시료의 전처리 과정은 식품공전의 방법을 적용하였다[20]. 균질화된 시료 5 g에 5 mM *p*-toluene sulfonic acid/0.1 M ammonium acetate 용액 10 mL, 25% 염화수산화아민 용액 1 mL, 1 M *p*-toluene sulfonic acid 용액 100 μL를 넣어 균질화한 후, 아세토니트릴 25 mL를 넣어 진탕하고 다시 알루미나(80~200 mesh) 5 g을 넣어 진탕하였다. 0ºC, 2,000 × g에서 10분간 원심분리하고 상층액은 미리 물 50 mL와 디에틸렌글리콜 2 mL을 넣은 분액깔때기에 따른 후, 다시 아세토니트릴 25 mL을 넣어 진탕한 후 원심분리하여 상층액을 앞의 분액깔때기에 따라서 합하였다. 분액깔때기에 디클로로메탄 25 mL을 넣고 5분간 진탕 후 정치하여 아래층의 디클로로메탄을 환저플라스크에 취하였다. 다시 디클로메탄 25 mL을 넣어 반복하였다. 모은 액을 40ºC에서 감압농축한 후 아세토니트릴 3 mL에 녹이고 1 mM 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone용액 3 mL을 넣어 30분간 반응시켰다. 프로필설폰산 카트리지 위에 알루미나 카트리지를 연결하여 메탄올 5 mL와 아세토니트릴 5 mL로 활성화 시킨 후, 추출액을 알루미나 카트리지에 붓고 감압, 알루미나 카트리지를 제거하였다. 프로필설폰산 카트리지를 아세토니트릴 5 mL로 세척, 감압하여 건조시킨 후 이동상 용액 3 mL로 용출시킨 다음, 0.2 μm 멤브레인 필터로 여과하여 HPLC-DAD와 LC-MS/MS로 분석하였다.

HPLC-DAD 분석조건

HPLC는 DAD가 장착된 Agilent Technologies의 1100 series (CA, USA)를 사용하였고, 컬럼은 Eclipse XDB-C18 (Agilent, USA) (3.5 μm, 4.6 × 150 mm)을 사용하였다. 이동상은 5 mM *p*-toluene sulfonic acid/0.1 M ammonium acetate 용액과 아세토니트릴을 1:1로 혼합하여 사용하였고, 유속 1.0 mL/min로 흘려주었다. 측정파장은 618 nm이었다.

LC-MS/MS 분석조건

Mass spectrometer는 Waters Xevo TQ (USA)를 사용하였으며, 컬럼은 ACQUITY UPLC®- BEH C18 (1.7 μm, 2.1 × 100 mm; Waters, USA)를 사용하였다. 기기조건은 Table 2와 같다.

분석법 유효성 검증

LC-MS/MS를 이용한 말라카이트 그린의 정량분석법에 대한 유효성을 검증하기위하여 CODEX 가이드라인에 준하여 특이성(specificity), 직선성(linearity), 정확성(accuracy), 정밀성(precision), 검출한계(limit of detection)와 정량한계(limit of quantification)를 구하여 평가하였다[21]. 직선성을 구하기 위하여 표준용액 0.01, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0

Table 2. Analytical conditions of LC-MS/MS for Malachite green

Instrument	Parameter	Condition
UPLC	Column	ACQUITY UPLC®BEH C18 (1.7 μm, 2.1 × 100 mm)
	Mobile phase	A: 0.1% formic acid in water B: 0.1% formic acid in acetonitrile
	Flow rate	0.4 mL/min
	Gradient	Time (min) 0 3 3.5 5.0 Solvent A(%) 90 0 0 90
MSMS	Ionization mode	ESI positive
	Capillary voltage	0.50 kV
	Cone voltage	60 V
	Desolvation Temp.	500°C
	Desolvation gas flow	800 L/h
	Cone gas flow	50 L/h
MRM	Precursor ion	329.3
	Product ion	313.3 (37 V)
	(Collision energy)	208.3 (35 V) 165.1 (57 V)

ng/mL로 LC-MS/MS로 측정하여 얻은 피크의 면적으로 검량선을 작성하였다. 정확성과 정밀성은 말라카이트 그린이 검출되지 않은 시료에 2.0 μg/kg 농도로 표준물질을 첨가하여 구한 회수율과 상대표준편차로 구하였다. 정확성을 위해 3반복 실험하였으며, 정밀성을 위해 실험일자와 용매의 batch를 달리하여 실험하였다.

Results and Discussion

시험법 검증

Fig. 1은 말라카이트 그린이 첨가되지 않은 메기와 말라카이트 그린 표준물질, 그리고 메기 시료에 말라카이트 그린을 0.03 μg/kg이 되도록 첨가하여 분석한 크로마토그램을 비교한 것으로, 말라카이트 그린과 같은 머무름 시간에 시료에서 유래한 방해물질 등이 검출되지 않아 시험법의 특이성이 있음을 확인하였다. 말라카이트 그린의 직선성을 조사하기 위하여 0.01, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 ng/mL 의 표준용액을 LC-MS/MS로 분석한 결과, 검량선의 결정계수(R^2)가 0.9996으로 높은 직선성을 보여주었다. 검출한계와 정량한계는 회귀선(regression line) 에서 절편의 표준편차(s) 와 검량선의 기울기의 평균값(S)을 이용하여 계산한 결과, 검출한계는 0.013 μg/kg (3.3 s/S) 이고, 정량한계는 0.038 μg/kg (10 s/S) 이었다.

정확성과 정밀성 실험을 위하여 말라카이트 그린이 검출되지 않은 시료에 표준용액을 첨가하여 2 μg/kg이 되도록 준비하여 회수율을 구하였다. 시료는 기존의 말라카이트 그린 검출 사례를 고려하여 미꾸라지, 메기, 뱀장어, 붕어를 선택하였고 실험은 3회 반복하여 평균을 구하였다. 회수율은 미꾸라지는 93.9 ± 2.0%, 메기는 72.4 ± 6.5%, 뱀장어는 92.8 ± 0.8%, 붕어는 73.9 ± 15.5% 였다.

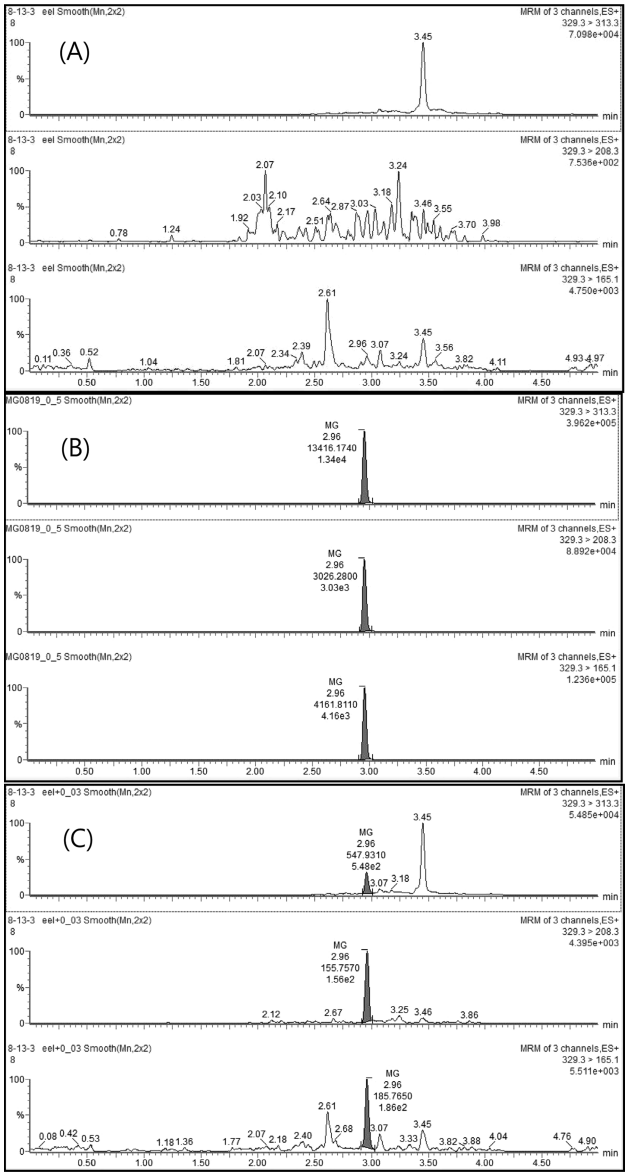

Fig. 1. Chromatograms of ell sample (A), malachite green (B) and ell sample spiked with 0.03 μg/kg of malachite green (C).

CODEX는 식품 중 동물용 의약품 잔류시험법에 대한 유효성 검증 가이드라인에서 검량선의 결정계수 0.95이상, MRPL (minimum required performance limit)의 농도별 회수율과 분석오차를 규정하고 있는데, 1~10 μg/kg일 때에 평균회수율이 60~120%, 변동계수 30% 이하로 권고하고 있다[21]. 현재 식품공전과 EU 등의 말라카이트 그린에 대한 MRPL은 2 μg/kg이며 우리의 실험은 CODEX의 가이드라인을 충분히 만족하였다. 현재 식품공전의 말라카이트 그린 분석법은 LC-DAD로 분석 후, 검출 시 질량분석

기로 확인하도록 되어있는데, 이 실험 결과로 보아 질량분석기만으로 말라카이트 그린의 정량분석과 확인이 충분히 가능하며, 분석시간과 비용을 절약할 수 있을 뿐 아니라, 검출한계 및 정량한계가 월등하게 낮아 보다 미량의 말라카이트 그린을 검출 할 수 있다.

유통 중인 생선의 말라카이트 그린 분석결과

서울시내에서 유통 중인 미꾸라지, 메기, 장어 등 민물고기 총 200 건을 수거하여 HPLC-DAD로 말라카이트 그린을 분석한 결과, 메기에서 1 건이 검출되었다. 이 메기는 양식메기로 2마리가 같이 수거되었는데 각각 근육부에서 92.6 μg/kg, 58.8 μg/kg의 말라카이트 그린이 검출되었고, 이 중 58.8 μg/kg이 검출된 메기의 알에서는 35,824.9 μg/kg의 말라카이트 그린이 검출되었다. 이 시료를 LC-MS/MS로 분석해보니 각각 89.3 μg/kg, 64.2 μg/kg, 알에서 22,745.6 μg/kg의 말라카이트 그린이 검출되었다. 위 결과는 표준물질의 농도범위에 맞게 희석하여 측정 한 이후 희석배수를 곱해준 것으로, 희석배수를 곱하기 전의 값은 유사하였다.

LC-MS/MS로 말라카이트 그린을 분석한 결과 총 200건 가운데 정량한계 0.038 μg/kg을 초과하여 검출된 시료가 37건(18.5%)이었다. 검출한계 초과, 정량한계 이하로 검출된 시료는 27건(13.5%)이었고, 24건(12.0%)이 검출한계인 0.013 μg/kg이하로 검출되었다. 기존 문헌들을 살펴보면 정량한계가 2 μg/kg 수준의 분석법을 사용했을 때 말라카이트 그린의 검출률은 매우 낮았지만, 보다 민감한 분석법을 사용했을 때 1 μg/kg 이하의 농도에서 높은 검출률을 보였다. Bergwerff와 Scherpenisse는 지역 소매상에서 수거한 48마리 어류에서 말라카이트 그린의 대사산물인 류코말라카이트 그린을 분석하였는데 이때 검출률이 47.9%였으며 이 가운데 연어가 72%, 장어가 50%의 검출률을 보였다고 보고하였다[14]. Schuetze 등은 자연산 장어 45마리 중 25마리(55.5%)에서 0.044~0.765 μg/kg 의 말라카이트 그린과 그 대사산물을 검출하였다고 보고하였다[22]. Bilandzic 등은 양식장에서 수거한 잉어와 무지개송어 72마리 중 18.1%가 검출한계(0.31 μg/kg)를 넘었으며 68.1%에 해당하는 어류에서 0.1~0.3 μg/kg의 말라카이트 그린이 검출되었다고 보고하였다[15]. 이로 미루어 보아, 유통되는 생선에서 식품공전과 다른 선진국의 말라카이트 그린의 정량한계 수준인 2 μg/kg 을 초과하는 검출은 많지 않지만, 정량한계를 낮추어 보다 미량의 범위에서는 빈번하게 검출되는 것으로 보이며, 본 모니터링 결과도 동일하였다.

정량한계를 초과한 시료를 원산지별로 구분해 보면, 국내산 시료 총 83건 중 21 건에서 말라카이트 그린이 검출되어 검출률이 25.3%였으며, 중국산의 경우 총 117 건에서 16 건이 검출되어 13.7%의 검출률을 보였다(Table 3). 이는 원산지가 중국인 수산물 중 잉어, 뱀장어, 향어, 무지개송어, 농어, 붕어, 홍민어, 메기, 가물치 9개 품종은 중국측의 수출 전 검사가 의무화되어 말라카이트 그린 검사결과가 포함된 위생증명서가 있어야 수출이 가능하며, 우리나라에 들어올 때 2차적으로 검역을 거치기 때문에 국내산 어류보다 말라카이트 그린의 검출률이 낮은 것으로 보인다[23].

어종별로 보면 잉어, 붕어, 메기, 동자개, 가물치가 각각 35.0, 30.4, 28.0, 23.8, 20.0% 검출되어 평균 검출률 18.5%을 넘게 검출되었으며, 미꾸라지와 뱀장어가 각각 7.8과 10.5%로 평균 검출률보다 적은 빈도로 검출되었다(Table 3). 해양수산부의 2013년과 2014년의 내수면어업 품종별 생산현황에 의하면 뱀장어와 미꾸라지는 주로 양식어업으로 생산되는 품종인데 우리의 분석결과 검출률이 평균에 비해 낮았으며, 반대로 어로어업으로 생산되는 잉어와 붕어류에서 말라카이트 그린의 검출률이 높았다[24]. 이는 말라카이트 그린의 노출원인 조사를 다각적으로 해야 할 필요성이 있음을 시사한다. 기존의 말라카이트 그린 검출 사례들을 보면, 아일랜드, 뉴질랜드, 노르웨이, 영국, 스코틀랜드, 칠레 등에서 양식어류에서 말라카이트 그린이 검출

Table 3. Summary of the detection results of malachite green from the analysis of 200 fish from April 2013 to February 2014 by LC-MS/MS

Fish species	Detection rate (%)			Average (μg/kg)	SD	Range (μg/kg)
	Korean	China	Total			
Loach	0.0	8.7	7.8	0.35	0.54	0.066~1.435
Catfish	28.0		28.0	12.82	33.72	0.041~89.296
Crucian carp	60.0	22.2	30.4	0.13	0.20	0.039~0.591
Carp	50.0	20.0	35.0	0.88	0.98	0.040~4.127
Korean bullhead	33.3	22.2	23.8	1.50	1.98	0.087~1.974
Eel	11.1	0.0	10.5	0.10	0.07	0.150~0.053
Snake head	21.4	0.0	20.0	0.87	0.99	0.546~1.990
Total	25.3	13.7	18.5	2.84	14.62	0.039~89.296

Table 4. Malachite green concentrations in freshwater fish according to season

Season	Detection Rate (%)	Mean ± SD (μg/kg)
Mar.-May.	10.4	0.433 ± 0.760
Jun.-Aug.	54.8	8.513 ± 27.175
Sep.-Nov.	16.2	0.209 ± 0.188
Dec.-Feb.	6.4	0.065 ± 0.003
All	18.5	2.839 ± 0.327

된 경우가 많았지만[8], 환경 중으로 유입된 말라카이트 그린이 원인으로 추정된 경우도 있었다. Nelson과 Hites는 미국 뉴욕 버팔로의 염색공장 인근 강의 퇴적물과 흙에서 류코말라카이트 그린이 검출된 사례를 보고하였고[25], Schuetze 등은 독일 베를린의 하천과 호수에서 잡은 장어 45마리 가운데 말라카이트 그린과 그 대사산물인 류코말라카이트 그린이 검출된 25마리의 장어를 잡은 곳이 모두 도시 하수종말처리장의 영향을 받는 곳이라고 보고했다[26].

분석한 200건의 어류를 수거한 계절별로 살펴본 결과, 여름철인 6월에서 8월 사이에 수거한 어류에서 말라카이트 그린의 검출률이 54.4%로 가장 높았다. 검출된 시료 중 말라카이트 그린 평균 농도, 최저, 최고농도가 각각 8.51, 0.047, 89.296 μg/kg으로 다른 계절보다 높았다(Table 4). 앞선 결과로부터, 여름철에 수산물에서 말라카이트 그린을 집중적으로 모니터링 할 필요가 있는 것으로 사료된다.

국문요약

LC-MS/MS를 이용한 말라카이트 그린 유효성 검증결과 결정계수(R^2)가 0.9996이상으로 높은 직선성을 보여주었으며 회수율은 어종에 따라 69.8%에서 93.9%범위를 보였다. 검출한계는 0.013 μg/kg, 정량한계는 0.038 μg/kg으로 CODEX의 가이드라인을 만족하였다. 수거된 어류 200건에서 말라카이트 그린을 분석한 결과, HPLC-DAD로는 1건이 검출되었으나, LC-MS/MS로 분석시 검출률은 18.5%였다. 본 연구 결과, LC-MS/MS를 이용한 말라카이트 그린 분석법이 우리나라에서 많이 소비되는 담수어종에서 분석에 적합하며, 1건을 제외한 모든 시료에서 식품공전의 잔류허용기준 이하로 말라카이트 그린이 검출되어서 안전한 것으로 나타났다. 다만 식품공전의 검출한계 이하로 말라카이트 그린이 검출되는 빈도가 18.5%임을 볼 때, 지속적으로 감시하고 모니터링 할 필요가 있음을 시사한다.

References

1. Alderman, D.J.: Malachite green: a review. *J. Fish Dis.,* **8**, 289-298 (1985).
2. Bergwerff, A.A. and Scherpenisse, P.: Determination of residues of malachite green in aquatic animals. *J. Chromatogr. B.,* **788**, 351-359 (2003).
3. Hashimoto, J.C., Paschoal, J.A.R., Queiroz, F.F. and Reyes, F.G.R.: Considerations on the use of malachite green in aquaculture and analytical aspects of determining the residues in Fish: A review. *J. Aquat. Food Product Technol.,* **20**, 273-294 (2011).
4. Rushing, L.G. and Hansen, E.B. Jr.: Confirmation of malachite green, gentian violet and their leuco analogs in catfish and trout tissue by high-performance liquid chromatography utilizing electrochemistry with ultraviolet-visible diode array detection and fluorescence detection. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.,* **700**, 223-231 (1997).
5. Andersen, W.C., Turnipseed, S. B., Karbiwnyk, C. M., Lee, R. H., Clark, S. B., Rowe, W. D., Madson, M. R. and Miller, K.E.: Multiresidue method for the triphenylmethane dyes in fish: Malachite green, crystal (gentian) violet, and brilliant green. *Anal. Chem. Acta*., **637**, 279-289 (2009).
6. Srivastava, S., Sinha, R. and Roy, D.: Toxicological effects of malachite green. *Aquat. Toxicol.,* **66**, 319-329 (2004).
7. Hashimoto, J.C., Paschoal, J.A.R., Queiroz, F.F. and Reyes, F.G.R.: Considerations on the use of malachite green in aquaculture and analytical aspects of determining the residues in Fish: A review. *J. Aquat. Food Product Technol.,* **20**, 273-294 (2011).
8. Myung C.S. and Kang Y.S.: The problem of using malachite green and what we can do about it. *J. Kor. prof. engineers assoc.* **38**, 10-12 (2005).
9. Korea Ministry of food and drug Safety: Notification No. 2007-84 (2007).
10. Conti, G. O., Copat, C., Wang, Z., Agati, P. D', Cristaldi, A. and Ferrante, M.: Determination of illegal antimicrobials in aquaculture feed and fish: An ELISA study. *Food Control.* **50**, 937-941 (2015).
11. Olesen, P.T.: Risk assessment of malachite green in food. *National Food Institute Technical University of Denmark* (2007) (available from www.food.dtu.dk).
12. Pourreza, N. and Elhami, S.: Spectrophtometric determination of malachite green in fish farming water samples after cloud point extraction suing nonionic surfactant Triton X-100. *Anal. Chem. Acta,* **596**, 62-65 (2007).
13. Bae J.H., Yun Y.S., Yoon S.H., Choi K. J., Lee J. S., Lim C.W., Kim Y.K. and Park H.Y.: Extraction methods for recovering malachite green and leucomalachite green. *J. Kor. Fish. Soc* **1**, 13-19 (2008).
14. Bergwerff, AA. and Scherpenisse, P.: Determination of residues of malachite green in aquatic animals. *J. Chromatogr. B*., **788**, 351-359 (2003).
15. Bilandžić, N., Varenina, I., Kolanović, B.S., Oraić, D. and Zrnčić, S.: Malachite green residues in farmed fish in Croatia. *Food Control.* **26**, 393-396 (2012).
16. Dowling, G., Mulder, P., Duffy, C., Regan, L. and Smyth, M.: Confirmatory analysis of malachite green, leucomalachite green, crystal violet and leucocrystal violet in salmon by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.*

Acta., **586**, 411-419 (2007).
17. Fallah, A. and Barani, A.: Determination of malachite green residues in farmed rainbow trout in Iran. *Food Control* **40**, 100-105 (2014).
18. Kim Y.M., Lee M.S. and Chung Y.H.: The residues of antibiotics (tetracycline, oxolinic acid and ciplofloxacin) and malachite green in cultured rainbow trout. *JFMSE,* **25**, 828-835 (2013).
19. Martínez, M.J.B., Herreraa,S., Uclésa, A., Agüeraa, S., Hernandoa, M.D., Shimelisc, O., Rudolfssond, M. and Amadeo R. F.: Determination of malachite green residues in fish using molecularly imprinted solid-phase extraction followed by liquid chromatography-linear ion trap mass spectrometry. *Anal. Chem. Acta,* **665**, 47-54 (2010).
20. KFDA. Food Code. Korea Ministry of Food and Drug Safety, Seoul, Korea (2014).
21. 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.
22. Korea Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs: Notification No. 2012-264 (2012).
23. Schuetze, A., Heberer, T. and Juergensen, S.: Occurrence of residues of the veterinary drug malachite green in eels caught downstream from municipal sewage treatment plants. *Chemosph.,* **72**, 1664-1670 (2008).
24. Korea Ministry of Oceans and Fisheries.: Statistics of Fishery Production. (Available from www.fips.go.kr/jsp/sf/ss/ss_kind_law_list.jsp?menuDepth =070104)
25. Nelson, C.R. and Hites, R.A.: Aromatic amines in and near the Buffalo River. *Environ. Sci. Technol.* **14**, 1147-1149 (1980).
26. Schuetze, A., Heberer, T. and Juergensen, S.: Occurrence of residues of the veterinary drug malachite green in eels caught downstream from municipal sewage treatment plants. *Chemosph.*, **72**, 1664-1670 (2008).